



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 20 025 T2** 2008.01.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 366 197 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 20 025.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/07306**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 721 342.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/072772**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.03.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.09.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.12.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.01.2008**

(30) Unionspriorität:
274550 P 09.03.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:
Nugen Technologies, Inc., San Carlos, Calif., US

(72) Erfinder:
KURN, Nurith, Palo Alto, CA 94306, US

(74) Vertreter:
**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München**

(54) Bezeichnung: **METHODEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR VERVIELFÄLTIGUNG VON RNA SEQUENZEN**

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

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

Beschreibung**FACHGEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die Erfindung betrifft das Fachgebiet der Polynukleotidamplifizierung. Genauer gesagt stellt die Erfindung Verfahren, Zusammensetzungen und Kits zur Amplifizierung (d.h. Herstellung vielfacher Kopien) von RNA-Sequenzen von Interesse bereit, die einen zusammengesetzten RNA/DNA-Primer und gegebenenfalls eine Transkription anwenden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Fähigkeit der Amplifizierung von Ribonukleinsäure (RNA) stellt einen bedeutenden Aspekt bei den Anstrengungen zur Aufklärung biologischer Prozesse dar. Bis heute wird die Amplifikation der RNA (im Allgemeinen mRNA) am häufigsten mit Hilfe des als reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bezeichneten Verfahrens und Variationen davon durchgeführt. Diese Verfahren beruhen auf der Replikation der RNA durch eine reverse Transkriptase, um einzelsträngige DNA (cDNA) zu bilden, die zu der RNA komplementär ist, und einer nachfolgenden Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um vielfache Kopien doppelsträngiger DNA herzustellen. Obwohl diese Verfahren am weitesten verbreitet sind, besitzen sie signifikante Nachteile: a) die Reaktionen erfordern eine Thermozyklisierung; b) die Produkte sind doppelsträngig, was sie folglich für ein Binden an Sonden weniger zugänglich macht; c) die Reaktionen sind für eine Kontamination mit Produkten vor der Amplifikation anfällig, was eine strikte Einschließung der Reaktionsgemische erfordert; und d) die exponentielle Natur der Amplifikation dieser Verfahren macht sie für eine Erzeugung von Produktpools anfällig, die nicht die Präsenz der verschiedenen RNA-Sequenzen in der eingesetzten Gesamt-RNA-Probe aufgrund der unterschiedlichen Amplifikationseffizienz der verschiedenen Sequenzen und der Natur der exponentiellen Amplifikation, die eher auf der Replikation von Amplifikationsprodukten als auf einer fortlaufenden Replikation der eingesetzten Ziel-RNAs beruht, tatsächlich wiedergeben.

[0003] Die zelluläre Gesamt-mRNA repräsentiert die Aktivität der Genexpression zu einem definierten Zeitpunkt. Die Genexpression wird durch das Fortschreiten des Zellzyklus, Entwicklungsregulation, Antwort auf interne und externe Stimuli und dergleichen beeinflusst. Das Profil von exprimierten Genen für jeden Zelltyp in einem Organismus spiegelt Normal- oder Krankheitsstadien, Antworten auf verschiedene Stimuli, Entwicklungsstadien, Zelldifferenzierung und ähnliches wider.

[0004] Verschiedene Verfahren zur Analyse der Genexpression sind in den letzten Jahren entwickelt worden. Siehe zum Beispiel US-Patente Nrn. 5.744.308; 6.143.495; 5.824.517; 5.829.547; 5.888.779; 5.545.522; 5.716.785; 5.409.818; 5.665.545; EP 0971039A2; EP 0878553A2. Diese beinhalten eine Quantifizierung spezifischer mRNAs und die gleichzeitige Quantifizierung einer großen Anzahl an mRNAs, wie auch den Nachweis und die Quantifizierung von Expressionsmustern von bekannten und unbekannten Genen. Die Analyse von Genexpressionsprofilen ist gegenwärtig eines der mächtigsten Werkzeuge bei der Untersuchung der Zelldifferenzierung und Zellentwicklung und bei der Erforschung von Normal- und Krankheitsstadien verschiedener Organismen, insbesondere beim Menschen. Diese Analyse ist für Prozesse bei der Entdeckung von Genen, in der molekularen Medizin und bei der Entdeckung von Arzneimitteln von entscheidender Bedeutung.

[0005] Die Amplifikation von zellulären Gesamt-mRNAs, die aus einer beliebigen Zelle oder einem beliebigen Gewebe präpariert sind, ist im Allgemeinen für ein Genexpressions-Profilings entscheidend. Obwohl eine Analyse von nicht amplifizierter mRNA durchführbar ist, so wäre doch eine signifikante Menge an mRNA als Ausgangsmaterial erforderlich. Allerdings ist die verfügbare Gesamtmenge an Proben-mRNA durch die Menge der biologischen Probe, aus der die mRNA stammt, häufig begrenzt. Biologische Proben sind oftmals bezüglich Qualität und Quantität begrenzt. Darüber hinaus ist die Menge der verschiedenen mRNA-Spezies nicht gleich; manche Spezies sind reichlicher vorhanden als andere, und diese sind wahrscheinlicher und leichter zu analysieren. Die Fähigkeit, mRNA-Sequenzen zu amplifizieren, ermöglicht die Analyse weniger häufiger vorhandener, seltener mRNA-Spezies. Die Fähigkeit, kleine Proben mit Hilfe der Nukleinsäureamplifizierung zu analysieren, ist ebenfalls für die Gestaltung von Parametern für eine umfangreiche Durchmusterung von Effektormolekül-Bibliotheken vorteilhaft, für die eine Verringerung des Probenvolumens ein wesentliches Problem sowohl für die Fähigkeit zur Durchführung einer sehr umfangreichen Durchmusterung als auch einer Durchmusterung mit sehr hohem Durchsatz sowie im Hinblick auf die limitierenden Mengen von Bibliothekskomponenten darstellt.

[0006] Deshalb besteht ein Bedarf an verbesserten RNA-Amplifizierungsverfahren, welche die Nachteile bestehender Verfahren umgehen. Die hier bereitgestellte Erfindung erfüllt diesen Bedarf und liefert weitere Vor-

teile.

OFFENLEGUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die Erfindung wird ausschließlich durch die angefügten Ansprüche definiert und stellt Verfahren, Zusammensetzungen und Kits für RNA-Amplifikationen sowie Anwendungen der Amplifikationsverfahren bereit.

[0008] Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, welches Verfahren umfasst:

(a) Bereitstellen eines Komplexes, welcher Komplex umfasst:

(i) einen Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten, worin das erste Primer-Extensionsprodukt durch Extension eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase erzeugt ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, worin das zweite Primer-Extensionsprodukt durch Extension eines zweiten Primers, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, erzeugt ist, und worin die RNA von dem Komplex der ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukte mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, abgespalten wird; und

(ii) einen zusammengesetzten Primer, welcher zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst, wobei der zusammengesetzte Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist;

und (b) Extendieren des zusammengesetzten Primers aus (ii), wodurch das erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0009] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Extendieren eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, wodurch ein Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird; (b) Abspalten der RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Enzym, das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; (c) Extendieren eines zweiten Primers, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein zweites Primer-Extensionsprodukt erzeugt wird, um einen Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten zu bilden; (d) Abspalten der RNA von dem zusammengesetzten Primer in dem Komplex der ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukte mit einem Enzym, das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (e) Extendieren des zusammengesetzten Primers, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch das erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0010] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Extendieren eines zweiten Primers, der an ein erstes Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei der erste Primer einen RNA-Abschnitt am 5'-Ende umfasst, wobei dieses erste Primer-Extensionsprodukt eine Sequenz umfasst, die zu einer RNA-Sequenz komplementär ist, wodurch ein zweites Primer-Extensionsprodukt erzeugt wird, um einen Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten zu bilden; (b) Abspalten der RNA in dem Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten mit einem Enzym, das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (c) Extendieren des zusammengesetzten Primers, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch dieses erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden. In einigen Anwendungsformen der Erfindung wird das erste Primer-Extensionsprodukt durch eine Extension eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase erzeugt, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, der einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst.

[0011] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Abspalten der RNA von einem Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst, wobei das erste Primer-Extensionsprodukt durch Extension eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase erzeugt wird, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (b) Hybridisieren eines zusammengesetzten Primers an das zweite Primer-Extensionsprodukt und Extendieren des zusammengesetzten Primers mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch dieses erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0012] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Extendieren eines zusammengesetzten Primers, der an ein zweites Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, wobei dieses Primer-Extensionsprodukt (i) ein Komplement oder eine Sequenz eines ersten Primer-Extensionsprodukts umfasst, das durch Extension eines ersten Primers, der an Template-RNA hybridisiert ist, erzeugt wird, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; und (ii) an ein zweites Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, das durch Extension eines zweiten Primers, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, erzeugt wird, und Abspaltung der RNA von dem ersten Primer mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; wodurch dieses erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0013] Mit einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, wobei dieses Verfahren die Schritte umfassen: Hybridisieren des verdrängten ersten Primer-Extensionsprodukts eines beliebigen hier beschriebenen Verfahrens zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, mit einem Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt unter Bedingungen hybridisierbar ist, die eine von einer RNA-Polymerase zu erfolgende Transkription zulassen, so dass RNA-Transkripte erzeugt werden, die zu dem verdrängten ersten Primer-Extensionsprodukt komplementäre Sequenzen umfassen, wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

[0014] Mit einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: Hybridisieren eines ersten Primer-Extensionsprodukts eines beliebigen hier beschriebenen Verfahrens zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu einer RNA-Sequenz komplementär ist, mit einem Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt unter Bedingungen hybridisierbar ist, die eine von einer RNA-Polymerase zu erfolgende Transkription zulassen, so dass RNA-Transkripte erzeugt werden, die zu dem verdrängten ersten Primer-Extensionsprodukt komplementäre Sequenzen umfassen, wobei das Primer-Extensionsprodukt ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt ist, das erzeugt wird durch: (a) Extendieren eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, wodurch ein Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird; (b) Abspalten der RNA in dem Komplex von Schritt (a) mit einem Enzym, das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; (c) Extendieren eines zweiten Primers, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein zweites Primer-Extensionsprodukt erzeugt wird, um einen Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten zu bilden; (d) Abspalten der RNA von dem zusammengesetzten Primer in dem Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten mit einem Enzym, das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (e) Extendieren dieses zusammengesetzten Primers, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch dieses erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

[0015] Mit einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizie-

rung) einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Hybridisieren eines ersten Primers an eine Ziel-RNA, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (b) Extendieren des ersten Primers mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird; (c) Abspalten der RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Agens (wie einem Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; (d) Hybridisieren eines zweiten Primers an das erste Primer-Extensionsprodukt; (e) Extendieren des zweiten Primers mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein zweites Primer-Extensionsprodukt erzeugt wird, um einen Komplex aus ersten und zweiten Extensionsprodukten zu bilden; (f) Abspalten der RNA von dem zusammengesetzten Primer in dem Komplex aus ersten und zweiten Extensionsprodukten mit einem Agens (wie einem Enzym), das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer sein kann oder nicht) an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (g) Extendieren dieses zusammengesetzten Primers von Schritt (f) mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch dieses erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien eines Polynukleotids, das zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0016] Mit einigen Aspekten stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: Vereinigen und Reagieren: des Komplexes aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten von Schritt (e), der oben beschrieben ist; eines zusammengesetzten Primers (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer sein kann oder nicht), der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; und eines Agens (wie einem Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; wobei das Gemisch unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen umfassen) inkubiert wird, die eine Primer-Hybridisierung, RNA-Abspaltung und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem oben beschriebenen Komplex von Schritt (e) zulassen, wenn seine RNA abgespalten ist und ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem Komplex bindet.

[0017] Dem Fachmann ist es offensichtlich, dass eine Bezugnahme auf eine Erzeugung von Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse oder von Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, sich auf Produkte bezieht, die derartige Sequenzen enthalten, umfassen oder daraus bestehen. Dem Fachmann ist es offensichtlich, dass Aspekte, die sich auf ein Vereinigen und Inkubieren des resultierenden Gemisches beziehen, ebenfalls Anwendungsformen von Verfahren umfassen, die ein Inkubieren der verschiedenen Gemische (in verschiedenen Kombinationen und/oder Subkombinationen) umfassen, so dass die erwünschten Produkte gebildet werden.

[0018] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, umfassend Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei dieses Reaktionsgemisch umfasst: (a) eine Ziel-RNA; (b) einen ersten Primer, der an die Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (c) einen zweiten Primer, der an ein Extensionsprodukt des ersten Primers hybridisierbar ist; (d) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase; (e) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; (f) ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die eine Primer-Hybridisierung, Extension des ersten Primers und des zweiten Primers, um einen Komplex zu bilden, bestehend aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten, RNA-Abspaltung und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem Komplex bindet und extendiert wird, zulassen, wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0019] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Hybridisieren eines ersten Primers an eine Ziel-RNA, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (b) Extendieren des ersten Primers mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird; (c) Abspalten der RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Agens (wie einem Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; (d) Hybridisieren eines zweiten Primers an das erste Primer-Extensionsprodukt; (e) Extendieren des zweiten Primers mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase,

wodurch ein zweites Primer-Extensionsprodukt erzeugt wird, um einen Komplex aus ersten und zweiten Extensionsprodukten zu bilden; (f) Abspalten der RNA von dem zusammengesetzten Primer in dem Komplex aus ersten und zweiten Extensionsprodukten mit einem Agens (wie einem Enzym), das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer sein kann oder nicht) an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (g) Extendieren dieses zusammengesetzten Primers von Schritt (f) mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch dieses erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird; (h) Hybridisieren des verdrängten ersten Primer-Extensionsprodukts mit einem Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt unter Bedingungen hybridisierbar ist, welche eine zu erfolgende Transkription durch die RNA-Polymerase zulassen, so dass RNA-Transkripte erzeugt werden, umfassend Sequenzen, die zu den verdrängten Primer-Extensionsprodukten komplementär sind, wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden. In einigen Anwendungsformen stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien bereit, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Vereinigen: eines ersten Komplexes, wobei der erste Komplex der in diesem Absatz oben beschriebene Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten Schritt (e) ist; eines zusammengesetzten Primers (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer sein kann oder nicht), der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; einer RNA-Polymerase; eines Propromotor-Polynukleotids, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an ein zweites Primer-Extensionsprodukt hybridisiert; und eines Agens (wie ein Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (b) Inkubieren des Gemisches von Schritt (a) unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen umfassen), die eine Primer-Hybridisierung, RNA-Abspaltung und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem ersten Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem ersten Komplex bindet, Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend das verdrängte Primer-Extensionsprodukt und das Propromotor-Polynukleotid, und die RNA-Transkription von diesem zweiten Komplex zulassen.

[0020] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, umfassend Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei besagtes Reaktionsgemisch umfasst: (a) eine Ziel-RNA; (b) einen ersten Primer, der an die Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (c) einen zweiten Primer, der an ein Extensionsprodukt des ersten Primers hybridisierbar ist; (d) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase; (e) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; (f) eine RNA-Polymerase; (g) ein Propromotor-Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an ein Extensionsprodukt des zweiten Primers hybridisiert; und (h) ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die eine Primer-Hybridisierung, Extension von dem ersten und zweiten Primer, um einen ersten Komplex zu bilden, bestehend aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten, RNA-Abspaltung, Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem ersten Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem ersten Komplex bindet, Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend das verdrängte Primer-Extensionsprodukt und das Propromotor-Polynukleotid, und die RNA-Transkription von diesem zweiten Komplex zulassen, wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

[0021] Mit einem noch anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, umfassend Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei besagtes Reaktionsgemisch umfasst: (a) eine Ziel-RNA; (b) einen ersten Primer, der an die Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (c) einen zweiten Primer, der an ein Extensionsprodukt des ersten Primers hybridisierbar ist; (d) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase; (e) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; (f) ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; wobei die Inkubation unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen umfassen) erfolgt, die eine Primer-Hybridisierung, Extension von dem ersten und zweiten Primer, um einen Komplex zu bilden, bestehend aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten, RNA-Abspaltung und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein weiterer zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem Komplex bindet, zulassen, wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotid-Sequenz erzeugt werden, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist.

[0022] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung)

rung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, umfassend (a) Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei dieses Reaktionsgemisch umfasst: (i) eine Ziel-RNA; und (ii) einen ersten Primer, der an eine Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; und (iii) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, welche eine Primer-Hybridisierung und Bildung eines Komplexes, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, zulassen; (b) Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei dieses Reaktionsgemisch umfasst: (i) den Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA; und (ii) ein Enzym, das zur Abspaltung der RNA von einem RNA/DNA-Hybrid fähig ist; wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die eine Abspaltung von RNA in dem Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, zulassen; (c) Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei dieses Reaktionsgemisch umfasst: (i) das erste Primer-Extensionsprodukt; (ii) einen zweiten Primer, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist; und (iii) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die eine Primer-Hybridisierung und Bildung eines Komplexes, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt, zulassen; (d) Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei dieses Reaktionsgemisch umfasst: (i) den Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt; (ii) ein Enzym, das zur Abspaltung der RNA von einem RNA/DNA-Hybrid fähig ist; wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die eine Abspaltung von RNA in dem Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt, zulassen; (e) Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei dieses Reaktionsgemisch umfasst: (i) einen zusammengesetzten Primer, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (ii) den gespaltenen Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt; (iii) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die eine Hybridisierung des zusammengesetzten Primers und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt, zulassen; wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0023] Die Reaktionsgemische können in beliebiger Weise mit einem oder mehreren oben vereinten Reaktionsgemischen vereint werden (was folglich die Anzahl der Inkubationen verringert). Dementsprechend sind in einigen Anwendungsformen die Reaktionsgemische der Schritte (a) und (b) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (vier Inkubationen oder Inkubationsschritte). In anderen Anwendungsformen sind die Reaktionsgemische der Schritte (d) und (e) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (vier Inkubationen oder Inkubationsschritte). In einer noch anderen Anwendungsform sind die Reaktionsgemische der Schritte (a) und (b) ein und dasselbe Reaktionsgemisch und die Reaktionsgemische der Schritte (d) und (e) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (drei Inkubationen oder Inkubationsschritte). In noch anderen Anwendungsformen sind die Reaktionsgemische der Schritte (a)-(c) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (drei Inkubationen oder Inkubationsschritte). In einer noch weiteren Anwendungsform sind die Reaktionsgemische der Schritte (a)-(c) ein und dasselbe Reaktionsgemisch und die Reaktionsgemische der Schritte (d) und (e) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (zwei Inkubationen oder Inkubationsschritte). In anderen Anwendungsformen sind die Reaktionsgemische der Schritte (a)-(d) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (zwei Inkubationen oder Inkubationsschritte). In anderen Anwendungsformen sind die Reaktionsgemische von (b) und (c) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (vier Inkubationen oder Inkubationsschritte). In anderen Anwendungsformen sind die Reaktionsgemische der Schritte (c) und (d) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (vier Inkubationen oder Inkubationsschritte). In einer noch anderen Anwendungsform sind die Reaktionsgemische von (a)-(e) ein und dasselbe Reaktionsgemisch (eine Inkubation). Es ist zu verstehen, dass jede beliebige Kombination dieser Inkubationsschritte und jeder einzelne Inkubationsschritt in dem Umfang, wo die Inkubation als Teil eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren durchgeführt ist, im Rahmen der Erfindung liegen.

[0024] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, außerdem umfassend (a) Inkubieren eines Reaktionsgemisches, wobei dieses Reaktionsgemisch umfasst: (i) eine Kopie einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist; (ii) ein Propromotor-Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an die Kopie einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, hybridisiert; und RNA-Polymerase; und wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die eine Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an die Kopie einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend die Kopie einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, und das Propromotor-Polynukleotid, und die RNA-Transkription von diesem zweiten Komplex zulassen.

[0025] Mit noch einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Am-

plifizierung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Vereinigen: einer Ziel-RNA; eines ersten Primers, der an die Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; eines zweiten Primers, der an ein Extensionsprodukt des ersten Primers hybridisierbar ist; einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase; einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; einer RNA-Polymerase; eines Propromotor-Polynukleotids, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an ein Extensionsprodukt des zweiten Primers hybridisiert; und eines Agens (wie ein Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (b) Inkubieren des Gemisches von Schritt (a) unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen einschließen), die eine Primer-Hybridisierung, Extension von dem ersten Primer und dem zweiten Primer, um einen ersten Komplex, umfassend erstes und zweites Extensionsprodukt, zu bilden, RNA-Abspaltung, Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem ersten Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein anderer erster Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem ersten Komplex bindet, Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt, um einen zweiten Komplex, umfassend das verdrängte Primer-Extensionsprodukt und das Propromotor-Polynukleotid, und die RNA-Transkription von diesem zweiten Komplex zulassen, wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

[0026] Mit noch einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Hybridisieren eines Primers an eine Ziel-RNA, wobei der Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (b) Extendieren des Primers mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein Komplex, umfassend ein Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird; (c) Abspalten von RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Agens (wie einem Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass wenigstens ein Fragment der Ziel-RNA an dem Primer-Extensionsprodukt hybridisiert verbleibt; (d) Extendieren des wenigstens einen Fragments der Ziel-RNA mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein Fragment-Extensionsprodukt, umfassend die Sequenz von Interesse, erzeugt wird, um einen Komplex von Primer- und Fragment-Extensionsprodukten zu bilden; (e) Abspalten von RNA von dem zusammengesetzten Primer in dem Komplex aus Primer- und Fragment-Extensionsprodukt mit einem Agens (wie einem Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer oder ein anderer sein kann) an das Fragment-Extensionsprodukt hybridisiert und die Primerextension durch Strangverdrängung wiederholt, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz erzeugt werden, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist. In einigen Anwendungsformen stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Vereinigen: des Komplexes aus Primer- und Fragment-Extensionsprodukt von Schritt (d), der in diesem Absatz oben beschrieben ist; eines zusammengesetzten Primers (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer oder ein anderer sein kann), der an das Fragment-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; und eines Agens (wie ein Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (b) Inkubieren des Gemisches von Schritt (a) unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen umfassen), die eine Primer-Hybridisierung, RNA-Abspaltung und Verdrängung des Primer-Extensionsprodukts von dem Komplex von Schritt (d), der in diesem Absatz oben beschrieben ist, zulassen, wenn seine RNA abgespalten ist und ein zusammengesetzter Primer an das Fragment-Extensionsprodukt in dem Komplex bindet.

[0027] Mit noch einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Hybridisieren eines ersten Primers an eine Ziel-RNA, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (b) Extendieren des ersten Primers mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird; (c) Abspalten der Ziel-RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Agens (wie einem Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass Fragmente der Ziel-RNA an dem Primer-Extensionsprodukt hybridisiert verbleiben; (d) Extendieren des wenigstens einen Fragments der Ziel-RNA mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein Fragment-Extensionsprodukt, umfassend die Sequenz von Interesse, erzeugt wird, um einen Komplex von Primer- und Fragment-Extensionsprodukten zu bilden; (e) Abspalten von RNA von dem zusammengesetzten Primer in dem Komplex aus Primer- und Fragment-Extensionsprodukten mit einem Agens (wie einem Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer oder ein anderer sein kann) an das Fragment-Extensionsprodukt hybridisiert und die Primerextension durch Strangver-

drängung wiederholt, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (f) Hybridisieren eines verdrängten Primer-Extensionsprodukts mit einem Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an das verdrängte Primer-Extensionsprodukt unter Bedingungen hybridisierbar ist, die eine zu erfolgende Transkription von RNA-Polymerase zulassen, so dass RNA-Transkripte, umfassend zu dem verdrängten Primer-Extensionsprodukt komplementäre Sequenzen, erzeugt werden, wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden. In einigen Anwendungsformen stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Vereinigen: eines ersten Komplexes, wobei der erste Komplex ein Komplex aus Primer- und Fragment-Extensionsprodukt von Schritt (d) ist, der in diesem Absatz oben beschrieben ist; eines zusammengesetzten Primers (welcher der gleiche Primer wie der erste Primer oder ein anderer sein kann), der an das Fragment-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, wobei dieser zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; einer RNA-Polymerase; eines Propromotor-Polynukleotids, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an ein zweites Primer-Extensionsprodukt hybridisiert; und eines Agens (wie ein Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (b) Inkubieren des Gemisches von Schritt (a) unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen einschließen), die eine Primer-Hybridisierung, RNA-Abspaltung, Verdrängung des Primer-Extensionsprodukts von dem ersten Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein zusammengesetzter Primer an das Fragment-Extensionsprodukt in dem ersten Komplex bindet, Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an das verdrängte Primer-Extensionsprodukt, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend das verdrängte Primer-Extensionsprodukt und das Propromotor-Polynukleotid, und die RNA-Transkription von diesem zweiten Komplex zulassen.

[0028] Mit noch einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Vereinigen: einer Ziel-RNA; eines Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase; einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; und eines Agens (wie ein Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (b) Inkubieren des Gemisches von Schritt (a) unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen einschließen), die eine Primer-Hybridisierung, RNA-Abspaltung von einem ersten Komplex, umfassend eine Ziel-RNA und ein Primer-Extensionsprodukt, so dass ein Fragment der Ziel-RNA an das Primer-Extensionsprodukt hybridisiert verbleibt, Primerextension von dem Primer und dem Fragment des RNA-Ziels, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend ein Primer-Extensionsprodukt und ein Fragment-Extensionsprodukt, das die Sequenz von Interesse umfasst, und Verdrängung des Primer-Extensionsprodukts von dem zweiten Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein anderer Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem zweiten Komplex bindet, zulassen, wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotid-Sequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

[0029] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Vereinigen: einer Ziel-RNA; eines Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase; einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; einer RNA-Polymerase; eines Propromotor-Polynukleotids; und eines Agens (wie ein Enzym), das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (b) Inkubieren des Gemisches von Schritt (a) unter Bedingungen (welche erforderliche Substrate und Pufferbedingungen einschließen), die eine Primer-Hybridisierung, RNA-Abspaltung, wobei eine RNA-Abspaltung von einem ersten Komplexes, umfassend eine Ziel-RNA und ein Primer-Extensionsprodukt, erfolgt, so dass ein Fragment der Ziel-RNA an das Primer-Extensionsprodukt hybridisiert verbleibt, Primerextension des Primers und des Fragments der Ziel-RNA, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend ein Primer-Extensionsprodukt und ein Fragment-Extensionsprodukt, das die Sequenz von Interesse umfasst, Verdrängung des Primer-Extensionsprodukts von dem zweiten Komplex, wenn seine RNA abgespalten ist und ein anderer Primer an den zweiten Komplex bindet, Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt, um einen dritten Komplex zu bilden, umfassend das verdrängte Primer-Extensionsprodukt und das Propromotor-Polynukleotid, und die RNA-Transkription von diesem dritten Komplex zulassen, wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

[0030] Mit einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, die auf einer Ziel-RNA vorhanden ist, wobei das Verfahren die Schritte umfasst: Bildung eines Komplexes aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten, umfassend einen einzel-

strängigen 3'-Abschnitt gemäß einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; (c) Hybridisieren eines Propromotor-Oligonukleotids an den in Schritt (b) beschriebenen einzelsträngigen 3'-Abschnitt; und (d) Transkription unter Verwendung einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase, wodurch vielfache Kopien von Sense-RNA-Produkten erzeugt werden.

[0031] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Sequenz, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist und auf einer Ziel-RNA vorhanden ist, und vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse, die auf einer Ziel-RNA vorhanden ist, bereit, wobei diese Verfahren die Schritte umfassen: (a) Extendieren eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, wodurch ein Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird; (b) Abspalten der RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Enzym, das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; (c) Extendieren eines zweiten Primers, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei der zweite Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, wodurch ein zweites Primer-Extensionsprodukt erzeugt wird, um einen Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten zu bilden; (d) Abspalten der RNA von dem ersten und zweiten zusammengesetzten Primer in dem Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten mit einem Enzym, das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein weiterer zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert und ein weiterer Primer an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert; (e) Extendieren dieser zusammengesetzten Primer von Schritt (d) mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch dieses erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden; und wodurch dieses zweite Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

[0032] Mit einem weiteren Aspekt umfassen die Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, die Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu zwei oder mehreren verschiedenen Sequenzen von Interesse komplementär sind.

[0033] Mit einem weiteren Aspekt umfassen die Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse die Erzeugung vielfacher Kopien von zwei oder mehreren verschiedenen Sequenzen von Interesse.

[0034] Verschiedene Anwendungsformen des zusammengesetzten Primers und des zweiten Primers, die in den Verfahren der Erfindung verwendet werden, sind hier beschrieben. Zum Beispiel liegt in einigen Anwendungsformen der RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers 5' bezüglich des 3'-DNA-Abschnitts. In noch anderen Anwendungsformen ist der 5'-RNA-Abschnitt benachbart zu dem 3'-DNA-Abschnitt. In einigen Anwendungsformen umfasst ein zusammengesetzter Primer einen 5'-Abschnitt (zum Beispiel einen 5'-RNA-Abschnitt), der an eine Ziel-RNA nicht unter Bedingungen hybridisierbar ist, unter denen der zusammengesetzte Primer an eine Ziel-RNA hybridisiert. In noch weiteren Anwendungsformen umfasst ein zusammengesetzter Primer einen 3'-Abschnitt (zum Beispiel einen 3'-DNA-Abschnitt), der eine Zufallssequenz umfasst. In einigen Anwendungsformen, bei denen eine Ziel-RNA eine mRNA ist, kann ein zusammengesetzter Primer eine poly-dT-Sequenz umfassen. In anderen Anwendungsformen ist ein zusammengesetzter Primer ein Zufallsprimer. In noch anderen Anwendungsformen wird eine Vielzahl an zusammengesetzten Primern für eine Hybridisierung an die Ziel-RNA verwendet. In einigen Anwendungsformen sind der zusammengesetzte Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, und der zusammengesetzte Primer, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, die gleichen Primer. In einigen Anwendungsformen sind der zusammengesetzte Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, und der zusammengesetzte Primer, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, unterschiedliche Primer.

[0035] In noch weiteren Anwendungsformen ist der zweite Primer ein DNA umfassender Primer (in einigen Anwendungsformen ein aus DNA bestehender Primer). In anderen Anwendungsformen umfasst der zweite Primer ein oder mehrere Fragmente der Ziel-RNA, die an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, wobei dieses eine oder diese mehreren Fragmente durch Abspalten von RNA in dem Komplex aus Ziel-RNA und erstem Primer-Extensionsprodukt mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, erzeugt werden. In anderen Anwendungsformen umfasst der zweite Primer einen Abschnitt (zum Beispiel einen 3'-Abschnitt), der eine Zufallssequenz umfasst. In noch anderen Anwendungsformen ist der zweite Primer ein Zufallsprimer. In einigen Anwendungsformen umfasst der zweite Primer einen 5'-Abschnitt, der nicht an ein

erstes Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist. Für die hier beschriebenen Verfahren können ein oder mehrere zusammengesetzte Primer verwendet werden.

[0036] Die Enzyme, die in den Verfahren und Zusammensetzungen verwendet werden können, sind hier beschrieben. Zum Beispiel kann das Agens (wie ein Enzym), das RNA spaltet, eine RNase H sein, und die RNA-abhängige DNA-Polymerase kann eine reverse Transkriptase sein. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase kann eine RNase H-Aktivität umfassen, oder es können verschiedene Enzyme verwendet werden. Ähnlicherweise kann eine DNA-Polymerase sowohl RNA-abhängige als auch DNA-abhängige DNA-Polymerase-Enzymaktivitäten umfassen, oder es können verschiedene Enzyme verwendet werden. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und ein Enzym, das RNA abspaltet, kann ebenfalls das gleiche Enzym sein. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und das Enzym, das die RNA abspaltet, kann ebenfalls das gleiche Enzym sein.

[0037] In einigen Anwendungsformen werden die Verfahren der Erfindung zur Erzeugung markierter Polynukleotidprodukte (im Allgemeinen DNA- oder RNA-Produkte) verwendet. In einigen Anwendungsformen der Verfahren zur Erzeugung markierter DNA-Produkte ist wenigstens ein eingesetzter dNTP-Typ ein markiertes dNTP. In einigen Anwendungsformen der Verfahren zur Erzeugung markierter RNA-Produkte ist wenigstens ein eingesetzter rNTP-Typ ein markiertes rNTP. In anderen Anwendungsformen der Verfahren zur Erzeugung markierter DNA-Produkte wird ein markierter zusammengesetzter Primer verwendet.

[0038] Bei einigen Aspekten umfasst ein Propromotor-Polynukleotid (zum Beispiel ein PTO) eine Region am 3'-Ende, die an das verdrängte Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wodurch eine DNA-Polymerase-Extension des verdrängten Extensionsprodukts einen doppelsträngigen Promotor erzeugt, von dem aus die Transkription erfolgt.

[0039] Die Verfahren sind für eine Amplifizierung eines beliebigen RNA-Ziels, einschließlich zum Beispiel mRNA und ribosomaler RNA, anwendbar. Ein oder mehrere Schritte können zusammen und/oder sequentiell durchgeführt werden (oftmals in beliebiger Reihenfolge, solange das(die) erforderliche(n) Produkt(e) gebildet werden können), und, wie es offensichtlich ist, umfasst die Erfindung verschiedene Kombinationen der hier beschriebenen Schritte. Es ist ebenfalls offensichtlich und hier beschrieben, dass die Erfindung Verfahren umfasst, in denen der anfängliche oder erste Schritt ein beliebiger der hier beschriebenen Schritte ist. Zum Beispiel erfordern die Verfahren der Erfindung nicht, dass der erste Schritt die Erzeugung des Extensionsprodukts des ersten Primers von dem RNA-Template ist. Verfahren der Erfindung umfassen Anwendungsformen, in denen spätere, „nachfolgende“ Schritte ein anfänglicher Schritt sind.

[0040] Außerdem ist es in verschiedenen Anwendungsformen der Erfindung zu verstehen, dass das erste Primer-Extensionsprodukt umfasst: (a) eine Sequenz, die zu einer RNA-Sequenz komplementär ist, und (b) einen 5'-Abschnitt, vorzugsweise ein 5'-Ende, das aus RNA besteht. Wie beschrieben, entsteht dieses Produkt im Allgemeinen durch eine Primerextension eines zusammengesetzten Primers mit einem RNA-Abschnitt entlang eines RNA-Templates. Als solches bezieht sich ein erstes Primer-Extensionsprodukt auf ein Produkt, das (a) und (b) oben umfasst.

[0041] Die Erfindung stellt ebenfalls Verfahren bereit, welche die Produkte der Amplifikationsverfahren der Erfindung verwenden (üblicherweise analysieren), wie beispielsweise Sequenzierung, Nachweis von Sequenzänderung(en) (z.B. Genotypisierung oder Nachweis einer Nukleinsäuremutation); Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Sequenz von Interesse; Genexpressionsprofiling; subtraktive Hybridisierung; Herstellung einer subtraktiven Hybridisierungssonde; differenzielle Amplifikation; Herstellung von Bibliotheken (einschließlich cDNA-Bibliotheken und differenzieller Expressionsbibliotheken); Herstellung einer immobilisierten Nukleinsäure (die eine auf einem Mikroarray immobilisierte Nukleinsäure sein kann) und Charakterisierung (einschließlich Nachweis oder quantitativer Bestimmung) amplifizierter Nukleinsäureprodukte, die mit den Verfahren der Erfindung erzeugt sind.

[0042] Mit einigen Aspekten stellt die Erfindung Verfahren zur Sequenzierung einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, wobei diese Verfahren eine Amplifizierung einer Ziel-RNA, die die Sequenz von Interesse enthält, mit den Amplifikationsverfahren der Erfindung in Gegenwart eines Gemisches aus dNTPs und dNTP-Analoga (die markiert oder unmarkiert sein können), so dass eine Primerextension nach Einbau eines dNTP-Analogon, das markiert oder unmarkiert sein kann, abbricht, und Analysieren der Amplifikationsprodukte zwecks Bestimmung der Sequenz umfassen. In Anwendungsformen, wo die amplifizierten Produkte RNA-Transkripte sind, können die Verfahren umfassen (a) Amplifizieren einer Ziel-RNA, welche die Sequenz von Interesse enthält, mit den Amplifikationsverfahren der Erfindung in Gegenwart eines Gemisches aus rNTPs und rNTP-Analoga

(die markiert oder unmarkiert sein können), so dass die RNA-Transkription nach Einbau eines rNTP-Analogon, das markiert oder unmarkiert sein kann, abbricht; und (b) Analysieren der Amplifikationsprodukte, um die Sequenz zu ermitteln.

[0043] Mit einigen Aspekten stellt die Erfindung Verfahren zum Nachweis einer Mutation (oder bei einigen Aspekten zur Charakterisierung einer Sequenz) in einer Ziel-RNA bereit, umfassend (a) Amplifizieren der Ziel-RNA mit einem hier beschriebenen Verfahren; und (b) Analysieren der Amplifikationsprodukte des Verfahrens auf eine Einzelstrang-Konformation, wobei ein Unterschied in der Konformation verglichen mit einer einzelsträngigen Referenz-RNA eine Mutation in der Ziel-RNA anzeigt. In anderen Anwendungsformen stellt die Erfindung Verfahren zum Nachweis einer Mutation (oder bei einigen Aspekten zur Charakterisierung einer Sequenz) in einer Ziel-RNA bereit, umfassend ein Analysieren der Amplifikationsprodukte eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren auf eine Einzelstrang-Konformation, wobei ein Unterschied in der Konformation verglichen mit einer einzelsträngigen Referenz-RNA eine Mutation in der Ziel-RNA anzeigt (oder bei einigen Aspekten die Zielsequenz charakterisiert).

[0044] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Sequenz von Interesse bereit, wobei diese Verfahren umfassen (i) Amplifizieren einer Ziel-RNA, die eine Sequenz von Interesse enthält, wobei diese Amplifikation die Extension eines zusammengesetzten Primers umfasst, der an einen gespaltenen Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten hybridisiert ist, der mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren hergestellt ist, wobei die Sequenz des RNA-Abschnitts des zusammengesetzten Primers bekannt ist, und (ii) Vergleich der Amplifikationsprodukte, sofern vorhanden, von Schritt (i) mit der Menge an Amplifikationsprodukten von einem Referenztemplate; worin (1) eine Produktion von nachweislich weniger Amplifikationsprodukten von dem Template im Vergleich zu der Menge an Amplifikationsprodukten von dem Referenztemplate, das eine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Region umfasst, anzeigt, dass das zweite Primer-Extensionsprodukt keine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Sequenz umfasst und eine Sequenzvariante bezüglich der Sequenz ist, die an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbar ist; oder (2) eine Produktion von nachweislich mehr Amplifikationsprodukten von dem Template im Vergleich zu der Menge an Amplifikationsprodukten von dem Referenztemplate, das keine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Region umfasst, anzeigt, dass das zweite Primer-Extensionsprodukt eine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Sequenz umfasst und keine Sequenzvariante bezüglich der Sequenz ist, die an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbar ist.

[0045] Mit einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure bereit, die auf einem Substrat immobilisiert ist (welches Verfahren zur Herstellung eines Mikroarrays umfasst), umfassend (a) Amplifizieren einer Ziel-RNA mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; und (b) Immobilisieren der Amplifikationsprodukte auf einem Substrat. Die Amplifikationsprodukte können markiert oder unmarkiert sein. Mit anderen Aspekten stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung eines Mikroarrays bereit, umfassend (a) Amplifizieren einer Ziel-RNA mit einem hier beschriebenen Amplifikationsverfahren; und (b) Immobilisieren der Amplifikationsprodukte auf einem Substrat (das fest oder halbfest sein kann). In einigen Anwendungsformen werden die Mikroarrays durch Immobilisieren der Amplifikationsprodukte auf einem Substrat hergestellt, um ein Mikroarray von Amplifikationsprodukten herzustellen. Das Mikroarray kann wenigstens ein Amplifikationsprodukt umfassen, das auf einem festen oder halbfesten Substrat immobilisiert ist, wobei das Mikroarray aus einem Material hergestellt ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Papier, Glas, Keramik, Kunststoff, Polystyrol, Polypropylen, Nylon, Polyacrylamid, Nitrocellulose, Silikon und anderen Metallen und optischer Faser. Ein Amplifikationsprodukt kann auf dem festen oder halbfesten Substrat in einer zweidimensionalen oder dreidimensionalen Konfiguration, umfassend Nadeln, Stäbchen, Fasern, Bänder, Fäden, Kügelchen, Partikel, Mikrotitervertiefungen, Kapillaren und Zylinder, immobilisiert sein.

[0046] Jedes beliebige der Verfahren der Erfindung kann zur Erzeugung von Polynukleotidprodukten (im Allgemeinen DNA oder RNA) angewandt werden, die für eine Charakterisierung einer RNA-Sequenz von Interesse in einer Probe geeignet sind. In einer Anwendungsform stellt die Erfindung Verfahren zur Charakterisierung (zum Beispiel Nachweis (Anwesenheit oder Abwesenheit) und/oder quantitative Bestimmung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, umfassend: (a) Amplifizieren einer Ziel-RNA mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; und (b) Analysieren der Amplifikationsprodukte. Der Schritt (b) der Analyse der Amplifikationsprodukte kann mit einem beliebigen in der Technik bekannten oder hier beschriebenen Verfahren durchgeführt werden, zum Beispiel mittels Nachweis und/oder quantitativer Bestimmung der Amplifikationsprodukte, die an eine Sonde hybridisiert sind. Diese Amplifikationsprodukte können markiert oder unmarkiert sein. Jedes beliebige der Verfahren der Erfindung kann zur Erzeugung von DNA- oder RNA-Produkten, die mittels

Einbau markierter Nukleotide und/oder markierter zusammengesetzter Primer in geeigneten Schritten der Verfahren markiert werden, angewandt werden. Diese markierten Produkte sind besonders für eine Quantifizierung und/oder Identifizierung mit in der Technik bekannten Verfahren besonders geeignet, die den Einsatz von Arrays, wie cDNA-Mikroarrays und Oligonukleotid-Arrays, umfassen. Mit einem Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Charakterisierung einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, umfassend (a) Amplifizieren einer Ziel-RNA mit einem hier beschriebenen Verfahren, um markierte DNA-Produkte zu erzeugen; und (b) Analysieren der markierten DNA-Produkte. In einigen Anwendungsformen umfasst der Schritt der Analyse der DNA-Produkte die Mengenbestimmung dieser Produkte, wodurch die in einer Probe vorhandene Menge der RNA-Sequenz von Interesse quantitativ bestimmt wird.

[0047] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Charakterisierung einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, umfassend (a) Amplifizieren einer Ziel-RNA mit einem hier beschriebenen Verfahren, um markierte RNA-Produkte zu erzeugen; und (b) Analysieren der markierten RNA-Produkte. In einigen Anwendungsformen umfasst der Schritt der Analyse der RNA-Produkte die Mengenbestimmung dieser Produkte, wodurch die in einer Probe vorhandene Menge der RNA-Sequenz von Interesse quantitativ bestimmt wird. Die DNA- oder RNA-Produkte können zum Beispiel durch Inkontaktbringen dieser mit wenigstens einer Sonde analysiert werden. In einigen Anwendungsformen wird die wenigstens eine Sonde als ein Mikroarray bereitgestellt. Das Mikroarray kann wenigstens eine Sonde umfassen, die auf einem festen oder halbfesten Substrat immobilisiert ist, das aus einem Material hergestellt ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Papier, Glas, Keramik, Kunststoff, Polystyrol, Polypropylen, Nylon, Polyacrylamid, Nitrocellulose, Silikon und anderen Metallen und optischer Faser. Eine Sonde kann auf dem festen oder halbfesten Substrat in einer zweidimensionalen oder dreidimensionalen Konfiguration, umfassend Nadeln, Stäbchen, Fasern, Bänder, Fäden, Kügelchen, Partikel, Mikrotitervertiefungen, Kapillaren und Zylinder, immobilisiert sein.

[0048] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Bestimmung des Genexpressionsprofils in einer Probe bereit, wobei die Verfahren umfassen: (a) Amplifizieren wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse in einer Probe unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; und (b) Bestimmen der Menge an Amplifikationsprodukten jeder RNA-Sequenz von Interesse, wobei jede dieser Menge indikativ ist für eine Menge jeder RNA-Sequenz von Interesse in der Probe, wodurch das Genexpressionsprofil der Probe ermittelt wird.

[0049] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek (einschließlich cDNA- und subtraktiver Hybridisierungsbibliotheken) bereit, wobei diese Verfahren umfassen: Amplifizieren wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren, um ein einzel- oder doppelsträngiges Nukleinsäureprodukt zu erzeugen.

[0050] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer subtraktiven Hybridisierungssonde bereit, wobei diese Verfahren die Erzeugung vielfacher Kopien eines einzelsträngigen Polynukleotids, vorzugsweise DNA, des Komplements wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren umfassen.

[0051] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Ausführung der subtraktiven Hybridisierung bereit, wobei diese Verfahren umfassen: (a) Erzeugung vielfacher Kopien des Komplements wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; und (b) Hybridisieren der vielfachen Kopien an eine zweite mRNA-Population, wodurch eine Subpopulation der zweiten mRNA-Population einen Komplex mit einer DNA-Kopie bildet. In einigen Anwendungsformen umfasst das Verfahren außerdem: (c) Spalten der RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (d) Amplifizieren einer unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population (unter Anwendung eines beliebigen Verfahrens, einschließlich der hier beschriebenen Verfahren), wodurch vielfache Kopien einzelsträngiger DNA, die zu der unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population komplementär ist, erzeugt werden.

[0052] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur differenziellen Amplifikation bereit, wobei die Verfahren umfassen: (a) Erzeugung vielfacher Polynukleinsäure-Kopien, im Allgemeinen DNA, des Komplements wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; (b) Hybridisieren der vielfachen Kopien an eine zweite mRNA-Population, wodurch eine Subpopulation der zweiten mRNA-Population einen Komplex mit einer DNA-Kopie bildet; (c) Spalten der RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (d) Amplifizieren einer unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population unter Anwendung eines beliebigen Verfahrens, einschließlich derjenigen, der hier beschriebenen, wo-

durch vielfache Kopien von einzelsträngiger DNA, die zu der unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population komplementär ist, erzeugt werden.

[0053] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek bereit, wobei diese Verfahren die Herstellung einer subtraktiven Hybridisierungs-sonde, wie sie hier beschrieben ist, oder eine differenzielle Amplifikation, wie sie hier beschrieben ist, umfassen.

[0054] Für jede dieser Anwendungen kann jedes beliebige der Amplifizierungsverfahren (einschließlich verschiedener Komponenten und verschiedener Anwendungsformen jeder dieser Komponenten), wie sie hier beschrieben sind, genutzt werden. Zum Beispiel kann der eingesetzte zusammengesetzte Primer einen 5'-RNA-Abschnitt besitzen, der zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart sein kann.

[0055] Die Erfindung stellt ebenfalls Kits bereit, die verschiedene Komponenten (und verschiedene Kombinationen der Komponenten) umfassen, die in den hier beschriebenen Amplifikationsverfahren verwendet werden. Wir beschreiben zum Beispiel die Zusammensetzungen, die einen zusammengesetzten Primer, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst, und einen zweiten Primer umfassen, wobei der zweite Primer ein Zufallsprimer ist. In einigen Anwendungsformen umfassen diese Zusammensetzungen außerdem eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (die eine reverse Transkriptase sein kann). Wir beschreiben ebenfalls eine Zusammensetzung, die einen zusammengesetzten Primer und einen zweiten Primer umfasst, der eine Sequenz umfasst, die nicht an ein Extensionsprodukt eines zusammengesetzten Primers (im Allgemeinen, aber nicht notwendigerweise, führt die Verwendung dieses Primers zu einer Erzeugung von Primer-Extensionsprodukten, an die ein Propromotor-Polynukleotid hybridisieren kann) hybridisiert werden kann (unter Bedingungen, bei denen eine Region des Primers hybridisierbar ist). In einigen Anwendungsformen ist der 5'-RNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers benachbart zu seinem 3'-DNA-Abschnitt. In noch anderen Anwendungsformen besteht der 5'-RNA-Abschnitt aus etwa 5 bis etwa 20 Nukleotiden und sein 3'-DNA-Abschnitt aus etwa 5 bis etwa 15 Nukleotiden. In einigen Anwendungsformen ist das Propromotor-Polynukleotid ein Propromotor-Template-Oligonukleotid (PTO). In noch weiteren Anwendungsformen stellt die Erfindung eine Zusammensetzung bereit, umfassend: (a) einen zusammengesetzten Primer; (b) einen zweiten Primer (der ein Zufallsprimer sein kann); und (c) ein Propromotor-Polynukleotid (das in einigen Anwendungsformen ein PTO ist).

[0056] Wir beschreiben ebenfalls Zusammensetzungen, die einen beliebigen der hier beschriebenen Komplexe umfassen (die im Allgemeinen als Intermediate bezüglich der Amplifikationsendprodukte zu betrachten sind) (siehe ebenfalls die Figuren für beispielhafte schematische Darstellungen dieser verschiedenen Komplexe). Zum Beispiel beschreiben wir Zusammensetzungen, umfassend einen Komplex aus (a) einem ersten Primer-Extensionsstrang, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist und einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; und (b) einen Ziel-RNA-Strang. Mit einem noch anderen Aspekt beschreiben wir Zusammensetzungen, umfassend einen Komplex aus: (a) einem ersten Primer-Extensionsprodukt, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist und einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; und (b) einem Extensionsprodukt eines zweiten Primers (oder Fragments). Wir beschreiben ebenfalls einen Komplex aus (a) einem abgespaltenen Primer-Extensionsprodukt, wobei der Primer ein zusammengesetzter Primer ist und einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; (b) einem Extensionsprodukt eines zweiten Primers (oder Fragments); und (c) einem zusammengesetzten Primer.

[0057] Wir beschreiben ebenfalls irgendein oder mehrere Produkte (einschließlich Intermediate) und Zusammensetzungen, umfassend die Produkte (einschließlich Intermediate), die mit einem beliebigen Aspekt der Verfahren der Erfindung hergestellt werden. Die Produkte umfassen Bibliotheken und jede andere erzeugte Population, die im Allgemeinen auf der Natur des Primers oder der Primer basieren, die in den hier beschriebenen Verfahren eingesetzt sind.

[0058] Wir beschreiben ebenfalls Reaktionsgemische (oder Zusammensetzungen, die Reaktionsgemische umfassen), welche verschiedene Kombinationen der hier beschriebenen Komponenten enthalten. Zum Beispiel beschreiben wir Reaktionsgemische, umfassend (a) eine Ziel-RNA; (b) einen zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt; (c) einen zweiten Primer; und (d) eine DNA-Polymerase. Wie hier beschrieben, kann ein beliebiger der zusammengesetzten Primer (oder viele zusammengesetzte Primer), einschließlich eines zusammengesetzten Primers, der einen zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbarten 5'-RNA-Abschnitt umfasst, in dem Reaktionsgemisch enthalten sein. Das Reaktionsgemisch könnte ebenfalls außerdem ein Enzym, wie RNase H, umfassen, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet. Ein Reaktionsgemisch kann ebenfalls ein Propromotor-Polynukleotid (das in einigen Anwendungsformen PTO ist) und/oder eine RNA-Polymerase umfassen. Ein Reaktionsgemisch kann ebenfalls umfassen

(a) ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt (das eine 5'-Endsequenz enthält, die zu einem 3'-DNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers komplementär ist, aber keine Sequenzen enthält, die zu dem RNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers komplementär sind); (b) ein Propromotor-Polynukleotid (wie ein PTO); und (c) eine RNA-Polymerase.

[0059] Mit einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Kits für die Durchführung der hier beschriebenen Verfahren bereit. Diese Kits, die in einer geeigneten Weise verpackt sind und im Allgemeinen (aber nicht notwendigerweise) geeignete Anleitungen enthalten, enthalten eine oder mehrere Komponenten, die in den Amplifikationsverfahren verwendet werden. Zum Beispiel stellt die Erfindung Kits bereit, die einen ersten zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt (der 5' liegen kann und außerdem zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart sein kann), und einen zweiten zusammengesetzten Primer (der gesondert verpackt sein kann oder nicht) umfassen, wobei der zweite zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst und wobei der zweite zusammengesetzte Primer eine Sequenz umfasst, die an ein Polynukleotid, umfassend ein Komplement des RNA-Abschnitts des ersten zusammengesetzten Primers, hybridisierbar ist. In einigen Anwendungsformen umfassen diese Kits außerdem Gebrauchsanleitungen der Primer für eine RNA-Amplifikation. Die zusammengesetzten Primer in den Kits können beliebige Primer sein, die hier beschrieben sind. Die Kits können beliebig weitere Komponenten enthalten, wie (a) ein Propromotor-Polynukleotid (wie ein PTO); und (b) ein beliebiges der hier beschriebenen Enzyme, wie ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet (zum Beispiel RNase H), DNA-Polymerase (RNA-abhängig oder DNA-abhängig) und RNA-Polymerase. Jedes dieser Kits kann außerdem Gebrauchsanleitungen der Komponenten für eine RNA-Amplifikation enthalten.

[0060] Wir beschreiben ebenfalls Systeme für die Durchführung der hier beschriebenen Amplifikationsverfahren. Zum Beispiel beschreiben wir Systeme für eine Amplifizierung einer Ziel-RNA, umfassend (a) einen zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt; (b) einen zweiten Primer; (c) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase; (d) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; und (e) ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet (wie beispielsweise RNase H). Der zusammengesetzte Primer kann ein beliebiger (ein oder mehrere) der hier beschriebenen Primer sein, einschließlich eines zusammengesetzten Primers, der einen 5'-RNA-Abschnitt umfasst, der zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart ist. Die Systeme können außerdem ein Propromotor-Polynukleotid (wie ein PTO) und/oder eine RNA-Polymerase umfassen. Wie hier beschrieben, können die Systeme im Allgemeinen ein oder mehrere Geräte für die Ausführung der Verfahren der Erfindung umfassen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0061] [Fig. 1A-Fig. 1B](#) zeigen eine schematische Darstellung eines linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers, eines zweiten Primers und einer Strangverdrängung, um vielfache Kopien eines einzelsträngigen DNA-Produkts zu erzeugen, das zu der Ziel-RNA komplementäre Sequenzen umfasst.

[0062] [Fig. 2A-Fig. 2C](#) zeigen eine schematische Darstellung eines verstärkten linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers, eines zweiten Primers, einer Strangverdrängung und einer Transkription, um vielfache Kopien der Ziel-RNA zu erzeugen.

[0063] [Fig. 3A-Fig. 3B](#) zeigen eine schematische Darstellung eines linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers und einer Strangverdrängung, um vielfache Kopien eines einzelsträngigen DNA-Produkts zu erzeugen, das zu der Ziel-RNA komplementäre Sequenzen umfasst.

[0064] [Fig. 4A-Fig. 4B](#) zeigen eine schematische Darstellung eines verstärkten linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers, einer Strangverdrängung und einer Transkription, um vielfache Kopien der Ziel-RNA zu erzeugen.

[0065] [Fig. 5](#) zeigt eine schematische Darstellung eines linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers, der eine poly-dT-Sequenz enthält, und einer Strangverdrängung, um vielfache Kopien eines einzelsträngigen DNA-Produkts zu erzeugen, das zu der Ziel-RNA komplementäre Sequenzen umfasst.

[0066] [Fig. 6](#) zeigt eine schematische Darstellung eines linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers, der eine Zufallssequenz enthält, und einer

Strangverdrängung, um vielfache Kopien eines einzelsträngigen DNA-Produkts zu erzeugen, das zu der Ziel-RNA komplementäre Sequenzen umfasst.

[0067] [Fig. 7](#) zeigt eine schematische Darstellung eines verstärkten linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers und einer Transkription, um vielfache Kopien eines einzelsträngigen DNA-Produkts zu erzeugen, das zu der Ziel-RNA komplementäre Sequenzen umfasst.

[0068] [Fig. 8A-8E](#) zeigen eine schematische Darstellung eines linearen isothermen RNA-Amplifikationsprozesses unter Verwendung zweier zusammengesetzter Primer und einer Strangverdrängung, um vielfache Kopien von einzelsträngigen DNA-Produkten zu erzeugen, das zu der Ziel-RNA komplementäre Sequenzen und zu der Ziel-RNA identische Sequenzen umfasst.

[0069] [Fig. 9](#) zeigt ein Foto eines Gels, das unter Anwendung der isothermen RNA-Amplifikationsverfahren erzeugte PCR-Produkte zeigt, die von einer doppelsträngigen cDNA amplifiziert worden sind, die eine angefügte definierte Sequenz auf dem zweiten cDNA-Strang umfasst.

[0070] [Fig. 10](#) zeigt Schaubilder, welche die Ergebnisse von PCR-Echtzeitexperimenten zur quantitativen Bestimmung von Produkten darstellen, die unter Anwendung einer linearen isothermen RNA-Amplifikation erzeugt worden sind.

AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG

Überblick über die Erfindung und ihre Vorteile

[0071] Die Erfindung legt neuartige Verfahren, Zusammensetzungen und Kits für eine Amplifikation von RNA-Sequenzen offen. Die Verfahren ermöglichen eine isotherme Amplifikation einer einzigen RNA-Spezies oder eines Pools von RNA-Spezies. Einige Verfahren stellen die Erzeugung vielfacher Kopien von DNA bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementäre Sequenzen umfasst. Andere Verfahren stellen die Erzeugung vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse bereit. Diese Verfahren sind zum Beispiel für die Erzeugung von cDNA-Bibliotheken und subtraktiven Hybridisierungssonden geeignet. Sie erzeugen einzelsträngige DNA- oder RNA-Produkte, die ohne weiteres für eine Reihe von Verwendungen, einschließlich Expressionsprofiling, z.B. durch Multiplexanalyse mit Hilfe von Mikroarray-Technologien, ebenso wie für Elektrophorese-gestützte Technologien, wie differenzielles Display, geeignet sind. Diese Verfahren sind für eine Automatisierung geeignet und erfordern keine Thermozyklisierung.

[0072] Die Verfahren der Erfindung beziehen sich auf die Amplifikation einer oder mehrerer RNA-Spezies, wie beispielsweise einen Pool von RNA-Sequenzen, und sind für die Amplifikation aller RNA-Sequenzen (wie mRNA) in einem Gesamt-RNA-Präparat von einer biologischen Probe besonders geeignet. Folglich ist einer der Hauptvorteile der Verfahren der Erfindung die Fähigkeit zur Amplifizierung eines vollständigen Pools von Sequenzen, was eine wesentliche Voraussetzung für die Analyse des Genexpressionsprofils in Zellen ist, wie beispielsweise in den Zellen in einer biologischen Probe von Interesse. Die Verfahren der Erfindung können ebenfalls für eine Amplifizierung einer spezifischen RNA-Sequenz von Interesse oder einer Vielzahl an RNAs, zum Beispiel von Mitgliedern einer Familie verwandter RNAs, angewandt werden. Die Verfahren der Erfindung sind ebenfalls für eine Amplifizierung einer großen Vielzahl und am bevorzugtesten aller RNA-Sequenzen (wie mRNA) in einer Probe geeignet.

[0073] Insofern als viele mRNAs ein einzigartiges poly-A 3'-Ende besitzen, wird eine von der 3'-Endsequenz ausgehende Amplifikation von mRNAs üblicherweise zur Herstellung von cDNA-Bibliotheken und anschließende Sequenzanalyse für eine Bestimmung des Genexpressionsprofils oder für andere Anwendungen ausgeführt. Die Verfahren der Erfindung sind für eine Herstellung von Bibliotheken amplifizierter 3'-Abschnitte von mRNAs ähnlich geeignet. Ein in den Verfahren der Erfindung verwendeter zusammengesetzter Primer kann unter Verwendung von Zufallssequenzen gemäß in der Technik bekannter Verfahren so gestaltet werden, dass er an eine Vielzahl oder an sämtliche RNA-Spezies in der Probe hybridisierbar ist. Wenn eine ausgewählte RNA oder eine Familie verwandter RNAs amplifiziert werden soll, umfasst alternativ der zusammengesetzte Primer eine Sequenz oder Sequenzen, die an die ausgewählte RNA oder an eine Familie verwandter RNAs hybridisierbar sind.

[0074] Die Verfahren umfassen im Allgemeinen die Verwendung speziell gestalteter Primer, im Allgemeinen eines oder mehrerer zusammengesetzter RNA/DNA-Primer, um einen Komplex aus Erst- und Zweitstrang-cD-

NAs zu erzeugen, der einen Abschnitt mit einem besonderen Merkmal (z.B. von einem Enzym spaltbar) umfasst. Wie hier verwendet, versteht es sich, dass „cDNA“ ein Polynukleotid-Primer-Extensionsprodukt bezeichnet. Im Allgemeinen umfasst der Komplex einen RNA/DNA-Heteroduplex an einem Ende des doppelsträngigen cDNA-Komplexes. Der RNA/DNA-Heteroduplex an einem Ende des doppelsträngigen cDNA-Komplexes kann eine definierte Endsequenz umfassen, die im Allgemeinen von dem RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers eingefügt ist. Der zusammengesetzte Primer gemäß den Verfahren der Erfindung umfasst einen 3'-DNA-Abschnitt, der im Allgemeinen so gestaltet ist, dass er an eine Ziel-RNA oder Ziel-RNAs hybridisierbar ist. Der/die verbleibende Abschnitt(e) (wie der 5'-RNA-Abschnitt) des zusammengesetzten Primers umfasst im Allgemeinen, aber nicht notwendigerweise, eine Sequenz, die nicht an eine Ziel-RNA hybridisierbar ist (die einen Schwanz bilden würde, wenn der Primer an eine Ziel-RNA gebunden ist). Folglich und wie es aus der Beschreibung ersichtlich ist, umfasst die Bezugnahme auf einen Primer, der an eine Sequenz (oder Hybridisierungstemplate) hybridisiert, Anwendungsformen, in denen wenigstens ein Teil des Primers hybridisiert ist, wie auch diejenigen Anwendungsformen, in denen der ganze Primer hybridisiert ist.

[0075] Der doppelsträngige cDNA-Komplex ist ein Substrat für eine lineare Amplifikation, die folgendermaßen abläuft: ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet (wie RNase H), spaltet die RNA-Sequenz von dem Hybrid ab, lässt dabei eine 3'-DNA-Sequenz auf dem zweiten cDNA-Strang zurück, die für ein Binden eines zusammengesetzten Primers verfügbar ist, welcher der gleiche oder ein anderer Primer als der erste zusammengesetzte Primer sein kann. Die Extension eines gebundenen zusammengesetzten Primers durch die DNA-Polymerase erzeugt ein Primer-Extensionsprodukt, welches das zuvor gebundene abgespaltene erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt, wodurch ein einzelsträngiges DNA-Produkt angehäuft wird. Das einzelsträngige DNA-Produkt ist eine Kopie des Komplements der Ziel-RNA (oder „Antisense“-DNA). Diese lineare Amplifikation wird als „SPIA“ (steht für Single Primer Linear Amplification) bezeichnet und ist von Kurn et al., in U.S. Patent Nr. 6.251,639 B1, beschrieben.

[0076] Ein Aspekt der Erfindung funktioniert folgendermaßen: ein zusammengesetzter RNA/DNA-Primer bildet die Basis für eine Replikation der Template-RNA. Der zusammengesetzte Primer (hier ebenfalls als „der erste Primer“ bezeichnet) hybridisiert an Template-RNA, welche die RNA-Sequenz(en) von Interesse umfasst, und der zusammengesetzte Primer wird von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase verlängert, um ein erstes Primer-Extensionsprodukt (austauschbar auch als „Extensionsprodukt des zusammengesetzten Primers“ oder „Erststrang-cDNA“ bezeichnet) zu bilden. Nach Abspaltung der Template-RNA wird ein zweites Primer-Extensionsprodukt (austauschbar als „Zweitstrang-cDNA“ bezeichnet) in einem Komplex mit dem ersten Primer-Extensionsprodukt gebildet (wie unten beschrieben). Der Komplex aus ersten und zweiten Extensionsprodukten besteht, aufgrund des Vorhandenseins des zusammengesetzten Primers in dem ersten Primer-Extensionsprodukt, aus einem RNA/DNA-Hybrid an einem Ende. Ein Agens, wie ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet (wie RNase H), spaltet die RNA-Sequenz von dem Hybrid ab und lässt dabei eine Sequenz auf dem zweiten Primer-Extensionsprodukt zurück, die für ein Binden eines weiteren zusammengesetzten Primers verfügbar ist, der der gleiche oder ein anderer Primer als der erste zusammengesetzte Primer sein kann. Ein weiteres Extensionsprodukt des ersten (zusammengesetzten) Primers wird von der DNA-Polymerase erzeugt, die das zuvor gebundene abgespaltene Extensionsprodukt des ersten Primers verdrängt, was ein verdrängtes abgespaltenes Extensionsprodukt des ersten Primers ergibt.

[0077] In einigen Anwendungsformen der Erfindung wird ein zweites Primer-Extensionsprodukt folgendermaßen gebildet: nach Abspaltung des RNA-Templates wird dann ein zweiter Primer an das Extensionsprodukt des ersten Primers hybridisiert und extendiert, um ein zweites Primer-Extensionsprodukt in einem Komplex mit dem ersten Primer-Extensionsprodukt zu bilden. Der Komplex aus ersten und zweiten Extensionsprodukten besteht aufgrund des Vorhandenseins des zusammengesetzten Primers in dem ersten Primer-Extensionsprodukt aus einem RNA/DNA-Hybrid an einem Ende. Der zweite Primer ist eine beliebige Sequenz, die an den ersten DNA-Strang hybridisierbar ist, so dass er geeignet ist, von einer DNA-Polymerase entlang des ersten Primer-Extensionsprodukt extendiert zu werden, um ein zweites Primer-Extensionsprodukt zu bilden. Folglich ist in einigen Anwendungsformen der zweite Primer ein Oligonukleotid, der eine Zufallssequenz (d.h. eine Sequenz, die so gestaltet ist, dass sie (unter einer Reihe an gegebenen Bedingungen) an eine oder mehrere Sequenzen in der Probe hybridisierbar ist) umfassen kann oder nicht. In anderen Anwendungsformen umfasst er eine Sequenz des ersten DNA-Strangs (im Allgemeinen am 3'-Ende), die an eine Sequenz im ersten DNA-Strang (zum Beispiel eine Haarnadelstruktur oder selbstassozierte Struktur) hybridisiert wird.

[0078] Bei einem anderen Aspekt der Amplifikationsverfahren dient ein oder mehrere Fragmente der Ziel-RNA als der Primer des Extensionsprodukts des zweiten Primers. Die Ziel-RNA in dem anfänglichen Komplex, umfassend die Ziel-RNA und ein erstes Primer-Extensionsprodukt, wird mit einem Agens (wie RNase H) gespalten, so dass wenigstens ein Fragment der Template-RNA an dem ersten Primer-Extensionsprodukt hy-

bridisiert verbleibt. Bei diesem Aspekt der Erfindung dient ein (oder mehrere) Fragment(e) der Template-RNA als ein „zweiter“ Primer in der oben beschriebenen Art und Weise, um ein Extensionsprodukt des Fragments zu erzeugen, das dieselbe Funktion wie das zweite Primer-Extensionsprodukt in den oben beschriebenen Amplifikationsverfahren besitzt. Ein geeignetes RNA-Fragment in den Verfahren der Erfindung ist lang genug, so dass es nicht von der Erststrang-cDNA abdissoziiert, bevorzugt ist es etwa 3 bis etwa 30, bevorzugter etwa 5 bis etwa 25, noch bevorzugter etwa 10 bis etwa 20 und am bevorzugtesten etwa 12 bis etwa 17 Nukleotide lang.

[0079] In Anwendungsformen, die eine Transkription einbeziehen (hier werden sie als „verstärkte“ Verfahren bezeichnet), kann der zweite Primer außerdem eine Sequenz umfassen, so dass verdrängte Extensionsprodukte des ersten Primers (anders als das allererste Extensionsprodukt des ersten zusammengesetzten Primers) eine Sequenz enthalten, an die ein Polynukleotid, umfassend einen Propromotor (hier auch als „Propromotor-Polynukleotid“ bezeichnet), hybridisieren kann. Die Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt und Extension des 3'-Endes des verdrängten ersten Primer-Extensionsprodukts (falls dort ein Überhang vorhanden ist) ergibt eine doppelsträngige Promotorregion, die die Transkription steuert (über eine DNA-abhängige RNA-Polymerase), um Sense-RNA-Produkte zu erzeugen. Dieser „verstärkte“ Ansatz ist in Kurn et al., U.S. Patent Nr. 6.251.639 B1, beschrieben.

[0080] Dementsprechend stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung wenigstens einer Kopie einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, umfassend Vereinigen und Reagieren des folgenden: (a) einer Ziel-RNA, umfassend eine RNA-Sequenz von Interesse; (b) eines ersten (zusammengesetzten) Primers, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (c) eines zweiten Primers, der an ein Extensionsprodukt des zusammengesetzten Primers hybridisierbar ist; (d) einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase; (e) einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; (f) eines Agens (wie ein Enzym), das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (g) Desoxyribonukleosidtriphosphate oder geeigneter Analoga (die markiert oder unmarkiert sein können). In Anwendungsformen, die eine Transkription einbeziehen (d.h. verstärkte Verfahren), sind folgende ebenfalls in der Amplifikationsreaktion enthalten (entweder zum selben Zeitpunkt wie die oben angeführten Komponenten oder separat zugegeben): (h) ein Propromotor-Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an ein Hybridisierungsprodukt des ersten Primers (ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt) hybridisiert; (i) eine RNA-Polymerase; und (j) Ribonukleosidtriphosphate oder geeignete Analoga (die markiert oder unmarkiert sein können). Die Kombination wird für eine Primer-Hybridisierung, Primer-Extension, RNA-Abspaltung und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts geeigneten Bedingungen ausgesetzt, wenn dessen RNA abgespalten wird und ein anderer erster Primer an die von der abgespaltenen RNA frei gemachte Stelle bindet. In Anwendungsformen, die eine Transkription umfassen, sind die angewandten Bedingungen ebenfalls für eine Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an das verdrängte abgespaltene erste Primer-Extensionsprodukt, Extension des 3'-Endes des abgespaltenen ersten Primer-Extensionsprodukts (falls erforderlich), um eine doppelsträngige Promotorregion zu erzeugen, und eine von dem Promotor gesteuerte RNA-Transkription geeignet. Wie hier beschrieben und beispielhaft dargestellt kann das oben erwähnte Reaktionsgemisch in zwei oder mehrere verschiedene Reaktionsgemische für getrennte, im Allgemeinen sequenzielle Inkubationen unterteilt werden, die den verschiedenen Aspekten des Amplifikationsprozesses entsprechen (siehe beispielsweise Beispiel 1).

[0081] Bei einem anderen Aspekt der Amplifikationsverfahren dienen Fragmente der Ziel-RNA als ein Primer für die Synthese des zweiten DNA-Strangs. Die Ziel-RNA in dem anfänglichen Komplex, umfassend die Ziel-RNA und das Extensionsprodukt des zusammengesetzten Primers, wird mit einem Agens (wie RNase H) gespalten, so dass wenigstens ein Fragment der Template-RNA an dem ersten Primer-Extensionsprodukt hybridisiert verbleibt. Bei diesem Aspekt der Erfindung dient ein (oder mehrere) Fragment(e) der Template-RNA als ein „zweiter“ Primer in der oben beschriebenen Art und Weise, um ein Extensionsprodukt des Fragments zu erzeugen, das dieselbe Funktion wie das zweite Primer-Extensionsprodukt in den oben beschriebenen Amplifikationsverfahren besitzt.

[0082] In einigen Anwendungsformen stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung wenigstens einer Kopie einer Polynukleotidsequenz bereit, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, umfassend Vereinigen und Reagieren des folgenden: (a) eines Komplexes aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten; (b) eines ersten (zusammengesetzten) Primers, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; (c) einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase; (d) eines Agens (wie ein Enzym), das die RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (e) Desoxyribonukleosidtriphosphate oder geeigneter Analoga (die markiert oder unmarkiert sein können). In Anwendungsformen, die eine Transkription einbeziehen, sind folgende ebenfalls in der Amplifikationsreaktion enthalten (entweder zum selben Zeitpunkt wie die oben angeführten Komponenten oder separat zugegeben): (f) ein Propromotor-Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und

eine Region, die an ein Hybridisierungsprodukt des ersten Primers (ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt) hybridisiert; (g) eine RNA-Polymerase; und (h) Ribonukleosidtriphosphate oder geeignete Analoga (die markiert oder unmarkiert sein können). Die Kombination wird für eine Primer-Hybridisierung, Primer-Extension, RNA-Abspaltung und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts geeigneten Bedingungen ausgesetzt, wenn dessen RNA abgespalten wird und ein anderer erster Primer an die von der abgespaltenen RNA frei gemachte Stelle auf dem zweiten Primer-Extensionsprodukt bindet. In Anwendungsformen, die eine Transkription einbeziehen, sind die angewandten Bedingungen ebenfalls für eine Hybridisierung des Promotor-Polynukleotids an das verdrängte abgespaltene erste Primer-Extensionsprodukt, Extension des 3'-Endes des abgespaltenen ersten Primer-Extensionsprodukts (falls erforderlich), um eine doppelsträngige Promotorregion zu erzeugen, und eine von dem Promotor gesteuerte RNA-Transkription geeignet.

[0083] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung einzelsträngiger Antisense- und Sense-DNA-Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse unter Verwendung eines ersten zusammengesetzten Primers, eines zweiten zusammengesetzten Primers (als der „reverse zusammengesetzte“ Primer bezeichnet) und eines Ziel-RNA-Fragments bereit. Das Verfahren umfasst folgendes: (a) Bildung einer doppelsträngigen cDNA, umfassend einen RNA-DNA-Heteroduplex an jedem Ende der doppelsträngigen cDNA; und (b) die lineare Amplifikation der Erststrang-(Sense)-cDNA und Zweitstrang-(Antisense)-cDNA durch eine Primerextension von zwei zusammengesetzten Primern und Strangverdrängung. Das einzelsträngige Produkt der Erst- und Zweitstrang-cDNA wird erzeugt. Dieses Produkt ist z.B. für die Erzeugung von cDNA-Bibliotheken zweckdienlich. Es ist bei diesem Aspekt der Erfindung offensichtlich, dass das Extensionsprodukt des zweiten Primers von einem zusammengesetzten Primer gestartet wird.

[0084] Die Verfahren der Erfindung umfassen Verfahren, die amplifizierte Produkte nutzen, (sogenannte „Anwendungen“). In einigen Anwendungsformen stellt die Erfindung Verfahren zur Sequenzierung von RNA-Sequenzen bereit. Für Sequenzierungsverfahren, die auf hier beschriebene Verfahren beruhen, wo DNA das amplifizierte Produkt ist, werden geeignete dNTPs oder Analoga davon, die markiert oder unmarkiert sein können, verwendet. Für Sequenzierungsverfahren, die auf hier beschriebene Verfahren beruhen, wo RNA das amplifizierte Produkt ist, werden geeignete rNTPs oder Analoga davon, die markiert oder unmarkiert sein können, verwendet.

[0085] In anderen Anwendungsformen stellt die Erfindung Verfahren zum Nachweis von Mutationen der Nukleinsäuresequenz bereit. In einer Anwendungsform werden die amplifizierten Produkte verwendet, um einen Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus nachzuweisen und/oder zu identifizieren.

[0086] Die Erfindung stellt Verfahren zur Charakterisierung (zum Beispiel Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von und/oder Quantifizierung) einer RNA-Sequenz von Interesse durch Erzeugung von DNA- oder RNA-Produkten unter Anwendung von Amplifikationsverfahren der Erfindung und Analyse der Produkte mit Nachweis/Quantifizierungsverfahren bereit, wie diejenigen, die auf Array-Technologien oder Flüssigphasen-Technologien basieren. Diese amplifizierten Produkte können markiert oder unmarkiert sein.

[0087] In einer noch weiteren Anwendungsform stellt die Erfindung Verfahren zum Immobilisieren von Nukleinsäuren bereit, einschließlich Verfahren zur Herstellung von Mikroarrays von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) unter Verwendung von amplifizierten Produkten der Amplifikationsverfahren der Erfindung.

[0088] In einer weiteren Anwendungsform stellt die Erfindung Verfahren zur Erzeugung von cDNA-Bibliotheken, Verfahren zur Erzeugung subtraktiver Hybridisierungs sonden und Verfahren zur Erzeugung subtraktiver Hybridisierungsbibliotheken bereit.

[0089] Verschiedene Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Genexpressionslevels sind in den letzten Jahren entwickelt worden. Zum Beispiel ermöglichen Mikroarrays, in denen entweder definierte cDNAs oder Oligonukleotide an diskreten Stellen, zum Beispiel auf festen oder halbfesten Substraten oder auf definierten Partikeln immobilisiert sind, den Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung der Expression einer Vielzahl an Genen in einer gegebenen Probe.

[0090] Die Anwendung dieser bereits bekannten Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit von und/oder zur Quantifizierung vieler mRNA-Spezies in einer Probe, die wiederum als Maß des Genexpressionsprofilings verwendet wird, erfordert im Allgemeinen ein direktes Markieren von cDNA, das eine große Menge von einzusetzender Gesamt-RNA erfordert, zum Teil weil die mRNA nur eine kleine Teilmenge des Gesamt-RNA-Pools darstellt. Wenn Gesamt-RNA-Präparate von einer gegebenen Zell- oder Gewebeprobe verwendet werden, erfordert folglich die Analyse der Genexpression in der Probe unter Anwendung von Verfah-

ren, wie Arrays, eine wesentliche Menge an einzusetzender RNA, die im Allgemeinen im Bereich von 50 bis 200 µg liegt. Ähnlicherweise wären im Allgemeinen 2 bis 5 µg mRNA, aus einem Gesamt-RNA-Präparat aufgereinigt, für eine einzige Analyse des Genexpressionsprofils bei Anwendung von Array-Technologien erforderlich. Dies bedeutet eine eindeutige Beschränkung für solche Verfahren, die auf der Array-Technologie basieren, insofern als die benötigte Zellzahl oder Größe der Gewebeprobe sehr groß ist und diese Zell- oder Gewebeproben oftmals kaum für ein Testen zur Verfügung stehen oder zu wertvoll sind. Diese Beschränkung ist besonders bei der Untersuchung klinischer Proben, wo die zu untersuchenden Zellen selten und/oder schwierig in vitro zu kultivieren sind, und bei Hochdurchsatz-Durchmusterung von Bibliotheken von Effektormolekülen besonders besauerlich. Ebenfalls sind die vorigen Transkriptions-gestützten Verfahren der Amplifikation von mRNA (zum Beispiel in Lockhart et al., *Nature Biotechnology* (1996), 14, 1675-1680); van Gelder et al., U.S. Patent Nr. 5.716.783, beschrieben) hinsichtlich der Amplifikationseffizienz von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen begrenzt und einige dieser Verfahren erfordern mehrere Schritte. Darüber hinaus ist der Prozess, bei dem die Polymerase-Promotorsequenz eingebaut wird, für eine unspezifische Amplifikation anfällig.

[0091] Die Verfahren der Erfindung bieten die Möglichkeit, mRNA unter Bedingungen zu amplifizieren, die für eine hochspezifische Ziel-Amplifikation sorgen, und geben im Allgemeinen die Verteilung der eingesetzten RNA wieder. Folglich sollte der Nutzen der Nachweis/Quantifizierungsverfahren stark verbessert sein, die mit den Amplifikationsprodukten angewandt werden können, wie diejenigen Verfahren, die auf der leistungsfähigen Array-Technologie, Echtzeit-PCR, quantitativen TaqMan, quantitativen PCR unter Verwendung von molekularen Leuchtsignalen und dergleichen basieren.

[0092] Der lineare Aspekt der Amplifikationsverfahren der Erfindung wächst signifikant mit der Spezifität der Ziel-Amplifikation. Da die Erzeugung vielfacher Kopien einer Sequenz von Interesse von einer zyklischen, exponentiellen Amplifikation von Amplifikationsprodukten weder abhängig ist noch darauf beruht, ist die Spezifität von der erhaltenen Produkten stark verbessert. Die Verteilung der verschiedenen Spezies amplifizierter Produkte gibt im Allgemeinen die Verteilung der eingesetzten RNA wieder.

[0093] Die Verfahren der Erfindung erfordern keine Thermozyklisierung und die gesamten Schritte können isotherm ausgeführt werden, obwohl die verschiedenen Schritte bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt werden können. Dieses Merkmal liefert zahlreiche Vorteile, einschließlich einer Erleichterung der Automatisierung und Anpassung für Hochdurchsatzverfahren. Die isotherme Reaktion ist schneller als die Reaktion, die mit Hilfe einer Thermozyklisierung erhalten wird, und ist für die Durchführung der Verfahren der Erfindung in miniaturisierten Vorrichtungen geeignet.

[0094] Der intermediäre doppelsträngige cDNA-Komplex, umfassend einen RNA/DNA-Heteroduplex, liefert ein Substrat für eine lineare Amplifikation. Die Abspaltung des RNA-Abschnitts vom RNA/DNA-Heteroduplex lässt eine weitere Amplifikation zu, ohne den intermediären doppelsträngigen cDNA-Komplex denaturieren zu müssen. Darüber hinaus ist es weniger wahrscheinlich, dass die Sekundärstruktur eines einzelsträngigen Templates mit der nachfolgenden Amplifikation interferiert, da der abgespaltene doppelsträngige cDNA-Komplex größtenteils doppelsträngig ist.

[0095] Schließlich erzeugen die meisten Verfahren der Erfindung Produkte, die einzelsträngig sind, was sie für ein Binden an Sonden zugänglicher macht, entweder auf homogene Weise, d.h. in Lösung, oder für ein Binden an Sonden, die auf festen Trägern immobilisiert sind. Die doppelsträngigen Produkte der Verfahren der Erfindung sind, zum Beispiel für die Herstellung von DNA-Bibliotheken, zweckdienlich.

[0096] Die Fähigkeit zur effizienten Amplifikation von mRNA (oder jeder anderen erwünschten RNA-Spezies oder Population) unter Bedingungen, die für eine hochspezifische Ziel-Amplifikation sorgen und die im Allgemeinen die Repräsentation der verschiedenen mRNA-Spezies in dem Präparat nicht verändern, verbessert sehr stark den Nutzen der Nachweis/Quantifizierungsverfahren, wie derjenigen Verfahren, die auf einer leistungsfähigen Array-Technologie gestützt sind.

Allgemeine Techniken

[0097] Bei der praktischen Umsetzung der Erfindung werden, außer anderes ist angegeben, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie (einschließlich rekombinanter Techniken), Mikrobiologie, Zellbiologie, Biochemie und Immunologie eingesetzt, die im Rahmen der Fachkenntnisse liegen. Derartige Techniken sind in der Literatur, wie „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, zweite Ausgabe (Sambrook et al., 1989); „Oligonucleotide Synthesis“ (M. J. Gait, ed., 1984); „Animal Cell Culture“ (R. I. Freshney, ed., 1987); „Methods in Enzymology“ (Academic Press, Inc.); „Current Protocols in Molecular Biology“ (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, und

regelmäßige Aktualisierungen); „PCR: The Polymerase Chain Reaction“, (Mullis et al., eds. 1994). umfassend beschrieben.

[0098] In der Erfindung eingesetzte Primer, Oligonukleotide und Polynukleotide können unter Anwendung in der Technik bekannter Standardtechniken hergestellt werden.

Definitionen

[0099] Eine „Zielsequenz“, „Zielnukleinsäure“ oder „Ziel-RNA“, wie hier verwendet, ist ein Polynukleotid, umfassend eine Sequenz von Interesse, für die eine Amplifikation erwünscht ist. Die Zielsequenz kann, bezüglich ihrer tatsächlichen Sequenz, eine bekannte oder unbekannte Sequenz sein. In einigen Fällen werden die Ausdrücke „Ziel“, „Template“ oder Variationen davon austauschbar verwendet.

[0100] „Amplifikation“ oder „Amplifizieren“, wie hier verwendet, bezeichnet im Allgemeinen den Prozess der Erzeugung vielfacher Kopien einer erwünschten Sequenz. „Vielfache Kopien“ bedeutet wenigstens 2 Kopien. Eine „Kopie“ bedeutet nicht notwendigerweise vollkommene Sequenzkomplementarität oder -identität zu der Sequenz des Templates. Zum Beispiel können Kopien Nukleotidanaloga, wie Desoxyinosin, beabsichtigte Sequenzänderungen (wie Sequenzänderungen, die durch einen Primer eingeführt sind, der eine Sequenz umfasst, die an das Template hybridisierbar ist, aber nicht zu diesem komplementär ist, oder eine Nichtzielsequenz, die durch einen Primer eingeführt ist) und/oder Sequenzfehler, die während der Amplifikation erfolgen, umfassen. Das „Amplifizieren“ einer Sequenz kann im Allgemeinen die Herstellung von Kopien einer Sequenz oder ihres Komplements bezeichnen, unter der Bedingung, dass, wie oben angeführt, das Kopieren nicht notwendigerweise eine vollkommene Sequenzkomplementarität oder -identität bezüglich der Templatesequenz bedeutet.

[0101] „Polynukleotid“ oder „Nukleinsäure“, wie hier austauschbar verwendet, bezeichnen Polymere von Nukleotiden einer beliebigen Länge und umfassen DNA und RNA. Die Nukleotide können Desoxyribonukleotide, Ribonukleotide, modifizierte Nukleotide oder Basen und/oder ihre Analoga oder ein beliebiges Substrat sein, das in ein Polymer von einer DNA- oder RNA-Polymerase eingebaut werden kann. Ein Polynukleotid kann modifizierte Nukleotide, wie methylierte Nukleotide und ihre Analoga, umfassen. Sofern vorhanden, kann eine Modifikation der Nukleotidstruktur vor oder nach dem Zusammenfügen des Polymers erfolgen. Die Sequenz der Nukleotide kann durch Nichtnukleotid-Komponenten unterbrochen sein. Außerdem kann ein Polynukleotid nach einer Polymerisation, wie durch Konjugation mit einer markierenden Komponente, modifiziert werden. Weitere Arten von Modifikationen umfassen zum Beispiel „Caps“, eine Substitution eines oder mehrerer natürlich vorkommender Nukleotide mit einem Analogon, Internukleotidmodifikationen, wie zum Beispiel solche mit ungeladenen Bindungen (z.B. Methylphosphonate, Phosphotriester, Phosphoamidate, Carbamate, etc.) und mit geladenen Bindungen (z.B. Phosphorthioate, Phosphordithioate, etc.), solche, die Pendant-Komponenten enthalten, zum Beispiel Proteine (z.B. Nukleasen, Toxine, Antikörper, Signalpeptide, Poly-L-Lysin, etc.), solche mit interkalierenden Substanzen (z.B. Acridin, Psoralen, etc.), solche, die Chelatoren enthalten (z.B. Metalle, radioaktive Metalle, Bor, oxidative Metalle, etc.), solche, die Alkylatoren enthalten, solche mit modifizierten Bindungen (z.B. alpha anomere Nukleinsäuren, etc.), wie auch nichtmodifizierte Formen des oder der Polynukleotide. Außerdem kann jede beliebige Hydroxylgruppe, die normalerweise in den Zuckern vorhanden ist, ersetzt werden durch beispielsweise Phosphonatgruppen, Phosphatgruppen, die mit Standardschutzgruppen geschützt werden, oder aktiviert werden, um weitere Bindungen zu zusätzlichen Nukleotiden herzustellen, oder an feste Träger gebunden werden können. Die 5'- und 3'-terminale OH-Gruppe kann phosphoryliert oder mit Aminen oder organischen Capping-Gruppenresten mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen substituiert werden. Weitere Hydroxyle können ebenfalls zu Standardschutzgruppen derivatisiert werden. Polynukleotide können ebenfalls analoge Formen von Ribose- oder Desoxyribosezuckern enthalten, die im Allgemeinen in der Technik bekannt sind, einschließlich zum Beispiel 2'-O-Methyl-, 2'-O-Allyl-, 2'-Fluor- oder 2'-Azidoribose, carbocyclischer Zuckeranaloga, α -anomerer Zucker, epimerer Zucker, wie Arabinose, Xylosen oder Lyxosen, Pyranosezucker, Furanosezucker, Sedoheptulosen, acyclischer Analoga und abasischer Nukleosidanaloga, wie Methylribosid. Eine oder mehrere Phosphodiesterbindungen können durch alternative bindende Gruppen ersetzt sein. Diese alternativen bindenden Gruppen umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, Anwendungsformen, wo Phosphat durch P(O)S („Thioat“), P(S)S („Dithioat“), (O)NR₂ („Amidat“), P(O)R, P(O)OR', CO oder CH₂ (Formacetal) ersetzt ist, in denen jeweils R oder R' unabhängig voneinander H oder substituiertes oder unsubstituiertes Alkyl (1-20 C), das gegebenenfalls eine Ether(-O)-Bindung enthält, Aryl, Alkenyl, Cycloalkyl, Cycloalkenyl oder Araldyl ist. Nicht alle Bindungen in einem Polynukleotid müssen identisch sein. Die vorangehende Beschreibung ist auf alle hier genannten Polynukleotide anwendbar, einschließlich RNA und DNA.

[0102] Ein „markiertes dNTP“ oder „markiertes rNTP“, wie hier verwendet, bezeichnet ein dNTP oder rNTP

oder Analoga davon, das an eine Markierung direkt oder indirekt gebunden ist. Zum Beispiel kann ein „markiertes“ dNTP oder rNTP zum Beispiel mit einem Farbstoff und/oder einer detektierbaren Komponente, wie einem Element eines spezifischen bindenden Paares (wie Biotin-Avidin), direkt markiert sein. Ein „markiertes“ dNTP oder rNTP kann ebenfalls indirekt über seine Befestigung an, zum Beispiel eine Komponente, an die eine Markierung angeheftet ist/sein kann, markiert sein. Ein dNTP oder rNTP kann einen Molekülrest (zum Beispiel eine Aminogruppe) umfassen, an den eine Markierung nach dem Einbau des dNTP oder rNTP in ein Extensionsprodukt angeheftet wird. Zweckdienliche Markierungen in der vorliegenden Erfindung umfassen fluoreszierende Farbstoffe (z.B. Fluoresceinisothiocyanat, Texas Red, Rhodamin, grün fluoreszierendes Protein und dergleichen), Radioisotope (z.B. ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I oder ^{14}C), Enzyme (z.B. LacZ, Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase), Digoxigenin und kolorimetrische Markierungen, wie kolloidales Gold oder farbige Glas- oder Kunststoffkügelchen (z.B. aus Polystyrol, Polypropylen, Latex, etc.). Verschiedene Antiliganden und Liganden können verwendet werden (als Markierungen selbst oder als ein Mittel zum Anheften einer Markierung). Im Falle eines Liganden, der einen natürlichen Antiligand besitzt, wie Biotin, Thyroxin und Cortisol, kann der Ligand zusammen mit markierten Antiliganden verwendet werden.

[0103] Der „Typ“ dNTP oder rNTP, wie hier verwendet, bezeichnet die bestimmte Base eines Nukleotids, nämlich Adenin, Cytosin, Thymin, Uridin oder Guanin.

[0104] „Oligonukleotid“, wie hier verwendet, bezeichnet im Allgemeinen kurze, im Allgemeinen einzelsträngige, im Allgemeinen synthetische Polynukleotide, die im Allgemeinen, aber nicht notwendigerweise, weniger als 200 Nukleotide lang sind. Oligonukleotide in der Erfindung umfassen zusammengesetzte Primer und Propromotor-Polynukleotide (wie das PTO). Die Ausdrücke „Oligonukleotid“ und „Polynukleotid“ schließen sich gegenseitig nicht aus. Die obere Beschreibung für Polynukleotide ist für Oligonukleotide gleich und voll anwendbar.

[0105] Ein „Primer“, wie hier verwendet, bezeichnet eine Nukleotidsequenz, im Allgemeinen mit einer freien 3'-OH-Gruppe, die mit einer Templatesequenz (wie einer Ziel-RNA, oder einem Primer-Extensionsprodukt) hybridisiert und die Fähigkeit besitzt, die Polymerisierung eines Polynukleotids zu fördern, das zum Template komplementär ist. Ein „Primer“ kann zum Beispiel ein Oligonukleotid sein. Er kann ebenfalls zum Beispiel eine Sequenz des Templates (wie ein Primer-Extensionsprodukt oder ein Fragment des Templates, das nach einer RNase-Spaltung eines Template-DNA-Komplexes gebildet wird) sein, die an eine Sequenz in dem Template selbst (zum Beispiel als eine Haarnadelschleife) hybridisiert wird, und die die Fähigkeit besitzt, eine Nukleotidpolymerisierung zu fördern. Folglich kann ein Primer ein exogener Primer (d.h. zugefügter Primer) oder ein endogener Primer (z.B. Template-Fragment) sein.

[0106] Ein „Zufallsprimer“, wie hier verwendet, ist ein Primer, der eine Sequenz umfasst, die nicht notwendigerweise basierend auf einer bestimmten oder spezifischen Sequenz in einer Probe, sondern eher basierend auf einer statistischen Erwartung (oder einer empirischen Beobachtung) konstruiert ist, so dass die Sequenz des Zufallsprimers an eine oder mehrere Sequenzen in der Probe (unter einer gegebenen Reihe an Bedingungen) hybridisierbar ist. Die Sequenz eines Zufallsprimers (oder seines Komplements) kann eine natürlich vorkommende Sequenz sein oder nicht, oder kann in einem Pool von Sequenzen in einer Probe von Interesse vorkommen oder nicht. Die Amplifikation einer Vielzahl an RNA-Spezies in einem einzigen Reaktionsgemisch würde im Allgemeinen, aber nicht notwendigerweise, eine Vielzahl, bevorzugt eine große Vielzahl, an Zufallsprimern verwenden. Wie es in der Technik verstanden wird, kann ein „Zufallsprimer“ ebenfalls einen Primer bezeichnen, der ein Element einer Population von Primern ist (eine Vielzahl an Zufallsprimern), die insgesamt konstruiert sind, um an eine erwünschte und/oder eine signifikante Anzahl an Zielsequenzen zu hybridisieren. Ein Zufallsprimer kann an viele Stellen auf einer Nukleinsäuresequenz hybridisieren. Die Verwendung von Zufallsprimern stellt ein Verfahren zur Erzeugung von Primer-Extensionsprodukten bereit, die zu einem Zielpolynukleotid komplementär sind, wobei das Verfahren nicht die vorherige Kenntnis der genauen Sequenz des Ziels erfordert.

[0107] „Protopromotorsequenz“ und „Propromotorsequenz“, wie hier verwendet, bezeichnet eine einzelsträngige DNA-Sequenzregion, die in doppelsträngiger Form in der Lage ist, die RNA-Transkription zu vermitteln. In manchen Zusammenhängen werden „Protopromotorsequenz“, „Protopromotor“, „Propromotorsequenz“, „Propromotor“, „Promotorsequenz“ und „Promotor“ austauschbar verwendet.

[0108] Ein „Propromotor-Polynukleotid“, wie hier verwendet, bezeichnet ein Polynukleotid, umfassend eine Propromotorsequenz. Beispiele für ein Propromotor-Polynukleotid ist ein Propromotor-Template-Oligonukleotid (PTO).

[0109] „Propromotor-Template-Oligonukleotid (PTO)" und „Promotor-Template-Oligonukleotid (PTO)", wie hier verwendet, bezeichnen ein Oligonukleotid, das eine Propromotorsequenz und einen Abschnitt, im Allgemeinen einen 3'-Abschnitt, umfasst, der (unter einer gegebenen Reihe an Bedingungen) an die 3'-Region eines Primer-Extensionsprodukts hybridisierbar ist. Die Propromotorsequenz und der hybridisierbare Abschnitt können die gleichen, unterschiedliche oder überlappende Nukleotide eines Oligonukleotids sein.

[0110] „Hemmen" heißt Vermindern oder Reduzieren einer Aktivität, Funktion und/oder Menge im Vergleich mit einer Referenz.

[0111] Ein „Komplex" ist eine Zusammenlagerung von Komponenten. Ein Komplex kann stabil sein oder nicht und kann direkt oder indirekt nachgewiesen werden. Wie es hier beschrieben ist, kann zum Beispiel aus bestimmten gegebenen Komponenten einer Reaktion und der Art des Produkts oder der Produkte der Reaktion das Vorliegen eines Komplexes gefolgert werden. Im Sinne der Erfindung ist ein Komplex im Allgemeinen ein Intermediat bezüglich des/der Endprodukte der Amplifikation. Ein weiteres Beispiel für einen Komplex ist ein Nukleinsäureduplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt.

[0112] Ein „Abschnitt" oder eine „Region", wie hier austauschbar verwendet, eines Polynukleotids oder Oligonukleotids ist eine zusammenhängende Sequenz aus zwei oder mehr Basen. In anderen Anwendungsformen besteht eine Region oder ein Abschnitt aus wenigstens etwa 3, 5, 10, 15, 20, 25 zusammenhängenden Nukleotiden.

[0113] Eine Region, ein Abschnitt oder eine Sequenz, der/die zu einer anderen Sequenz „benachbart" ist, grenzt direkt an diese Region, Abschnitt oder Sequenz. Zum Beispiel grenzt ein RNA-Abschnitt, der zu einem 5'-DNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers benachbart ist, direkt an diese Region. Zur Veranschaulichung dieses Beispiels siehe [Fig. 1A](#) und [Fig. 2A](#).

[0114] Ein „Reaktionsgemisch" ist ein Gemenge von Komponenten, die unter geeigneten Bedingungen reagieren, um einen Komplex (der ein Intermediat sein kann) und/oder ein Produkt(e) zu bilden.

[0115] „Ein", „eine" und „der", „die", „das" und dergleichen schließen die Pluralformen mit ein, außer anderes ist angegeben. „Ein" Fragment bedeutet ein oder mehrere Fragmente.

[0116] „Umfassen" heißt einschließen.

[0117] Bedingungen, die ein zu geschehendes Ereignis „zulassen", oder Bedingungen, die für ein zu geschehendes Ereignis „geeignet" sind, wie Hybridisierung, Strangextension und dergleichen, oder „geeignete" Bedingungen sind Bedingungen, die nicht verhindern, dass ein derartiges Ereignis eintritt. Folglich erlauben, verstärken, fördern diese Bedingungen das Ereignis und/oder sind ihm dienlich. Derartige Bedingungen, die in der Technik bekannt und hier beschrieben sind, hängen zum Beispiel von der Art der Nukleotidsequenz, Temperatur und Pufferbedingungen ab. Diese Bedingungen sind ebenfalls davon abhängig, welches Ereignis, wie Hybridisierung, Spaltung, Strangextension oder Transkription erwünscht ist.

[0118] Eine „Mutation" einer Sequenz, wie hier verwendet, bezeichnet eine beliebige Sequenzänderung in einer Sequenz von Interesse im Vergleich mit einer Referenzsequenz. Eine Referenzsequenz kann eine Wildtyp-Sequenz oder eine Sequenz sein, mit der man eine Sequenz von Interesse vergleichen möchte. Eine Sequenzmutation umfasst einzelne Nukleotidänderungen oder Änderungen von mehr als einem Nukleotid in einer Sequenz aufgrund von Mechanismen, wie eine Substitution, Transversion, Deletion oder Insertion. Ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP), wie hier verwendet, ist ebenfalls eine Sequenzmutation.

[0119] „Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus" und „SSCP", wie hier verwendet, bezeichnen im Allgemeinen die spezifische Konformation einer einzelsträngigen Nukleinsäure, wie sie durch ihre spezifische Nukleinsäuresequenz beeinflusst wird. Eine Änderung der Sequenz des einzelsträngigen Polynukleotids, wie eine einzelne Nukleotidsubstitutionen, -deletionen oder -insertionen führen zu einer Änderung oder einem Polymorphismus der Konformation des einzelsträngigen Polynukleotids. Die Konformation des Polynukleotids ist im Allgemeinen nachweisbar, identifizierbar und/oder unterscheidbar mit Hilfe in der Technik bekannter Verfahren, wie elektrophoretische Mobilität, wie sie mit Gelelektrophorese, Kapillarelektrophorese und/oder Empfindlichkeit für einen Endonuklease-Verdau bestimmt wird.

[0120] „Mikroarray" und „Array", wie hier austauschbar verwendet, umfassen eine Oberfläche mit einem Ar-

ray, vorzugsweise einem geordneten Array, von mutmaßlichen bindenden Stellen (z.B. durch Hybridisierung) für eine biochemische Probe (Ziel), das oftmals unbestimmte Charakteristika aufweist. In einer bevorzugten Anwendungsform bezeichnet Mikroarray eine Ansammlung verschiedener Polynukleotid- oder Oligonukleotidsonden, die an definierten Positionen auf einem Substrat immobilisiert sind. Arrays werden auf Substraten gebildet, die aus Materialien wie Papier, Glas, Kunststoff (z.B. Polypropylen, Nylon, Polystyrol), Polyacrylamid, Nitrocellulose, Silikon, optischer Faser oder einem beliebigen anderen geeigneten festen oder halbfesten Träger hergestellt sind und in planarer (z.B. Glasplatten, Siliziumchips) oder dreidimensionaler (z.B. Nadeln, Fasern, Kügelchen, Partikel, Mikroplattenvertiefungen, Kapillaren) Konfiguration vorliegen. Die Arrays bildende Sonden können an das Substrat mit Hilfe zahlreicher Möglichkeiten gebunden werden, einschließlich (i) in situ Synthese (z.B. hochdichte Oligonukleotid-Arrays) unter Anwendung photolithographischer Techniken (siehe Fodor et al., *Science* (1991), 251:767-773; Pease et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994), 91:5022-5026; Lockhart et al., *Nature Biotechnology* (1996), 14:1675; U.S. Pat. Nr. 5.578.832; 5.556.752 und 5.510.270); (ii) Spotting/Printing mit mittlerer bis geringer Dichte (z.B. cDNA-Sonden) auf Glas, Nylon oder Nitrocellulose (Skena et al., *Science* (1995), 270:467-470; DeRisi et al., *Nature Genetics* (1996), 14:457-460; Shalon et al., *Genome Res.* (1996), 6:639-645 und Skena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995), 93:10539-11286); (iii) mittels Maskieren (Maskos und Southern, *Nuc. Acids. Res.* (1992), 20:1679-1684) und (iv) mittels Dot-Blotting auf eine Nylon- oder Nitrocellulose-Hybridisierungsmembran (siehe z.B. Sambrook et al., eds., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y.)). Sonden können ebenfalls auf dem Substrat mittels Hybridisierung an Ankern, mit Hilfe von magnetischen Kügelchen oder in flüssiger Phase, wie in einer Mikroplattenvertiefung oder Kapillaren, nichtkovalent immobilisiert sein. Die Sondenmoleküle sind im Allgemeinen Nukleinsäuren, wie DNA, RNA, PNA und cDNA, können aber ebenfalls Proteine, Polypeptide, Oligosaccharide, Zellen, Gewebe und beliebige Permutationen davon sein, welche die Zielmoleküle spezifisch binden können.

[0121] Der Ausdruck „3“ bezeichnet im Allgemeinen eine Region oder Position in einem Polynukleotid oder Oligonukleotid 3' (stromabwärts) von einer anderen Region oder Position im selben Polynukleotid oder Oligonukleotid.

[0122] Der Ausdruck „5“ bezeichnet im Allgemeinen eine Region oder Position in einem Polynukleotid oder Oligonukleotid 5' (stromaufwärts) von einer anderen Region oder Position im selben Polynukleotid oder Oligonukleotid.

[0123] Die Ausdrücke „3'-DNA-Abschnitt“, „3'-DNA-Region“, „3'-RNA-Abschnitt“ und „3'-RNA-Region“ bezeichnen den Abschnitt oder die Region eines Polynukleotids oder Oligonukleotids, der/die in Richtung des 3'-Endes des Polynukleotids oder Oligonukleotids liegt und die äußersten 3'-Nukleotide oder Reste umfassen können oder nicht umfassen können, die an das äußerste 3'-Nukleotid des gleichen Polynukleotids oder Oligonukleotids gebunden sind. Die äußersten 3'-Nukleotide können bevorzugt etwa 1 bis etwa 50, bevorzugter etwa 10 bis etwa 40, noch bevorzugter etwa 20 bis etwa 30 Nukleotide umfassen.

[0124] Die Ausdrücke „5'-DNA-Abschnitt“, „5'-DNA-Region“, „5'-RNA-Abschnitt“ und „5'-RNA-Region“ bezeichnen den Abschnitt oder die Region eines Polynukleotids oder Oligonukleotids, der/die in Richtung des 5'-Endes des Polynukleotids oder Oligonukleotids liegt und die äußersten 5'-Nukleotide oder Reste umfassen können oder nicht umfassen können, die an das äußerste 5'-Nukleotid des gleichen Polynukleotids oder Oligonukleotids gebunden sind. Die äußersten 5'-Nukleotide können bevorzugt etwa 1 bis etwa 50, bevorzugter etwa 10 bis etwa 40, noch bevorzugter etwa 20 bis etwa 30 Nukleotide umfassen.

[0125] Der Fachmann versteht unter einer „Schwanz“-Sequenz eines Primers eine Sequenz, die nicht an die Zielsequenz unter den Bedingungen hybridisiert, unter denen andere Regionen oder Abschnitte des Primers an das Ziel hybridisieren.

[0126] „Abwesend“ oder „Abwesenheit“ eines Produkts und „fehlender Nachweis eines Produkts“, wie hier verwendet, umfasst unwesentliche oder minimale Levels, im Allgemeinen aufgrund einer ausbleibenden signifikanten Anhäufung des Produkts durch die Zyklisierung.

Amplifikationsverfahren der Erfindung

[0127] Nachfolgend werden Beispiele der Amplifikationsverfahren der Erfindung angeführt. Es versteht sich, dass verschiedene weitere Anwendungsformen praktisch umgesetzt werden können, die in der oben gegebenen allgemeinen Beschreibung aufgeführt sind. Zum Beispiel bedeutet die Bezugnahme auf die Verwendung eines zusammengesetzten Primers, dass ein beliebiger der hier beschriebenen zusammengesetzten Primer

verwendet werden kann.

[0128] Mit einem Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer Polynukleotid-(DNA)-Sequenz, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers und eines zweiten Primers bereitgestellt. In diesem Verfahren wird eine isotherme lineare Nukleinsäuresequenz-Amplifikation unter Verwendung zweier Primer (eines zusammengesetzten Primers und eines zweiten Primers) und Strangverdrängung erreicht. In einigen Anwendungsformen ist ein Transkriptionsschritt (d.h. ein „verstärktes“ Verfahren) mit eingeschlossen und das amplifizierte Produkt wird in Form einer Sense-RNA erzeugt.

[0129] Mit einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien (Amplifizierung) einer DNA-Sequenz, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, unter Verwendung eines einzigen Primers (welcher ein zusammengesetzter Primer ist) bereitgestellt. In diesem Verfahren wird eine isotherme lineare Nukleinsäuresequenz-Amplifikation unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers, eines Fragments einer Ziel-RNA (welche als ein endogener Primer dient) und einer Strangverdrängung erreicht. In einigen Anwendungsformen ist ein Transkriptionsschritt (d.h. ein „verstärktes“ Verfahren) mit eingeschlossen und das amplifizierte Produkt wird in Form einer Sense-RNA erzeugt.

[0130] Wie hier beschrieben, können die Amplifikationsverfahren der Erfindung außerdem einen Transkriptionsschritt umfassen. Falls ein Primer-Extensionsprodukt, das transkribiert werden soll, eine Propromotorsequenz umfasst, wird im Allgemeinen eine doppelsträngige Promotorregion durch Hybridisieren eines Polynukleotids, umfassend einen Propromotor (hier ebenfalls als „Propromotor-Polynukleotid“ bezeichnet), an das Primer-Extensionsprodukt erzeugt. Falls ein Primer-Extensionsprodukt keine erwünschte Propromotorsequenz umfasst, ist der Transkriptionsschritt im Allgemeinen von dem Einbau einer RNA-Polymerase-Propromotorsequenz mit Hilfe eines Propromotor-Polynukleotids, wie eines Promotorsequenz-Oligonukleotids (PTO), abhängig. Ein Propromotor-Polynukleotid, wie das PTO, kann als ein Template für eine Extension eines einzelsträngigen Primer-Extensionsprodukts und Bildung eines partiellen Duplexes dienen, der einen doppelsträngigen Promotor an einem Ende umfasst. Die Fähigkeit, das einzelsträngige Produkt an das Propromotor-Polynukleotid (wie ein PTO) zu hybridisieren, wird im Allgemeinen durch die Bildung eines Primer-Extensionsprodukts mit einer definierten 3'-Endsequenz erreicht, die zu der 3'-Endsequenz des Propromotor-Polynukleotids komplementär ist.

[0131] Ein Aspekt der Verfahren der Erfindung umfasst die Gestaltung von Primern, die in der Lage sind, an RNA-Sequenzen zu hybridisieren, wie beispielsweise eine Vielzahl an RNA-Sequenzen, für eine Initiation der Primerextension und Erzeugung von Amplifikationssubstraten und -produkten.

Lineare Nukleinsäuresequenz-Amplifikation unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers und eines zweiten Primers

[0132] Die Erfindung stellt Verfahren zum Amplifizieren einer RNA-Sequenz von Interesse unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers und eines zweiten Primers und Strangverdrängung bereit. Die Amplifikation mit diesen Verfahren ist linear und kann isotherm durchgeführt werden. In Anwendungsformen, die keinen Transkriptionsschritt umfassen, sind die amplifizierten Produkte einzelsträngige DNA, umfassend Sequenzen, die zu RNA-Sequenzen von Interesse in der Ziel-RNA komplementär sind. In Anwendungsformen, die eine Transkription umfassen, sind die amplifizierten Produkte Sense-RNA-Kopien der RNA-Sequenz von Interesse in der Ziel-RNA.

[0133] Eine schematische Beschreibung einer Anwendungsform der Verfahren, die auf dem zusammengesetzten Primer, zweiten Primer und Strangverdrängung basieren, ist in [Fig. 1A](#)-B und [Fig. 2A](#)-C gegeben. [Fig. 1A](#)-B veranschaulichen ein nicht verstärktes lineares Verfahren. [Fig. 2A](#)-C veranschaulichen ein verstärktes Verfahren (d.h. einschließlich Transkriptionsschritt). Die Verfahren umfassen die folgenden Schritte: (a) Bildung einer Zweitstrang-cDNA, der den gleichen Sinn wie die eingesetzte RNA besitzt; (b) lineare Amplifikation des Komplements eines Zweitstrang-cDNA-Strangs mittels Primerextension (von einem zusammengesetzten Primer) entlang der Zweitstrang-cDNA und Strangverdrängung; und in dem verstärkten Verfahren (c) Transkription des Produkts des linearen Amplifikationsschritts, um vielfache Kopien von Sense-RNA-Produkten zu erzeugen. Wie gezeigt, sind alle Schritte isotherm, obwohl die Temperaturen für jeden Schritt gleich oder verschieden sein können.

[0134] Die in [Fig. 1A](#)-B gezeigte Anwendungsform verwendet zwei Oligonukleotide: einen zusammengesetzten Primer (als 1 bezeichnet), der für die Amplifikation verwendet wird, und einen zweiten Primer (als 2 be-

zeichnet), der für die Bildung der Sense-Komplement-DNA (cDNA) (austauschbar „zweites Extensionsprodukt“ oder „Zweitstrang-cDNA“ genannt) verwendet wird. Die in [Fig. 2A-C](#) gezeigte Anwendungsform verwendet drei Oligonukleotide: einen zusammengesetzten Primer (als 1 bezeichnet), der für die Amplifikation verwendet wird, einen zweiten Primer (als 2 bezeichnet), der für die Bildung der Zweitstrang-(Sense)-cDNA verwendet wird; und ein Polynukleotid, umfassend eine Propromotorsequenz einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase, d.h. ein Promotor-Template-Oligonukleotid (PTO) (als 3 bezeichnet).

[0135] Der 3'-Abschnitt des zusammengesetzten Primers kann auf mehrere Weisen konstruiert werden (bezüglich der Sequenz), abhängig davon, welcher Typ, Klasse, Population und/oder Spezies an RNA amplifiziert werden soll. In einigen Anwendungsformen umfasst der 3'-Abschnitt des zusammengesetzten Primers 1, wie in [Fig. 1](#) und [2](#) gezeigt, eine Sequenz, die zu dem poly-A-Schwanz der mRNA komplementär ist, und kann außerdem zusätzliche Zufallssequenzen (die im Allgemeinen zu einer poly-A-Sequenz nicht komplementär sind) am 3'-Ende des 3'-Abschnitts umfassen. In anderen Anwendungsformen ist der 3'-Abschnitt des zusammengesetzten Primers 1 ein Zufallsprimer, umfassend Sequenzen, die an eine Vielzahl an RNA-Spezies (die von 2 oder mehr bis zu mehreren Hundert oder Tausend oder mehr reichen können) hybridisierbar sind. Zufallsprimer sind in der Technik bekannt, zum Beispiel sind sie bei der Herstellung von cDNA-Bibliotheken unter Anwendung PCR-gestützter Verfahren weit verbreitet eingesetzt worden. Wie es in der Technik bekannt ist, kann ein „Zufallsprimer“ einen Primer bezeichnen, der ein Element einer Primerpopulation (eine Vielzahl an Zufallsprimern) sein, die insgesamt gestaltet sind, um an eine erwünschte und/oder eine signifikante Anzahl an Zielsequenzen zu hybridisieren. Ein Zufallsprimer kann an viele Stellen auf einer Nukleinsäuresequenz hybridisieren.

[0136] In anderen Anwendungsformen kann der 3'-Abschnitt des zusammengesetzten Primers 1 eine Sequenz umfassen, die zu einer spezifischen RNA oder Familie von RNAs (oder Abschnitten davon) komplementär ist oder an diese hybridisierbar ist.

[0137] In einigen Anwendungsformen, wie in [Fig. 1](#) und [2](#) gezeigt, kann der 5'-Abschnitt des zusammengesetzten Primers 1 eine Sequenz sein, die nicht an die Zielsequenz hybridisierbar ist (unter Bedingungen, bei denen der 3'-Abschnitt an das RNA-Ziel hybridisiert), z.B. eine Sequenz, die einen „Schwanz“ bildet, wenn der Primer an ein Ziel hybridisiert ist. Diese „Schwanz“-Sequenz wird im Allgemeinen in das erste Primer-Extensionsprodukt eingebaut (Erststrang-cDNA) und das Komplement dieses Schwanzes wird am 3'-Ende des zweiten Primer-Extensionsprodukt (Zweitstrang-cDNA) eingebaut. Dementsprechend ist in einigen Anwendungsformen der zusammengesetzte Primer 1 ein Gemisch aus zusammengesetzten Primern, die den gleichen 5'-RNA-Abschnitt und eine Vielzahl an 3'-DNA-Abschnitten umfassen, die ausgewählt sind, um eine Vielzahl (die von klein bis zu sehr groß reichen kann) an RNA-Sequenzen von Interesse zu amplifizieren. In anderen Anwendungsformen kann der 5'-Abschnitt des zusammengesetzten Primers 1 an die Ziel-RNA hybridisierbar sein. Obwohl [Fig. 1](#) und [2](#) einen 3'-Abschnitt, der an die Zielsequenz hybridisiert ist und ein DNA-Abschnitt ist, und einen 5'-Abschnitt, der nicht an das Ziel hybridisiert ist und ein RNA-Abschnitt ist, zeigen, ist es zu verstehen, dass DNA-Abschnitte einen Teil eines „Schwanzes“ umfassen können, und umgekehrt, dass RNA-Abschnitte an Ziel-RNA hybridisierbar sein können. Zum Beispiel kann der 5'-RNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers teilweise hybridisierbar und teilweise nicht hybridisierbar sein oder der DNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers kann teilweise hybridisierbar und teilweise nicht hybridisierbar sein oder beides kann zutreffen.

[0138] Wie in diesen Figuren gezeigt, umfasst der zusammengesetzte Primer 1 einen DNA-Abschnitt, A, an seinem 3'-Ende und einen RNA-Abschnitt, B, an seinem 5'-Ende. Wie es hier diskutiert ist, ist es ebenfalls möglich, einen zusammengesetzten Primer zu verwenden, bei dem auf den 3'-DNA-Abschnitt in 5'-Richtung ein RNA-Abschnitt folgt, auf den wiederum ein Abschnitt folgt, der aus DNA besteht. Die Länge jedes dieser Segmente wird im Allgemeinen durch die maximale Effizienz für die Amplifikation festgelegt. Nur der aus zwei Abschnitten (d.h. 3'-DNA-RNA-5') zusammengesetzte Primer ist in [Fig. 1A-B](#) und [Fig. 2A-C](#) gezeigt.

[0139] Primer 2 kann, muss aber nicht, wie in [Fig. 1A-B](#) und [Fig. 2A-C](#) gezeigt, aus DNA bestehen und kann zwei Segmente (austauschbar „Abschnitte“ oder „Regionen“ genannt) umfassen. Der 3'-Abschnitt, F, von Primer 2 kann für ein Zufallspriming von vielen, der meisten und/oder allen möglichen RNA-Sequenzen in einer biologischen Probe ausgewählt werden. Zufallsprimer sind in der Technik bekannt und sind zum Beispiel bei der Herstellung von cDNA-Bibliotheken unter Anwendung PCR-gestützter Verfahren weit verbreitet eingesetzt worden. Der 5'-Abschnitt, E, von Primer 2 kann eine Sequenz sein, die nicht zu einer spezifischen Zielsequenz komplementär ist und im Wesentlichen nicht an diese hybridisierbar ist, d.h. sie würde nicht hybridisieren (unter Bedingungen, bei denen der 3'-Abschnitt an das RNA-Ziel hybridisiert) und würde einen Schwanz bilden. Die „Schwanz“-Sequenz würde im Allgemeinen in das zweite Primer-Extensionsprodukt eingebaut werden und die

3'-Endsequenz des DNA-Produkts der linearen Amplifikationsschritte würde im Allgemeinen das Komplement dieser Sequenz umfassen. In anderen Anwendungsformen kann, falls eine verstärkte Amplifikation nicht erwünscht ist (wie unten beschrieben), der 5'-Endabschnitt, E, von Primer 2 an die Zielsequenz in dem ersten Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar sein.

[0140] Wie in [Fig. 2A-C](#) gezeigt, kann ein Promotor-Template-Oligonukleotid, 3 (PTO), folgendermaßen gestaltet werden: der 3'-Abschnitt ist der gleiche wie der Abschnitt E von Primer 2. Diese Gestaltung ermöglicht dem PTO an das 3'-Ende des linearen Amplifikationsprodukts zu hybridisieren. Der äußerste 5'-Abschnitt des PTO ist eine Promotorsequenz für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, die, wie es oben beschrieben ist, in bestimmten (nämlich dem „verstärkten“ Verfahren) Anwendungsformen der Amplifikationsverfahren der Erfindung verwendet wird. Im Allgemeinen wird die Sequenz zwischen diesen beiden Segmenten für eine optimale Transkription durch die bevorzugte Polymerase gestaltet. Kriterien für die Auswahl und Gestaltung dieser Sequenz sind in der Technik bekannt.

[0141] Der Einfachheit halber sind nur ein erstes Primer-Extensionsprodukt (Erststrang-cDNA) und Zweitstrang-Primer-Extensionsprodukt (Zweitstrang-cDNA) in [Fig. 1](#) und [2](#) beschrieben und gezeigt. Es ist zu verstehen, dass die Verfahren der Erfindung nicht nur zur Erzeugung großer Mengen einer spezifischen Nukleinsäuresequenz sondern auch für ein gleichzeitiges Amplifizieren von mehr als einer verschiedenen spezifischen Nukleinsäuresequenz, die sich auf demselben oder auf verschiedenen Zielnukleinsäuremolekülen befindet, zweckdienlich sind. Zum Beispiel sind die Verfahren für ein Amplifizieren aller mRNAs in einer Probe oder für ein Amplifizieren einer Vielzahl spezifischer RNA-Familien oder RNA-Spezies in einer Probe zweckdienlich.

[0142] Wie in [Fig. 1A-B](#) gezeigt, ist in einer Anwendungsform der auf RNA basierende Prozess der Amplifikationsverfahren der Erfindung, der zur Erzeugung von DNA-Produkten führt, die zu einer RNA-Sequenz(en) von Interesse komplementäre Sequenzen umfassen, folgendermaßen:

A) Bildung eines doppelsträngigen cDNA-Substrats für eine lineare Amplifikation

1. Primer 1 bindet an eine RNA-Spezies in einer Probe durch Hybridisierung des Abschnitts A der Zufallssequenz (die wenigstens zum Teil auf der poly-A-Sequenz der mRNA basiert), um Komplex I zu bilden ([Fig. 1A](#)).
2. Eine reverse Transkriptase (als „RT“ bezeichnet), extendiert den hybridisierten Primer 1 entlang des Ziel-RNA-Strangs, an den der Primer hybridisiert ist, um einen RNA/DNA-Duplex zu bilden. RNase H baut den Ziel-RNA-Strang des hybriden Duplexes ab, um eine einzelsträngige Erststrang-cDNA (als „I“ bezeichnet) zu erzeugen. Das 5'-Ende von I ist Primer 1.
3. Primer 2 bindet an die Erststrang-cDNA, II, durch Hybridisierung von Sequenz F, um Komplex III zu bilden.
4. Primer 2 wird entlang des cDNA-Strangs II durch eine DNA-Polymerase extendiert, um ein doppelsträngiges Produkt (als „IV“ bezeichnet) zu bilden. Primerextension entlang des 5'-RNA-Abschnitts von 2 durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, wie eine reverse Transkriptase, führt zu einer Bildung eines RNA/DNA-Hybridabschnitts an einem Ende von Komplex IV.
5. RNase H baut den RNA-Abschnitt des RNA/DNA-Hybrids an einem Ende von Komplex IV ab, um einen teilweise doppelsträngigen Komplex (als Komplex „V“ bezeichnet) mit einem 3'-DNA einzelsträngigen Ende zu bilden, das eine Sequenz aufweist, die das Komplement von Abschnitt B des zusammengesetzten Primers 1 ist. Die RNase H-Aktivität kann von der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (wie einer reversen Transkriptase) stammen oder kann von einem separaten Enzym geliefert werden. Die für dieses Verfahren zweckdienliche reverse Transkriptase kann entweder eine RNase H-Aktivität besitzen oder nicht.

B) Isotherme lineare Amplifikation

1. Primer 1 bindet an Komplex V durch Hybridisierung des RNA-Abschnitts, B, an das einzelsträngige DNA-Ende, das zu diesem komplementär ist, um den Komplex VI zu bilden. Die 3'-DNA-Sequenz von Primer 1 ist nicht hybridisiert.
2. Das 3'-Ende des gebundenen Primers 1 in Komplex VI und das 5'-Ende des DNA-Strangs unmittelbar stromaufwärts sind gleich und konkurrieren um eine Hybridisierung an den Gegenstrang. Ohne dass wir einer Theorie folgen wollen, wäre es zu erwarten, dass die hohe Affinität der DNA-Polymerase für das hybridisierte 3'-Ende eines Primers das Gleichgewicht der beiden konkurrierenden Strukturen in Richtung Hybridisierung des 3'-Endes des neuen Primers und Verdrängung des 5'-Endes des vorherigen Primer-Extensionsprodukts (als „VII“ bezeichnet) verschiebt. Eine Primerextension entlang des Zweitstrang-(Sense)-cD-

NA-Strangs führt zu einer Verdrängung des vorherigen zweiten Primer-Extensionsprodukts (VII) und repliziert die E-Sequenz von Primer 2, um Komplex VIII zu bilden.

3. Komplex VIII besitzt, an einem Ende, ein RNA/DNA-Hybrid, das aus Sequenz B und seinem Komplement besteht. Das RNA-Segment des Hybrids wird von RNase H abgebaut, um Komplex IX zu bilden, was zu der Bildung eines einzelsträngigen 3'-Endes führt, an das ein neuer Primer 1 mit seinem 5'-B-Abschnitt gebunden werden kann.

4. Der Hybridisierungsprozess der 3'-Endsequenz A des gebundenen Primers 1 durch Verdrängung des äußersten 5'-Endes des vorherigen Primer-Extensionsprodukts in dem Duplex, Primerextension und Verdrängung des vorherigen Produkts läuft so weiter ab, wie es in [Fig. 1A-B](#) gezeigt ist, und führt zu einer Anhäufung von vielfachen Kopien einzelsträngiger Antisense-DNA-Produkte (als „XII“ gekennzeichnet). Diese Produkte besitzen an ihren 3'-Enden eine Sequenz, die zum Abschnitt E von Primer 2 komplementär ist, und an ihren 5'-Enden eine Sequenz, die im Wesentlichen (im Allgemeinen identisch) mit Sequenz A des zusammengesetzten Primers identisch ist. Kurn, U.S. Patent Nr. 6.251.639 B1.

[0143] Eine Anwendungsform des verstärkten Verfahrens ist in [Fig. 2A-C](#) veranschaulicht. In dieser Anwendungsform werden im Anschluss an die Erzeugung des DNA-Produkts, das von einer RNA-Sequenz von Interesse komplementäre Sequenzen umfasst, die folgenden Schritte ausgeführt:

C) Transkription der DNA-Produkte

1. Ein PTO (siehe [Fig. 2C](#)) bindet an DNA-Produkt XII durch Hybridisierung seiner 3'-Endsequenz an die 3'-Endsequenz von DNA-Produkt XII, um Komplex XIII zu bilden. Das 3'-Ende des PTO wird vorzugsweise, aber nicht erforderlicherweise, blockiert, so dass es nicht von einer DNA-Polymerase extendiert werden kann.

2. DNA-Polymerase extendiert das 3'-Ende von Produkt XII im Komplex XIII entlang des PTO-Templates, um Komplex XIV, umfassend eine doppelsträngige Promotorsequenz an einem Ende, zu bilden.

3. DNA-abhängige RNA-Polymerase bindet an den doppelsträngigen Promotor in Komplex XIV, um das einzelsträngige Antisense-DNA-Produkt zu transkribieren, um vielfache Kopien von Sense-RNA-Produkten (als „XV“ bezeichnet) zu erhalten. Mehrere Spezies von Produkt XV würden vielfache Kopien mehrerer Sequenzen von einem Pool eingesetzter RNA repräsentieren. Kurn, U.S. Patent Nr. 6.251.639 B1.

[0144] Die Verfahren der Erfindung können zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Vielzahl an RNA-Sequenzen in der Probe verwendet werden. Zum Beispiel kann der zusammengesetzte Primer eine poly-dT-Sequenz umfassen, von der zu erwarten wäre, dass sie an die poly-A-Schwänze sämtlicher mRNAs in der Probe hybridisiert, oder der zusammengesetzte Primer kann im Allgemeinen wenigstens einen 3'-Abschnitt umfassen, der an zufällige oder partiell zufällige Sequenzen hybridisierbar ist (z.B. der eine poly-dT-Sequenz und eine Zufallsequenz umfasst, von denen zu erwarten wäre, dass sie an den Anfang der poly-A-Schwänze von mRNAs hybridisieren). In einem anderen Aspekt können die Verfahren der Erfindung zur Erzeugung vielfacher Kopien einer spezifischen RNA-Spezies oder Klasse von RNA-Spezies (z.B. Familie oder Superfamilie von RNA-Spezies) verwendet werden. Im diesem letzteren Fall umfasst der zusammengesetzte Primer im Allgemeinen einen 3'-Abschnitt, der zu einer Sequenz eines spezifischen RNA-Ziels (oder Familie von RNA-Zielen) komplementär ist.

[0145] Der 5'-RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers kann mit der spezifischen RNA-Zielsequenz verwandt sein oder nicht und kann an das RNA-Ziel hybridisieren oder nicht, zum Beispiel kann er einen Schwanz bilden, wie es hier zudem beschrieben ist.

[0146] Obwohl nur ein zusammengesetzter Primer in den obigen Anwendungsformen beschrieben ist, ist es zu verstehen, dass ein anderer zusammengesetzter Primer in Schritt (b) oben verwendet werden kann. Der andere zusammengesetzte Primer umfasst Sequenzen, die an den einzelsträngigen DNA-Abschnitt des oben beschriebenen Komplexes IX hybridisierbar sind. Der zweite zusammengesetzte Primer kann außerdem Sequenzen umfassen, die an einen Abschnitt der Sequenzen des zweiten Primer-Extensionsprodukts unmittelbar 5' zu dem einzelsträngigen DNA-Abschnitt des oben beschriebenen Komplexes IX hybridisierbar sind. Der zweite zusammengesetzte Primer umfasst im Allgemeinen mit dem ersten zusammengesetzten Primer überlappende Sequenzen. Der zweite zusammengesetzte Primer wird an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert und durch Primerextension erweitert. Die Abspaltung des DNA-RNA-Heteroduplexes durch eine RNase lässt ein Binden eines weiteren zweiten Primers, die Extension und Strangverdrängung zu, wodurch vielfache Kopien des einzelsträngigen Produkts erzeugt werden.

[0147] Der Einfachheit halber sind nur ein erstes Primer-Extensionsprodukt (Erststrang-cDNA) und

Zweitstrang-Primer-Extensionsprodukt (Zweitstrang-cDNA) in **Fig. 1** und **2** beschrieben und gezeigt. Es zu verstehen, dass die Verfahren der Erfindung nicht nur zur Erzeugung großer Mengen einer spezifischen Nukleinsäuresequenz sondern auch für ein gleichzeitiges Amplifizieren von mehr als einer verschiedenen spezifischen Nukleinsäuresequenz, die sich auf demselben oder auf verschiedenen Zielnukleinsäuremolekülen befinden, zweckdienlich sind. Zum Beispiel sind die Verfahren für ein Amplifizieren aller mRNAs in einer Probe oder für ein Amplifizieren einer Vielzahl an spezifischen RNA-Spezies (in diesem Fall könnte eine Vielzahl an ersten zusammengesetzten Primern verwendet werden, wobei jeder einen 3'-Abschnitt umfasst, der an spezifischen Sequenzen spezifischer RNA-Spezies hybridisierbar ist) oder Familien von RNA-Spezies in einer Probe zweckdienlich.

Lineare Nukleinsäuresequenz-Amplifikation unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers und eines Ziel-RNA-Fragments

[0148] Die Erfindung stellt ebenfalls Verfahren zum Amplifizieren einer RNA-Sequenz von Interesse unter Verwendung eines einzigen Primers (der ein zusammengesetzter Primer ist), eines Ziel-RNA-Fragments und Strangverdrängung bereit. Die Amplifikation mit diesen Verfahren ist linear und kann isotherm durchgeführt werden. In Anwendungsformen, die keinen Transkriptionsschritt einschließen, sind die amplifizierten Produkte DNA, die zu RNA-Sequenzen von Interesse in der Ziel-RNA komplementäre Sequenzen umfassen. In Anwendungsformen, die eine Transkription einschließen, sind die amplifizierten Produkte Sense-RNA-Kopien der RNA-Sequenz von Interesse in der Ziel-RNA.

[0149] Eine schematische Beschreibung einer nicht verstärkten (linearen) Anwendungsform der Verfahren der Erfindung, die auf dem einzigen zusammengesetzten Primer und Strangverdrängung basieren, wird in den **Fig. 3A-B** bereitgestellt. Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte: (a) Primer-Extension, um einen RNA/DNA-Heteroduplex aus einer Ziel-RNA und einer Erststrang-cDNA zu bilden; (b) unvollständigen Abbau des RNA-Ziels des Heteroduplexes, um einen Komplex aus der Erststrang-cDNA und wenigstens einem RNA-Fragment zu bilden, das wiederum als ein Primer dienen kann; (c) Bildung einer Zweitstrang-cDNA, die den gleichen Sinn wie die eingesetzte Ziel-RNA aufweist; (d) lineare Amplifikation des Komplements einer Zweitstrang-DNA durch Primerextension (von einem zusammengesetzten Primer) entlang der Zweitstrang-cDNA und Strangverdrängung, um vielfache Kopien einzelsträngiger Antisense-DNA-Produkte zu erzeugen. Wie gezeigt, sind alle Schritte isotherm, obwohl die Temperatur für jeden der Schritte gleich oder verschieden sein kann. Eine schematische Beschreibung einer Anwendungsform von verstärkten Verfahren der Erfindung, die auf einem einzigen zusammengesetzten Primer und Strangverdrängung beruhen, wird in den **Fig. 4A-B** gezeigt. Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte: (a) Primerextension, um einen RNA/DNA-Heteroduplex aus einer Ziel-RNA und einer Erststrang-cDNA zu bilden; (b) unvollständigen Abbau des RNA-Ziels des Heteroduplexes, um einen Komplex aus der Erststrang-cDNA und wenigstens einem RNA-Fragment zu bilden, das wiederum als ein Primer dienen kann; (c) Bildung einer Zweitstrang-cDNA, die den gleichen Sinn wie die eingesetzte Ziel-RNA aufweist; (d) lineare Amplifikation des Komplements einer Zweitstrang-DNA durch Primerextension (von einem zusammengesetzten Primer) entlang der Zweitstrang-cDNA und Strangverdrängung, um vielfache Kopien einzelsträngiger Antisense-DNA-Produkte zu erzeugen; und (e) Transkription des Produkts des linearen Amplifikationsschritts, um vielfache Kopien von Sense-RNA-Produkten zu erzeugen.

[0150] Ein zusammengesetzter Primer, wie hier beschrieben, wird für die Amplifikation in diesen Verfahren verwendet. Wie in den **Fig. 3A** und **Fig. 4A** gezeigt, kann der einzige (zusammengesetzte) Primer (als „1“ bezeichnet) aus einem 3'-DNA-Abschnitt (als „A“ bezeichnet), der zu einer Sequenz auf der Ziel-RNA komplementär ist, und aus einem 5'-RNA-Abschnitt (als „B“ bezeichnet) zusammengesetzt sein, der eine Nichtziel-verwandte Sequenz umfasst (d.h. weder komplementär zu noch hybridisierbar an eine Sequenz auf der Ziel-RNA ist (unter einer Reihe gegebener Bedingungen)). Der 3'-DNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers kann poly-dT-Nukleotide umfassen, die ihn komplementär zu oder hybridisierbar an das poly-A 3'-Ende von mRNA, die von einer eukaryotischen Zelle stammt, machen (unter einer Reihe gegebener Bedingungen).

[0151] Ein zusammengesetzter Primer, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, wie eine reverse Transkriptase, extendiert, um einen RNA/DNA-Heteroduplex aus der Ziel-RNA und einer Erststrang-cDNA zu bilden. Ein Abbau der Ziel-RNA des Heteroduplexes wird dann unter Verwendung einer Ribonuklease, wie RNase H, erreicht, um einen Komplex aus der Erststrang-cDNA und einem oder mehreren RNA-Fragmenten (Oligonukleotiden) zu bilden. Die RNase H-Aktivität kann von der RNA-abhängigen DNA-Polymerase (wie einer reversen Transkriptase) stammen oder kann von einem separaten Enzym geliefert werden. Für dieses Verfahren zweckdienliche reverse Transkriptasen können eine RNase H-Aktivität besitzen oder nicht. Die Fragmente sind ein Ergebnis eines unvollständigen Abbaus der Ziel-RNA in dem Heteroduplex. Diese Fragmente fungieren als Primer für eine DNA-abhängige DNA-Polymerase.

rase, um einen Zweitstrang-cDNA zu bilden. Okayama & Berg, *Molecular and Cell Biology* (1982), 2:161; und Gubler & Hoffman, *Gene* (1983), 25:263. Die reverse Transkriptase extendiert dann das 3'-Ende der Zweitstrang-cDNA in dem Duplex entlang der 5'-RNA-Sequenz des zusammengesetzten Primer-Extensionsprodukts (der Erststrang-cDNA), um einen RNA/DNA-Heteroduplex am Ende des doppelsträngigen cDNA-Produkts zu bilden.

[0152] Der Heteroduplex am Ende der doppelsträngigen cDNA ist ein Substrat für die RNase H. Die RNase H baut den 5'-RNA-Abschnitt der Erststrang-cDNA ab, um eine Stelle für eine Hybridisierung des zusammengesetzten Primers zu schaffen, der mit seinem 5'-RNA-Abschnitt an das 3'-Ende der Zweitstrang-cDNA in dem cDNA-Duplex hybridisiert. Der 3'-Abschnitt des neuen Primers verdrängt das 5'-Ende der Erststrang-cDNA durch Hybridisierung an seine komplementäre Sequenz auf der Zweitstrang-cDNA. Eine DNA-Polymerase mit einer starken strangverdrängenden Aktivität extendiert dann den neuen Primer entlang der Zweitstrang-cDNA und verdrängt das zuvor gebildete cDNA-Produkt. Eine RNase H baut den 5'-Abschnitt des neuen Primer-Extensionsprodukts in dem Heteroduplex ab, um eine freie Stelle für eine Hybridisierung eines neuen zusammengesetzten Primers zu schaffen, was folglich zu einer kontinuierlichen linearen Amplifikation der Zielsequenz und Erzeugung vielfacher Kopien eines einzelsträngigen DNA-Produkts führt, das gegensinnig zu der Ziel-RNA-Sequenz ist.

[0153] Wie in [Fig. 4A-B](#) dargestellt und wie es aus der Beschreibung hier hervorgeht, können die Amplifikationsverfahren mit einem einzigen zusammengesetzten Primer ebenfalls einen Transkriptionsschritt umfassen, die ein Propromotor-Polynukleotid auf die selbe Art und Weise verwenden, wie diejenigen Verfahren, die unter Bezugnahme auf die verstärkten Amplifikationsverfahren, die einen zusammengesetzten Primer und einen zweiten Primer nutzen, beschrieben sind.

[0154] Die Verfahren der Erfindung können zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Vielzahl an RNA-Sequenzen in der Probe oder einer spezifischen RNA-Spezies oder Gruppe von Spezies verwendet werden. Im letzteren Fall umfasst der zusammengesetzte Primer im Allgemeinen einen 3'-Abschnitt, der zu einer Sequenz eines spezifischen RNA-Ziels oder Gruppe von RNA-Zielen komplementär ist und/oder an diese hybridisierbar ist (z.B. homologe RNA-Ziele oder Ziele, die Mitglieder einer Familie oder Superfamilie von Sequenzen sind). Zum Beispiel kann der Primer eine Kollektion von Primersequenzen umfassen, beispielsweise wo es mehr als eine Zielsequenz gibt.

[0155] Eine weitere Anwendung der Verfahren der Erfindung ist der Nachweis von verschiedenen Regionen, die eine weitverbreitete Sequenz flankieren. Durch die Gestaltung eines ersten zusammengesetzten Primers, der eine weitverbreitete Sequenz erkennt, wird ein einzelsträngiges DNA- oder RNA-Produkt erzeugt, das nicht nur die von dem Primer erkannte weitverbreitete Sequenz enthält, sondern auch 5'-flankierende Sequenzen, die für den Nachweis von Sequenzvarianten zweckdienlich sind. Folglich kann zum Beispiel ein einzelsträngiges DNA- oder RNA-Produkt von einer begrenzten Menge an klinischem Material hergestellt werden, um eine Identifizierung von Pathogen-spezifischen Sequenzen (wie solche, die Virus-Typen differenzieren), einen Nachweis eines genetischen Polymorphismus oder eine Charakterisierung von veränderten Spleißvarianten, sämtliches in Übereinstimmung mit Standardtechniken, zu gestatten. In anderen Anwendungsformen wird ein einzelsträngiges DNA- oder RNA-Produkt erzeugt, das nicht nur die von dem Primer erkannte weitverbreitete Region, z.B. ein konserviertes oder funktionales Sequenzmotiv, sondern auch 5'-flankierende Sequenzen enthält, die eine Identifizierung von Gruppen von RNA-Spezies gestatten, die ähnliche Sequenzmotive umfassen.

[0156] Der 5'-RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers kann mit der spezifischen RNA-Zielsequenz verwandt sein oder nicht und kann an das RNA-Ziel hybridisieren oder nicht. Verfahren der Erfindung, die zusammengesetzte Primer „mit Schwanz“ verwenden, sind hier zudem beschrieben.

Lineare mRNA-Amplifikation unter Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers und eines Ziel-RNA-Fragments

[0157] Wie hier beschrieben, kann Gesamt-mRNA unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers, umfassend ein poly(T) hinreichender Länge für eine Hybridisierung mit im Wesentlichen einer vollständigen Population von mRNAs (d.h. poly(T)_n, worin n üblicherweise etwa 5 bis etwa 50 oder mehr ist), amplifiziert werden. **Fig. 5** gibt eine schematische Darstellung einer nicht verstärkten Anwendungsform der auf Strangverdrängung basierenden Verfahren der Erfindung beispielhaft wieder, umfassend die Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt, umfassend eine poly-dT-Sequenz, und außerdem umfassend eine Zufallssequenz 3' zu der poly-dT-Sequenz. Der zusammengesetzte Primer 1 umfasst außerdem einen 5'-RNA-Abschnitt, der im Wesentlichen an die RNA-Zielsequenzen nicht hybridisierbar ist

(d.h. der Primer besitzt unter Bedingungen, bei denen die poly-dT-Sequenz hybridisiert, einen Schwanz). Wahlweise kann ein zweiter zusammengesetzter Primer verwendet werden, wie es unten beschrieben ist.

[0158] Das Verfahren beinhaltet die folgenden Schritte: (a) eine Primer-Extension, um einen RNA/DNA-Heteroduplex aus einer Ziel-RNA und einer Erststrang-cDNA zu bilden; (b) Bildung eines zweiten Primer-Extensionsprodukts (Zweitstrang-cDNA), das den gleichen Sinn wie die eingesetzte Ziel-RNA aufweist. Das zweite Primer-Extensionsprodukt umfasst im Allgemeinen einen 3'-Abschnitt, der zu dem 5'-RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers (d.h. zum Schwanz) komplementär ist; (c) eine lineare Amplifikation des Komplements der Zweitstrang-cDNA durch Primerextension (von einem zusammengesetzten Primer) und Strangverdrängung, um vielfache Kopien einzelsträngiger Antisense-DNA-Produkte (die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär sind) zu erzeugen.

[0159] **Fig. 6** gibt eine schematische Darstellung einer nicht verstärkten Anwendungsform der auf Strangverdrängung basierenden Verfahren der Erfindung beispielhaft wieder, umfassend die Verwendung eines einzigen zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt, umfassend eine Zufallssequenz und außerdem umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt, der im Wesentlichen an die RNA-Zielsequenzen nicht hybridisierbar ist (d.h. der Primer besitzt unter Bedingungen, bei denen die Zufallssequenz hybridisiert, einen Schwanz). Wahlweise kann ein zweiter zusammengesetzter Primer verwendet werden, wie es unten beschrieben ist.

[0160] Das Verfahren beinhaltet die folgenden Schritte: (a) eine Primerextension, um RNA/DNA-Heteroduplexe aus einer Ziel-RNA und einer Erststrang-cDNA zu bilden; (b) Bildung von zweiten Primer-Extensionsprodukten (Zweitstrang-cDNA), die den gleichen Sinn wie die eingesetzte Ziel-RNA aufweisen. Das zweite Primer-Extensionsprodukt umfasst im Allgemeinen einen 3'-Abschnitt, der zu dem 5'-RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers (d.h. zum Schwanz) komplementär ist; (c) eine lineare Amplifikation des Komplements des Sense-DNA-Strangs durch Primerextension von einem zusammengesetzten Primer und Strangverdrängung, um vielfache Kopien einzelsträngiger Antisense-DNA-Produkte zu erzeugen, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär sind.

[0161] Wie in diesen Anwendungsformen dargestellt, sind sämtliche Schritte isotherm, obwohl die Temperatur für jeden Schritt gleich oder verschieden sein kann. Es ist zu verstehen, dass verschiedene weitere Anwendungsformen durchgeführt werden können, die in der oben gemachten allgemeinen Beschreibung angeführt sind. Es ist darüber hinaus zu verstehen, dass die Bildung eines zweiten Primer-Extensionsprodukts mit einem beliebigen in der Technik bekannten Verfahren oder hier beschriebenen Verfahren erhalten werden kann (z.B. Extension eines hybridisierten zweiten Primers oder RNA-Fragments).

[0162] Wie es aus der hier gegebenen Beschreibung ersichtlich ist, können die Amplifikationsverfahren ebenfalls einen Transkriptionsschritt einschließen, der ein Propromotor-Polynukleotid auf die gleiche Art und Weise nutzt, wie es mit Bezug auf die verstärkten Amplifikationsverfahren beschrieben ist, die einen zusammengesetzten Primer und einen zweiten Primer nutzen. Die einzelsträngigen RNA-Produkte der verstärkten Amplifikationsverfahren würden im Allgemeinen eine 3'-Region umfassen, die zu dem 5'-RNA-Abschnitt des ersten zusammengesetzten Primers komplementär ist.

[0163] **Fig. 7** gibt eine schematische Darstellung einer verstärkten Anwendungsform der auf Strangverdrängung basierenden Verfahren der Erfindung beispielhaft wieder, umfassend die Verwendung (a) eines einzigen zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt, umfassend eine Zufallssequenz, und außerdem umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt, der im Wesentlichen an die RNA-Zielsequenzen nicht hybridisierbar ist (d.h. der Primer besitzt unter Bedingungen, bei denen die Zufallssequenz hybridisiert, einen Schwanz); und (b) eines Propromotor-Oligonukleotids. Wahlweise kann ein zweiter zusammengesetzter Primer verwendet werden, wie es unten beschrieben ist.

[0164] Das Verfahren beinhaltet die folgenden Schritte: (a) eine Primerextension, um RNA/DNA-Heteroduplexe aus einer Ziel-RNA und einer Erststrang-cDNA zu bilden; (b) Bildung von zweiten Primer-Extensionsprodukten (Zweitstrang-cDNA), die den gleichen Sinn wie die eingesetzte Ziel-RNA aufweisen, und Abspaltung der in einem RNA/DNA-Heteroduplex vorhandenen RNA mit einem Agens (wie RNase H), das in der Lage ist, in einem RNA/DNA-Heteroduplex vorhandene RNA abzuspalten, wodurch ein doppelsträngiger Komplex von erstem und zweiten Primer-Extensionsprodukt, umfassend einen einzelsträngigen 3'-Abschnitt, erzeugt wird (Komplex IX in **Fig. 8**, der Komplex IX wie in **Fig. 1** dargestellt, entspricht); und (c) ein PTO bindet an das doppelsträngige Produkt IX, um Komplex X zu bilden, wie in **Fig. 8** gezeigt. DNA-Polymerase extendiert das 3'-Ende des zweiten Primer-Extensionsprodukts in Komplex XIII entlang des PTO-Templates, um Komplex XI, umfassend eine doppelsträngige Promotorsequenz an einem Ende, zu bilden; und (d) Transkription unter Verwen-

derung einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase, um vielfache Kopien von Sense-RNA-Produkten zu erzeugen. Wie dargestellt, sind sämtliche Schritte isotherm, obwohl die Temperatur für jeden Schritt gleich oder verschieden sein kann.

[0165] Wie in **Fig. 8** dargestellt, kann ein Promotor-Template-Oligonukleotid, 3 (PTO), folgendermaßen gestaltet werden: der 3'-Abschnitt ist der gleiche wie der 5'-RNA-Abschnitt des ersten zusammengesetzten Primers (der an Template-RNA hybridisiert). Diese Gestaltung ermöglicht dem PTO, an den einzelsträngigen 3'-Abschnitt des zweiten Primer-Extensionsprodukts (welches in einem Komplex mit dem ersten Primer-Extensionsprodukt vorliegt) zu hybridisieren. Der äußerste 5'-Abschnitt des PTO ist eine Promotorsequenz für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, die, wie oben beschrieben, in bestimmten (nämlich den anderen „verstärkten“) Anwendungsformen der Amplifikationsverfahren der Erfindung verwendet wird.

Lineare mRNA-Amplifikation unter Verwendung eines ersten zusammengesetzten Primers eines zweiten zusammengesetzten Primers und einer Ziel-RNA

[0166] Die Erfindung stellt Verfahren zur Erzeugung einzelsträngiger Antisense- und Sense-Polynukleotid-Kopien, im Allgemeinen DNA, einer RNA-Sequenz von Interesse unter Verwendung eines ersten zusammengesetzten Primers, eines zweiten zusammengesetzten Primers, der zur Erzeugung der Zweitstrang-cDNA verwendet wird, und einer Ziel-RNA bereit. In diesem Aspekt der Erfindung wird ein erster zusammengesetzter Primer verwendet, um ein erstes Extensionsprodukt (im Allgemeinen cDNA) zu erzeugen, das ein Substrat für die lineare Amplifikation unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers darstellt, wie es oben beschrieben ist. Zusätzlich wird ein zweiter zusammengesetzter Primer eingesetzt, um einer Zweitstrang-cDNA zu erzeugen, der ein Substrat für eine lineare Amplifikation darstellt, was zur Erzeugung einzelsträngiger Polynukleotid-Kopien der RNA-Sequenz von Interesse führt.

[0167] Das Verfahren beinhaltet folgendes: (a) Bildung einer doppelsträngigen cDNA, umfassend einen RNA-DNA-Heteroduplex an jedem Ende der cDNA; und (b) lineare Amplifikation von Erststrang-(Sense)-cDNA und Zweitstrang-(Antisense)-cDNA durch Primerextension von dem ersten zusammengesetzten Primer und dem zweiten zusammengesetzten Primer (welcher an die Erststrang-cDNA bindet) und Strangverdrängung. Einzelsträngiges erstes und zweites cDNA-Produkt wird erzeugt, das, zum Beispiel für die Herstellung von cDNA-Bibliotheken, zweckdienlich ist. Es ist offensichtlich, dass bei diesem Aspekt der Erfindung das zweite Primer-Extensionsprodukt von einem zusammengesetzten Primer gestartet wird.

[0168] **Fig. 8** veranschaulicht eine Anwendungsform der Erfindung. Zwei zusammengesetzte Primer, umfassend verschiedene „Schwanz“-Sequenzen, werden zur Erzeugung einer doppelsträngigen cDNA, umfassend einen RNA-DNA-Heteroduplex an jedem Ende der cDNA, verwendet. Die Abspaltung der RNA mit einem Agens, das RNA von einem RNA/DNA-Heteroduplex abspaltet, lässt ein Binden eines weiteren ersten zusammengesetzten Primers, eines weiteren zusammengesetzten zweiten Primers (der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert), Extension und Strangverdrängung zu, wodurch vielfache Kopien eines einzelsträngigen Antisense-Produkts und vielfache Kopien eines einzelsträngigen Sense-DNA-Produkts erzeugt werden. Eine Kombination von einzelsträngigem Sense- und Antisense-Produkt besitzt die Fähigkeit, doppelsträngige cDNA zu erzeugen. Der Prozess der Amplifikationsverfahren der Erfindung, der zur Erzeugung einzelsträngiger cDNA-Produkte führt, die Sequenzen, die zu einer RNA-Sequenz(en) von Interesse komplementär sind, und Sequenzen umfassen, umfassend eine RNA-Sequenz(en) von Interesse, läuft folgendermaßen ab (eine Anwendungsform davon ist in [Fig. 7](#) dargestellt):

A) Bildung eines doppelsträngigen cDNA-Substrats für eine lineare Amplifikation

1. Zusammengesetzter Primer 1 bindet an ein RNA-Ziel in einer Probe durch Hybridisierung des Primer-Abschnitts A (welcher wenigstens zum Teil auf der poly-A-Sequenz der mRNA basiert), um Komplex I zu bilden.
2. Eine reverse Transkriptase extendiert den hybridisierten Primer 1 entlang des Ziel-RNA-Strangs, an den er hybridisiert ist, um einen als II bezeichneten RNA/DNA-Heteroduplex zu bilden. Ein Agens (wie RNase H) baut den Ziel-RNA-Strang des hybriden Duplex ab, um eine einzelsträngige Erststrang-cDNA (als „III“ bezeichnet) zu erzeugen. Das 5'-Ende von III ist Primer 1.
3. Zusammengesetzter Primer 2 bindet an die Erststrang-cDNA, III, durch Hybridisierung von Sequenz F, um Komplex IV zu bilden.
4. Zusammengesetzter Primer 2 wird entlang des cDNA-Strangs III durch eine DNA-Polymerase extendiert, um ein doppelsträngiges Produkt (als „V“ bezeichnet) zu bilden, das aus Erst- und Zweitstrang-cDNA besteht. Primerextension entlang des 5'-RNA-Abschnitts von IV durch eine RNA-abhängige DNA-Polymera-

se, wie eine reverse Transkriptase, führt zur Bildung eines RNA/DNA hybriden Abschnitts an einem Ende von Komplex V.

5. Ein Agens (wie RNase H) baut den RNA-Abschnitt des RNA/DNA-Hybrids an einem Ende von Komplex V ab, um einen zum Teil doppelsträngigen Komplex (als „VI“ bezeichnet) mit einem 3'-DNA einzelsträngigen Ende zu schaffen, das eine Sequenz aufweist, die das Komplement von Abschnitt B des zusammengesetzten Primers 1 ist.

6. Zusammengesetzter Primer 1 bindet an Komplex VI durch Hybridisierung des RNA-Abschnitts an das einzelsträngige DNA-Ende, das zu ihm komplementär ist, um Komplex VII zu bilden.

7. Primerextension des gebundenen Primers 1 in Komplex VII entlang des Sense-cDNA-Strangs führt zu einer Verdrängung des vorherigen Primer-Extensionsprodukts (VII) und repliziert Abschnitt „G“ des zweiten zusammengesetzten Primers, um Komplex VIII zu bilden.

8. Ein Agens (wie RNase H) spaltet die RNA-Abschnitte der RNA/DNA-Heteroduplices ab, wobei Komplex VIII gebildet wird. Komplex VIII besitzt zwei RNA/DNA-Heteroduplices, bestehend aus zusammengesetztem Primer 1 und dem Komplement des zusammengesetzten Primers 1 an einem Ende und dem zweiten zusammengesetzten Primer und dem Komplement des zweiten zusammengesetzten Primers an dem anderen Ende. Komplex VIII ist ein Substrat für nachfolgende Reaktionen, die als „A“ und „B“ bezeichnet werden.

B) Isotherme lineare Amplifikation

9. Bei der Reaktion A bindet ein erster zusammengesetzter Primer an Komplex VIII. Primerextension und Verdrängung erzeugt das erste Verdrängungsprodukt A. RNase H-Spaltung schafft eine Stelle für ein Binden eines ersten zusammengesetzten Primers und anschließend Primer-Extension, wodurch ein einzelsträngiges Antisense-DNA-Produkt angehäuft wird.

10. Bei der Reaktion B bindet ein zweiter zusammengesetzter Primer an Komplex VIII (oder an das erste Verdrängungsprodukt A). Primerextension und Verdrängung erzeugt einzelsträngige Sense-DNA-Produkte.

[0169] Die einzelsträngigen Produkte können assoziieren, um einen doppelsträngigen Komplex aus Erst- und Zweitstrang-cDNA zu bilden, oder das Assoziieren kann verhindert werden (oder sie werden anschließend denaturiert), um ein Gemisch aus einzelsträngigen Erst- und Zweitstrang-cDNAs herzustellen.

In den Verfahren der Erfindung eingesetzte Komponenten und Reaktionsbedingungen

Template-Nukleinsäure

[0170] Das RNA-Ziel, das amplifiziert werden soll, umfasst RNAs aus einer beliebigen Quelle in gereinigter oder ungereinigter Form, die RNA sein kann, wie Gesamt-RNA, tRNA, mRNA, rRNA, mitochondriale RNA, Chloroplasten RNA, DNA-RNA-Hybride oder Gemische davon, aus beliebigen Quellen und/oder Spezies, einschließlich Mensch, Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Viren, Viroide, Schimmelpilze, Pilze, Pflanzen und Fragmente davon. Die RNAs können unter Anwendung von Standardverfahren in der Technik gewonnen und gereinigt werden. Eine Amplifikation eines DNA-Ziels (einschließlich genomischer DNA) würde zuerst eine Transkription des DNA-Ziels in eine RNA-Form erfordern, was unter Anwendung von Verfahren, die in Kurn, U.S. Patent Nr. 6.251.639 B1, offen gelegt sind, oder mit anderen in der Technik bekannten Verfahren (wie Expressionssysteme) erreicht werden kann. Eine Amplifikation eines DNA-RNA-Hybrids würde eine Denaturierung des Hybrids erfordern, um eine ssRNA zu erhalten, oder eine Denaturierung nach einer Transkription des DNA-Strangs erfordern, um eine RNA zu erhalten. Die Ziel-RNA kann nur einen kleinen Teil eines komplexen Gemisches, wie einer biologischen Probe, ausmachen und kann von verschiedenen biologischen Materialien mit Hilfe von in der Technik gut bekannten Verfahren erhalten werden. Die Ziel-RNA kann eine bekannte oder unbekannte RNA sein und kann mehr als eine spezifische Nukleinsäuresequenz von Interesse enthalten, wobei diese gleich oder verschieden sein können. Deshalb ist der Amplifikationsprozess nicht nur für eine Erzeugung großer Mengen einer spezifischen Nukleinsäuresequenz sondern auch für ein gleichzeitiges Amplifizieren von mehr als einer unterschiedlichen spezifischen Nukleinsäuresequenz auf den gleichen oder verschiedenen Nukleinsäuremolekülen zweckdienlich.

[0171] Der erste Schritt der Amplifikation einer Ziel-RNA-Sequenz ist, das Ziel einzelsträngig zu machen. Falls die Zielnukleinsäure doppelsträngig ist (z.B. RNA/DNA-Hybrid) könnte der erste Schritt eine Denaturierung des Ziels sein. Eine Denaturierung kann ebenfalls durchgeführt werden, um in einem RNA-Zielmolekül vorhandene Sekundärstrukturen zu entfernen. Der Denaturierungsschritt kann eine thermische Denaturierung oder ein in der Technik bekanntes beliebiges anderes Verfahren sein.

Der zusammengesetzte Primer

[0172] Die Verfahren der Erfindung verwenden einen zusammengesetzten Primer, der aus RNA- und DNA-Abschnitten zusammengesetzt ist. Wie hier beschrieben, umfasst der zusammengesetzte Primer im Allgemeinen, wenn er für die Hybridisierung und Initiierung der hier beschriebenen Verfahren der RNA-Amplifikation verwendet wird, einen DNA-Abschnitt, der an das RNA-Ziel hybridisiert (welches, wie hier beschrieben, eine beliebige Anzahl an Sequenzpermutationen abhängig von der Natur der RNA (entweder eine Spezies oder eine Population), die amplifiziert werden soll, aufweisen kann). Wenn der Primer für eine Amplifikation eines cDNA-Strangs verwendet wird, der mit hier beschriebenen Verfahren der Erfindung erzeugt ist, ist der zusammengesetzte Primer so gestaltet, dass eine anschließende Verdrängung des Primer-Extensionsprodukts durch ein Binden eines neuen (weiteren) zusammengesetzten Primers und die Extension des neuen Primers durch die Polymerase erhalten werden kann. Zusätzlich führt die Abspaltung des RNA-Abschnitts des Primer-Extensionsprodukts zur Erzeugung eines Amplifikationsprodukts, das kein Substrat für eine Amplifikation durch den zusammengesetzten Primer darstellt. Es ist zu verstehen, dass im nachfolgenden Abschnitt, wo Aspekte der in den Verfahren der Erfindung eingesetzten Primer allgemein beschreiben sind, die beschriebenen Charakteristika auf die Primer übertragbar sind, falls sie für eine Hybridisierung und Initiierung der RNA-Amplifikation (Erzeugung des ersten Extensionsprodukts) und/oder für eine lineare Verdrängungsamplifikation verwendet werden.

[0173] Zusammengesetzte Primer für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen eine Sequenz, die in der Lage ist, an eine Ziel-RNA zu hybridisieren. Die Sequenz, die in der Lage ist, an die Ziel-RNA zu hybridisieren, kann auf der bestimmten Sequenz einer spezifischen Ziel-RNA (z.B. der mRNA eines bestimmten Gens) basieren oder kann auf einem allgemeineren Sequenztyp basieren, von dem bekannt ist, dass er in vielen RNA-Spezies vorkommt, wie die poly-A-Schwanz-Sequenz, von der generell vermutet wird, dass sie in jeder eukaryotischen mRNA vorkommt. Zusätzlich kann die Sequenz, die in der Lage ist, an die Ziel-RNA zu hybridisieren, eine Sequenz umfassen, die zu dem poly-A-Schwanz von mRNA komplementär ist, oder kann außerdem eine zusätzliche Zufallssequenz (welche im Allgemeinen zu einer poly-A-Sequenz nicht komplementär ist) am 3'-Ende des 3'-Abschnitts (oder eine Population von Zufallssequenzen) umfassen.

[0174] Die Sequenz, die in der Lage ist, an die Ziel-RNA zu hybridisieren, kann ebenfalls eine Zufallssequenz umfassen. Zufallsprimer sind in der Technik bekannt, siehe z.B., und umfassen wenigstens folgendes: Primer, die an zwei oder mehrere Sequenzen in einer Probe hybridisierbar sind; und Primer, die poly-dT-Sequenzen umfassen, die an eine Vielzahl an RNAs in einer Probe (wie beispielsweise an alle mRNAs) hybridisierbar sind. Der Einfachheit halber wird oben ein einziger zusammengesetzter Zufallsprimer diskutiert. Allerdings ist es zu verstehen, dass der Ausdruck „Zufallsprimer“ einen Primer bezeichnen kann, der ein Element einer Population von Primern ist, die insgesamt gestaltet sind, um an eine erwünschte und/oder signifikante Population von Zielsequenzen zu hybridisieren.

[0175] Es ist ebenfalls zu verstehen, dass die Amplifikation einer Vielzahl an mRNA-Spezies in einem einzigen Reaktionsgemisch eine Vielzahl an Primern (von zwei bis zu sehr vielen), aber nicht notwendigerweise, erfordert. Folglich wird in der Erfindung die Verwendung einer Vielzahl an verschiedenen zusammengesetzten Primern (zufälligen oder nicht zufälligen) erwogen, wenn eine Vielzahl an mRNA-Spezies in einem einzigen Reaktionsgemisch amplifiziert werden.

[0176] In einigen Anwendungsformen wird ein erster zusammengesetzter Primer in den Verfahren der Erfindung eingesetzt, die jene Schritte beinhalten, die eine lineare Verdrängungsamplifikation (SPIA) des zweiten cDNA-Strangs umfassen. In anderen Anwendungsformen werden ein erster und ein zweiter, anderer, zusammengesetzter Primer in den Verfahren der Erfindung eingesetzt. Der zweite zusammengesetzte Primer wird für den linearen Verdrängungsamplifikation-(SPIA)-Schritt verwendet und kann ein Teil oder die gesamte Sequenz des ersten zusammengesetzten Primers umfassen, und der erste zusammengesetzte Primer kann ein Teil oder die gesamte Sequenz des zweiten zusammengesetzten Primers umfassen. In einigen Anwendungsformen umfasst der zweite zusammengesetzte Primer eine andere Sequenz als der erste zusammengesetzte Primer.

[0177] In einigen Anwendungsformen ist ein Primer so gestaltet, dass der gesamte Primer an die Ziel-RNA hybridisiert. In anderen Anwendungsformen umfasst ein zusammengesetzter Primer eine Sequenz, vorzugsweise am 5'-Ende, die nicht (unter einer gegebenen Reihe an Bedingungen) an das Ziel hybridisierbar ist (zum Beispiel einen nicht hybridisierten 5'-Abschnitt, der einen Schwanz bilden würde, wenn der Primer an das Ziel gebunden ist). Einzelne DNA- und RNA-Abschnitte des zusammengesetzten Primers können komplett oder

partiell an die Ziel-RNA hybridisieren. Zum Beispiel kann der 5'-RNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers partiell hybridisierbar und partiell nicht hybridisierbar sein oder der DNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers kann partiell hybridisierbar und partiell nicht hybridisierbar oder beides kann zutreffen. Eine andere Möglichkeit ist, dass DNA-Abschnitte einen Teil eines „Schwanzes“ bilden können und RNA-Abschnitte partiell oder komplett an Ziel-RNA hybridisierbar sein können. Zum Beispiel kann der 5'-RNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers partiell hybridisierbar und partiell nicht hybridisierbar sein oder der DNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers kann partiell hybridisierbar und partiell nicht hybridisierbar oder beides sein.

[0178] Für eine Verwendung bei der linearen Verdrängungsamplifikation umfasst ein Primer wenigstens einen RNA-Abschnitt, der in der Lage ist (a) an eine Sequenz auf der Zweitstrang-cDNA (austauschbar „zweites Primer-Extensionsprodukt“ oder „zusammengesetztes Primer-Extensionsprodukt“ genannt) zu binden (hybridisieren), unabhängig von einer Hybridisierung des DNA-Abschnitts oder der DNA-Abschnitte an eine Sequenz auf derselben Zweitstrang-cDNA; und (b) mit einem Agens, wie einer Ribonuklease, abgespalten zu werden, wenn er an das Extensionsprodukt des zweiten Primers oder Fragments hybridisiert ist. Der zusammengesetzte Primer bindet an die Zweitstrang-cDNA, um einen partiellen Heteroduplex zu bilden, in dem nur der RNA-Abschnitt des Primers nach Kontakt mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, wie einem Enzym, wie Ribonuklease (wie RNase H), abgespalten wird, während die Zweitstrang-cDNA intakt bleibt, was die Assoziierung eines weiteren zusammengesetzten Primers ermöglicht.

[0179] Wenn der zusammengesetzte Primer für die hier beschriebene lineare Verdrängungsamplifikation verwendet wird, umfasst er ebenfalls einen 3'-DNA-Abschnitt, der in der Lage ist, an eine Sequenz auf der Zweitstrang-cDNA zu hybridisieren, so dass seine Hybridisierung an der Zweitstrang-cDNA gegenüber der Hybridisierung des Nukleinsäure-Strangs begünstigt wird, der von der Zweitstrang-cDNA von der DNA-Polymerase verdrängt wird. Derartige Primer können basierend auf gut bekannten Faktoren, welche die Bindungsaffinität der Nukleinsäure, wie Sequenzlänge und/oder -identität, wie auch Hybridisierungsbedingungen beeinflussen, rational gestaltet werden. In einer bevorzugten Anwendungsform ist die Hybridisierung des 3'-DNA-Abschnitts des zusammengesetzten Primers an seine komplementäre Sequenz in der Zweitstrang-cDNA gegenüber der Hybridisierung der homologen Sequenz in dem 5'-Ende des verdrängten Strangs an der Zweitstrang-cDNA begünstigt.

[0180] Die Erzeugung von Primern, die für eine Extension mittels Polymerisierung geeignet sind, ist in der Technik gut bekannt, wie es beispielsweise in PCT Pub. Nr. WO99/42618 (und darin zitierten Referenzen) beschrieben ist. Der zusammengesetzte Primer umfasst eine Kombination aus RNA und DNA (siehe obige Definition), wobei das 3'-Endnukleotid ein Nukleotid ist, das sich für eine Nukleinsäure-Extension eignet. Das 3'-Endnukleotid kann ein beliebiges Nukleotid oder Analogon sein, das, wenn es in einem Primer vorhanden ist, von einer DNA-Polymerase extendierbar ist. Im Allgemeinen weist das 3'-Endnukleotid ein 3'-OH auf. Geeignete Primer umfassen diejenigen, die wenigstens einen RNA-Abschnitt und wenigstens einen DNA-Abschnitt umfassen. Zum Beispiel können zusammengesetzte Primer einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfassen (wo der RNA-Abschnitt zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart ist); oder 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt umfassen. Dementsprechend umfasst in einer Anwendungsform der zusammengesetzte Primer einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, vorzugsweise worin der RNA-Abschnitt zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart ist. In einer anderen Anwendungsform umfasst der zusammengesetzte Primer 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt (d.h. einen RNA-Abschnitt zwischen zwei DNA-Abschnitten). In einer noch anderen Anwendungsform umfasst der zusammengesetzte Primer der Erfindung einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt (d.h. einen RNA-Abschnitt zwischen zwei DNA-Abschnitten).

[0181] Die Länge eines RNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 50, bevorzugter etwa 3 bis etwa 20, noch bevorzugter etwa 4 bis etwa 15 und am bevorzugtesten etwa 5 bis etwa 10 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt, kann ein RNA-Abschnitt beliebig wenigstens etwa 1, 3, 4, 5 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 10, 15, 20, 25, 30, 50 Nukleotiden umfassen.

[0182] Die Länge des 5'-RNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 3 bis etwa 50 Nukleotide, bevorzugter etwa 5 bis etwa 20 Nukleotide, noch bevorzugter etwa 7 bis etwa 18 Nukleotide, bevorzugt etwa 8 bis etwa 17 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 10 bis etwa 15 Nukleotide betragen. In anderen Anwendungsformen eines zu-

sammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, kann der 5'-RNA-Abschnitt beliebig wenigstens etwa 3, 5, 7, 8, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 15, 17, 18, 20, 50 Nukleotiden umfassen. In einer Anwendungsform besitzt der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt von etwa 14 Nukleotiden.

[0183] In Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, umfassend außerdem nicht-5'-RNA-Abschnitt(e), kann ein nicht-5'-RNA-Abschnitt bevorzugt etwa 1 bis etwa 7 Nukleotide, bevorzugter etwa 2 bis etwa 6 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 3 bis etwa 5 Nukleotide enthalten. In bestimmten Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, umfassend außerdem nicht-5'-RNA-Abschnitt(e), kann ein nicht-5'-RNA-Abschnitt beliebig wenigstens etwa 1, 2, 3, 5 mit einer Obergrenze von beliebig etwa 5, 6, 7, 10 Nukleotiden enthalten.

[0184] In Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, in dem der 5'-RNA-Abschnitt zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart ist, kann die Länge des 5'-RNA-Abschnitts bevorzugt etwa 3 bis etwa 50 Nukleotide, bevorzugter etwa 5 bis etwa 20 Nukleotide, noch bevorzugter etwa 7 bis etwa 18 Nukleotide, bevorzugt etwa 8 bis etwa 17 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 10 bis etwa 15 Nukleotide betragen. In bestimmten Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, in dem der 5'-RNA-Abschnitt zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart ist, kann der 5'-RNA-Abschnitt beliebig wenigstens etwa 3, 5, 7, 8, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 15, 17, 18, 20, 50 Nukleotiden enthalten.

[0185] Die Länge eines dazwischen liegenden RNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 7 Nukleotide, bevorzugter etwa 2 bis etwa 6 Nukleotide, und am bevorzugtesten etwa 3 bis etwa 5 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann ein dazwischen liegender RNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 2, 3, 5 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 5, 6, 7, 10 Nukleotiden enthalten. Die Länge eines dazwischen liegenden RNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 7 Nukleotide, bevorzugter etwa 2 bis etwa 6 Nukleotide, und am bevorzugtesten etwa 3 bis etwa 5 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann ein dazwischen liegender RNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 2, 3, 5 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 5, 6, 7, 10 Nukleotiden enthalten. In einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt und außerdem umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt, kann der 5'-RNA-Abschnitt etwa 3 bis etwa 25 Nukleotide, bevorzugter etwa 5 bis etwa 20 Nukleotide, noch bevorzugter etwa 7 bis etwa 18 Nukleotide, bevorzugt etwa 8 bis etwa 17 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 10 bis etwa 15 Nukleotide enthalten. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, außerdem umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt, kann der 5'-RNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 3, 5, 7, 8, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 15, 17, 18, 20 Nukleotiden enthalten.

[0186] Die Länge des 3'-DNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 20, bevorzugter etwa 3 bis etwa 18, noch bevorzugter etwa 5 bis etwa 15 und am bevorzugtesten etwa 7 bis etwa 12 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt, kann der 3'-DNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 3, 5, 7, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 10, 12, 15, 18, 20, 22 Nukleotiden enthalten.

[0187] Die Länge des 3'-DNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 20, bevorzugter etwa 3 bis etwa 18, noch bevorzugter etwa 5 bis etwa 15 und am bevorzugtesten etwa 7 bis etwa 12 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, kann der 3'-DNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 3, 5, 7, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 10, 12, 15, 18, 20, 22 Nukleotiden enthalten.

[0188] In Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, außerdem umfassend einen nicht-3'-DNA-Abschnitt(e), kann ein nicht-3'-DNA-

schnitt bevorzugt etwa 1 bis etwa 10 Nukleotide, bevorzugter etwa 2 bis etwa 8 Nukleotide und am bevorzugtesten 3 bis etwa 6 Nukleotide enthalten. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, außerdem umfassend einen nicht-3'-DNA-Abschnitt(e), kann ein nicht-3'-DNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 2, 3, 5 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 6, 8, 10, 12 Nukleotiden enthalten.

[0189] In Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, in dem der 5'-RNA-Abschnitt benachbart zu dem 3'-DNA-Abschnitt ist, kann die Länge des 3'-DNA-Abschnitts bevorzugt etwa 1 bis etwa 20, bevorzugter etwa 3 bis etwa 18, noch bevorzugter etwa 5 bis etwa 15 und am bevorzugtesten etwa 7 bis etwa 12 Nukleotide betragen. In bestimmten Anwendungsformen des Primers, umfassend einen 5'-RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, in dem der 5'-RNA-Abschnitt benachbart zu dem 3'-DNA-Abschnitt ist, kann der 3'-DNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 3, 5, 7, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 10, 12, 15, 18, 20, 22 Nukleotiden enthalten.

[0190] Die Länge eines nicht-3'-DNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 10, bevorzugter etwa 2 bis etwa 8 und am bevorzugtesten etwa 3 bis etwa 6 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines Primers, umfassend 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann ein nicht-3'-DNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 2, 3, 5 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 6, 8, 10, 12 Nukleotiden enthalten.

[0191] Die Länge des 3'-DNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 20, bevorzugter etwa 3 bis etwa 18, noch bevorzugter etwa 5 bis etwa 15 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 7 bis etwa 12 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann der 3'-DNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 3, 5, 7, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 10, 12, 15, 18, 20, 22 Nukleotiden enthalten.

[0192] Die Länge eines nicht-3'-DNA-Abschnitts (d.h. jeder beliebige DNA-Abschnitt außer dem 3'-DNA-Abschnitt) in einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 10, bevorzugter etwa 2 bis etwa 8 und am bevorzugtesten etwa 3 bis etwa 6 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann ein nicht-3'-DNA-Abschnitt wenigstens etwa beliebig 1, 3, 5, 7, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 6, 8, 10, 12 Nukleotiden enthalten. Die Länge des 3'-DNA-Abschnitts in einem zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann bevorzugt etwa 1 bis etwa 20 Nukleotide, bevorzugter etwa 3 bis etwa 18, noch bevorzugter etwa 5 bis etwa 15 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 7 bis etwa 12 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen eines zusammengesetzten Primers, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und wenigstens einen dazwischen liegenden RNA-Abschnitt, kann der 3'-DNA-Abschnitt wenigstens beliebig etwa 1, 3, 5, 7, 10 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 10, 12, 15, 18, 20, 22 Nukleotiden enthalten. Es ist zu verstehen, dass die Längen der verschiedenen Abschnitte größer oder kleiner sein können, so wie es unter den Reaktionsbedingungen der Verfahren der Erfindung geeignet ist.

[0193] In einigen Anwendungsformen umfasst der 5'-DNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers das 5' äußerste Nukleotid des Primers. In einigen Anwendungsformen umfasst der 5'-RNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers das 5' äußerste Nukleotid des Primers. In anderen Anwendungsformen umfasst der 3'-DNA-Abschnitt eines zusammengesetzten Primers das 3' äußerste Nukleotid des Primers. In anderen Anwendungsformen ist der 3'-DNA-Abschnitt zu dem 5'-RNA-Abschnitt benachbart und umfasst das 3' äußerste Nukleotid des Primers (und der 5'-RNA-Abschnitt umfasst das 5' äußerste Nukleotid des Primers).

[0194] Die Gesamtlänge des zusammengesetzten Primers kann bevorzugt etwa 10 bis etwa 50 Nukleotide, bevorzugter etwa 15 bis etwa 30 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 20 bis etwa 25 Nukleotide betragen. In einigen Anwendungsformen kann die Länge wenigstens beliebig etwa 10, 15, 20, 25 Nukleotide mit einer Obergrenze von beliebig etwa 25, 30, 50, 60 Nukleotiden betragen. Es ist zu verstehen, dass die Länge der verschiedenen Abschnitte größer oder kleiner sein kann, so wie es unter den Reaktionsbedingungen der Verfahren der Erfindung geeignet ist.

[0195] Um eine Hybridisierung an die Zielnukleinsäure zu erreichen (die, wie es in der Technik gut bekannt

ist, von weiteren Faktoren, wie zum Beispiel Ionenstärke und Temperatur, abhängig ist), ist der Abschnitt des Primers, der an die Ziel-RNA hybridisierbar ist, bevorzugt wenigstens etwa zu 60%, bevorzugter wenigstens etwa zu 75%, noch bevorzugter wenigstens etwa zu 90% und am bevorzugtesten wenigstens etwa zu 95% zu der Zielnukleinsäure komplementär.

[0196] Wie es hier beschrieben ist, können ein oder mehrere Primer in einer Amplifikationsreaktion eingesetzt werden.

Der zweite Primer

[0197] Der zweite Primer in den Verfahren der Erfindung (welcher die Erzeugung des zweiten Primer-Extensionsprodukts startet, das austauschbar als Zweitstrang-cDNA bezeichnet wird) umfasst eine Sequenz (welche der gesamte Primer sein kann oder nicht), die (unter einer gegebenen Reihe an Bedingungen) an einer Erststrang-cDNA (austauschbar als erstes Primer-Extensionsprodukt bezeichnet) an eine Stelle auf der Erststrang-cDNA hybridisierbar ist, so dass die Zweitstrang-cDNA die RNA-Sequenz von Interesse enthalten würde. In einigen Anwendungsformen wird die hybridisierbare Sequenz des zweiten Primers basierend auf einer bekannten Sequenz der erwünschten Bindungsstelle auf einer Erststrang-cDNA gestaltet. In anderen Anwendungsformen basiert die hybridisierbare Sequenz auf Zufallssequenzen, zum Beispiel von denen in der Technik bekannt ist, dass sie sich für ein Zufallspriming der Erststrang-cDNAs eignen, die aus einer Vielzahl an RNA-Spezies erzeugt sind. In anderen Anwendungsformen umfasst der zweite Primer ein Strang-„Switch“-Oligonukleotid, das in U.S. Patent Nr. 5.962.271 und 5.962.272 beschrieben ist, das an die Cap-Sequenzen, die auf der mRNA vorhanden sind, hybridisierbar ist und das die Ursache dafür ist, dass die reverse Transkriptase von dem mRNA-Template zu dem „Switch“-Oligonukleotid wechselt, was die Erzeugung einer von dem „Switch“-Oligonukleotid gestarteten Zweitstrang-cDNA zulässt. Alternativ wird ein homopolymerer Schwanz an den 3'-Terminus des ersten Primer-Extensionsprodukts angefügt und der zweite Primer umfasst das Komplement des homopolymeren Schwanzes.

[0198] In einigen Anwendungsformen umfasst der zweite Primer DNA. In anderen Anwendungsformen besteht der zweite Primer aus DNA. In anderen Anwendungsformen, wie hier beschrieben, ist der zweite Primer ein Fragment der Ziel-RNA, wobei das Fragment durch Abspaltung von der Ziel-RNA erzeugt wird.

[0199] In einigen Anwendungsformen ist der zweite Primer (welcher die Erzeugung der Zweitstrang-cDNA startet) ein zusammengesetzter Primer (wie oben beschrieben). In diesen Anwendungsformen umfasst das Verfahren folgendes: (a) Bildung einer doppelsträngigen cDNA, umfassend einen RNA-DNA-Heteroduplex an einem Ende der cDNA; und (b) lineare Amplifikation der Erststrang-(Sense)-cDNA, wodurch vielfache Kopien einer einzelsträngigen Erststrang-cDNA erzeugt werden.

[0200] Um eine Hybridisierung an die Erststrang-cDNA zu erreichen (die, wie es in der Technik gut bekannt ist, von weiteren Faktoren, wie zum Beispiel Ionenstärke und Temperatur, abhängig ist), ist die Sequenz des zweiten Primers, der an die Erststrang-cDNA hybridisierbar ist, bevorzugt wenigstens etwa zu 60%, bevorzugter wenigstens etwa zu 75%, noch bevorzugter wenigstens etwa zu 90% und am bevorzugtesten wenigstens etwa zu 95% zu der Erststrang-cDNA komplementär.

[0201] In bestimmten Anwendungsformen (welche üblicherweise, aber nicht notwendigerweise, eine Transkription einschließen) kann der zweite Primer ebenfalls eine Sequenz, bevorzugt eine Sequenz am 5'-Ende (welches im Allgemeinen das 5' äußerste Nukleotid umfasst) umfassen, die nicht an die Erststrang-cDNA unter einer gegebenen Reihe an Bedingungen hybridisierbar ist. Diese Sequenz ermöglicht die Erzeugung einer definierten Endsequenz für das 5'-Ende der Zweitstrang-cDNA (und folglich darauffolgend das 3'-Ende der einzelsträngigen DNA-Produkte). Eine definierte Endsequenz am 3'-Ende der einzelsträngigen DNA-Produkte ist besonders vorteilhaft bezüglich einer Hybridisierung eines Propromotor-Polynukleotids (in Anwendungsformen, die einen Transkriptionsschritt einschließen) an verdrängte erste Primer-Extensionsprodukte in den nachfolgenden Schritten. In bestimmten Anwendungsformen umfasst eine nicht-hybridisierbare 5'-Sequenz eine Sequenz, deren Komplement von einem Propromotor-Polynukleotid hybridisierbar ist. Einzelsträngige DNA-Produkte, umfassend eine 3' definierte Endsequenz, sind ebenfalls für eine Hybridisierung an ein komplementäres Oligonukleotid zweckdienlich, das an einen bindenden Partner oder Substrat, zum Beispiel ein generisches Mikroarray, wie hier beschrieben, geheftet ist. Dementsprechend stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Produkte mit einem, wie hier beschriebenen, definierten 3'-Ende bereit.

[0202] In einer Anwendungsform umfasst der zweite Primer DNA. In einer anderen Anwendungsform umfasst der zweite Primer RNA. In einer noch weiteren Anwendungsform umfasst der zweite Primer DNA und RNA.

[0203] In einigen Anwendungsformen wird der Primer durch Selbstpriming (z.B. durch eine Haarnadelschleife) am 3'-Ende des Extensionsprodukts des zusammengesetzten Primers bereitgestellt. In diesen Anwendungsformen hybridisiert eine Sequenz am 3'-Ende des Extensionsprodukts des zusammengesetzten Primers selbst an eine andere Sequenz in dem Extensionsprodukt des zusammengesetzten Primers, zum Beispiel wie im U.S. Patent Nr. 6.132.997 beschrieben. In diesen Anwendungsformen wird diese Sequenz am 3'-Ende des Extensionsprodukts des zusammengesetzten Primers im Allgemeinen (zum Beispiel mit S1-Nuklease) im Anschluss an ihre Hybridisierung an das Extensionsprodukt des zusammengesetzten Primers und/oder ihrer Extension entlang des Extensionsprodukts des zusammengesetzten Primers gespalten. U.S. Patent Nr. 6.132.997.

[0204] In einigen Anwendungsformen wird der zweite Primer von einem oder mehreren Ziel-RNA-Fragmenten bereitgestellt. Ein derartiges RNA-Fragment kann als ein Ergebnis eines unvollständigen Verdaus einer Ziel-RNA in einem Komplex aus Ziel-RNA und erstem Primer-Extensionsprodukt von einem Agens (wie einem Enzym) erzeugt sein, das RNA in einem RNA/DNA-Hybrid spaltet, so dass ein oder mehrere RNA-Fragmente an dem ersten Primer-Extensionsprodukt gebunden bleiben.

Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an ein Primer-Extensionsprodukt hybridisiert.

[0205] Einige Anwendungsformen verwenden ein Propromotor-Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an ein Primer-Extensionsprodukt hybridisiert. In einigen Anwendungsformen ist das Propromotor-Polynukleotid als ein PTO bereitgestellt, wie es unten detaillierter beschrieben wird.

Propromotor-Template-Oligonukleotid

[0206] In einigen Anwendungsformen verwenden die Verfahren eine Propromotorsequenz für die Transkription, die von einem Propromotor-Template-Oligonukleotid (PTO) bereitgestellt ist.

[0207] Ein PTO für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung ist ein einzelsträngiges Polynukleotid, im Allgemeinen DNA, umfassend eine Propromotorsequenz, die für eine Bildung eines doppelsträngigen Promotors einer RNA-Polymerase gestaltet ist, und einen Abschnitt, der zur Hybridisierung an das 3'-Ende eines Primer-Extensionsprodukts fähig ist. In einer Anwendungsform der Erfindung umfasst der Abschnitt, der zur Hybridisierung an das 3'-Ende eines Primer-Extensionsprodukts fähig ist, eine Sequenz, deren Komplement an eine definierte Endsequenz des zweiten Primer-Extensionsprodukts hybridisierbar ist (und folglich nachfolgend das 3'-Ende der einzelsträngigen DNA-Produkte). In einer anderen Anwendungsform umfasst der Abschnitt, der zur Hybridisierung an das 3'-Ende eines Primer-Extensionsprodukts fähig ist, eine Zufallssequenz. In einer weiteren Anwendungsform umfasst der Abschnitt, der zur Hybridisierung an das 3'-Ende eines Primer-Extensionsprodukts fähig ist, eine Sequenz, deren Komplement zur Hybridisierung an Sequenzen fähig ist, die am 3'-Ende einer Vielzahl an Erststrang-cDNAs gefunden werden.

[0208] In einer bevorzugten Anwendungsform ist die Propromotorsequenz im 5'-Abschnitt des Oligonukleotids lokalisiert und die hybridisierende Sequenz ist im 3'-Abschnitt des Oligonukleotids lokalisiert. In einer Anwendungsform, und am üblichsten, sind die Promotorsequenz und die hybridisierende Sequenz verschiedene Sequenzen. In einer anderen Anwendungsform, sind die Promotorsequenz und die hybridisierende Sequenz überlappend identisch. In einer noch anderen Anwendungsform sind die Promotorsequenz und die hybridisierende Sequenz dieselbe Sequenz und sind folglich an derselben Stelle auf dem PTO. In Anwendungsformen, wo die Hybridisierung des PTO an das Primer-Extensionsprodukt einen Duplex ergibt, der einen Überhang umfasst (das 5'-Ende des PTO, das nicht an das verdrängte Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, umfasst üblicherweise die gesamte oder einen Teil der Propromotorsequenz), füllt DNA-Polymerase den Überhang auf, um einen doppelsträngigen Promotor zu schaffen, der in der Lage ist, die Transkription durch eine geeignete RNA-Polymerase zu bewirken.

[0209] Promotorsequenzen, die eine Transkription einer Template-DNA zulassen, sind in der Technik bekannt und sind oben diskutiert worden. Vorzugsweise sind die Promotorsequenzen so ausgewählt, dass sie für eine optimale Transkriptionsaktivität der eingesetzten speziellen RNA-Polymerase sorgen. Auswahlkriterien, d.h. eine bestimmte Promotorsequenz, die von einer speziellen RNA-Polymerase besonders bevorzugt wird, sind in der Technik ebenfalls bekannt. Zum Beispiel sind die Sequenzen des Promotors für eine Transkription von T7-DNA-abhängiger RNA-Polymerase und SP6 in der Technik bekannt. Die Promotorsequenz kann aus einer prokaryotischer oder eukaryotischer Quelle stammen.

[0210] In einigen Anwendungsformen umfasst das PTO eine dazwischen liegende Sequenz zwischen einer Propromotorsequenz und einem Abschnitt, der zur Hybrisierung an das 3'-Ende des Primer-Extensionsprodukts fähig ist. Geeignete Längen der dazwischen liegenden Sequenz können empirisch bestimmt werden und können wenigstens etwa 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 Nukleotide betragen. Eine geeignete Sequenzidentität der dazwischen liegenden Sequenz kann ebenfalls empirisch bestimmt werden, und die Sequenz wird so gestaltet, dass sie vorzugsweise, aber nicht notwendigerweise, das Ausmaß der Amplifikation verglichen mit dem Fall, wo die Sequenz weggelassen ist, verstärkt. In einer Anwendungsform ist die dazwischen liegende Sequenz eine Sequenz, die so gestaltet ist, dass sie für eine verstärkte oder bessere Transkription durch die eingesetzte RNA-Polymerase sorgt. Im Allgemeinen ist die Sequenz nicht mit der Zielnukleinsäure verwandt (d.h. sie hybridisiert im Wesentlichen nicht an die Zielnukleinsäure). Eine bessere Transkription wird erhalten, wenn die Transkriptionsaktivität der Polymerase von einem Promotor, der an dieser Sequenz operativ gebunden ist, größer ist als die Aktivität eines Promotors, der nicht auf diese Weise gebunden ist. Die Sequenzvoraussetzungen für eine optimale Transkription sind im Allgemeinen in der Technik bekannt und sind bereits für verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen, wie in U.S. Patent Nr. 5766849 und 5654142, beschrieben, und können ebenfalls empirisch bestimmt werden.

[0211] In einer anderen Anwendungsform umfasst das PTO eine Sequenz, die 5' zur Propromotorsequenz liegt, d.h. das PTO umfasst weitere Nukleotide (welche transkriptionale regulatorische Sequenzen sein können oder nicht), die 5' zu der Propromotorsequenz liegen. Im Allgemeinen, aber nicht notwendigerweise, ist die Sequenz (unter einer gegebenen Reihe an Bedingungen) nicht an das Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar.

[0212] In einer Anwendungsform kann das PTO nicht als ein Primer für eine Nukleinsäure-Extension wirksam fungieren. Techniken zur Blockierung der Primerfunktion des PTO umfassen jede beliebige Technik, die eine Addition von Nukleotiden an das 3'-Ende des PTO durch eine DNA-Polymerase verhindert. Derartige Techniken sind in der Technik bekannt, einschließlich zum Beispiel Substitution oder Modifikation der 3'-Hydroxylgruppe oder Einbau eines modifizierten Nukleotids, wie ein Didesoxynukleotid, in die äußerste 3'-Position des PTO, das nicht zu einer festen Addition von Nukleotiden durch eine DNA-Polymerase fähig ist. Es ist möglich, das 3'-Ende durch Verwendung einer Markierung oder eines kleinen Moleküls, das ein Element eines spezifischen Bindungspaares ist, wie Biotin, zu blockieren. Es ist ebenfalls möglich, das 3'-Ende durch Addition von Nukleotiden nicht extendierbar zu machen, die entweder wegen einer Nichtkomplementarität oder wegen struktureller Modifikationen, die für Wasserstoffbindungen nicht förderlich sind, nicht an ein Primer-Extensionsprodukt hybridisieren können. In anderen Anwendungsformen ist das PTO nicht blockiert.

[0213] Die Länge des PTO-Abschnitts, der an ein Primer-Extensionsprodukt von Interesse hybridisiert, beträgt bevorzugt etwa 5 bis etwa 50 Nukleotide, bevorzugter etwa 10 bis etwa 40 Nukleotide, noch bevorzugter etwa 15 bis etwa 35 Nukleotide und am bevorzugtesten etwa 20 bis 30 Nukleotide. In einigen Anwendungsformen enthält der hybridisierende Abschnitt wenigstens beliebig des folgenden: 3, 5, 10, 15, 20; und weniger als etwa beliebig des folgenden: 30, 40, 50, 60. Die Komplementarität des hybridisierenden Abschnitts beträgt bevorzugt wenigstens etwa 25%, bevorzugter wenigstens etwa 50%, noch bevorzugter wenigstens etwa 75% und am bevorzugtesten wenigstens etwa 90% zu der Sequenz auf dem Primer-Extensionsprodukt von Interesse, an die er binden soll.

DNA-Polymerase, ein Agens, das zur Spaltung eines RNA-DNA-Hybrids fähig ist, und RNA-Polymerase

[0214] Die Amplifikationsverfahren der Erfindung verwenden folgende Enzyme: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, und ein Agens, das zur Abspaltung eines RNA-Strangs von einem RNA-DNA-Hybrid fähig ist (zum Beispiel eine Ribonuklease, wie RNase H) und bei manchen Aspekten eine DNA-abhängige RNA-Polymerase. Eine oder mehrere dieser Aktivitäten können in einem einzigen Enzym vorgefunden und genutzt werden. Zum Beispiel kann die RNase H-Aktivität von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase geliefert werden (wie beispielsweise von einer reversen Transkriptase) oder kann von einem separaten Enzym bereitgestellt werden. Für dieses Verfahren zweckdienliche reverse Transkriptasen können entweder eine RNase H-Aktivität besitzen oder nicht.

[0215] Ein Aspekt der Erfindung ist die Bildung doppelsträngiger cDNA von einem Primer-RNA-Komplex. Dieser Prozess nutzt im Allgemeinen die Enzymaktivitäten einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und eines Agens, das zur Spaltung eines RNA/DNA-Hybrids fähig ist (wie RNase H).

[0216] RNA-abhängige DNA-Polymerasen für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung sind in der Lage, eine Extension eines Primers gemäß den Verfahren der Erfindung zu bewirken.

Dementsprechend ist eine bevorzugte RNA-abhängige DNA-Polymerase eine Polymerase, die zur Extension eines Nukleinsäure-Primers entlang eines Nukleinsäure-Templates fähig ist, das überwiegend aus Ribonukleotiden besteht. Geeignete RNA-abhängige DNA-Polymerasen für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen eine reverse Transkriptase. Viele reverse Transkriptasen, wie diejenigen vom avianen Myeloblastosevirus (AMV-RT) und Moloney murinen Leukämievirus (MMLV-RT), umfassen mehr als eine Aktivität (zum Beispiel Polymeraseaktivität und Ribonukleaseaktivität) und können bei der Bildung der doppelsträngigen cDNA-Moleküle wirken. Allerdings ist es in manchen Fällen vorzuziehen, eine reverse Transkriptase ohne die RNase H-Aktivität zu verwenden. Reverse Transkriptasen frei von RNase H-Aktivität sind in der Technik bekannt, einschließlich solcher Transkriptasen, die eine Mutation der reversen Wildtyp-Transkriptase aufweisen, wo die Mutation die RNase H-Aktivität eliminiert. In diesen Fällen kann die Zugabe einer RNase H aus anderen Quellen, wie eine aus *E. coli* isolierte, für die Bildung der doppelsträngigen cDNA genutzt werden.

[0217] DNA-abhängige DNA-Polymerasen für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung sind in der Lage, eine Extension des zusammengesetzten Primers gemäß den Verfahren der Erfindung zu bewirken. Dementsprechend ist eine bevorzugte Polymerase diejenige, die zur Extension eines Nukleinsäure-Primers entlang eines Nukleinsäure-Templates fähig ist, das überwiegend aus Desoxynukleotiden besteht. Die Bildung der doppelsträngigen cDNA kann mit einer reversen Transkriptase ausgeführt werden, die sowohl RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivitäten als auch DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivitäten aufweist. Die Amplifikation einer RNA-Sequenz gemäß den Verfahren der Erfindung umfasst die Verwendung einer DNA-Polymerase, die in der Lage ist, einen Nukleinsäurestrang von dem Polynukleotid zu verdrängen, an das der zu verdrängende Strang gebunden ist, und im Allgemeinen wird die Polymerase bevorzugt, die mehr Strangverdrängungsvermögen zeigt (d.h. im Vergleich mit anderen Polymerasen, die kein so hohes Strangverdrängungsvermögen zeigen). Vorzugsweise besitzt die DNA-Polymerase eine hohe Affinität für ein Binden an das 3'-Ende eines Oligonukleotids, das am Nukleinsäurestrang hybridisiert ist. Vorzugsweise besitzt die DNA-Polymerase keine wesentliche Strangbruchaktivität. Im Allgemeinen besitzt die DNA-Polymerase vorzugsweise eine geringe oder keine 5' → 3' Exonukleaseaktivität, um so den Abbau von Primer oder Primer-Extensionspolynukleotiden zu minimieren. Im Allgemeinen ist diese Exonukleaseaktivität von Faktoren, wie pH, Salzkonzentration, ob das Template doppel- oder einzelsträngig ist und so weiter abhängig, die dem Fachmann geläufig sind. Mutierte DNA-Polymerasen, in denen die 5' → 3'-Exonukleaseaktivität verloren gegangen ist, sind in der Technik bekannt und sind für die hier beschriebenen Amplifikationsverfahren geeignet. Mutierte DNA-Polymerasen, denen sowohl 5' nach 3'-Nukleaseaktivitäten als auch 3' nach 5'-Nukleaseaktivitäten fehlen, sind ebenfalls beschrieben worden, zum Beispiel die *exo⁻*-Klenow DNA-Polymerase. Es ist bevorzugt, dass die DNA-Polymerase die Primer-Extensionsprodukte von der Template-Nukleinsäure bei wenigstens etwa 25%, bevorzugter wenigstens etwa 50%, noch bevorzugter wenigstens etwa 75% und am bevorzugtesten wenigstens 90% aller Kontaktbegegnungen zwischen der Polymerase und dem 5'-Ende des Primer-Extensionsprodukts verdrängt. In einigen Anwendungsformen wird die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen mit Strangverdrängungsaktivität bevorzugt. Derartige Polymerasen sind in der Technik bekannt, wie in U.S. Patent Nr. 5744312 (und darin zitierten Referenzen) beschrieben. Vorzugsweise besitzt die DNA-Polymerase eine geringe bis keine Korrekturleseaktivität.

[0218] Geeignete DNA-Polymerasen für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen diejenigen, die in U.S. Patent Nr. 5648211 und 5744312 offen gelegt sind, die *exo⁻* Vent (New England Biolabs), *exo⁻* Deep Vent (New England Biolabs), Bst (BioRad), *exo⁻* Pfu (Stratagene), Bca (Panvera), Sequencing grade Taq (Promega), *exo⁻*-Klenow DNA-Polymerase und thermostabile DNA-Polymerase von *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* umfassen.

[0219] Die Ribonukleasen für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung besitzen die Fähigkeit, Ribonukleotide in einem RNA/DNA-Hybrid abzuspalten. Vorzugsweise spaltet die Ribonuklease in einem RNA/DNA-Hybrid Ribonukleotide ab ungeachtet der Identität und Art der Nukleotide, die den abzuspaltenen Nukleotiden benachbart sind. Es ist bevorzugt, dass die Ribonuklease unabhängig von der Sequenzidentität spaltet. Beispiele für geeignete Ribonukleasen für die Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung sind in der Technik gut bekannt, und schließen Ribonuklease H (RNase H), einschließlich Hybridase, ein.

[0220] Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen für eine Verwendung in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung sind in der Technik bekannt. Es können entweder eukaryotische oder prokaryotische Polymerasen verwendet werden. Beispiele umfassen T7, T3 und SP6 RNA-Polymerase. Im Allgemeinen ist die ausgewählte RNA-Polymerase zur Transkription von der Promotorsequenz ausgehend fähig, die von dem Promotor-Polynukleotid bereitgestellt ist, wie es hier beschrieben ist. Im Allgemeinen ist die RNA-Polymerase

eine DNA-abhängige Polymerase, die bevorzugt die Fähigkeit besitzt, von einem einzelsträngigen DNA-Template zu transkribieren, sofern die Promotorregion doppelsträngig ist.

[0221] Im Allgemeinen sollten die in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung verwendeten Enzyme nicht einen wesentlichen Abbau der Nukleinsäure-Komponenten besagter Verfahren und Zusammensetzungen bewirken.

Reaktionsbedingungen und Nachweis

[0222] Geeignete Reaktionsmedien und -bedingungen für die Ausführung der Verfahren der Erfindung sind diejenigen, die eine Nukleinsäure-Amplifikation gemäß den Verfahren der Erfindung zulassen. Derartige Medien und Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und sind in den verschiedenen Veröffentlichungen, wie U.S. Pat. Nrn. 5.554.516; 5.716.785; 5.130.238; 5.194.370; 6.090.591; 5.409.818; 5.554.517; 5.169.766; 5.480.784; 5.399.491; 5.679.512; und PCT Pub. Nr. WO99/42618. Zum Beispiel kann der eingesetzte Puffer ein Tris-Puffer sein, obwohl andere Puffer ebenfalls verwendet werden können, solange die Puffer-Komponenten für die Enzym-Komponenten der Verfahren der Erfindung nicht hemmend sind. Der pH liegt bevorzugt bei etwa 5 bis etwa 11, bevorzugter bei etwa 6 bis etwa 10, noch bevorzugter bei etwa 7 bis etwa 9 und am bevorzugtesten bei etwa 7,5 bis etwa 8,5. Das Reaktionsmedium kann ebenfalls zweiwertige Metallionen enthalten, wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} , mit Endkonzentrationen der freien Ionen, die im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 15 mM und am bevorzugtesten von etwa 1 bis etwa 10 mM liegen. Das Reaktionsmedium kann ebenfalls weitere Salze, wie KCl oder NaCl, enthalten, die zur Gesamtionenstärke des Mediums beitragen. Zum Beispiel reicht der Konzentrationsbereich eines Salzes, wie KCl, bevorzugt von etwa 0 bis etwa 125 mM, bevorzugter von etwa 0 bis etwa 100 mM und am bevorzugtesten von 0 bis etwa 75 mM. Das Reaktionsmedium kann außerdem Additive enthalten, welche die Leistung der Amplifikationsreaktionen beeinflussen könnten, die aber für die Aktivität der Enzym-Komponenten der Verfahren nicht wesentlich sind. Derartige Additive umfassen Proteine, wie BSA, Einzelstrang bindende Proteine (z.B. T4-Gene 32 protein) und nichtionische Detergenzien, wie NP40 oder Triton. Reagenzien, wie DTT, die in der Lage sind, Enzymaktivitäten aufrechtzuerhalten, können ebenfalls enthalten sein. Derartige Reagenzien sind in der Technik bekannt. Wo es geeignet erscheint, kann ebenfalls ein RNase-Inhibitor (wie Rnasin) enthalten sein, der nicht die Aktivität der im Verfahren eingesetzten RNase hemmt. Jeder Aspekt der Verfahren kann bei gleichen oder bei variierenden Temperaturen erfolgen. Bevorzugt werden die Amplifikationsreaktionen (insbesondere Primer-Extension, außer den Syntheseschritten der Erst- und Zweitstrang-cDNA und Strangverdrängung) isotherm durchgeführt, was die aufwändige Thermozyklisierung vermeidet. Die Amplifikationsreaktion wird bei einer Temperatur ausgeführt, die eine Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer und/oder PTO) der Erfindung an das Template-Polynukleotid und an die Primer-Extensionsprodukte zulässt und nicht wesentlich die Aktivität der eingesetzten Enzyme hemmt. Die Temperatur kann im Bereich von etwa 25°C bis etwa 85°C, bevorzugter von etwa 30°C bis etwa 80°C und am bevorzugtesten von etwa 37°C bis etwa 75°C liegen. In einigen Anwendungsformen, die eine RNA-Transkription einschließen, ist die Temperatur für den Transkriptionsschritt geringer als die Temperatur(en) für die vorhergehenden Schritte. In diesen Anwendungsformen kann die Temperatur für den Transkriptionsschritt bevorzugt im Bereich von etwa 25°C bis etwa 85°C, bevorzugter von etwa 30°C bis etwa 75°C und am bevorzugtesten von etwa 37°C bis etwa 70°C liegen.

[0223] Nukleotide und/oder Nukleotidanaloga, wie Desoxyribonukleosidtriphosphate, die für die Synthese der Primer-Extensionsprodukte in den Verfahren der Erfindung verwendet werden können, werden in einer Menge bevorzugt von etwa 50 bis etwa 2500 μM , bevorzugter von etwa 100 bis etwa 2000 μM , noch bevorzugter von etwa 200 bis etwa 1700 μM und am bevorzugtesten von etwa 250 bis etwa 1500 μM bereitgestellt. In einigen Anwendungsformen ist ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen enthalten, dessen Vorhandensein in dem Primer-Extensionsstrang eine Verdrängung des Strangs verstärkt (zum Beispiel durch die Ausbildung einer Basenpaarung, die schwächer als die normale AT- oder CG-Basenpaarung ist). Derartige Nukleotide oder Nukleotidanaloga umfassen Desoxyinosin und andere modifizierte Basen, die alle in der Technik bekannt sind. Nukleotide und/oder Analoga, wie Ribonukleosidtriphosphate, die für die Synthese der RNA-Transkripte in den Verfahren der Erfindung verwendet sein können, werden in einer Menge bevorzugt von etwa 0,25 bis etwa 6 mM, bevorzugter von etwa 0,5 bis etwa 5 mM, noch bevorzugter von etwa 0,75 bis etwa 4 mM und am bevorzugtesten von etwa 1 bis etwa 3 mM bereitgestellt.

[0224] Die Oligonukleotid-Komponenten der Amplifikationsreaktionen der Erfindung liegen im Allgemeinen im Überschuss zur Anzahl an Zielnukleinsäure-Sequenz vor, die amplifiziert werden soll. Sie können beliebig mit etwa oder wenigstens etwa der folgenden Menge bereitgestellt werden, welche der 10, 10², 10⁴, 10⁶, 10⁸, 10¹⁰, 10¹²-fachen der Menge an Zielnukleinsäure entspricht. Zusammengesetzte Primer und PTO können jeweils beliebig mit etwa oder wenigstens etwa der folgenden Konzentrationen bereitgestellt werden: 50 nM, 100 nM,

500 nM, 1000 nM, 2500 nM, 5000 nM.

[0225] In einer Anwendungsform werden die zuvor erwähnten Komponenten gleichzeitig am Anfang des Amplifikationsprozesses zugegeben. In einer anderen Anwendungsform werden die Komponenten in einer beliebigen Reihenfolge vor oder nach geeigneten Zeitpunkten während des Amplifikationsprozesses zugegeben, wie es die Amplifikationsreaktion erfordert und/oder zulässt. Derartige Zeitpunkte, wovon einige unten angegeben sind, können ohne weiteres von einem Fachmann ermittelt werden. Die Enzyme, die für eine Nukleinsäure-Amplifikation gemäß den Verfahren der Erfindung verwendet werden, können entweder vor dem Zielnukleinsäure-Denaturierungsschritt, nach dem Denaturierungsschritt oder nach der Hybridisierung des Primers an die Ziel-RNA zu dem Reaktionsgemisch gegeben werden, wie es mit Hilfe ihrer thermischen Stabilität und/oder anderer Überlegungen, die dem Fachmann bekannt sind, bestimmt wird. Synthesereaktionen der Erststrang-cDNA (Extensionsprodukt des zusammengesetzten Primers) und der Zweitstrang-cDNA (Extensionsprodukt des zweiten Primers) können aufeinanderfolgend durchgeführt werden, gefolgt von den Amplifikationsschritten (Binden von einem weiteren zusammengesetzten Primer, Primerextension und Strangverdrängung). In diesen Anwendungsformen können die Reaktionsbedingungen und Komponenten bei den verschiedenen Reaktionen variieren.

[0226] Der Amplifikationsprozess kann zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgenommen werden. Diese Zeitpunkte können ohne weiteres von einem Fachmann ermittelt werden. Ein Zeitpunkt ist das Ende der Synthese der Erststrang-cDNA. Ein weiterer Zeitpunkt ist das Ende der Synthese der Zweitstrang-cDNA. Verfahren zum Stoppen der Reaktionen sind in der Technik bekannt, einschließlich zum Beispiel Kühlen des Reaktionsgemisches auf eine Temperatur, welche die Enzymaktivität hemmt, oder Erwärmen des Reaktionsgemisches auf eine Temperatur, welche ein Enzym zerstört. Verfahren zur Wiederaufnahme der Reaktionen sind in der Technik bekannt, einschließlich zum Beispiel Erhöhen der Temperatur des Reaktionsgemisches auf eine Temperatur, welche eine Enzymaktivität zulässt oder ein zerstörtes (erschöpftes) Enzym wiederherstellt. In einigen Anwendungsformen wird eine oder mehrere Komponenten der Reaktion vor, bei oder nach der Wiederaufnahme der Reaktionen ergänzt. Zum Beispiel kann es erforderlich sein, den zusammengesetzten Primer vor dem Beginn der linearen Amplifikationsreaktion zu ergänzen, falls der gleiche Primer weiter verwendet wird. Alternativ darf die Reaktion ohne eine Unterbrechung ablaufen (d.h. vom Start zum Ende).

[0227] Die Reaktion darf ohne eine Reinigung der intermediären Komplexe ablaufen, zum Beispiel um Primer zu entfernen. Produkte können zu verschiedenen Zeitpunkten gereinigt werden, die ohne weiteres vom Fachmann ermittelt werden können. Ein Zeitpunkt ist das Ende der Synthese der Erststrang-cDNA. Ein weiterer Zeitpunkt ist das Ende der Synthese der Zweitstrang-cDNA. Wir haben beobachtet, dass eine routinemäßige Reinigung des Komplexes aus erster und zweiter cDNA zu einer geringfügig höheren Amplifikationseffizienz in den nachfolgenden linearen Amplifikationsschritten führt.

[0228] Der Nachweis des Amplifikationsprodukts ist ein Hinweis auf das Vorhandensein der Zielsequenz. Eine quantitative Analyse ist ebenfalls durchführbar. Direkte und indirekte Nachweisverfahren (einschließlich quantitativer Bestimmung) sind in der Technik gut bekannt. Zum Beispiel kann durch Vergleich der Menge an amplifiziertem Produkt von einer Testprobe, die eine unbekannte Menge eines Zielsequenz enthaltenden Polynukleotids enthält, mit dem Amplifikationsprodukt einer Referenzprobe, die eine bekannte Menge eines Polynukleotids besitzt, das eine Zielsequenz enthält, die Menge an Zielsequenz in der Testprobe bestimmt werden. Die Amplifikationsverfahren der Erfindung können ebenfalls auf eine Analyse von Sequenzänderungen und Sequenzierung der Zielnukleinsäure erweitert werden. Außerdem könnte ein Nachweis mit Hilfe, zum Beispiel einer Untersuchung von Translationsprodukten von RNA-Amplifikationsprodukten, bewerkstelligt werden.

Zusammensetzungen und Kits der Erfindung

[0229] Die Erfindung stellt ebenfalls Zusammensetzungen und Kits bereit, die in den hier beschriebenen Verfahren verwendet werden. Die Zusammensetzungen können hier beschriebene beliebige Komponente(n), Reaktionsgemische und/oder Intermediate, wie auch beliebige Kombinationen davon, sein. Zum Beispiel stellt die Erfindung eine Zusammensetzung bereit, umfassend einen zusammengesetzten Primer und einen zweiten Primer, wobei der zweite Primer ein Zufallsprimer ist. In einigen Anwendungsformen umfasst der zweite Primer DNA. In anderen Anwendungsformen besteht der zweite Primer aus RNA. In einem noch anderen Beispiel umfasst die Zusammensetzung einen zusammengesetzten Primer und einen zweiten Primer, der eine Nichtzielsequenz umfasst, der zum Zwecke der Erzeugung verdrängter Primer-Extensionsprodukte enthalten ist, an die ein Promotor-Polynukleotid hybridisieren kann. Dieser zweite Primer kann ebenfalls ein Zufallsprimer sein.

[0230] In einigen Anwendungsformen umfasst der zusammengesetzte Primer einen zu dem DNA-Abschnitt benachbarten RNA-Abschnitt. In einer weiteren Anwendungsform umfasst der zusammengesetzte Primer 5'- und 3'-DNA-Abschnitte mit wenigstens einem dazwischen liegenden RNA-Abschnitt. In anderen Anwendungsformen umfasst der zusammengesetzte Primer einen poly-dT-Abschnitt. In einem weiteren Beispiel umfasst die Erfindung einen zusammengesetzten Primer, der ein Zufallsprimer ist. In einigen Anwendungsformen umfasst der zusammengesetzte Zufallsprimer oder zusammengesetzte Primer, der einen poly-dT-Abschnitt umfasst, außerdem einen Abschnitt, der an ein Ziel nicht hybridisierbar ist (unter Bedingungen, bei denen ein Abschnitt des Primers an ein Ziel hybridisiert). In anderen Beispielen stellt die Erfindung eine Zusammensetzung bereit, umfassend einen zusammengesetzten Primer, der außerdem durch Anheften einer Komponente derivatisiert ist, die zur Bewerkstelligung einer Bindung eines Polynukleotids fähig ist, umfassend den zusammengesetzten Primer, an ein festes Substrat, das zur Herstellung von Nukleinsäure-Mikroarrays verwendet wird. In einigen Anwendungsformen ist der zusammengesetzte Primer außerdem durch Anheften einer positiv geladenen Komponente, wie ein Amin, derivatisiert.

[0231] In einigen Anwendungsformen stellt die Erfindung eine Zusammensetzung bereit, umfassend einen zusammengesetzten Primer und ein Polynukleotid, umfassend eine Propromotorsequenz, wie ein PTO (d.h. in einer beliebigen der hier beschriebenen Anwendungsformen). Bezüglich der Zusammensetzungen, die einen Zufallsprimer enthalten, können diese Zusammensetzungen ebenfalls eine Vielzahl an Zufallsprimern (d.h. eine Population an Zufallsprimern mit verschiedenen Sequenzen) enthalten.

[0232] In bestimmten Anwendungsformen umfasst die Zusammensetzung (a) einen zusammengesetzten Primer; (b) einen zweiten Primer (welcher ein Zufallsprimer sein kann); und (c) eine reverse Transkriptase. In noch anderen Anwendungsformen umfasst die Zusammensetzung (a) einen zusammengesetzten Primer; (b) einen zweiten Primer (welcher ein Zufallsprimer sein kann); (c) eine reverse Transkriptase; und (d) eine DNA-Polymerase. In einigen Anwendungsformen umfasst die Zusammensetzung (a) einen zusammengesetzten Primer; (b) einen zweiten Primer (welcher ein Zufallsprimer sein kann); und (c) ein Polynukleotid, umfassend eine Propromotorsequenz (welche ein PTO sein kann). Jede beliebige dieser oberen Zusammensetzungen kann außerdem Ziel-RNA (welche eine RNA-Sequenz von Interesse umfasst) und/oder beliebige der hier beschriebenen Enzyme (wie DNA-Polymerase, zum Beispiel reverse Transkriptase, RNase H und/oder RNA-Polymerase) umfassen. Die Zusammensetzungen liegen im Allgemeinen in lyophilisierter oder wässriger Form, vorzugsweise in einem geeigneten Puffer, vor.

[0233] Die Erfindung stellt ebenfalls Zusammensetzungen bereit, umfassend die hier beschriebenen Amplifikationsprodukte. Dementsprechend stellt die Erfindung eine Population an DNA- oder RNA-Molekülen bereit, die Kopien oder das Komplement einer Zielsequenz sind, die mit Hilfe eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren (oder Zusammensetzungen, umfassend die Produkte) erzeugt werden.

[0234] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine Population von Sense-Polynukleotidmolekülen (vorzugsweise DNA) und Antisense-Polynukleotidmolekülen (vorzugsweise DNA) bereit, die Kopien und Komplemente einer Zielsequenz sind und mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren erzeugt sind. Die Erfindung umfasst ebenfalls Zusammensetzungen und verschiedene Konfigurationen (wie Arrays) dieser Populationen, die homogen (gleiche Sequenz) oder heterogen (unterschiedliche Sequenz) sein können. Diese Populationen können eine Ansammlung von Sequenzen sein, die mit den hier beschriebenen Verfahren erhalten sind, einschließlich basierend auf mRNA, ebenso wie bestimmte mRNA-Spezies oder mRNA-Klassen.

[0235] Die Zusammensetzungen liegen im Allgemeinen in einem geeigneten Medium vor, obwohl sie in lyophilisierter Form vorliegen können. Geeignete Medien umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt, wässrige Medien (wie reines Wasser oder Puffer).

[0236] Die Erfindung stellt Kits für die Durchführung der Verfahren der Erfindung bereit. Dementsprechend werden eine Reihe verschiedener Kits in einer geeigneten Verpackung bereitgestellt. Die Kits können für eine oder mehrere hier beschriebene Verwendungen eingesetzt werden und dementsprechend können sie Anleitungen für eine oder mehrere der folgenden Verwendungen enthalten: Amplifizieren einer RNA-Sequenz; Sequenzierung einer RNA-Sequenz von Interesse; Nachweis einer Sequenzmutation basierend auf der Amplifizierung einer RNA-Sequenz (z.B. Genotypisierung oder Nachweis einer Nukleinsäuremutation); Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Sequenz von Interesse; Verfahren zum Expressionsprofiling, Verfahren zur subtraktiven Hybridisierung; Verfahren zur Herstellung einer subtraktiven Hybridisierungssonde; Verfahren zur differentiellen Amplifikation; Verfahren zur Herstellung von Bibliotheken (einschließlich cDNA- und differentieller Expressionsbibliotheken); Verfahren zur Herstellung einer immobilisierten Nukleinsäure (die eine auf einem Mikroarray immobilisierte Nukleinsäure sein kann) und Verfahren zur Charakterisierung ampli-

fizierter Nukleinsäureprodukte, die mit den Verfahren der Erfindung erzeugt werden.

[0237] Die Kits der Erfindung umfassen ein oder mehrere Behälter, die eine beliebige Kombination der hier beschriebenen Komponenten umfassen, und nachfolgend sind Beispiele für derartige Kits angeführt. Ein Kit kann einen beliebigen der hier beschriebenen Primer umfassen. In einigen Anwendungsformen umfasst ein Kit zwei oder mehrere zusammengesetzte Primer, die separat verpackt sein können. Ein Kit kann einen zusammengesetzten Primer und ein Polynukleotid umfassen, das eine Propromotorsequenz (die ein PTO sein kann) umfasst. Ein Kit kann außerdem einen zweiten Primer (der ein Zufallsprimer sein kann) umfassen. Der zusammengesetzte Primer kann markiert oder unmarkiert sein. Die Kits können gegebenenfalls außerdem irgendeines oder mehrere der hier beschriebenen Enzyme (zum Beispiel RNA-abhängige DNA-Polymerase, wie reverse Transkriptase, und Ribonuklease, wie RNase H) wie auch Desoxynukleosidtriphosphate (markiert oder unmarkiert) und/oder Ribonukleosidtriphosphate (markiert oder unmarkiert) enthalten. Die Kits können ebenfalls einen oder mehrere geeignete Puffer enthalten (wie hier beschrieben). Die für eine Nukleinsäure-Sequenzierung zweckdienlichen Kits können gegebenenfalls markierte oder unmarkierte Nukleotidanaloga enthalten, die nach einem Einbau in ein Primer-Extensionsprodukt oder RNA-Transkript einen Abbruch der Nukleotidpolymerisierung bewirken. Ein oder mehrere Reagenzien in dem Kit können als ein trockenes Pulver, üblicherweise lyophilisiert, einschließlich Exzipienten, geliefert werden, die nach einem Auflösen eine Reagenzlösung mit den geeigneten Konzentrationen für eine Durchführung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren bereitstellen. Jede Komponente kann in separaten Behältern oder einige Komponenten können in einem Behälter gemeinsam enthalten sein, wo es die Kreuzreaktivität und Haltbarkeit zulassen.

[0238] Die Kits der Erfindung können gegebenenfalls eine Reihe von Anleitungen, im allgemeinen in Papierform, enthalten, obwohl elektronische Speichermedien (z.B. magnetische Diskette oder optische Diskette), welche die Anleitungen enthalten, ebenfalls geeignet sind, die sich auf die Verwendung von Komponenten der Verfahren der Erfindung für die beabsichtigte Nukleinsäure-Amplifikation und/oder, wenn geeignet, für eine Verwendung der Amplifikationsprodukte für Zwecke, wie Nukleinsäure-Sequenzierung und Nachweis von Sequenzmutationen, beziehen. Die dem Kit beigelegten Anleitungen enthalten im Allgemeinen Informationen über Reagenzien (ob im Kit enthalten oder nicht), die für die praktische Anwendung der Verfahren erforderlich sind, Anleitungen über die Einsatzmöglichkeiten des Kits und/oder geeignete Reaktionsbedingungen. Zum Beispiel können die Kits der Erfindung umfassen: einen zusammengesetzten Primer (der einen poly-dT-Abschnitt umfassen kann und/oder ein Zufallsprimer sein kann), einen zweiten Primer (der ein Zufallsprimer sein kann) und Anleitungen für eine Verwendung der Primer für eine Amplifizierung von RNA gemäß den Verfahren der Erfindung. In einem weiteren Beispiel umfassen die Kits der Erfindung: einen zusammengesetzten Primer (der einen poly-dT-Abschnitt umfassen kann und/oder ein Zufallsprimer sein kann) und Anleitungen für eine Verwendung der Primer für eine Amplifizierung von RNA gemäß den Verfahren der Erfindung. In einem weiteren Beispiel umfassen die Kits der Erfindung: einen zusammengesetzten Primer, einen zweiten Primer (der ein Zufallsprimer sein kann) und Anleitungen für eine Erzeugung doppelsträngiger komplementärer DNA von einem RNA-Ziel und/oder für eine Amplifizierung von RNA gemäß den Verfahren der Erfindung. In einem noch weiteren Beispiel umfasst jedes dieser Kits außerdem ein Propromotor-Polynukleotid und Anleitungen zur Herstellung eines Duplex von Primer-Extensionsprodukt und dem Propromotor-Polynukleotid, so dass eine doppelsträngige Promotorregion erzeugt wird und/oder für eine Amplifizierung von RNA gemäß den Verfahren der Erfindung. In einem anderen Beispiel umfassen die Kits der Erfindung einen zusammengesetzten Primer (der einen poly-dT-Abschnitt umfassen kann und/oder ein Zufallsprimer sein kann), der in der Lage ist, eine Erststrang-cDNA zu erzeugen, einen zweiten zusammengesetzten Primer, der in der Lage ist, an eine Erststrang-cDNA zu hybridisieren, und Anleitungen für die Verwendung der Primer, um doppelsträngige cDNA gemäß einem beliebigen Verfahren der Erfindung zu erzeugen. In einem anderen Beispiel umfassen die Kits der Erfindung einen doppelsträngigen cDNA-Komplex (umfassend Erst- und Zweitstrang-cDNA), der einen einzelsträngigen 3'-Abschnitt umfasst. In einem noch anderen Beispiel umfasst außerdem jedes dieser Kits eine oder mehrere Kontrollen (die zum Beispiel ein RNA-Template, zusammengesetzte Primer und/oder ein doppelsträngiger cDNA-Komplex (umfassend Erst- und Zweitstrang-cDNA), der einen einzelsträngigen 3'-Abschnitt umfasst, sein können).

[0239] Die Komponente(n) des Kits können in jeder beliebigen passenden, geeigneten Verpackung verpackt sein. Die Komponenten können getrennt oder in einer oder vielen Kombinationen verpackt sein. Wo die Kits für die praktische Durchführung von Amplifikationsverfahren der Erfindung, die eine Transkription umfassen, bereitgestellt sind, so wird die RNA-Polymerase (falls enthalten) vorzugsweise getrennt von den Komponenten bereitgestellt, die in den Schritten vor den Transkriptionsschritten verwendet werden.

[0240] Die relativen Mengen der verschiedenen Komponenten in den Kits können sehr weit variiert werden, um Konzentrationen der Reagenzien bereitzustellen, welche die Reaktionen wesentlich optimieren, die bei der

praktischen Umsetzung der hier offen gelegten Verfahren erfolgen müssen und/oder um die Empfindlichkeit eines jeden Assays noch weiter optimieren.

[0241] Die Erfindung stellt ebenfalls Systeme für eine erfolgreiche Durchführung der hier beschriebenen Verfahren bereit. Diese Systeme umfassen verschiedene Kombinationen der oben diskutierten Komponenten. Zum Beispiel stellt in einigen Anwendungsformen die Erfindung ein System bereit, das für eine Erzeugung einer Zielpolynukleotidsequenz (oder Amplifizierung einer Zielpolynukleotidsequenz) geeignet ist, umfassend (a) einen zusammengesetzten Primer (einen beliebigen der hier beschriebenen Primer), (b) DNA-Polymerase; und (c) Ribonuklease. In einigen Anwendungsformen umfasst das System außerdem ein Polynukleotid, umfassend eine Propromotorsequenz (welche ein PTO sein kann) und eine DNA-abhängige RNA-Polymerase. In anderen Anwendungsformen umfasst das System außerdem eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Jede beliebige Anwendungsform der Systeme kann ebenfalls eine Template-(Ziel)-Sequenz umfassen, wie es hier beschrieben ist. Ein System umfasst im Allgemeinen ein oder mehrere Geräte für die Ausführung der Amplifikationsverfahren der Erfindung. Derartige Geräte umfassen zum Beispiel Heizvorrichtungen (wie Heizblöcke oder Wasserbäder) und Geräte, die eine Automatisierung von einem oder mehreren Schritten der hier beschriebenen Verfahren bewirken. Die Verfahren der Erfindung sind besonders für eine Verwendung mit miniaturisierten Geräten geeignet, wenn ein Temperaturwechsel nicht bei jedem Schritt erforderlich ist. Ein nicht einschränkendes Beispiel geeigneter Geräte umfasst den BioAnalyzer (Agilent und Caliper) und den eSensor.

[0242] Die Erfindung stellt ebenfalls Reaktionsgemische (oder Zusammensetzungen, die Reaktionsgemische umfassen) bereit, die verschiedene Kombinationen von hier beschriebenen Komponenten enthalten. Beispiele für Reaktionsgemische sind beschrieben worden. In einigen Anwendungsformen stellt die Erfindung Reaktionsgemische bereit, umfassend (a) eine Ziel-RNA; (b) einen zusammengesetzten Primer, umfassend einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt; (c) einen zweiten Primer; und (d) DNA-Polymerase. Wie hier beschrieben, kann ein beliebiger der zusammengesetzten Primer in dem Reaktionsgemisch enthalten sein (oder eine Vielzahl an zusammengesetzten Primern), einschließlich eines zusammengesetzten Primers, der einen 5'-RNA-Abschnitt umfasst, der zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart ist. Das Reaktionsgemisch könnte ebenfalls außerdem ein Enzym, wie RNase H, umfassen, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet. Ein Reaktionsgemisch der Erfindung kann ebenfalls außerdem ein Polynukleotid umfassen, das eine wie hier beschriebene Propromotorsequenz umfasst. Ein weiteres Beispiel für ein Reaktionsgemisch ist (a) ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt (das als solches an seinem 5'-Ende eine Sequenz enthält, die zu dem 3'-DNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers komplementär ist, aber keine Sequenz enthält, die zu dem RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers komplementär ist); (b) ein Polynukleotid, umfassend eine Propromotorsequenz (zum Beispiel ein PTO); und (c) eine RNA-Polymerase. Weitere Reaktionsgemische sind hier beschrieben und werden von der Erfindung umfasst.

[0243] Die Erfindung umfasst ebenfalls Zusammensetzungen, umfassend einen beliebigen der hier beschriebenen Komplexe (welche in den hier beschriebenen Verfahren Intermediate sind). Beispiele für derartige Komplexe sind in **Fig. 1-8** schematisch dargestellt. Als ein Beispiel für einen Komplex der Erfindung dient ein Komplex, umfassend: (a) einen Ziel-RNA-Strang; und (b) einen zusammengesetzten Primer, wobei dieser Primer einen 3'-DNA-Abschnitt und einen RNA-Abschnitt umfasst. Der zusammengesetzte Primer kann einen RNA-Abschnitt besitzen, der 5' liegt und zu dem 3'-DNA-Abschnitt benachbart ist. Als ein weiteres Beispiel für einen Komplex der Erfindung dient ein Komplex, umfassend: (a) ein Extensionsprodukt eines zusammengesetzten Primers; und (b) einen Ziel-RNA-Strang. In einem noch weiteren Beispiel ist ein Komplex der Erfindung ein Komplex, umfassend: (a) ein erstes Primer-Extensionsprodukt, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; und (b) einen zweiten Primer. In einem wiederum weiteren Beispiel ist ein Komplex der Erfindung ein Komplex, umfassend: (a) ein erstes Primer-Extensionsprodukt, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; und (b) ein zweites Primer-Extensionsprodukt. In einem noch weiteren Beispiel ist ein Komplex der Erfindung ein Komplex, umfassend: (a) ein verdrängtes Primer-Extensionsprodukt, wobei der Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; und (b) ein Propromotor-Polynukleotid (wie ein PTO).

[0244] In einem noch weiteren Beispiel ist ein Komplex der Erfindung ein doppelsträngiger cDNA-Komplex, umfassend außerdem einen RNA/DNA-Abschnitt an einem Ende, der mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren erzeugt wird. In einigen Anwendungsformen umfasst außerdem der doppelsträngige cDNA-Komplex einen zweiten RNA/DNA-Abschnitt an einem zweiten Ende. In einem noch anderen Beispiel ist der Komplex der Erfindung ein erstes und zweites Primer-Extensionsprodukt, umfassend einen einzelsträngigen 3'-DNA-Abschnitt, umfassend einen einzelsträngigen 3'-DNA-Abschnitt, der mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren erzeugt wird. In einigen Anwendungsformen umfasst die Zusammensetzung außer-

dem eine zweite 3' einzelsträngige Region. In einem anderen Beispiel ist der Komplex der Erfindung (a) ein Komplex aus erstem und zweitem Primer-Extensionsprodukt, umfassend einen einzelsträngigen 3'-DNA-Abchnitt, und (b) ein zusammengesetzter Primer, der an ein zweites Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist. In einem anderen Beispiel ist der Komplex der Erfindung ein Komplex aus einer Erststrang-cDNA und einer Zweitstrang-cDNA (der mittels Extension entlang der Erststrang-cDNA von einem Primer erzeugt wird). In einigen Anwendungsformen umfasst der Primer ein Fragment von Template-RNA, das an die Erststrang-cDNA hybridisiert ist. In einigen Anwendungsformen ist der Primer DNA.

Verfahren, die Amplifikationsverfahren und Zusammensetzungen der Erfindung nutzen

[0245] Die Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung können für verschiedene Zwecke genutzt werden. Zum Zweck der Veranschaulichung sind Verfahren zur Sequenzierung, Genotypisierung (Nachweis einer Nukleinsäuremutation), Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Sequenz von Interesse, Präparierung einer immobilisierten Nukleinsäure (die eine auf einem Mikroarray immobilisierte Nukleinsäure sein kann) und Charakterisierung von Nukleinsäuren unter Verwendung amplifizierter Nukleinsäureprodukte, die mit den Verfahren der Erfindung erzeugt werden, beschrieben. Verfahren zum Genexpressionsprofiling, Verfahren zur subtraktiven Hybridisierung und der Herstellung von Sonden für eine subtraktive Hybridisierung, und Verfahren zur Herstellung von Bibliotheken (welche cDNA- und differenzielle Expressionsbibliotheken sein können) sind ebenfalls beschrieben.

Sequenzierung von RNA-Zielen unter Anwendung der Verfahren der Erfindung

[0246] Die Amplifikationsverfahren der Erfindung sind, zum Beispiel für eine Sequenzierung von einer RNA-Sequenz von Interesse, zweckdienlich. Das Sequenzierungsverfahren wird durch Amplifizierung einer Ziel-RNA, welche die Sequenz von Interesse enthält, mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren ausgeführt. Die Addition von Nukleotiden während der Primerextension wird mit Hilfe in der Technik bekannter Verfahren analysiert, zum Beispiel Einbau eines Terminator-Nukleotids oder Sequenzierung mittels Synthese (z.B. Pyrosequenzierung).

[0247] In Anwendungsformen, wo das Endprodukt in Form von verdrängten DNA-Primer-Extensionsprodukten vorliegt, können zusätzlich zu den Nukleotiden, wie natürliche Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), die in den Amplifikationsverfahren verwendet werden, geeignete Nukleotidtriphosphat-Analoga, die markiert oder unmarkiert sein können und nach einem Einbau in ein Primer-Extensionsprodukt den Abbruch der Primerextension bewirken, zu dem Reaktionsgemisch gegeben werden. Vorzugsweise werden die dNTP-Analoga nach einem hinreichend langen, seit dem Start der Amplifikationsreaktion vergangenen Reaktionszeitraum zugegeben, so dass eine erwünschte Menge an zweitem Primer-Extensionsprodukt oder Fragment-Extensionsprodukt erzeugt worden ist. Dieser Zeitraum kann von einem Fachmann empirisch bestimmt werden.

[0248] In Anwendungsformen, wo das Endprodukt in Form von RNA-Produkten vorliegt, kann eine Sequenzierung auf einer vorzeitigen (absichtlichen) Beendigung der RNA-Transkription beruhen. Die Zugabe von rNTP-Analoga zu dem Reaktionsgemisch, die markiert oder unmarkiert sein können und nach Einbau in ein RNA-Transkript den Abbruch der rNTP-Polymerisierung bewirken, führt zur Produktion verkürzter RNA-Produkte, die aus der Blockierung der RNA-Polymerase an den Einbaustellen der Analoga resultieren.

[0249] Geeignete Analoga (dNTP und rNTP) umfassen diejenigen, die in anderen Sequenzierungsverfahren üblicherweise verwendet werden und in der Technik gut bekannt sind. Beispiele für dNTP-Analoga umfassen Didesoxyribonukleotide. Beispiele für rNTP-Analoga (wie RNA-Polymerase-Terminatoren) umfassen 3'-dNTP. Sasaki et al., Biochemistry (1998) 95:3455-3460. Diese Analoga können markiert sein, zum Beispiel mit Fluorochromen oder Radioisotopen. Diese Markierungen können ebenfalls Markierungen sein, die sich für die Massenspektroskopie eignen. Die Markierung kann ebenfalls ein kleines Molekül sein, das ein Element eines spezifischen Bindungspaares ist und nach dem Binden des anderen Elements des spezifischen Bindungspaares detektiert werden kann, wie beispielsweise Biotin und Streptavidin, wobei das letztgenannte Element des Bindungspaares an ein Enzym konjugiert ist, das die Erzeugung eines detektierbaren Signals katalysiert, das mit Verfahren, wie Kolorimetrie, Fluorometrie oder Chemolumineszenz, detektiert werden könnte. Alle oberen Beispiele sind in der Technik bekannt. Diese werden in das Primer-Extensionsprodukt oder in die RNA-Transkripte durch die Polymerase eingebaut und dienen der Beendigung der weiteren Extension entlang einer Templatesequenz. Die resultierenden verkürzten Polymerisierungsprodukte sind markiert. Die angehäuften verkürzten Produkte variieren in ihrer Länge, je nach der Einbaustelle des jeweiligen Analogons, welche die verschiedenen Sequenzpositionen eines komplementären Nukleotids auf der Templatesequenz darstellen.

[0250] Eine Analyse der Reaktionsprodukte zur Aufklärung der Sequenzinformation kann unter der Anwendung beliebiger verschiedener in der Technik bekannter Verfahren ausgeführt werden. Derartige Verfahren umfassen Gelelektrophorese und Detektion markierter Banden mit Hilfe eines geeigneten Scanners, Sequenzierungs-Gelelektrophorese und direkte Detektion der radiomarkierten Banden mit Phosphoreszenz, wie beispielsweise einen Molecular Dynamics Reader, Kapillarelektrophorese mit Hilfe eines Detektors, der für in der Reaktion eingesetzte spezifische Markierungen angepasst ist, und dergleichen. Die Markierung kann ebenfalls ein Ligand für ein Bindeprotein sein, das für die Detektion der Markierung zusammen mit einem an das Bindeprotein konjugierten Enzym, wie Biotin-markierten Ketten-Terminator und an ein Enzym konjugiertes Streptavidin, verwendet wird. Die Markierung wird mit der Enzymaktivität des Enzyms detektiert, das ein detektierbares Signal erzeugt. Wie bei anderen in der Technik bekannten Sequenzierungsverfahren werden die Sequenzierungsreaktionen für die verschiedenen Nukleotidtypen (A, C, G, T oder U) entweder in einem einzigen Reaktionsgefäß oder in separaten Reaktionsgefäßen (wobei jedes einen der verschiedenen Nukleotidtypen repräsentiert) ausgeführt. Die Wahl des anzuwendenden Verfahrens hängt von praktischen Überlegungen ab, die dem Fachmann ohne weiteres einleuchten, wie den eingesetzten Nukleotidtriphosphat-Analoga und/oder der verwendeten Markierung. Folglich kann zum Beispiel, wenn jedes der Analoga unterschiedlich markiert ist, die Sequenzierungsreaktion in einem einzigen Gefäß ausgeführt werden. Die Überlegungen zur Wahl der Reagenzien und Reaktionsbedingungen für eine optimale Durchführung der Sequenzierungsanalyse gemäß den Verfahren der Erfindung sind den für die anderen zuvor beschriebenen Sequenzierungsverfahren ähnlich. Die Reagenzien und Reaktionsbedingungen sollten den für die Nukleinsäure-Amplifikation beschriebenen Verfahren der Erfindung gleichen.

Nachweis von Mutationen, einschließlich des Nachweises von Mutationen, die auf einem Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus basieren, unter Anwendung der Amplifikationsverfahren der Erfindung

[0251] Die DNA- oder RNA-Amplifikationsprodukte, die gemäß den Verfahren der Erfindung erzeugt sind, sind ebenfalls für eine Analyse für den Nachweis einer beliebigen Änderung in der Zelnukleinsäure verglichen mit einer Referenznukleinsäuresequenz, die mit der Zelnukleinsäuresequenz bis auf die Sequenzänderung identisch ist, geeignet. Die Sequenzänderungen können in der genomischen Sequenz vorliegende Sequenzänderungen sein oder Sequenzänderungen sein, die nicht in den genomischen DNA-Sequenzen enthalten sind, zum Beispiel Änderungen aufgrund von posttranslationalen Änderungen und/oder mRNA-Prozessierung, einschließlich Spleißvarianten. Sequenzänderungen (austauschbar als „Mutationen“ bezeichnet) umfassen eine Deletion, Substitution, Insertion und/oder Transversion eines oder mehrerer Nukleotide.

[0252] Die DNA- oder RNA-Produkte der Amplifikationsverfahren sind für einen auf einen Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP oder rSSCP) basierenden Mutationsnachweis geeignet. Die Amplifikationsverfahren der Erfindung können direkt mit einem geeigneten Nachweismittel für einen Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus verbunden werden, wie einem elektrophoretischen Trennverfahren für die Identifizierung eines spezifischen Mobilitätsmusters der einzelsträngigen DNA- oder RNA-Produkte, für die Aufklärung des Vorliegens eines spezifischen Sequenzmerkmals oder -merkmale und/oder des Vorliegens irgendeines Unterschieds in einer Testnukleinsäure verglichen mit einer Referenznukleinsäure.

[0253] Auf Gelelektrophorese oder Kapillarelektrophorese basierende Verfahren können für den Nachweis und die Analyse verschiedener Einzelstrang-Konformationsisomere genutzt werden. Alternativ ist es ebenfalls wahrscheinlich, dass eine Spaltung eines DNA- oder RNA-Produkts mit Hilfe von Nukleasen, die Sequenz-abhängige Sekundärstrukturen erkennen, für die Bestimmung eines Sequenz-spezifischen Konformations-Polymorphismus zweckdienlich sein kann. Derartige Nukleasen sind, wie der Cleavage Assay (Third Wave), in der Technik bekannt. Die elektrophoretischen Verfahren sind für Hochdurchsatznachweisverfahren oder Genotypisierung potenziell geeigneter.

[0254] Die Bestimmung Sequenz-spezifischer elektrophoretischer Muster für eine gegebene Nukleinsäuresequenz ist, zum Beispiel für den Nachweis spezifischer Allele einer Testsequenz, zweckdienlich. Darüber hinaus ist es zu erwarten, dass ein elektrophoretisches Mobilitätsmuster für die verschiedenen Allele sehr gut differenziert werden könnte, was folglich den Nachweis zweier Allele in einer Nukleinsäureprobe von einem einzelnen Individuum, wie es für den heterozygoten Genotyp erforderlich ist, oder vieler Allele zuließe. Jede beliebige Änderung in der Testnukleinsäuresequenz, wie Basensubstitution, -insertionen oder -deletion, könnte unter Anwendung dieses Verfahrens nachgewiesen werden. Von dem Verfahren ist zu erwarten, dass es für den Nachweis eines spezifischen einzelnen Basenpolymorphismus, SNP, und die Entdeckung neuer SNPs zweckdienlich ist. Folglich stellt die Erfindung ebenfalls Verfahren zum Nachweis eines Polynukleotids bereit, umfassend einen einzelnen Nukleotid-Polymorphismus, umfassend: (a) Amplifizieren eines Zielpolynukleotids unter Anwendung eines beliebigen hier beschriebenen Verfahrens; und (b) Analysieren der Amplifikationsprodukte

auf eine Einzelstrang-Konformation, wobei ein Unterschied in der Konformation im Vergleich mit einem einzelsträngigen Referenzpolynukleotid einen einzelnen Nukleotidpolymorphismus in dem Zielpolynukleotid anzeigt, wodurch ein Polynukleotid nachgewiesen wird, das einen einzelnen Nukleotidpolymorphismus umfasst.

[0255] Weitere in der Technik bekannte Analyseverfahren für den Nachweis einer beliebigen Änderung in der Zielnukleinsäuresequenz im Vergleich mit einer Referenznukleinsäuresequenz sind für eine Verwendung mit den einzelsträngigen Nukleinsäureprodukten der Amplifikationsverfahren der Erfindung geeignet. Derartige Verfahren sind in der Technik gut bekannt und umfassen verschiedene Verfahren für den Nachweis von spezifischen definierten Sequenzen, einschließlich Verfahren, die auf Allel-spezifischer Primerextension, Allel-spezifischer Sondenligation, differenzieller Sondenhybridisierung und begrenzter Primerextension basieren. Siehe zum Beispiel Kurn et al., U.S. Patent, Nr. 6.251.639 B1; U.S. Patent Nrn. 5.888.819; 6.004.744; 5.882.867; 5.854.033; 5.710.028; 6.027.889; 6.004.745; 5.763.178; 5.011.769; 5.185.243; 4.876.187; 5.882.867; 5.731.146; WO US88/02746; WO 99/55912; WO 92/15712; WO 00/09745; WO 97/32040; WO 00/56925 und 5.660.988. Folglich stellt die Erfindung ebenfalls Verfahren zum Nachweis einer Mutation in einer RNA-Sequenz von Interesse bereit, umfassend einen einzelnen Nukleotid-Polymorphismus, umfassend: (a) Amplifizieren einer Ziel-RNA mit Hilfe eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; und (b) Analysieren der Amplifikationsprodukte auf das Vorliegen einer Änderung (Mutation) im Vergleich mit einem einzelsträngigen Referenzpolynukleotid.

Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Sequenz von Interesse

[0256] Die einzigartigen Eigenschaften des zweiten zusammengesetzten Primers für eine Verwendung in den isothermen Amplifikationsverfahren der Erfindung liefern die Basis für ein isothermes Verfahren für den Nachweis definierter Mutationen (in dem Sinne definiert, dass der Ort der Mutation definiert ist) oder polymorpher Stellen (wie SNPs) in einer Zielnukleinsäuresequenz. Das Verfahren ist für eine Genotypisierung, Nachweis einer Mutation, die zu einer Arzneimittelresistenz und dergleichen führt, zweckdienlich.

[0257] Der oder die RNA-Abschnitte des zusammengesetzten Primers sind so gestaltet, dass der Primer an die Sequenz der Test-Ziel-RNA, in der die Anwesenheit einer Sequenzänderung vermutet wird, hybridisierbar ist. Alternativ ausgedrückt, umfasst der Primer einen RNA-Abschnitt(e), umfassend eine Sequenz, die an die RNA-Referenzsequenz hybridisierbar ist (zum Beispiel eine Wildtyp-Sequenz), die mit der Sequenz in der Test-Ziel-RNA verglichen werden soll. In einigen Anwendungsformen sind die geänderte Sequenz (d.h. die Sequenz, die eine Sequenzänderung umfasst) und die Referenzsequenz Allele. Die Sequenzänderung kann eine einzelne Nukleotidsubstitution, eine Deletion oder Insertion sein.

[0258] In einer anderen Anwendungsform ist der oder die RNA-Abschnitte des zusammengesetzten Primers so gestaltet, dass der Primer an die geänderte Sequenz, deren Anwesenheit in der Test-Ziel-RNA vermutet wird, hybridisierbar ist. Alternativ ausgedrückt, umfasst der Primer einen RNA-Abschnitt(e), umfassend eine Sequenz, die an die Test-Ziel-RNA und folglich nicht an die Referenzsequenz (zum Beispiel eine Wildtyp-Sequenz) hybridisierbar ist, die mit der Sequenz in der Test-Ziel-RNA verglichen werden soll. In einigen Anwendungsformen sind die geänderte Sequenz (d.h. die Sequenz, die eine Sequenzänderung umfasst) und die Referenzsequenz Allele.

[0259] Der RNA-Abschnitt, im Allgemeinen ein 5'-RNA-Abschnitt, des zusammengesetzten Primers umfasst eine Sequenz, die an eine bekannte normale Wildtyp-Sequenz oder an einen bekannten mutierten Genotyp oder an einen polymorphen Genotyp hybridisierbar ist. Im Allgemeinen umfasst ein geeigneter zusammengesetzter Primer einen RNA-Abschnitt, der dem Primer ein bevorzugtes Hybridisieren an eine Zielnukleinsäure gestattet, falls die Zielnukleinsäure eine Sequenz umfasst, die an den RNA-Abschnitt des Primers hybridisierbar ist, verglichen mit dem Fall, falls eine Fehlpaarung vorhanden ist (d.h. der Primer besitzt die mutierte Sequenz und das Ziel besitzt sie nicht oder umgekehrt), wobei die Zielnukleinsäure ein gebundenes Primer-Extensionsprodukt aufweist und sein 5'-RNA-Abschnitt abgespalten worden ist. Das Vorhandensein einer Sequenzänderung verhindert im Allgemeinen nicht den anfänglichen Schritt der Amplifikationsverfahren, so dass ein doppelsträngiger Komplex aus ersten und zweiten Extensionsprodukten, umfassend einen RNA/DNA-Heteroduplex, gebildet wird. Eine Ribonuklease, wie RNase H, spaltet dann den RNA-Abschnitt des RNA/DNA-Heteroduplexes ab. Während es wahrscheinlich ist, dass das Vorliegen eines fehlgepaarten Basenpaares das Spaltungsmuster des RNA/DNA-Hybrids beeinflusst, findet die Abspaltung dennoch wahrscheinlich statt. Der nächste Schritt, die Bindung eines weiteren zusammengesetzten Primers an den Komplex mittels Hybridisierung des 5'-RNA-Abschnitts, wird durch eine Fehlpaarung gehemmt, vorzugsweise verhindert. Dieser Effekt hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der Größe des hybridisierenden Oligonukleotids und der Stringenz der Reaktionsbedingung. Diese Faktoren werden bei der Gestaltung des zusammengesetzten Pri-

mers gemäß den bekannten Techniken und Erfahrungen in der Technik berücksichtigt. Es ist ebenfalls möglich, dass die Fehlpaarung die Abspaltung des oder der RNA-Abschnitte des zusammengesetzten Primers hemmt, was folglich die Amplifikation des Extensionsprodukt des zweiten Primers verhindert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Fehlpaarung zu einer verminderten Effizienz der Abspaltung des RNA-Abschnitts des Primers führt, was zu einer verminderten Amplifikationseffizienz oder zur Produktion von weniger Amplifikationsprodukt führt. Die Unfähigkeit des zusammengesetzten Primers, an das Ziel bei diesem Schritt der Amplifikation zu hybridisieren, verhindert weitere Schritte der Primer-Extensionsstrangverdrängung und die Erzeugung von vielfachen Kopien der Amplifikationsprodukte. Es ist zu verstehen, dass der Nachweis einer Mutation mit den Verfahren der vorliegenden Erfindung auf Basis der Abwesenheit oder Anwesenheit einzelsträngiger Amplifikationsprodukte oder durch quantitative Vergleiche der Menge an angehäuften Primer-Extensionsprodukt erfolgen kann. Wenn zum Beispiel der zusammengesetzte Primer die Referenzsequenz (zum Beispiel Wildtyp) umfasst, kann die Anwesenheit einer Mutation zu keinen nachweisbaren Amplifikationsprodukten führen; alternativ kann sie zu nachweisbaren Produkten führen, aber zu weniger als sonst von einem Templatestrang ohne Mutation erzeugt wird.

[0260] Wenn der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt, im Allgemeinen einen 5'-RNA-Abschnitt, umfasst, der an einen mutierten Genotyp vollständig hybridisierbar ist, wird eine Amplifikation einer Sequenz des normalen Genotyps verhindert werden, während ein Ziel eines mutierten Genotyps amplifiziert werden wird. Folglich wird in diesem Fall der Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung von vielfachen Kopien des Amplifikationsprodukts indikativ für die Anwesenheit einer Zielsequenz des mutierten Genotyps sein. Zum Beispiel könnten parallele Reaktionen, die entweder die Nukleinsäureprobe von Interesse oder eine Referenzprobe einer Zielnukleinsäure mit einer Wildtyp-Sequenz umfassen, durchgeführt werden. Eine Anhäufung von mehr Primer-Extensionsprodukt in der vorherigen Reaktion verglichen mit der letzteren wäre für die Anwesenheit eines mutierten Genotyps in der Probe von Interesse indikativ. Alternativ wird, wenn der zusammengesetzte Primer eine 5'-RNA-Sequenz umfasst, die an eine normale Genotyp-Sequenz des Test-Ziels vollständig hybridisierbar ist, eine Amplifikation einer Zielsequenz des mutierten Genotyps verhindert und der Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung von Amplifikationsprodukten ist für einen normalen Genotyp indikativ.

[0261] Jedes beliebige der Amplifikationsverfahren der vorliegenden Erfindung ist für einen wie oben beschriebenen Nachweis einer Mutation geeignet.

[0262] Dementsprechend stellt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Sequenz von Interesse bereit, wobei dieses Verfahren umfasst (i) Amplifizieren einer Ziel-RNA, die eine Sequenz von Interesse enthält, wobei diese Amplifikation die Extension eines zusammengesetzten Primers umfasst, der an einen gespaltenen Komplex von erstem und zweitem Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, der mit einem beliebigen der hier beschriebenen Verfahren hergestellt ist, wobei die Sequenz des RNA-Abschnitts des zusammengesetzten Primers bekannt ist, und (ii) Vergleich der Amplifikationsprodukte, falls vorhanden, von Schritt (i) mit der Menge an Amplifikationsprodukten von einem Referenztemplate; worin (1) eine Produktion von nachweisbar weniger Amplifikationsprodukten von dem Template verglichen mit der Menge an Amplifikationsprodukten von dem Referenztemplate, das eine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Region umfasst, anzeigt, dass das zweite Primer-Extensionsprodukt keine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Sequenz umfasst und eine Sequenzvariante bezüglich der Sequenz ist, die an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbar ist; oder (2) eine Produktion von nachweisbar mehr Amplifikationsprodukten von dem Template verglichen mit der Menge an Amplifikationsprodukten von dem Referenztemplate, das keine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Region umfasst, anzeigt, dass das zweite Primer-Extensionsprodukt eine an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbare Sequenz umfasst und keine Sequenzvariante bezüglich der Sequenz ist, die an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbar ist.

Verfahren zur Herstellung auf einem Substrat immobilisierter Nukleinsäuren, einschließlich eines Mikroarrays von Nukleinsäuren

[0263] Die einzelsträngigen Produkte einiger Amplifikationsverfahren der Erfindung sind für eine Immobilisierung auf einer Oberfläche geeignet. Die einzelsträngigen Produkte sind besonders für die Herstellung von Mikroarrays geeignet, welche die einzelsträngigen Amplifikationsprodukte umfassen.

[0264] Einzelsträngige Amplifikationsprodukte können an einen festen oder halbfesten Träger oder Oberfläche befestigt werden, der/die z.B. aus Glas, Kunststoff (z.B. Polystyrol, Polypropylen, Nylon), Polyacrylamid, Nitrocellulose oder anderen Materialien hergestellt sein können.

[0265] Mehrere Techniken sind in der Technik zum Befestigen von Nukleinsäuren an ein festes Substrat, wie an einen Objektträger aus Glas, bekannt. Ein Verfahren ist der Einbau von modifizierten Basen oder Analoga, die einen Molekülrest enthalten, der zur Befestigung auf einem festen Substrat fähig ist, wie eine Aminogruppe, ein Derivat einer Aminogruppe oder eine andere Gruppe mit einer positiven Ladung, in die amplifizierten Nukleinsäuren. Das amplifizierte Produkt wird dann mit einem festen Substrat in Kontakt gebracht, wie einem Glasobjektträger, der mit einem Aldehyd oder einer anderen reaktiven Gruppe beschichtet ist, die eine kovalente Bindung mit der reaktiven Gruppe eingeht, die sich auf dem amplifizierten Produkt befindet und an den Glasobjektträger kovalent gebunden wird. Mikroarrays, die die amplifizierten Produkte umfassen, können mit Hilfe eines Biodot (BioDot, Inc. Irvine, CA) Tüpfelgeräts und Aldehyd-beschichteten Glasobjektträgern (CEL, Associates, Houston, TX) hergestellt werden. Die Amplifikationsprodukte können auf die Aldehyd-beschichteten Glasobjektträger getüpfelt und gemäß publizierten Verfahren (Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1995) 93:10614-10619) bearbeitet werden. Die Arrays können ebenfalls mit Robotern auf Glas, Nylon (Ramsay, G., Nature Biotechnol. (1998), 16:40-44), Polypropylen (Matson, et al., Anal Biochem. (1995), 224(1):110-6) und Silikonträgern (Marshall, A. und Hodgson, J., Nature Biotechnol. (1998), 16:27-31) gedruckt werden. Weitere Ansätze für die Herstellung von Arrays umfassen feines Mikropipettieren in elektrischen Feldern (Marshall, A. und Hodgson, J., oben) und direktes Tüpfeln der Polynukleotide auf positiv beschichtete Platten. Verfahren mit Hilfe der Aminopropyl-Silikonoberflächenchemie sind ebenfalls in der Technik bekannt, wie es unter <http://www.cmt.corning.com> und <http://cmgm.stanford.edu/pbrown> offen gelegt ist.

[0266] Ein Verfahren zur Herstellung von Mikroarrays erfolgt mittels Herstellung hochdichter Polynukleotid-Arrays. Techniken für eine schnelle Anlagerung von Polynukleotiden sind bekannt (Blanchard et al., Biosensors & Bioelectronics, 11:687-690). Weitere Verfahren zur Herstellung von Mikroarrays, z.B. mittels Maskierung (Maskos und Southern, Nuc. Acids Res. (1992), 20:1679-1684), können ebenfalls angewandt werden. Prinzipiell könnte, wie oben angegeben, jeder beliebige Array-Typ, zum Beispiel Dot-Blots auf einer Hybridisierungsmembran aus Nylon, verwendet werden. Allerdings werden, wie es vom Fachmann einzusehen ist, sehr kleine Arrays häufig bevorzugt, weil die Hybridisierungsvolumina geringer sind.

[0267] Die amplifizierten Polynukleotide können als eine Matrix auf Substrate getüpfelt werden, die Papier, Glas, Kunststoff, Polystyrol, Polypropylen, Nylon, Polyacrylamid, Nitrocellulose, Silikon, optische Faser oder irgendeine geeignete feste oder halbfeste (z.B. dünne Schicht eines Polyacrylamidgels (Khrapko, et al., DNA Sequence (1991), 1:375-388) Oberfläche umfassen.

[0268] Ein Array kann als eine zweidimensionale Matrix auf einem ebenen Substrat zusammengefügt werden oder kann eine dreidimensionale Konfiguration einnehmen, umfassend Nadeln, Stäbchen, Fasern, Bänder, Fäden, Kügelchen, Partikel, Mikrotitervertiefungen, Kapillaren und Zylinder und jede beliebige andere Anordnung, die sich für eine Hybridisierung und Nachweis von Zielmolekülen eignet. In einer Anwendungsform ist das Substrat, an das die Amplifikationsprodukte geheftet sind, magnetische Kügelchen oder Partikel. In einer anderen Anwendungsform umfasst das Substrat eine optische Faser. In einer noch weiteren Anwendungsform sind die Amplifikationsprodukte in einer flüssigen Phase in einer Kapillare dispergiert, die wiederum bezüglich einer festen Phase immobilisiert ist.

Charakterisierung von Nukleinsäuren

[0269] Die Amplifikationsprodukte, die mit den Verfahren der Erfindung erhalten werden, sind für eine weitere Charakterisierung geeignet. Die einzelsträngige Natur einiger Produkte der Verfahren erleichtert eine Charakterisierung. Die Verfahren der Erfindung, die einzelsträngige Produkte erzeugen, sind besonders für eine quantitative Analyse geeignet, da hinreichend einzelsträngige DNA- und RNA-Produkte erzeugt werden, die im Allgemeinen das Vorliegen der verschiedenen mRNA in dem Ausgangsmaterial genau widerspiegeln.

[0270] Die amplifizierten Polynukleotidprodukte, entweder DNA oder RNA (d.h. Produkte eines beliebigen der hier beschriebenen Amplifikationsverfahren), können zum Beispiel unter Anwendung von in der Technik bekannten Sondenhybridisierungstechniken, wie Southern- und Northern-Blotting, und Hybridisierung an Sondenarrays analysiert werden. Sie können ebenfalls mit Hilfe Elektrophorese-gestützter Verfahren, wie differenzielles Display und Größen-Charakterisierung, die in der Technik bekannt sind, analysiert werden. Zusätzlich können die einzelsträngige DNA- und RNA-Produkte als Ausgangsmaterial für andere Ausgangsmaterialien für weitere in der Technik bekannte analytische und/oder quantitative Verfahren dienen, wie Echtzeit-PCR, quantitative TaqMan, quantitative PCR unter Verwendung von molekularen Leuchtsignalen, Verfahren, die in Kurn, U.S. Patent Nr. 6.251.639 etc. beschrieben sind. Folglich umfasst die Erfindung solche weiteren analytischen und/oder quantitativen Verfahren, wie sie für jedes der Produkte der Verfahren hier angewandt werden.

[0271] In einer Anwendungsform werden die Amplifikationsverfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einzelsträngiger Produkte genutzt und die einzelsträngigen Produkte werden durch einen Kontakt mit einer Sonde analysiert.

[0272] In einer Anwendungsform werden die Amplifikationsverfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einzelsträngiger Polynukleotidprodukte (im Allgemeinen DNA) genutzt, die unter Verwendung eines zusammengesetzten Primers markiert werden, die markiert sind (in dem oder den Abschnitten, die nicht abgespalten werden). In einer anderen Anwendungsform werden die Amplifikationsverfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einzelsträngiger Polynukleotidprodukte (DNA oder RNA) genutzt, die durch den Einbau markierter Nukleotide während der DNA- oder RNA-Polymerisierung markiert werden. Zum Beispiel kann eine Amplifikation gemäß den Verfahren der Erfindung mit geeigneten markierten dNTPs oder rNTPs ausgeführt werden. Diese markierten Nukleotide können an eine Markierung direkt angeheftet werden oder können eine Komponente umfassen, die an eine Markierung geheftet werden könnte. Die Markierung kann an die Amplifikationsprodukte kovalent oder nichtkovalent geheftet sein. Geeignete Markierungen sind in der Technik bekannt und umfassen zum Beispiel einen Liganden, der ein Element eines spezifischen Bindungspaares ist, das unter Verwendung eines detektierbaren zweiten Elements des Bindungspaares detektiert/quantifiziert werden kann. Folglich führt die Amplifikation von Gesamt-mRNA gemäß den Verfahren der Erfindung bei Anwesenheit zum Beispiel von Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP zum Einbau dieser Nukleotide in die Amplifikationsprodukte.

[0273] Die markierten amplifizierten Produkte sind besonders geeignet für eine Analyse (zum Beispiel Nachweis und/oder quantitative Bestimmung) mittels Inkontaktbringen dieser zum Beispiel mit Mikroarrays (mit jeder beliebigen geeigneten Oberfläche, umfassend Glas, Chips, Kunststoff), Kügelchen oder Partikeln, die geeignete Sonden, wie cDNA- und/oder Oligonukleotid-Sonden, umfassen. Folglich stellt die Erfindung Verfahren zur Charakterisierung (zum Beispiel Nachweis und/oder quantitative Bestimmung) einer RNA-Sequenz von Interesse bereit durch die Erzeugung markierter Polynukleotidprodukte (im Allgemeinen DNA oder RNA) unter Anwendung von Amplifikationsverfahren der Erfindung und die Analyse der markierten Produkte. Eine Analyse der markierten Produkte kann zum Beispiel durch Hybridisierung der markierten Amplifikationsprodukte, zum Beispiel an Sonden, die an spezifischen Stellen auf einem festen oder halbfesten Substrat immobilisiert sind, an Sonden, die auf definierten Partikeln immobilisiert sind, oder an Sonden, die auf Blots (wie eine Membran), zum Beispiel Arrays, immobilisiert sind, die oben beschrieben worden sind, ausgeführt werden. Weitere Verfahren zur Analyse markierter Produkte sind in der Technik bekannt, wie zum Beispiel durch Inkontaktbringen dieser mit einer Lösung, die Sonden enthält, und anschließende Extraktion der Komplexe, die die markierten Amplifikationsprodukte und Sonden umfassen, aus der Lösung. Über die Identität der Sonden erfolgt die Charakterisierung der Sequenzidentität der amplifizierten Produkte und folglich mittels Extrapolation die Identität der in einer Probe vorliegenden Ziel-RNA. Eine Hybridisierung der markierten Produkte ist detektierbar und die Menge an spezifischen Markierungen, die detektiert wird, ist zur Menge an markierten Amplifikationsprodukten einer spezifischen RNA-Sequenz von Interesse proportional. Diese Messung ist, zum Beispiel zum Messen der relativen Mengen der verschiedenen RNA-Spezies in einer Probe, zweckdienlich, die mit den relativen Genexpressionslevels in Beziehung stehen, wie es hier beschrieben ist. Die Menge an markierten Produkten (wie zum Beispiel mit einem detektierbaren Signal angezeigt, das mit der Markierung assoziiert ist), die an definierten Stellen auf einem Array hybridisiert sind, können für den Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung der entsprechenden Ziel-RNA-Spezies in der Probe indikativ sein.

[0274] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Quantifizierung eines einzelsträngigen Polynukleotids (im Allgemeinen DNA oder RNA) bereit, umfassend die Verwendung eines Oligonukleotids (Sonde) mit definierter Sequenz (das zum Beispiel auf einem Mikroarray immobilisiert sein kann). Bei diesem Aspekt der Erfindung sind markierte einzelsträngige Polynukleotidprodukte (im Allgemeinen DNA oder RNA), umfassend definierte Sequenzen am 5' und/oder 3'-Ende (unter Verwendung eines ersten oder zweiten Primers eingeführt, der mit einem Schwanz versehen sind, wie es hier beschrieben ist), an definierte Oligonukleotide hybridisierbar, wobei das Oligonukleotid das Komplement der definierten Sequenz umfasst, die am 5' und/oder 3'-Ende eingeführt ist. In einigen Anwendungsformen werden spezifische mRNA-Spezies unter Verwendung eines zusammengesetzten und/oder zweiten Primers amplifiziert, der einen Schwanz mit einer definierten Sequenz aufweist, die an eine Sequenz hybridisierbar ist, die auf einem Array immobilisiert ist (abhängig davon, ob die definierte Sequenz in den zusammengesetzten oder zweiten Primer eingebaut ist). Zum Beispiel umfasst in einer Anwendungsform ein erster Primer einen 3'-Abschnitt, der an eine Sequenz einer spezifischen RNA-Spezies hybridisierbar ist, und einen 5'-Abschnitt, der nicht an ein spezifisches RNA-Template hybridisierbar ist, sondern an ein definiertes Oligonukleotid hybridisierbar ist. In einer anderen Anwendungsform umfasst ein zweiter Primer einen 3'-Abschnitt, der an eine Sequenz eines ersten Primer-Extensionsprodukts hybridisierbar ist, und einen 5'-Abschnitt, der nicht an ein erstes Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, sondern er umfasst eine Sequenz eines definierten Oligonukleotids. Vielfache Kopien einzelsträngiger mar-

kierter DNA- oder RNA-Produkte werden erzeugt, die an ein Oligonukleotid hybridisierbar sind. Es ist zu verstehen, dass, obwohl eine einzige RNA-Spezies oben diskutiert ist, mehrere Spezies gleichzeitig amplifiziert werden können, jede mit einem zusammengesetzten Primer oder zweiten Primer, der einen Schwanz umfasst, mit dem er an verschiedene definierte Oligonukleotide hybridisierbar ist.

Bestimmung des Genexpressionsprofils

[0275] Die Amplifikationsverfahren der Erfindung sind besonders für eine Anwendung bei Bestimmung der Expressionslevels eines oder mehrerer Gene in einer Probe geeignet, da die hier beschriebenen Verfahren zur Amplifikation eines oder mehrerer, vorzugsweise einer Vielzahl an Ziel-RNAs in der gleichen Probe fähig sind. Wie es oben beschrieben ist, können die Amplifikationsprodukte mit verschiedenen Verfahren, die hier beschrieben und/oder in der Technik bekannt sind, nachgewiesen und quantifiziert werden. Da die RNA ein Produkt einer Genexpression ist, sind die Levels der verschiedenen RNA-Spezies, wie mRNAs, in einer Probe für die relativen Expressionslevels der verschiedenen Gene (Genexpressionsprofil) indikativ. Folglich liefert eine Bestimmung der Menge an RNA-Sequenzen von Interesse, die in einer Probe vorliegt, wie durch eine quantitative Bestimmung der Amplifikationsprodukte der Sequenzen ermittelt, eine Bestimmung des Genexpressionsprofils der Probenquelle.

[0276] Dementsprechend stellt die Erfindung Verfahren zur Bestimmung des Genexpressionsprofils in einer Probe bereit, wobei diese Verfahren umfassen: Amplifizieren eines einzelsträngigen Produkts von wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse in der Probe unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; und Bestimmen der Menge an amplifizierten Produkten jeder RNA-Sequenz von Interesse, wobei jede dieser Menge für die Menge jeder RNA-Sequenz von Interesse in der Probe indikativ ist, wodurch das Genexpressionsprofil in der Probe bestimmt wird. Im Allgemeinen werden markierte Produkte erzeugt. In einer Anwendungsform ist die Ziel-RNA mRNA in einer noch anderen Anwendungsform umfasst der zusammengesetzte Primer eine poly-dT-Sequenz (so dass mRNA in einer Probe amplifiziert wird). Es ist zu verstehen, dass die Menge an Amplifikationsprodukt mit Hilfe quantitativer und/oder qualitativer Verfahren bestimmt werden kann. Eine Bestimmung der Menge an Amplifikationsprodukt umfasst die Bestimmung, ob ein Amplifikationsprodukt in der Probe vorliegt oder nicht. Folglich kann ein Expressionsprofil eine Information über Anwesenheit oder Abwesenheit einer oder mehrerer RNA-Sequenzen von Interesse beinhalten. „Abwesend“ oder „Abwesenheit“ des Produkts und „fehlender Nachweis des Produkts“, wie hier verwendet, beinhaltet unwesentliche oder minimale Levels.

[0277] Die Verfahren des Genexpressionsprofilings sind bei einem sehr breiten Spektrum molekularer Diagnosen und insbesondere bei der Untersuchung der Genexpression im Wesentlichen jeder beliebigen Säugerzelle (einschließlich einer einzigen Zelle) oder Zellpopulation zweckdienlich. Eine Zelle oder Zellpopulation (z.B. ein Gewebe) kann zum Beispiel aus Blut, Gehirn, Milz, Knochen, Herz, Gefäßen, Lunge, Niere, Hypophyse, Embryozellen, Tumoren und dergleichen stammen. Ein Expressionsprofiling ist ebenfalls für den Vergleich einer Kontrollprobe (normal) mit einer Testprobe, einschließlich Testproben, die zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt werden, einschließlich vor, nach und/oder während einer Entwicklung, einer Behandlung und dergleichen, zweckdienlich.

Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek

[0278] Die einzelsträngigen DNA- und RNA-Produkte der Verfahren der Erfindung sind zur Herstellung von Bibliotheken, einschließlich cDNA-Bibliotheken und subtraktiver Hybridisierungsbibliotheken, zweckdienlich. Unter Anwendung der Verfahren der Erfindung können Bibliotheken von einer begrenzten Menge Ausgangsmaterial, zum Beispiel aus einer begrenzten Menge Gewebe oder sogar aus einzelnen Zellen extrahierter mRNA, hergestellt werden. Dementsprechend stellen mit einem Aspekt die Verfahren der Erfindung die Herstellung einer Bibliothek von den einzelsträngigen DNA- oder RNA-Produkten der Erfindung bereit. Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek von der doppelsträngigen cDNA bereit, die mit den Verfahren der Erfindung, die zwei zusammengesetzte Primer umfassen, erzeugt ist. Verfahren zur Herstellung von Bibliotheken von doppelsträngiger cDNA sind in der Technik gut bekannt. Mit einem noch weiteren Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer Bibliothek bereit, wobei diese Verfahren umfassen: Herstellen einer subtraktiven Hybridisierungssonde mit Hilfe eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren.

[0279] In einigen Anwendungsformen ist der erste zusammengesetzte Primer an die poly-A-Sequenz hybridisierbar, die eigentlich in allen mRNAs vorgefunden wird. In anderen Anwendungsformen ist der erste zusammengesetzte Primer ein Zufallsprimer.

[0280] Die Amplifikationsverfahren der Erfindung sind besonders für eine Anwendung in subtraktiven Hybridisierungsverfahren geeignet, in denen (wenigstens) eine erste und zweite Ziel-RNA-Population verglichen wird, da die hier beschriebenen Verfahren zur Amplifizierung vieler Ziel-RNAs in der gleichen Probe fähig sind, und die Verfahren der Erfindung zur Erzeugung großer Mengen an einzelsträngiger Antisense-Nukleinsäure geeignet sind, die sich für eine Verwendung als „Driver“ bei einer subtraktiven Hybridisierung eignen. Zum Beispiel ist es möglich, zwei Nukleinsäure-Populationen, eine Sense- und eine Antisense-Population, zusammenzumischen, wobei eine Population in einem molaren Überschuss („Driver“) vorliegt. Sequenzen, die in beiden Population vorkommen, werden Hybride bilden, während Sequenzen, die nur in einer Population vorkommen, einzelsträngig bleiben. Anschließend werden mit verschiedenen, gut bekannten Techniken die unhybridisierten Moleküle, die differenziell exprimierte Sequenzen repräsentieren, abgetrennt. Siehe z.B. Hamson et al., U.S. Patent Nr. 5.589.339; Van Gelder, U.S. Patent Nr. 6.291.170.

[0281] Dementsprechend stellt die Erfindung Verfahren zur Durchführung einer subtraktiven Hybridisierung bereit, wobei diese Verfahren umfassen: (a) Erzeugung vielfacher DNA-Kopien des Komplements wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; und (b) Hybridisieren der vielfachen Kopien an eine zweite mRNA-Population, wodurch eine Subpopulation der zweiten mRNA-Population einen Komplex mit einer Nukleotid-DNA-Kopie bildet. Die Erfindung stellt ebenfalls Verfahren zur Durchführung einer subtraktiven Hybridisierung bereit, wobei diese Verfahren umfassen: Hybridisieren vielfacher Kopien des Komplements wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Amplifikationsverfahren an eine zweite mRNA-Population, wodurch eine Subpopulation der zweiten mRNA-Population einen Komplex mit einer Kopie bildet. In einigen Anwendungsformen wird „Driver“ einzelsträngiges Antisense-DNA-Produkt der Verfahren der Erfindung mit Tester-(Sense)-mRNA-Spezies vereinigt. In einigen Anwendungsformen wird „Driver“ einzelsträngiges Antisense-Nukleinsäureprodukt (im Allgemeinen DNA) unter Anwendung der hier beschriebenen Verfahren der Erfindung und eines ersten zusammengesetzten Primers, der an die poly-A-Sequenz hybridisierbar ist, erzeugt (im Wesentlichen werden alle mRNA-Spezies amplifiziert). In einer anderen Anwendungsform ist der erste zusammengesetzte Primer ein Zufallsprimer.

[0282] Mit einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur differenziellen Amplifikation bereit, in denen einzelsträngige Driver (Antisense)-DNA-Sequenzen, die mit Tester-mRNA-Sequenz hybridisieren, mit Hilfe eines Agens, wie RNase H, das die in einem DNA/RNA-Hybrid vorhandene RNA abspaltet, einer Spaltung unterzogen werden. Die Abspaltung der mRNA führt zu der Unfähigkeit, einzelsträngiges DNA-Produkt von den Test-mRNA-Strängen zu erzeugen. Umgekehrt kann nicht-gespaltener Tester (d.h. Tester-mRNA, die nicht an Driver DNA-Moleküle hybridisierte) als ein Substrat für die nachfolgende Amplifikation dienen. Amplifizierte differenziell exprimierte Produkte werden vielfältig genutzt, einschließlich als eine differenzielle Expressionssonde für die Herstellung differenzieller Expressionsbibliotheken. Dementsprechend stellt die Erfindung Verfahren zur differenziellen Amplifikation einer oder mehrerer RNA-Sequenzen von Interesse bereit, wobei die Verfahren umfassen: (a) Erzeugung vielfacher Polynukleotid-Kopien (im Allgemeinen DNA) des Komplements wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Verfahren; (b) Hybridisieren der vielfachen Kopien an eine zweite mRNA-Population, wodurch eine Subpopulation der zweiten mRNA-Population einen Komplex mit einer DNA-Kopie bildet; (c) Abspalten der RNA in dem Komplex von Schritt (b) mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (d) Amplifizieren einer unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population, wodurch vielfache Kopien einzelsträngiger DNA, die zu der unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population komplementär ist, erzeugt werden. In einigen Anwendungsformen wird Schritt (d) unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Amplifikationsverfahren ausgeführt. In einigen Anwendungsformen umfassen die Verfahren eine Hybridisierung vielfacher Polynukleotid-Kopien (im Allgemeinen DNA) des Komplements wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung eines beliebigen der hier beschriebenen Amplifikationsverfahren an eine zweite mRNA-Population, wodurch eine Subpopulation der zweiten mRNA-Population einen Komplex mit einer DNA-Kopie bildet; (b) Abspalten der RNA in dem Komplex von Schritt (a) mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (c) Amplifizieren einer unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population, wodurch vielfache Kopien einzelsträngiger DNA, die zu der unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population komplementär ist, erzeugt werden.

[0283] Die folgenden Beispiele werden für eine Veranschaulichung aber nicht Beschränkung der Erfindung gegeben.

BEISPIELE

Beispiel 1: Amplifikation von Gesamt-poly-A-mRNA

[0284] Poly-A-mRNA von der MOLT-4 Zelllinie (CLONTECH 6587-1) wurde als ein Ziel für eine Amplifikation eingesetzt. Der Amplifikationsprozess erfolgte in drei Schritten: 1) Synthese des ersten cDNA-Strangs; 2) Synthese des zweiten cDNA-Strangs, um eine doppelsträngige cDNA von der Gesamt-mRNA der Probe herzustellen; und 3) Amplifikation der Gesamt-mRNA. Das doppelsträngige cDNA-Produkt umfasst an einem Ende einen RNA/DNA-Heteroduplex, der ein Substrat für RNase H darstellt. Die Sequenz der beiden Stränge dieses Abschnitts des Heteroduplexes ist nicht mit dem Ziel verwandt und wird durch die Verwendung eines zusammengesetzten (ersten) Primers eingebaut.

Primer-Sequenzen:

MTA1: GACGGAUGCGGUCUTTTTTTTT

MTA2: GACGGAUGCGGUCUTTTTTTTTN

MTA3: GACGGAUGCGGUCUTTTTTTTNN

worin kursive Nukleotide für Ribonukleotide stehen und „N“ für ein degeniertes Nukleotid steht (d.h., es kann A, T, C oder G sein).

Schritt 1: Synthese der Erststrang-cDNA von poly-A-mRNA

0,1 µg Gesamt-poly-A-mRNA wurde mit den folgenden Reagenzien in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt:

0,2 µl Primer MTA3 (100 µM)

0,5 µl dNTPs (25 mM)

0,1 µl Rnasin

0,1 µl DTT

2 µl 5X AMV reverse Transkriptase Reaktionspuffer

DEPC-behandeltes Wasser ad 10 µl Gesamtvolumen

[0285] Das Reaktionsgemisch wurde 2 min bei 75°C inkubiert und dann auf 37°C gekühlt. 1 µl AMV reverse Transkriptase (USB 70041Y, 15 U/µl) wurde zu jeder Reaktion gegeben und das Reaktionsgemisch wurde bei dieser Temperatur weitere 60 min inkubiert.

Schritt 2: Synthese der Zweistrang-cDNA

[0286] Das Reaktionsgemisch für die Erststrang-cDNA wurde mit 10 µl Synthesegemisch für die Zweistrang-cDNA gemischt, das folgendes enthielt:

1 µl 10X Klenow Reaktionspuffer

0,1 µl dNTPs (25 mM)

0,5 µl Klenow (USB 2141Y 5 U/µl) DNA-Polymerase

8,4 µl Wasser

[0287] Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde 5 min auf 75°C erhitzt, um die Reaktionen durch Inaktivierung der Enzyme zu stoppen.

Schritt 3: Amplifikation der Gesamt-cDNA

[0288] Zwei zusammengesetzte Primer wurden getestet - MTA1 und MTA2.

[0289] Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, das folgendermaßen zusammengesetzt war:

1 µl cDNA-Reaktion

0,2 µl MTA1 oder MTA2 (beide mit 100 µM)

0,2 µl 25 mM dNTPs

0,1 µl Rnasin

0,1 µl DTT

17,2 µl Wasser

[0290] Das obige Gemisch wurde bei 94°C 20 Sekunden inkubiert und dann auf 50°C gekühlt. Ein Gemisch aus 2U BOA, 0,02 U Hybridase (RNase H) und 0,4 µg T4 Gene 32 protein (einzelnsträngige DNA bindendes Protein) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde bei 50°C 60 min inkubiert.

[0291] Je 5 µl Reaktionsgemisch wurde mittels Elektrophorese auf 5-20% PAGE (Novex) analysiert. Eine erfolgreiche Amplifikation wurde durch die Reaktionsprodukte der amplifizierten Gesamt-mRNA angezeigt, die als ein Schmier auftraten, was aufgrund einer Amplifikation einer Vielzahl an mRNA-Spezies erwartet war. Kein Produkt wurde in Reaktionen beobachtet, die ohne eine der folgenden Komponenten ausgeführt wurden: a. eingesetzte doppelsträngige cDNA; b. Primer für die Synthese des Erststrangs; und c. eingesetzte mRNA für die Synthese der Erststrang-cDNA.

Beispiel 2: Charakterisierung von Produkten aus Reaktionsschritt 2 und 3 von Beispiel 1

[0292] In den Amplifikationsreaktionen von Beispiel 1 wird erwartet, dass eine „einzigartige“ Sequenz (d.h. eine Sequenz, die nicht an ein RNA-Template hybridisierbar ist) am 3'-Ende der Zweitstrang-cDNA aufgrund der „einzigartigen“ Sequenz des 5'-RNA-Abschnitts des eingesetzten zusammengesetzten Primers geschaffen wird. Diese Sequenz (des 3'-Endes der Zweitstrang-cDNA) ist zu dem 5'-RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers komplementär und ist nicht mit den Sequenzen in der Ziel-RNA verwandt. Um das Vorhandensein dieser Sequenz in der erhaltenen Zweitstrang-cDNA zu bestimmen, wurde eine PCR-Amplifikation der Reaktionsprodukte (wie sie im Reaktionsgemisch von Schritt 2 des Beispiels 1 gefunden wurden) unter Verwendung eines Primers, der zu der erwarteten Sequenz am 3'-Ende der Zweitstrang-cDNA komplementär ist, als Vorwärts-Primer, und eines G3PDH-spezifischen Primers als ein PCR-Rückwärts-Primer ausgeführt. Von diesem Primerpaar wäre zu erwarten, dass es ein spezifisches Produkt einer doppelsträngigen cDNA, die eine „einzigartige“ Sequenz aufweist, amplifizieren würde. Es würde allerdings nicht erwartet werden, dass das Paar ein spezifisches Produkt von der PCR-Amplifikation der Antisense-DNA-Produkte (wie sie im Reaktionsgemisch von Schritt 3 des Beispiels 1 gefunden werden) erzeugen würde, weil von diesen Produkten nicht erwartet wird, dass sie die „einzigartige“ Sequenz enthalten (die von dem RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers eingeführt wird, der von RNase H abgespalten wird). Da das Reaktionsgemisch von Schritt 3 des Beispiels 1 überwiegend amplifizierte DNA-Produkte enthält (die keine „einzigartige“ Sequenz enthalten sollten), wäre von einer PCR-Amplifikation dieses Reaktionsgemisches zu erwarten, dass sie viel weniger effizient ist (und folglich wesentlich weniger Produkte erzeugt) als die PCR-Amplifikation des Reaktionsgemisches von Schritt 2 (der primär doppelsträngiges cDNA-Produkt enthält).

[0293] PCR-Reaktionen wurden folgendermaßen ausgeführt:

Je 50 µl PCR-Reaktion enthält:

je 0,4 µM Primer (Biosource International)

je 100 µM dNTP (Epicenter)

2 mM Magnesiumchlorid (Epicenter)

1-2 Einheiten Polymerase (entweder Master Amp taq oder Master Amp Tfl, beide von Epicenter)

5 µl 10X Puffer, mit dem Enzym supplementiert

[0294] Entweder 0,5 µl lineare PCR-Amplifikationsreaktion des dritten Schritts in Beispiel 1 oder eine 1:20 Verdünnung der in Schritt 2 von Beispiel 1 erzeugten cDNA.

[0295] Die PCR-Amplifikationszyklen waren 94°C 30 Sekunden, 51°C 30 Sekunden und 72°C 30 Sekunden. Im Allgemeinen durchliefen die Proben 20 oder 25 Zyklen. Es erfolgte eine fünfminütige finale Extension bei 72°C bevor die Proben bei 4°C gehalten wurden.

[0296] Ähnliche Versuche wurden mit einem Primer ausgeführt, der für die T-Zellrezeptor-spezifische mRNA (TCR), die von der MOLT4-Zelllinie exprimiert wird, spezifisch war.

Erwartete PCR-Produktgröße (Basenpaare) unter Verwendung der G3PDH-Primer

RÜCKWARTS-PRIMER	VORWÄRTS-PRIMER	VORWÄRTS-PRIMER
	G3PDH3	dMTA1
G3PDH5-2	18	62
G3PDH5-3	110	156
G3PDH5-4	157	203
G3PDH5	253	299
G3PDH5-6	309	354
G3PDH5-7	361	405

Primer-Sequenzen

G3PDH5: 5' TTT CCT GGT ATG ACA ACG AA
 G3PDH5-4: 5' CCA GCA AGA GCA CAA GAG GA
 G3PDH3: 5' GAT GGT ACA TGA CAA GGT
 dMTA1: 5' GAC GGA TGC GGT CTT TTT TTT

Erwartete PCR-Produktgröße (Basenpaare) unter Verwendung von T-Zellrezeptor-Primern

	TCR3	dMTA1
TCR5-2	160	ungefähr 440
TCR5	238	ungefähr 500

Primer-Sequenzen

TCR5: 5' CCC GCA ACC ACT TCC GCT GTC
 TCR5-2: 5' CAA ACC CGT CAC CCA GAT CGT
 TCR3: 5' CAA CAC AAG GGC GCT GAC C

[0297] Die Ergebnisse zeigen, dass die einzigartige Sequenz in der Zweitstrang-cDNA eingebaut wird, wie es angezeigt wird mit der Anwesenheit des Produkts, das etwa 250 Basenpaare lang ist, wenn das Reaktionsgemisch von Schritt 2 unter Verwendung der Primer DMTA1 und G3PDH5 (Amplifikation einer G3PDH mRNA-Sequenz) einer PCR-Amplifikation unterzogen wurde, und eines Produkts mit etwa 400 Basenpaaren, wenn die Primer DMTA1 und TCR5-2 verwendet wurden (Amplifikation einer Sequenz einer TCR-beta-Kette mRNA). Die PCR-Amplifikation des Reaktionsgemisches des Schritts 3 mit den gleichen Primerpaaren zeigte andererseits eine wesentlich verringerte Menge an Amplifikationsprodukten. Folglich zeigten die Ergebnisse den Einbau der „einzigartigen“ Sequenz (des RNA-Abschnitts des in Beispiel 1 eingesetzten zusammengesetzten Primers) in die erzeugten doppelsträngigen cDNA-Produkte und die Abwesenheit der Sequenz in den amplifizierten cDNA-Endprodukten (aufgrund der Abspaltung des RNA-Abschnitts).

Beispiel 3: Amplifikation von Gesamt-mRNA ausgehend von einem Präparat der Gesamt-RNA

[0298] Die Fähigkeit, Gesamt-mRNA von einem Gesamt-RNA-Präparat zu amplifizieren, vereinfacht aufgrund des Wegfalls des mRNA-Reinigungsschritts den Prozess wesentlich. Die experimentelle Demonstration der Amplifizierung von Gesamt-mRNA von einem Gesamt-RNA-Präparat unter Anwendung der Verfahren der Erfindung wurde unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Gesamt-RNA-Präparats von einem Brustkrebstumor (CLONTECH; Kat.-Nr. 64015-1) ausgeführt. Der Amplifikationsprozess von Gesamt-mRNA wurde in drei Schritten folgendermaßen ausgeführt.

Primer-Sequenz:

MTB2: GAC GGA UGC GGU CUTTTTTTTTTTTTTTNN

BA5: AAC TAC CTT CAA CTC CAT CA

BA3: GGA CTC GTC ATA CTC CTG C

worin die kursiven Nukleotide für Ribonukleotide stehen und „N“ für ein degeneriertes Nukleotid steht (d.h. es kann A, T, C oder G sein).

Schritt 1: Synthese der Erststrang-cDNA

[0299] Jedes Reaktionsgemisch umfasste folgendes:

4 µl 5X Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

MTB2-Primer ad 1 µM

25 mM dNTPs

0,2 µl RNasin Ribonuklease-Inhibitor (Promega N2511, 40 U/µl)

1 µl 0,1 M DTT

5 µg, 1 µg, 0,2 µg oder 40 ng Gesamt-RNA pro Reaktion

DEPC-behandeltes Wasser ad 19 µl Gesamtvolumen

[0300] Die Reaktionsgemische wurden bei 75°C 2 Minuten inkubiert und dann auf 42°C abgekühlt. SuperScript II RNase H⁻ reverse Transkriptase (200 U, BRL 18064-022) wurde zu jeder Reaktion gegeben und die Reaktionen wurden bei 42°C 50 Minuten inkubiert.

Schritt 2: Synthese der Zweitstrang-cDNA

[0301] 10 µl Reaktionsgemisch der Synthese der Erststrang-cDNA wurden in die einzelnen Reaktionsröhrchen gleichmäßig aufgeteilt. 20 µl Stammreaktionsgemisch der Synthese des zweiten Strangs wurde zu jedem Röhrchen gegeben. Das Stammreaktionsgemisch der Synthese des zweiten Strangs enthielt folgendes:

2 µl 10X Klenow Reaktionspuffer (10X Puffer: 500 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl)

2 U Klenow DNA-Polymerase (BRL 18012-021)

0,1 µl AMV reverse Transkriptase (BRL 18020-016, 25 U/µl)

0,2 µl E. coli Ribonuklease H (BRL 18021-014, 4 U/µl)

0,2 µl (25 mM) dNTPs

0 oder 0,2 µl E. coli DNA-Ligase (BRL 18052-019, 10 U/µl)

[0302] Die Reaktionsgemische wurden bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Die Reaktionen wurden durch 5 Minuten Erhitzen auf 75°C, um die Enzyme zu inaktivieren, gestoppt.

Schritt 3: Amplifikation von Gesamt-cDNA

[0303] Die Amplifikation wurde unter Verwendung von 1 µl Reaktionsgemisch der Zweitstrang-cDNA oben unter Verwendung des MTA1 zusammengesetzten Primers in Gegenwart von T4 Gene 32 Protein bei 50°C 60 Minuten ausgeführt.

[0304] Jedes Reaktionsgemisch umfasste folgendes:

2 µl 10X Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,5; 50 mM MgCl₂, 1% NP-40)

0,2 µl dNTPs (25 mM)

0,2 ml MTA1 (100 µM)

1 µl Synthesegemisch der Zweitstrang-cDNA

0,1 µl RNasin

0,1 µl DTT (0,1 M)

DEPC-behandeltes Wasser ad 18,8 µl Gesamtvolumen

[0305] Die Reaktionsgemische wurden bei 94°C 20 Sekunden inkubiert und dann auf 50°C abgekühlt. 2 U Bca (Takara Kat.-Nr. 2710A) 0,02 U Hybridase Thermostable RNase H (Epicentre H39100) und 0,4 µg T4 Gene 32 Protein (USB 70029Z) wurden zugegeben und die Reaktionen wurden weitere 60 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert.

[0306] Das Reaktionsgemisch des Schritts 3 (von dem erwartet wurde, dass es amplifizierte DNA-Produkte enthält) wurde mittels Gelelektrophorese (5-20% PAGE, Novex) analysiert. Eine erfolgreiche Amplifikation wurde durch die Amplifikationsprodukte der Gesamt-mRNA angezeigt, die als ein Schmier auftraten, was aufgrund der Amplifikation einer Vielzahl an mRNA-Spezies in der Probe erwartet wurde.

[0307] Der Einbau einer „einzigartigen“ (definierten) Sequenz (welche zu dem RNA-Abschnitt am 5'-Ende des zusammengesetzten Primers komplementär ist) in der Zweitstrang-cDNA wurde mit Hilfe einer PCR-Amplifikation unter Verwendung spezifischer Primerpaare gezeigt. Aliquote der Reaktionsgemische von Schritt 2 und Schritt 3 wurden einer PCR-Amplifikation unter Verwendung der Primer G3PDH5-4/G3PDH3 oder BA5/BA3 (beta Aktin) unter den in Beispiel 2 beschriebenen Bedingungen unterzogen. Die PCR-Amplifikation der Reaktionsgemische von Schritt 2 führte zu wesentlichen Mengen an Produkten der korrekten Größe, wohingegen die Amplifikation der Reaktionsgemische von Schritt 3 zu wesentlich kleineren Mengen der gleichen Produkte führte. Folglich demonstrierten die Ergebnisse den Einbau der „einzigartigen“ Sequenz (des RNA-Abschnitts des in diesem Beispiel eingesetzten zusammengesetzten Primers) in die doppelsträngigen DNA-Produkte und das Fehlen der Sequenz in den amplifizierten DNA-Endprodukten (aufgrund der Abspaltung des RNA-Abschnitts).

Beispiel 4: Herstellung doppelsträngiger cDNA, umfassend eine angefügte definierte Sequenz in der Zweitstrang cDNA, von einem Gesamt-RNA-Präparat und gereinigter mRNA

[0308] Es wurde Gesamt-RNA (1 µg), die von der HCT116-Zelllinie präpariert war, oder mRNA (100 ng), die von der MOLT4-Zelllinie (Clontech) präpariert war, als ein Ziel für die Erzeugung des intermediären doppelsträngigen cDNA-Produkts verwendet, das eine angefügte definierte Sequenz in dem zweiten cDNA-Strang umfasst. Die angefügte Sequenz wird durch die Verwendung eines zusammengesetzten (ersten) Primers eingebaut.

[0309] Der Herstellungsprozess der Erst- und Zweitstrang-cDNA wurde, im Wesentlichen, wie in Beispiel 1 und 3 beschrieben, ausgeführt und beinhaltete die folgenden Schritte: (1) Synthese eines ersten cDNA-Strangs; (2) Synthese eines zweiten cDNA-Strangs, um ein doppelsträngiges Produkt zu erzeugen, das an einem Ende einen RNA/DNA-Heteroduplex umfasst, der ein Substrat für die RNase H ist. Von den intermediären doppelsträngigen cDNA-Produkten wird erwartet, dass sie cDNA-Kopien von mehreren RNAs von der Ziel-RNA-Probe umfassen, wobei jede cDNA die gleiche angefügte definierte Sequenz enthält. Es wird erwartet, dass die Sequenz der angefügten definierten Sequenz das Komplement der Sequenz des 5'-RNA-Abschnitts des zusammengesetzten (ersten) Primers ist, der an die Ziel-RNA hybridisiert.

[0310] PCR-Experimente wurden ausgeführt, um die Anwesenheit der Zweitstrang-cDNA zu bestätigen, der umfasst (a) Zweitstrang-cDNA-Kopie von einer Sequenz der GAPDH mRNA, die bekanntlich in der mRNA von beiden RNA-Ziel-Proben repräsentiert wird, und (b) die definierte Sequenz (d.h. das Komplement des 5'-RNA-Abschnitts des ersten zusammengesetzten Primers) am 3'-Ende. Die PCR-Primerpaare wurden folgendermaßen verwendet:

- 1) Ein Primer, der zu der einzigartigen Sequenz (DMTA1) komplementär ist, und ein Primer, der zu der Sequenz der GAPDH mRNA (GAPDH5-4) komplementär ist, für die Erzeugung eines 203 bp Produkt, die von einem Anfügen der Sequenz am 3'-Ende des zweiten cDNA-Strangs abhängig ist.
- 2) Zwei Primer, die zu der Sequenz der GAPDH mRNA komplementär sind, GAPDH3 und Primer GAPDH5-4, die für die Erzeugung eines 157 bp Produkts verwendet werden, das für GAPDH spezifisch ist und unabhängig von einem Anfügen der einzigartigen Sequenz am 3'-Ende des zweiten cDNA-Strangs ist.

[0311] PCR wurde, wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben, unter Verwendung zweier separater cDNA-Präparate von jedem Ausgangstemplate ausgeführt, wie es oben beschrieben ist. PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse sind in [Fig. 9](#) gezeigt. Die Spuren entsprechen den Reaktionsgemischen, welche die folgenden Templates und Primerpaare enthalten:

1. Markierung	
2. cDNA von HCT116	GAPDH3/GAPDH5-4
3. cDNA von HCT116	GAPDH3/GAPDH5-4
4. cDNA von MOLT4	GAPDH3/GAPDH5-4
5. cDNA von MOLT4	GAPDH3/GAPDH5-4
6. kein Template	GAPDH3/GAPDH5-4
7. cDNA von HCT116	dMTA1/GAPDH5-4
8. cDNA von HCT116	dMTA1/GAPDH5-4
9. cDNA von MOLT4	dMTA1/GAPDH5-4
10. cDNA von MOLT4	dMTA1/GAPDH5-4
11. kein Template	dMTA1/GAPDH5-4

[0312] Pfeile markieren die Position des erwarteten PCR-Produkts.

[0313] Wie erwartet, wurde ein längeres Produkt in HCT116- und MOLT4-Proben gebildet, die unter Verwendung des Primerpaars (1) amplifiziert wurden, und ein kürzeres Produkt wurde in HCT116- und MOLT4-Proben erzeugt, die unter Verwendung des Primerpaars (2) amplifiziert wurden. Kein Produkt wurde in den Kontrollproben ohne Template gebildet. Dieses Beispiel demonstriert das effiziente Anfügen einer definierten Sequenz am 3'-Ende der zweiten cDNA unter Anwendung der hier beschriebenen Verfahren.

Beispiel 5: Amplifikation von poly-A-Gesamt-mRNA und quantitative Bestimmung der Produkte mit Hilfe der Echtzeit-PCR

[0314] 200 ng Gesamt-RNA von humaner Darmtumor-Gesamt-RNA (Clontech Kat.-Nr. 64014-1) wurde als Ziel für die Amplifikation eingesetzt. Die Herstellung von erstem und Zweitstrang-cDNA und der anschließende Amplifikationsschritt wurde, im Wesentlichen wie in Beispiel 3 beschrieben, mit den folgenden Veränderungen ausgeführt:

- (1) Das Reaktionsgemisch für die Synthese der Zweitstrang-cDNA enthielt Klenow DNA-Polymerase (der 3' und 5'-Exonukleaseaktivitäten fehlen) und keine Ligase.
- (2) Die Amplifikation der resultierenden cDNA wurde unter Verwendung von Bst-Polymerase (4 Einheiten, NEB) anstatt Bca-Polymerase ausgeführt.

[0315] Die quantitative Bestimmung der cDNA-Intermediate (Zweitstrang-cDNA) und der Antisense-Amplifikationsprodukte erfolgte unter Verwendung von vier Primerpaaren, die vier verschiedenen mRNAs entsprachen, und Echtzeit-PCR gemäß dem folgenden Protokoll:

cDNA- oder Amplifikationsprodukte wurden 1:10 oder 1:100 in TE-Puffer verdünnt. Die Reaktionsgemische für die Echtzeit-PCR wurden auf ein Gesamtvolumen von 20 µl folgendermaßen eingestellt:

Für jede Reaktion

10 µl 2X ABI SYBR Green master mix (ABI Kat.-Nr. 4309155)

0,6 µl 10 µM Vorwärts-Primer

0,6 µl 10 µM Rückwärts-Primer

1 µl Template (die Verdünnung entweder von cDNA oder Amplifikationsprodukten ist oben angegeben)

7,8 µl H₂O

[0316] Die folgenden Primerpaare wurden für die quantitative Bestimmung von vier spezifischen exprimierten Genen entweder in wie oben beschriebenen erzeugten cDNA- oder Amplifikationsprodukten verwendet:

G6PD

G6PD5	5' AGGCAGCCTCTCTGCTATAAGAAA 3'
G6PD3	5' GCAGGGCATTGAGGTTGG 3'

LGALS1

LGALS15	5' ATGGCAGCTGACGGTGACTT 3'
LGALS13	5' CATGGGCTGGCTGATTT 3'

MT2A

MT2A5	5' CGCCTGATGCTGGGACAG 3'
MT2A3	5' GTTGTACATAAAAAATCCAGGTTTGTG 3'

RPL27

RPL275	5' GATCCTGCTCTTAAACGCAAGG 3'
RPL273	5' TGCCTGTCTTGTATCTCTCTTCAAAC 3'

[0317] Die PCR-Reaktion wurde in einem iCycler (BioRad) unter Anwendung des folgenden Protokolls ausgeführt:

94°C 10 Minuten zur Aktivierung der DNA-Polymerase

40 Zyklen: 94°C 30 Sekunden, anschließend 60°C 30 Sekunden.

[0318] Datenanalyse wurde nach Herstellerempfehlung ausgeführt.

[0319] [Fig. 10](#) zeigt vier Kurven von Fluoreszenzwerten, die in Abhängigkeit der Zykluszahl für die PCR-Reaktion das cDNA-Produkt (durch Amplifizieren der Zweitstrang-cDNA) oder der entsprechenden SPIA-Amplifikationsprodukte (durch Amplifizieren der angehäuften Zweitstrang-cDNA) quantifizieren. Die Teilbilder zeigen die Ergebnisse der Quantifizierungsversuche unter Verwendung (von oben nach unten) der Primerpaare MTA2, RPL27, LGALS1 beziehungsweise G6PD. Jedes Teilbild zeigt die Ergebnisse von 6 Versuchen unter Verwendung eines Amplifikationsproduktpräparats (als „SPIA“ bezeichnet) und 2 Versuchen unter Verwendung eines cDNA-Produktpräparats (als „cDNA“ bezeichnet). Die x-Achse stellt die PCR-Zyklen und die y-Achse stellt die PCR-Grundlinie minus RFU dar.

[0320] Der Amplifikationslevel eines jeden Genprodukts unter Anwendung des Verfahrens der Erfindung ist durch die unterschiedliche Anzahl an PCR-Zyklen definiert, die für die Erzeugung eines Fluoreszenzsignals (als „CT“ bezeichnet) oberhalb einer bestimmten Schwelle erforderlich sind, zwischen einer Reaktion, die unter Verwendung eines cDNA-Produkttemplates ausgeführt ist, und Reaktionen, die unter Verwendung der entsprechenden Amplifikationsprodukte als Templates ausgeführt sind. Tabelle 1 zeigt eine Berechnung eines „delta CT“-Werts für jedes Genprodukt (gibt den Vergleich zwischen CT-Werten wieder, die Reaktionen entsprechen, die unter Verwendung eines cDNA-Produkttemplates ausgeführt ist, und Reaktionen, die unter Verwendung der entsprechenden Amplifikationsprodukte als Templates ausgeführt sind) und die zeigten, dass ungeachtet ihres Expressionslevels in der eingesetzten Gesamt-RNA, die mRNAs, die den vier Genprodukten entsprechen, mit dem Verfahren der Erfindung in gleichem Maße amplifiziert werden.

Tabelle 1: Berechnung des CT-Werts für jedes Genprodukt

Gen	cDNA CT	SPIA CT	delta CT
MTA2	37	26	11
RPL27	30	19	11
LGAL	31	21	10
G6PD	35	26	9

[0321] Obwohl die voranstehende Erfindung mit Hilfe von Abbildungen und Beispielen für ein klares Verständnis recht genau beschrieben worden ist, wird es dem Fachmann offensichtlich sein, dass bestimmte Veränderungen und Modifikationen daran vorgenommen werden können. Deshalb sollten die Beschreibungen und Beispiele nicht als eine Begrenzung des Rahmens der Erfindung, der durch die angefügten Ansprüche definiert ist, erachtet werden.

SEQUENZLISTE

<110> Nugen Technologies, Inc.

<120> METHODEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR
VERVIELFÄLTIGUNG VON RNA-SEQUENZEN

<130> N.87525 SER

<140> EP 02721342.0

<141> 2002-03-11

<150> PCT/US02/07306

<151> 2002-03-11

<150> US 60/274,550

<151> 2001-03-09

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> Primer

<400> 1

gacggaugcg gucutttttt t

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> 22

<223> n = A,T,C or G

<400> 2

gacggaugcg gucutttttt tn

22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> Quelle

<223> Primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 22, 23
 <223> n = A,T,C or G

<400> 3
 gacggaugcg gucutttttt tnn

23

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 4
 tttcttggtg taacaacgaa

20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 5
 ccagcaagag cacaagagga

20

<210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 6
 gatggtacat gacaaggt

18

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 7
 gacggatgag gtcttttttt t

21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 8
 cccgcaacca cttccgctgt c 21

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 9
 caaacccgtc acccagatcg t 21

 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 10
 caacacaagg gcgctgacc 19

 <210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 29, 30
 <223> n = A,T,C or G

 <400> 11
 gacggaugcg gucutttttt ttttttttnn 30

 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 12
 aactaccttc aactccatca 20

 <210> 13

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 13
 ggactcgtca tactcctgc 19

 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 14
 aggcagcctc tctgctataa gaaa 24

 <210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 15
 gcagggcatt gaggttgg 18

 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 16
 atggcagctg acggtgactt 20

 <210> 17
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

 <400> 17
 catgggctgg ctgattt 17

 <210> 18
 <211> 18

<212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 18
 cgcctgatgc tgggacag 18

<210> 19
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 19
 gttgtacata aaaaatccag gtttgtg 27

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 20
 gatcctgctc ttaaacgcaa gg 22

<210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 21
 tgcctgtctt gtatctctct tcaaac 26

<210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A,T,C or G

<400> 22

naaaaaaaaa aaaaaaaaaa

19

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A,T,C or G

<400> 23
 naaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

21

<210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> Quelle
 <223> Primer

<400> 24
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa

19

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu einer RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, welches Verfahren umfasst:

(a) Bereitstellen eines Komplexes, welcher Komplex umfasst:

(i) einen Komplex aus ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten, worin das erste Primer-Extensionsprodukt durch Extension eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase erzeugt ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer (Composite Primer) ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt, worin das zweite Primer-Extensionsprodukt durch Extension eines zweiten Primers, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, erzeugt ist, und worin die RNA von dem Komplex der ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukte mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, abgespalten wird; und

(ii) einen zusammengesetzten Primer, welcher zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt umfasst, wobei der zusammengesetzte Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist;

und (b) Extendieren des zusammengesetzten Primers aus (ii), wodurch das erste Primer-Extensionsprodukt verdrängt wird, und wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, welches Verfahren außerdem die folgenden anfänglichen Schritte umfasst:

(a) Spalten der RNA von einem Komplex aus den ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, so dass ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt umfasst, worin das erste Primer-Extensionsprodukt durch Extension eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase hybridisiert ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt, erzeugt ist; und

(b) Hybridisieren eines zusammengesetzten Primers an das zweite Primer-Extensionsprodukt, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt umfasst, und wobei der zusammengesetzte Primer mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase extendiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, welches Verfahren außerdem die folgenden anfänglichen Schritte umfasst:

- (a) Extendieren eines ersten Primers, der an eine Ziel-RNA hybridisiert ist, mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt, wodurch ein Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, erzeugt wird;
- (b) Abspalten der RNA in dem Komplex aus Schritt (a);
- (c) Extendieren eines zweiten Primers, der an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert ist, mit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wodurch ein zweites Primer-Extensionsprodukt erzeugt wird, um einen Komplex aus den ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten zu bilden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, ausgeführt durch Inkubieren eines Reaktionsgemischs, welches umfasst:

- (a) den Komplex aus den ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukten;
 - (b) einen zusammengesetzten Primer, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt umfasst;
 - (c) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; und
 - (d) ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet;
- wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die die Primer-Hybridisierung, RNA-Spaltung und Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem Komplex aus Schritt (a), wenn seine RNA abgespalten wird und ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem Komplex bindet und extendiert wird, zulassen, wobei vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 3, worin:

Schritt (a) durchgeführt wird durch Inkubieren eines Reaktionsgemischs, welches umfasst:

- (i) eine Ziel-RNA;
 - (ii) einen ersten Primer, der an eine Ziel-RNA hybridisierbar ist, wobei der erste Primer ein zusammengesetzter Primer ist, umfassend einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt; und
 - (iii) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase;
- wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die die Primer-Hybridisierung, Bildung eines Komplexes, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und die Ziel-RNA, zulassen;
- Schritt (c), und wahlweise die Spaltung der RNA von dem Komplex der ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukte durchgeführt wird durch Inkubieren eines Reaktionsgemischs, welches umfasst:
- (i) das erste Primer-Extensionsprodukt;
 - (ii) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase;
 - (iii) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase; und
 - (iv) wahlweise ein Enzym, das zur Spaltung von RNA von einem RNA/DNA-Hybrid fähig ist;
- wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die die Bildung eines Komplexes, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt, wahlweise die Spaltung der RNA in dem Komplex, umfassend ein erstes Primer-Extensionsprodukt und das zweite Primer-Extensionsprodukt, zulassen; und

die in Ansprüchen 1 und 2 dargestellten Schritte ausgeführt, oder vervollständigt, werden durch

(c) Inkubieren eines Reaktionsgemischs, welches Reaktionsgemisch umfasst:

- (i) den Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt oder den gespaltenen Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt;
 - (ii) ein Enzym, das zur Spaltung von RNA von einem RNA/DNA-Hybrid fähig ist;
 - (iii) einen zusammengesetzten Primer, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3'-DNA-Abschnitt umfasst; und
 - (iv) DNA-abhängige DNA-Polymerase, wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die die Spaltung der RNA in dem Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt, die Hybridisierung des zusammengesetzten Primers und die Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem Komplex, umfassend das erste Primer-Extensionsprodukt und ein zweites Primer-Extensionsprodukt, zulassen;
- wodurch vielfache Kopien einer Polynukleotidsequenz, die zu der RNA-Sequenz von Interesse komplementär ist, erzeugt werden.

6. Verfahren zur Erzeugung vielfacher Kopien einer RNA-Sequenz von Interesse, welches Verfahren das Ausführen des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 3 umfasst und außerdem umfasst:

Hybridisieren des verdrängten ersten Primer-Extensionsprodukts mit einem Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, unter Bedingungen, die das Erfolgen der Transkription durch RNA-Polymerase erlauben, so dass RNA-Transkripte, umfassend Sequenzen, die zu dem verdrängten ersten Primer-Extensionsprodukt komplementär sind, erzeugt werden, wobei vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, ausgeführt durch Inkubieren eines Reaktionsgemischs, welches umfasst:

- (a) den Komplex der ersten und zweiten Primer-Extensionsprodukte;
 - (b) einen zusammengesetzten Primer, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist, wobei der zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt umfasst;
 - (c) eine DNA-abhängige DNA-Polymerase; und
 - (d) eine RNA-Polymerase;
 - (e) ein Propromotor-Polynukleotid, umfassend einen Propromotor und eine Region, die an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt hybridisiert; und
 - (f) ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet;
- und wobei die Inkubation unter Bedingungen erfolgt, die die Primer-Hybridisierung, RNA-Spaltung, Verdrängung des ersten Primer-Extensionsprodukts von dem ersten Komplex, wenn seine RNA gespalten wird und ein zusammengesetzter Primer an das zweite Primer-Extensionsprodukt in dem ersten Komplex bindet, Hybridisierung des Propromotor-Polynukleotids an das verdrängte erste Primer-Extensionsprodukt, um einen zweiten Komplex zu bilden, umfassend das verdrängte Primer-Extensionsprodukt und das Propromotor-Polynukleotid, und RNA-Transkription von dem zweiten Komplex, zulassen, wobei vielfache Kopien der RNA-Sequenz von Interesse erzeugt werden.

8. Verfahren zum Sequenzieren einer RNA-Sequenz von Interesse, welches Verfahren das Analysieren der Amplifikationsprodukte zur Bestimmung der Sequenz umfasst, wobei die Amplifikationsprodukte durch Amplifizieren der Sequenz von Interesse mittels des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 in der Gegenwart eines Gemischs von dNTPs und dNTP-Analoga erzeugt werden, so dass die Primerextension auf den Einbau eines dNTP-Analogons hin beendet wird.

9. Verfahren zum Sequenzieren einer RNA-Sequenz von Interesse, welches Verfahren das Analysieren der Amplifikationsprodukte zur Bestimmung der Sequenz umfasst, wobei die Amplifikationsprodukte durch Amplifizieren der Sequenz mittels des Verfahrens nach Anspruch 6 oder 7 in der Gegenwart eines Gemischs von rNTPs und rNTP-Analoga erzeugt werden, so dass die Transkription auf den Einbau eines rNTP-Analogons hin beendet wird.

10. Verfahren zum Detektieren einer Mutation in einer Ziel-RNA durch Einzelstrang-Konformations-Poly-morphismus, umfassend das Analysieren der Amplifikationsprodukte auf die Einzelstrang-Konformation, wobei die Amplifikationsprodukte durch Amplifizieren der Zielsequenz mittels des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 erzeugt werden, und wobei ein Unterschied in der Konformation im Vergleich zu einem Referenz-Einzelstrang-Polynukleotid eine Mutation in der Ziel-RNA anzeigt.

11. Verfahren zum Bestimmen des Vorhandenseins oder der Abwesenheit einer Sequenz von Interesse in der Ziel-RNA, welches Verfahren umfasst:

- (i) Amplifizieren der Ziel-RNA, die die Sequenz von Interesse enthält, mittels des Verfahrens nach Ansprüchen 1, 2 und 3, wobei von der Sequenz des RNA-Abschnitts des zusammengesetzten Primers nach Anspruch 1
 - (ii) bekannt ist, dass sie an eine Referenzsequenz, umfassend die Sequenz von Interesse, hybridisiert; und
 - (ii) Vergleichen der Amplifikationsprodukte, sofern vorhanden, aus Schritt (i) mit der Menge an Amplifikationsprodukten von einer Referenztemplate
- wobei die Produktion von nachweislich weniger Amplifikationsprodukten von der Ziel-RNA im Vergleich zu der Menge an Amplifikationsprodukten von einer Referenztemplate anzeigt, dass die Sequenz von Interesse in der Ziel-RNA abwesend ist und eine Sequenzvariante bezüglich der Referenzsequenz ist, die an den RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers hybridisierbar ist.

12. Verfahren zum Herstellen einer an einem Substrat immobilisierten Nukleinsäure, umfassend das Immobilisieren von Amplifikationsprodukten an einem Substrat, das wahlweise ein Mikroarray ist, wobei die Amplifikationsprodukte mittels des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 erzeugt sind.

13. Verfahren zum Charakterisieren einer RNA-Sequenz von Interesse, umfassend das Analysieren der Amplifikationsprodukte, wahlweise durch Bestimmen der Menge an diesen Produkten, wobei die Amplifikati-

onsprodukte durch Amplifizieren der Sequenz von Interesse mittels des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 erzeugt sind, wodurch die Menge der RNA-Sequenz von Interesse, die in einer Probe vorhanden ist, quantifiziert wird.

14. Verfahren zum Bestimmen des Genexpressionsprofils in einer Probe, welches Verfahren das Bestimmen der Menge der Amplifikationsprodukte von wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse umfasst, wobei die Amplifikationsprodukte durch Amplifizieren wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse mittels des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 erzeugt werden, und wobei die Menge indikativ ist für die Menge an dieser RNA-Sequenz von Interesse in der Probe, wodurch das Genexpressionsprofil in der Probe bestimmt wird.

15. Verfahren zum Durchführen einer subtraktiven Hybridisierung, bei dem wenigstens eine erste und zweite Ziel-RNA-Population verglichen wird, welches Verfahren umfasst: (a) Ausführen des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Erzeugung vielfacher DANN-Kopien des Komplements von wenigstens einer RNA-Sequenz von Interesse von einer ersten RNA-Population unter Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, und (b) Hybridisieren der vielfachen Kopien an eine zweite RNA-Population, wobei eine Subpopulation der zweiten RNA-Population einen Komplex mit einer DNA-Kopie bildet, und wahlweise außerdem umfasst: (c) Spalten der RNA in dem Komplex aus Schritt (b) mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und (d) Amplifizieren einer unhybridisierten Subpopulation der zweiten RNA-Population, wodurch vielfache Kopien der einzelsträngigen DNA, die zu der unhybridisierten Subpopulation der zweiten RNA-Population komplementär ist, erzeugt werden.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die zweite RNA-Population eine mRNA-Population ist.

17. Verfahren zur differentiellen Amplifikation einer oder mehrerer RNA-Sequenzen von Interesse, welches Verfahren umfasst:

(a) Ausführen des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Erzeugung vielfacher Polynukleotid-Kopien des Komplements von einer oder mehrerer RNA-Sequenzen von Interesse von einer ersten RNA-Population;

(b) Hybridisieren der vielfachen Polynukleotid-Kopien des Komplements von einer oder mehrerer RNA-Sequenzen von Interesse von einer ersten RNA-Population an eine zweite mRNA-Population, wodurch eine Subpopulation der zweiten mRNA-Population an die Polynukleotid-Kopien hybridisiert, um Komplexe zu bilden;

(c) Spalten der RNA in den Komplexen aus Schritt (b) mit einem Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet; und

(d) Amplifizieren einer unhybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population, wodurch vielfache Kopien der einzelsträngigen DNA, die zur der hybridisierten Subpopulation der zweiten mRNA-Population komplementär ist, erzeugt werden.

18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der zweite Primer ein Fragment der Ziel-RNA, hybridisiert an das Primer-Extensionsprodukt, umfasst, welches Fragment durch Spalten der RNA in dem Komplex aus dem ersten Primer-Extensionsprodukt und der Ziel-RNA erzeugt wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin der zweite Primer DNA umfasst.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, worin der zweite Primer einen zusammengesetzten Primer umfasst.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, 19 oder 21, worin der zweite Primer ein Zufallsprimer ist.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder 19 bis 21, worin der zweite Primer einen 5' Abschnitt umfasst, der nicht an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisierbar ist unter Bedingungen, die den zweiten Primer an das erste Primer-Extensionsprodukt hybridisieren.

23. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der RNA-Abschnitt in dem ersten Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, von 5 Nukleotide bis 50 Nukleotide beträgt.

24. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der 3' DNA-Abschnitt in dem ersten Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, von 5 Nukleotide bis 20 Nukleotide beträgt.

25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der RNA-Abschnitt des ersten Primers,

der an die Ziel-RNA hybridisiert, 5' bezüglich des 3' DNA-Abschnitt ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, worin der 5' RNA-Abschnitt benachbart zu dem 3' DNA-Abschnitt ist.

27. Verfahren nach Anspruch 26, worin der 5' RNA-Abschnitt von 10 bis 50 Nukleotide beträgt.

28. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der erste Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, einen 5' Abschnitt umfasst, der nicht an die Ziel-RNA hybridisierbar ist unter Bedingungen, die den ersten Primer an die Ziel-RNA hybridisieren.

29. Verfahren nach Anspruch 25, worin der 5' RNA-Abschnitt des ersten Primers teilweise hybridisierbar und teilweise nicht-hybridisierbar an die Ziel-RNA ist.

30. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der erste Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, eine poly-dT-Sequenz umfasst.

31. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, von 5 bis 50 Nukleotide beträgt.

32. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der 3' DNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, von 1 bis 20 Nukleotide beträgt.

33. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der RNA-Abschnitt des zusammengesetzten Primers, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, 5' bezüglich des 3' DNA-Abschnitt ist.

34. Verfahren nach Anspruch 33, worin der 5' RNA-Abschnitt benachbart zu dem 3' DNA-Abschnitt ist.

35. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Ziel-RNA mRNA ist.

36. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der erste Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, eine Zufallssequenz umfasst.

37. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die Ziel-RNA mRNA ist, und der erste Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, eine poly-dT-Sequenz umfasst, und außerdem einen 5' Abschnitt umfasst, der nicht an die Ziel-RNA hybridisierbar ist unter Bedingungen, die den ersten Primer an die Ziel-mRNA hybridisieren.

38. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin eine Vielzahl von unterschiedlichen ersten Primern zur Hybridisierung an die Ziel-RNA verwendet wird.

39. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, RNase H ist.

40. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die RNA-abhängige DNA-Polymerase und DNA-abhängige DNA-Polymerase die gleichen oder verschiedene Enzyme sind, die RNA-abhängige DNA-Polymerase und das Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, die gleichen oder verschiedene Enzyme sind, die DNA-abhängige DNA-Polymerase und das Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, die gleichen oder verschiedene Enzyme sind, oder die DNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA-abhängige DNA-Polymerase und das Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, die gleichen oder verschiedene Enzyme sind.

41. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verfahren in der Gegenwart wenigstens einer markierten dNTP vorgenommen wird, wodurch markierte Produkte erzeugt werden.

42. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der erste Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, einiges oder alles der Sequenz des zusammengesetzten Primers, der an das zweite Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, umfasst.

43. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verfahren das Erzeugen vielfacher

Kopien einer Polynukleotidsequenz umfasst, die zu zwei oder mehreren unterschiedlichen Sequenzen von Interesse komplementär ist.

44. Verfahren nach Anspruch 43, wobei das Verfahren wenigstens zwei unterschiedliche erste Primer, die an die Ziel-RNA hybridisieren, umfasst.

45. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, worin das Propromotor-Polynukleotid eine Region an dem 3' Ende umfasst, die an das verdrängte Primer-Extensionsprodukt hybridisiert, wodurch die DNA-Polymerase-Extension des verdrängten Primer-Extensionsprodukts einen doppelsträngigen Promotor erzeugt, von dem die Transkription erfolgt.

46. Verfahren nach einem der Ansprüche 6, 7 oder 45, worin das Propromotor-Polynukleotid ein Propromotor-Template-Oligonukleotid (PTO) ist.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 6, 7, 45 oder 46, wobei das Verfahren in der Gegenwart wenigstens einer markierten rNTP vorgenommen wird, wodurch markierte Produkte erzeugt werden.

48. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Amplifikationsprodukte markiert sind.

49. Verfahren nach Anspruch 13 oder 48, worin das Analysieren der Amplifikationsprodukte das Kontaktieren der Amplifikationsprodukte mit wenigstens einer Sonde umfasst, wahlweise bereitgestellt als ein Mikroarray, welches wahlweise wenigstens eine Sonde, immobilisiert an einem Substrat, das hergestellt ist aus einem Material, ausgewählt aus Papier, Glas, Keramik, Kunststoff, Polypropylen, Polystyrol, Nylon, Polyacrylamid, Nitrocellulose, Silikon und optische Faser, wahlweise in einer zweidimensionalen Konfiguration oder einer dreidimensionalen Konfiguration, umfassend Nadeln, Stäbchen, Fasern, Bänder, Fäden, Kügelchen, Partikel, Mikrotiter-Wells, Kapillaren und Zylinder, umfasst.

50. Kit zum Amplifizieren einer Ziel-RNA, umfassend einen ersten zusammengesetzten Primer und einen zweiten zusammengesetzten Primer, wobei der erste zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt umfasst, wobei der zweite zusammengesetzte Primer einen RNA-Abschnitt und einen 3' DNA-Abschnitt umfasst, und wobei der zweite zusammengesetzte Primer eine Sequenz umfasst, die an ein Polynukleotid, umfassend ein Komplement des RNA-Abschnitts des ersten zusammengesetzten Primers, hybridisierbar ist.

51. Kit nach Anspruch 50, wobei der erste zusammengesetzte Primer einiges oder alles der Sequenz des zweiten zusammengesetzten Primers umfasst.

52. Kit nach Anspruch 50 oder 51, wobei der RNA-Abschnitt des ersten und/oder zweiten zusammengesetzten Primers von 5 bis 50 Nukleotide beträgt.

53. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 52, wobei der 3' DNA-Abschnitt des ersten zusammengesetzten Primers von 5 bis 20 Nukleotide beträgt.

54. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 53, wobei der 3' DNA-Abschnitt des zweiten zusammengesetzten Primers von 1 bis 20 Nukleotide beträgt.

55. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 54, wobei der RNA-Abschnitt des ersten und/oder zweiten zusammengesetzten Primers 5' bezüglich des 3' DNA-Abschnitts ist.

56. Kit nach Anspruch 55, wobei der 5' RNA-Abschnitt benachbart zu dem 3' DNA-Abschnitt ist.

57. Kit nach Anspruch 55 oder 56, wobei der 5' RNA-Abschnitt des ersten zusammengesetzten Primers wenigstens 10 Nukleotide bis zu 50 Nukleotide beträgt.

58. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 57, wobei der erste zusammengesetzte Primer einen 5' Abschnitt umfasst, der nicht an die Ziel-RNA hybridisierbar ist unter Bedingungen, die den ersten zusammengesetzten Primer an die Ziel-RNA hybridisieren.

59. Kit nach Anspruch 55, wobei der 5' RNA-Abschnitt des ersten zusammengesetzten Primers teilweise hybridisierbar und teilweise nicht-hybridisierbar an die Ziel-RNA ist.

60. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 59, wobei der erste zusammengesetzte Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, eine poly-dT-Sequenz umfasst.

61. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 59, wobei der erste zusammengesetzte Primer, der an die Ziel-RNA hybridisiert, eine Zufallssequenz umfasst.

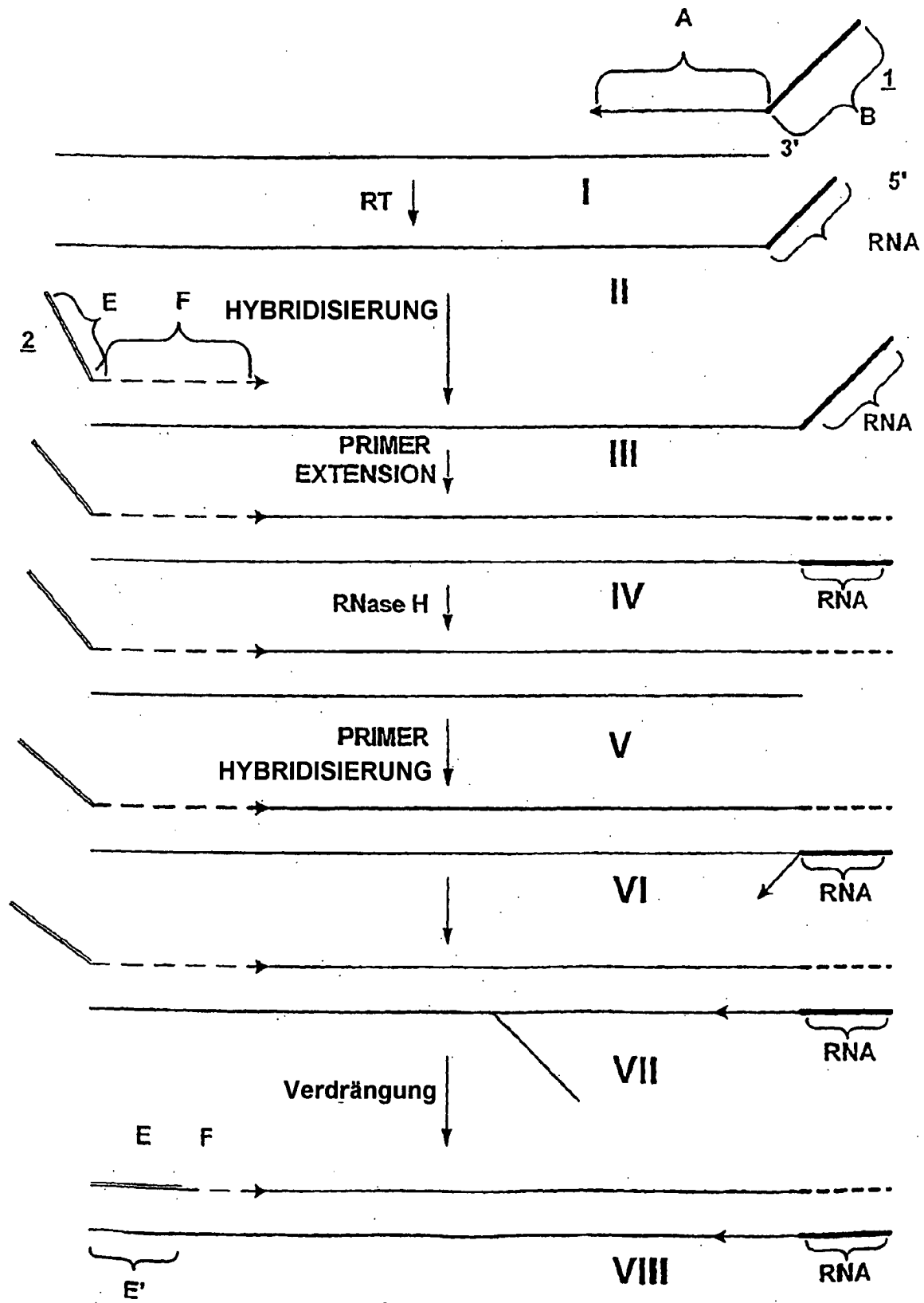
62. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 59, wobei der erste zusammengesetzte Primer einen 3' Abschnitt umfasst, der eine Zufallssequenz umfasst.

63. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 62, wobei der Kit ein Enzym, das RNA von einem RNA/DNA-Hybrid abspaltet, und ein Enzym, das eine DNA-Polymerase-Aktivität aufweist, umfasst.

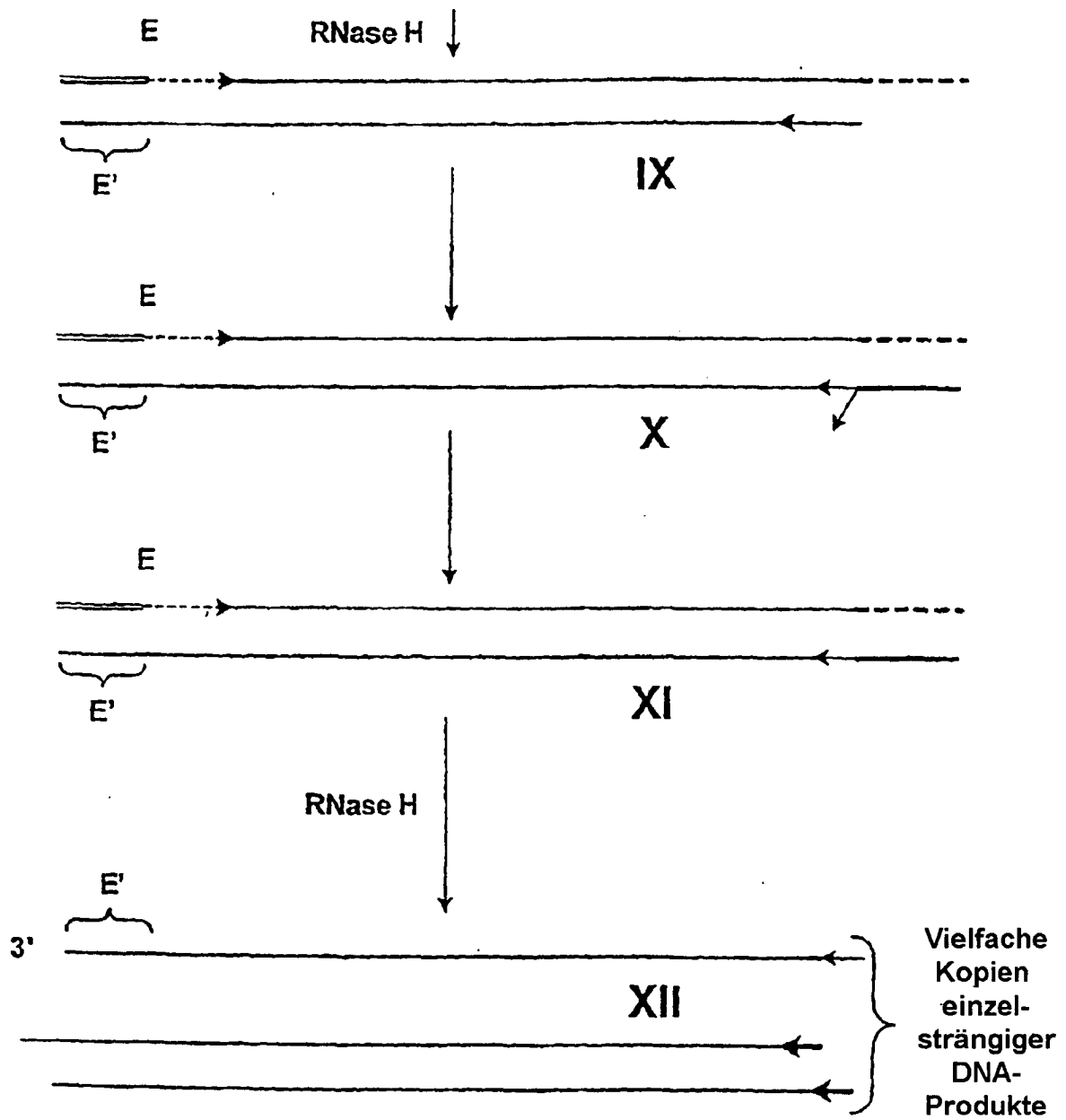
64. Kit nach einem der Ansprüche 50 bis 63, außerdem umfassend einen zusätzlichen Primer.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

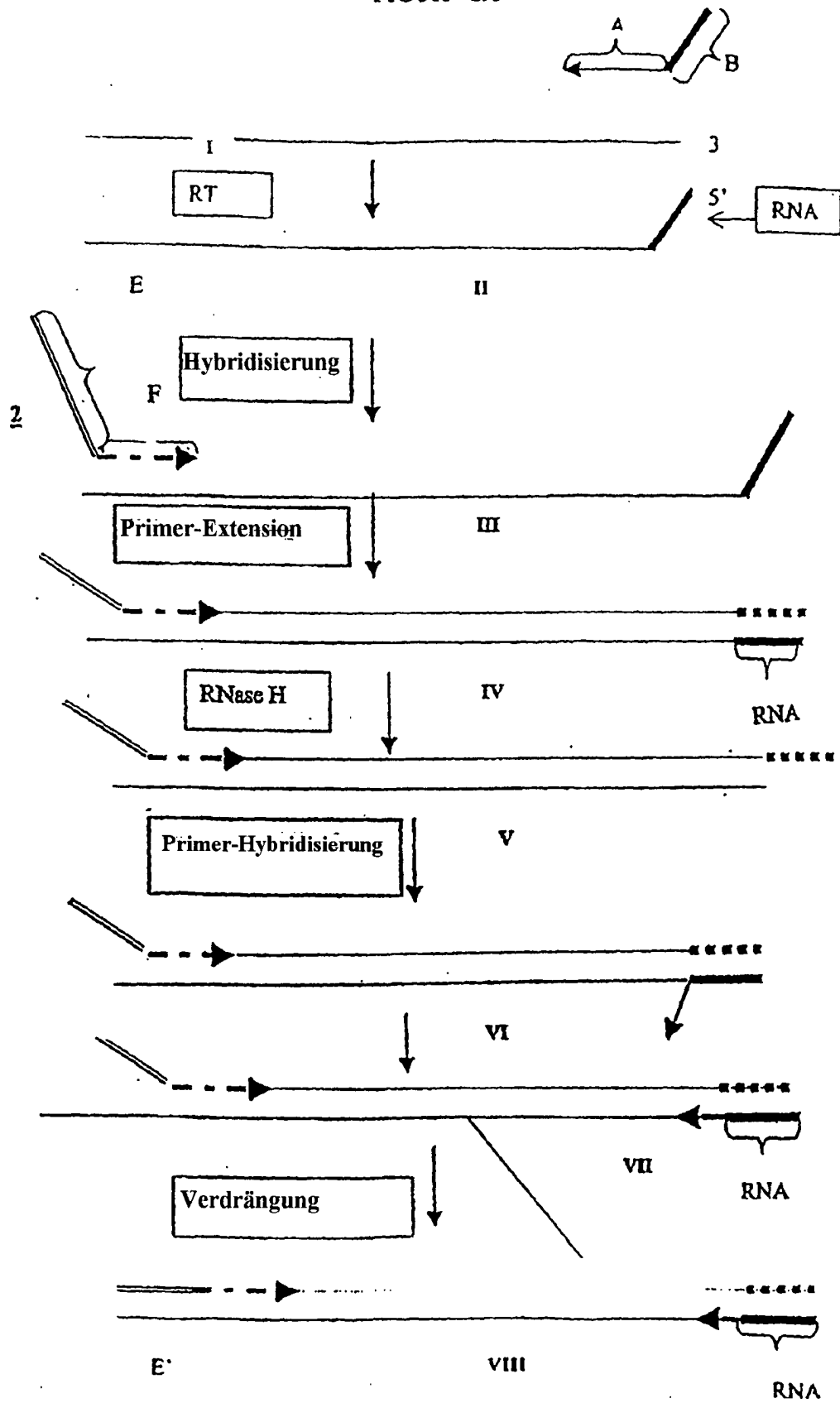


FIGUR 1A



FIGUR 1B

FIGUR 2A



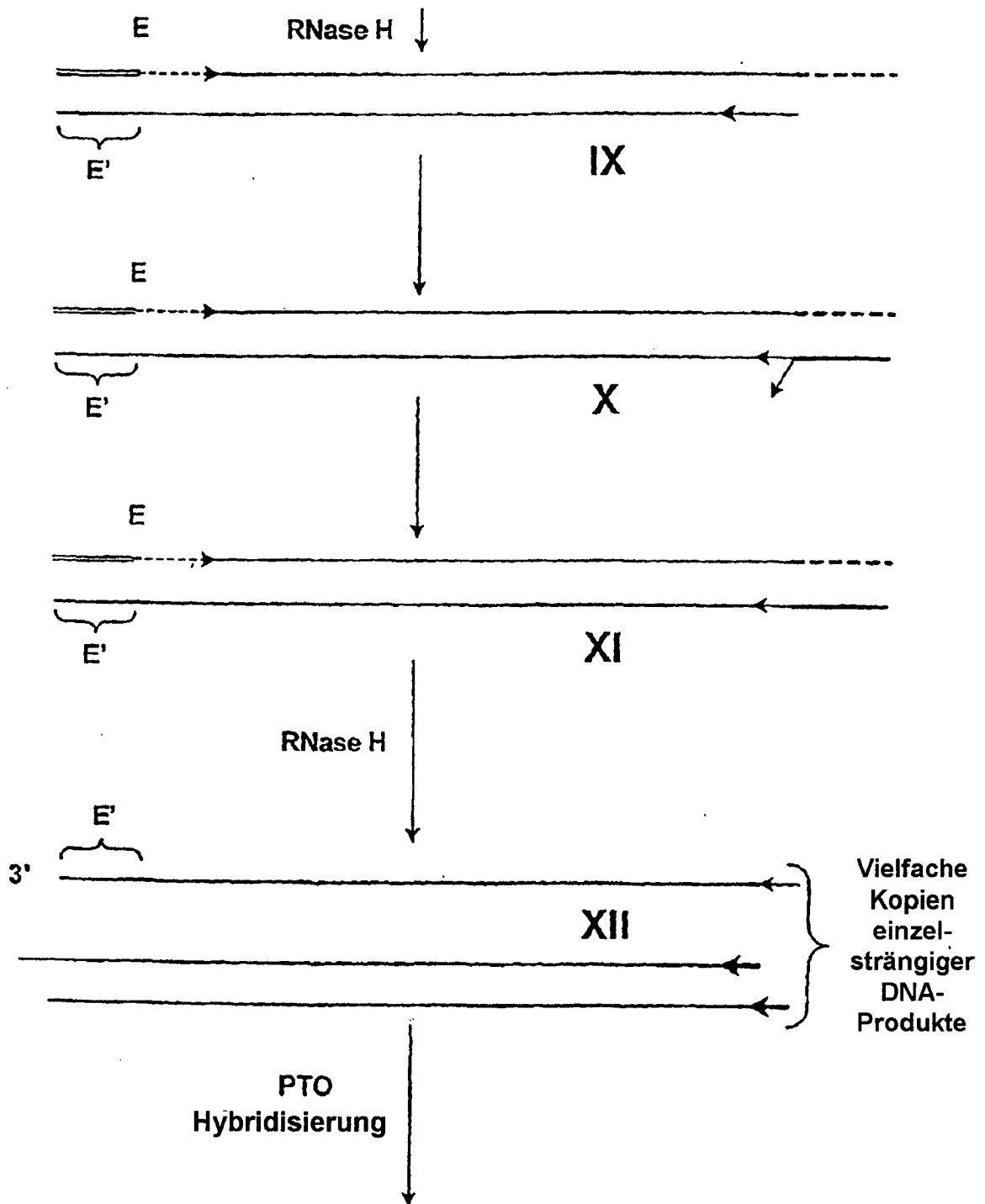
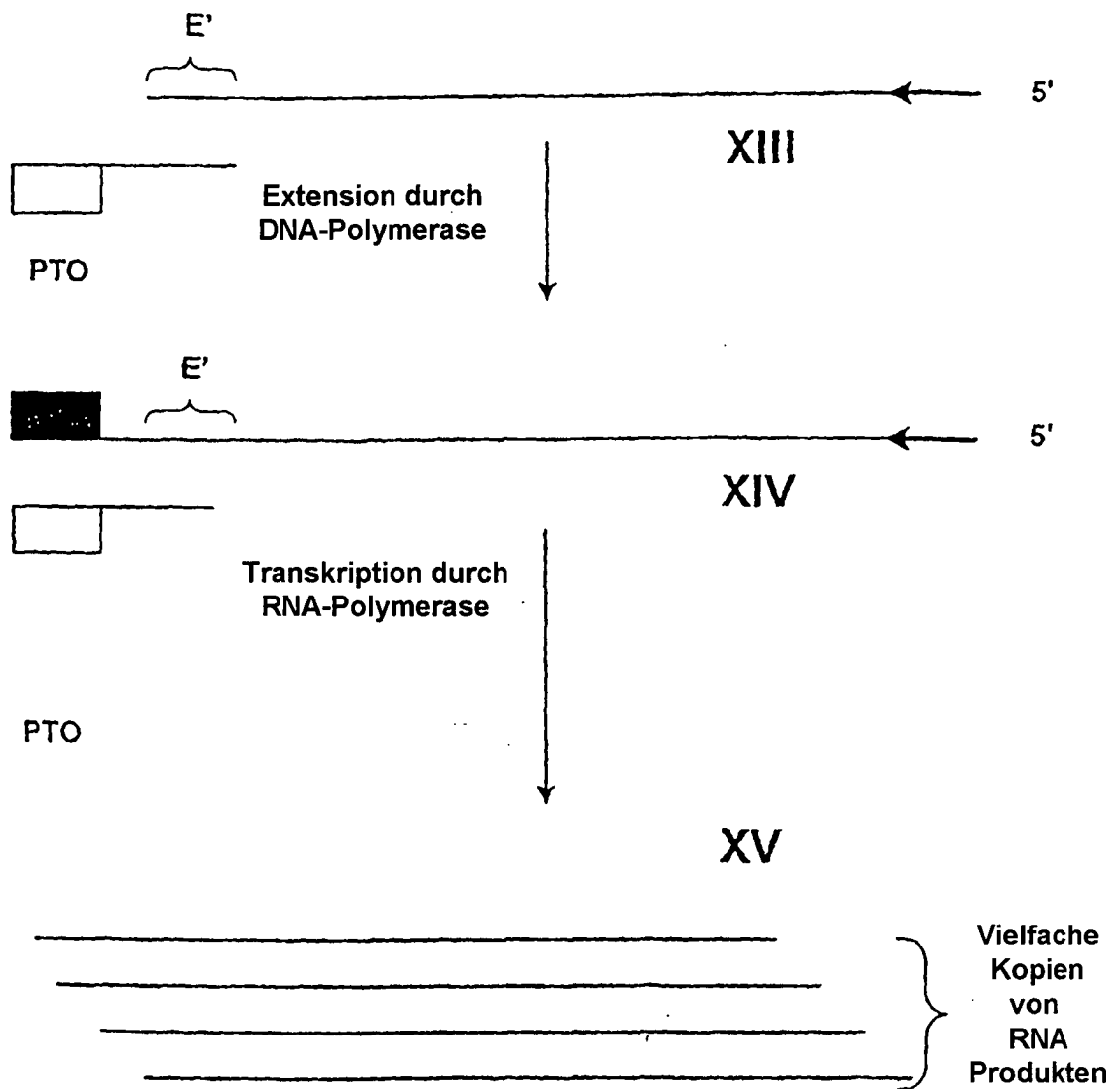
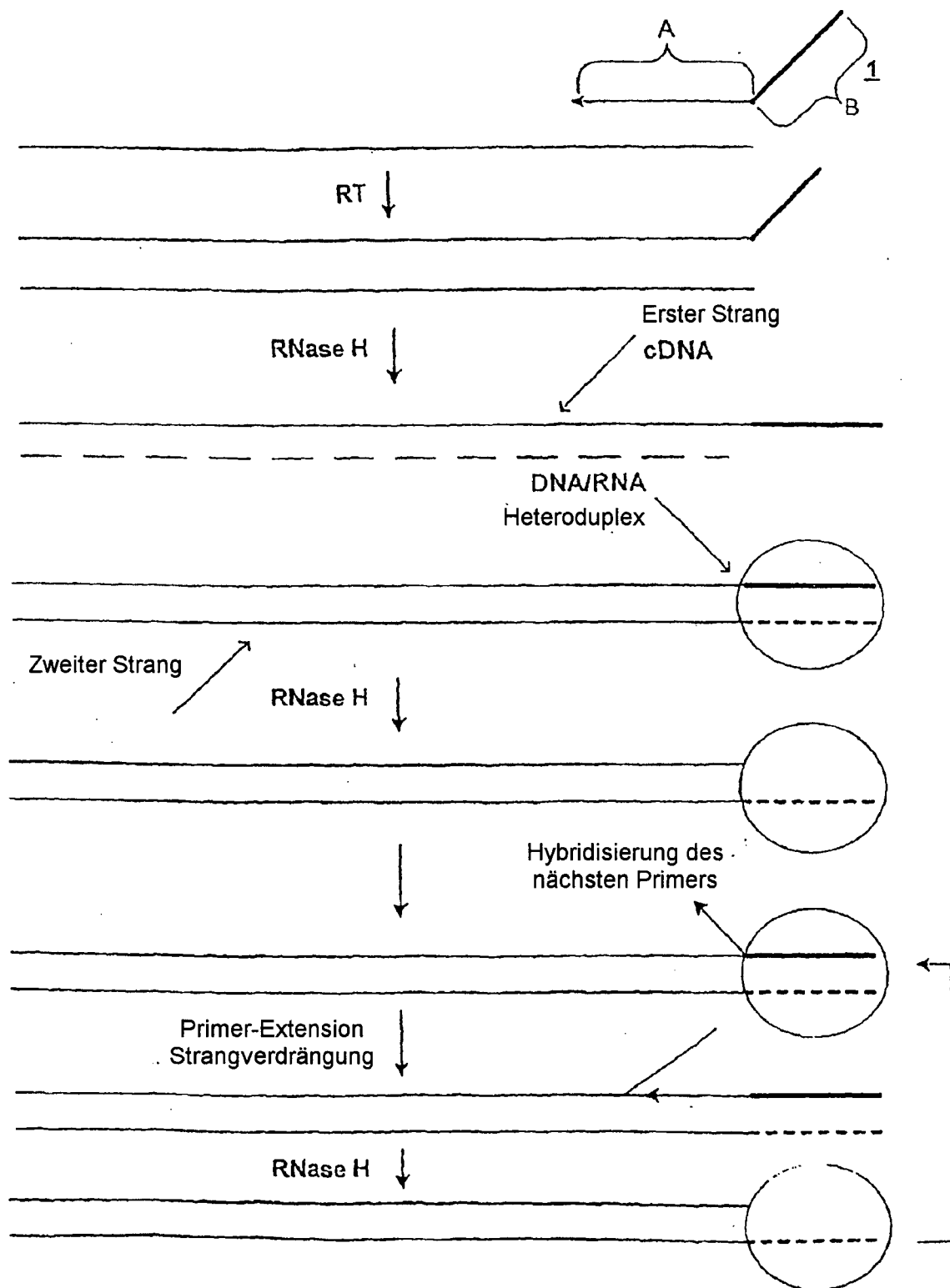


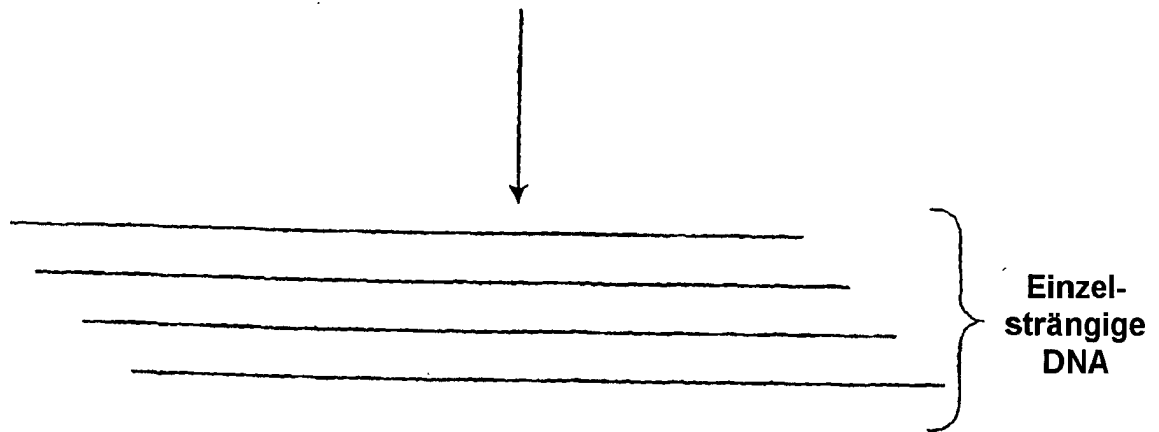
FIGURE 2B



FIGUR 2C

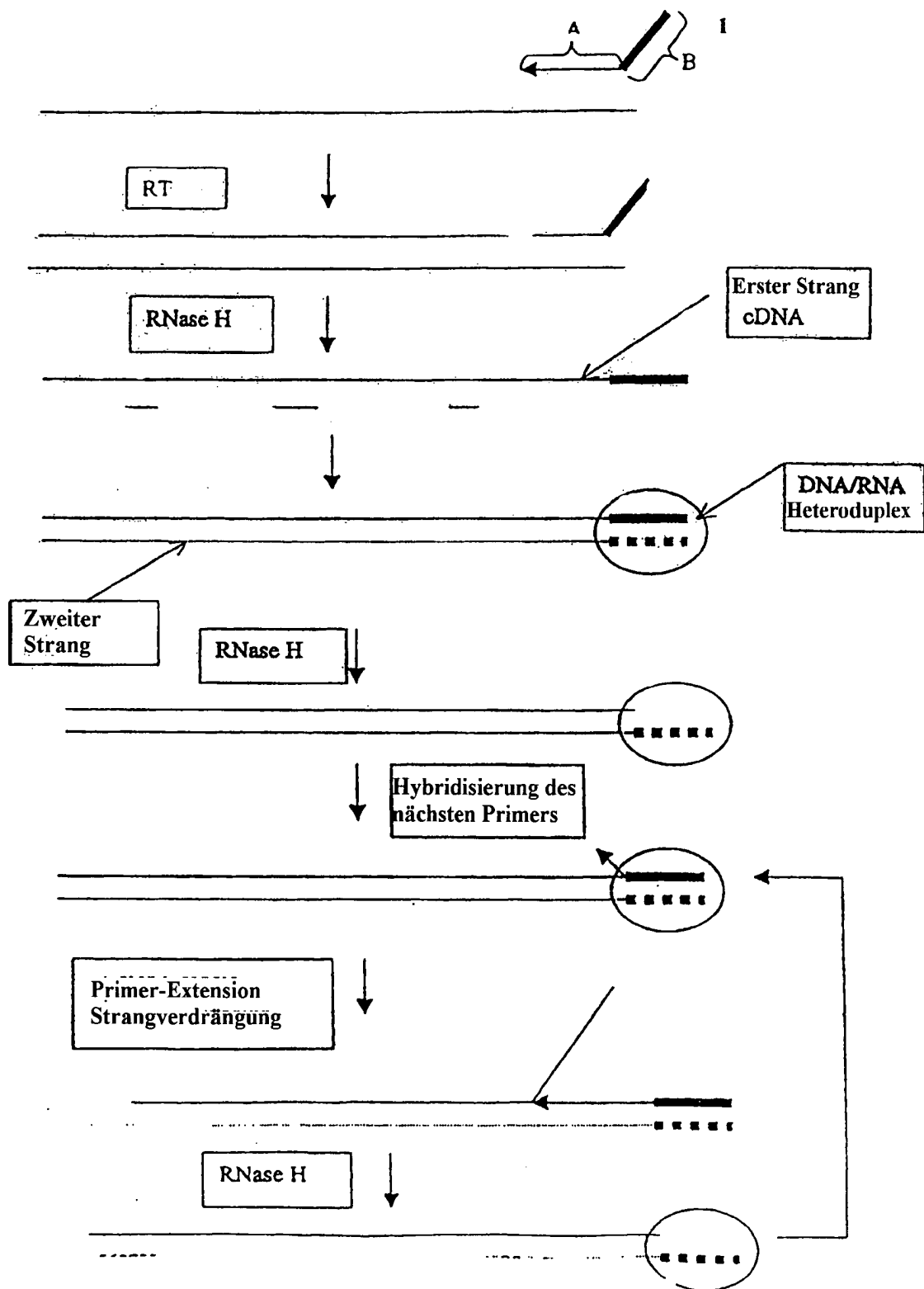


FIGUR 3A

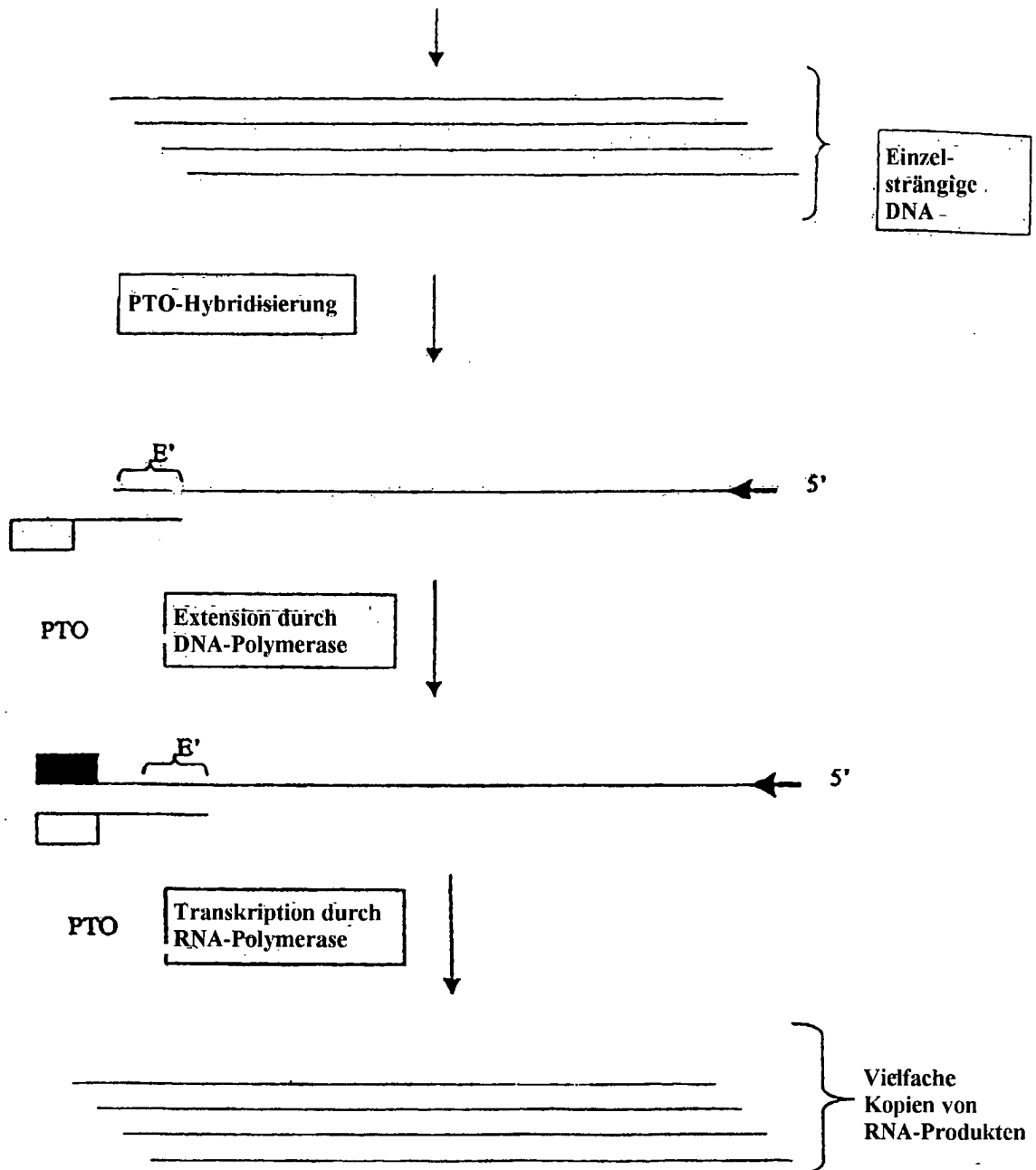


FIGUR. 3B

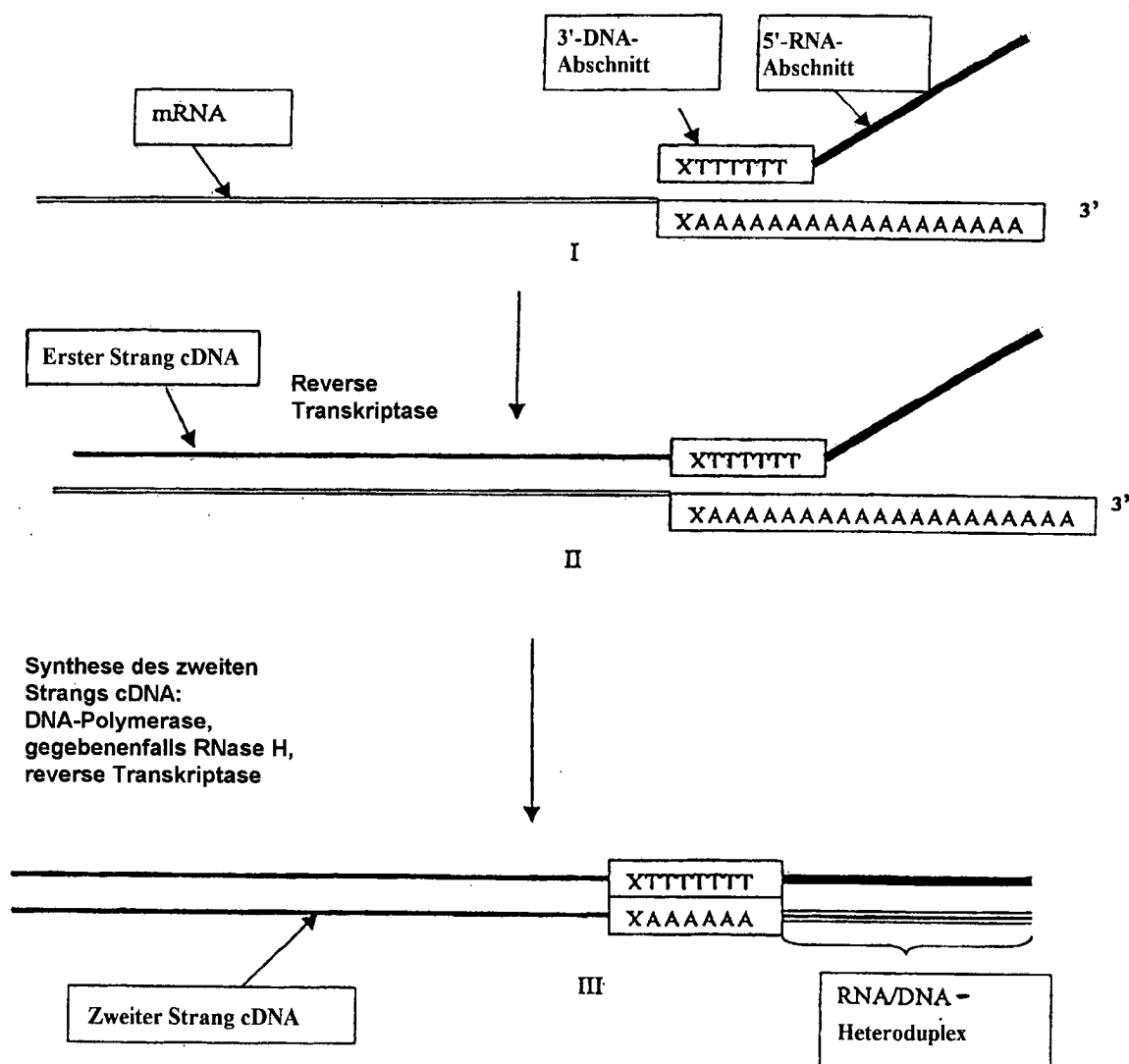
FIGUR 4A



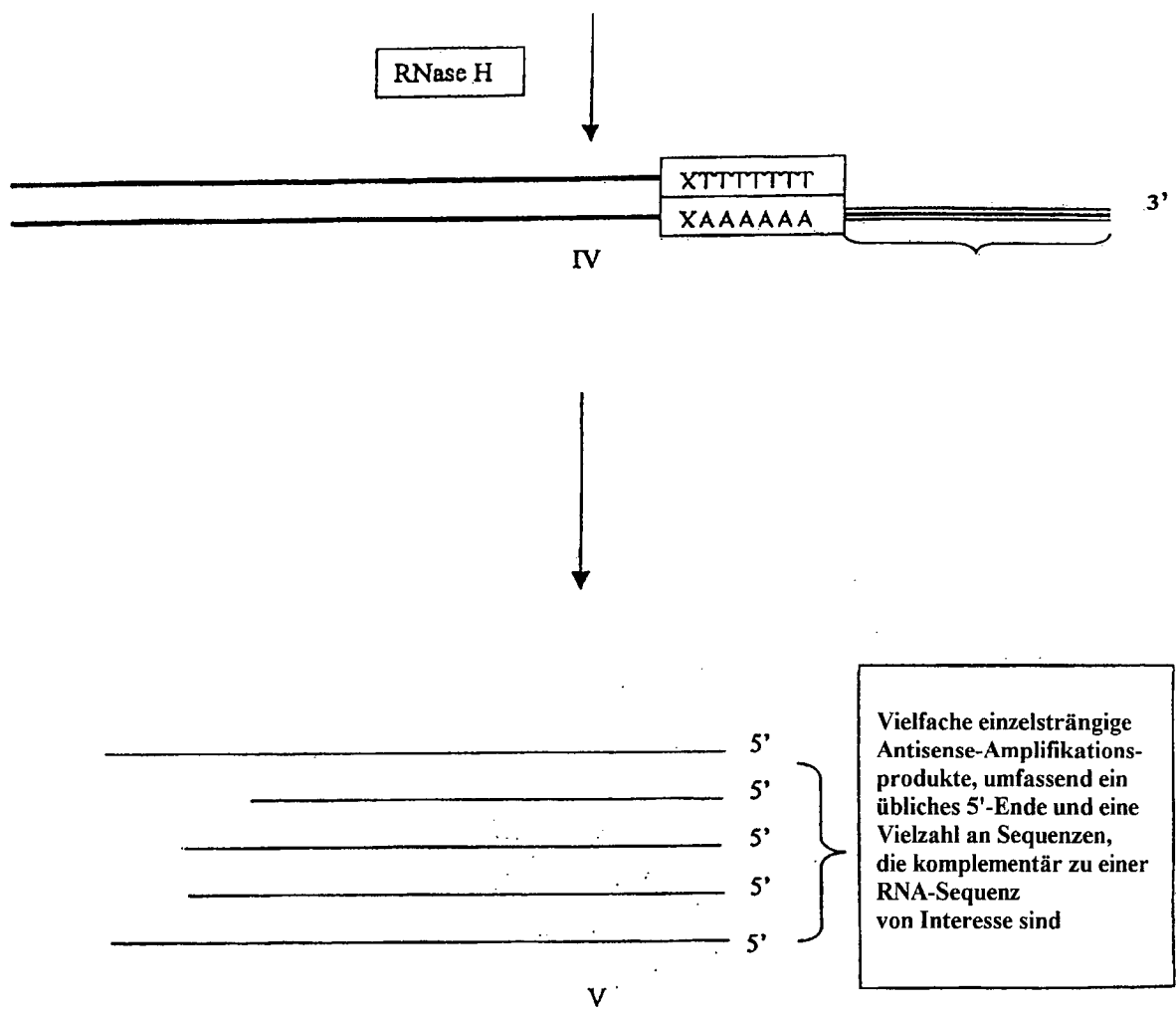
FIGUR 4B



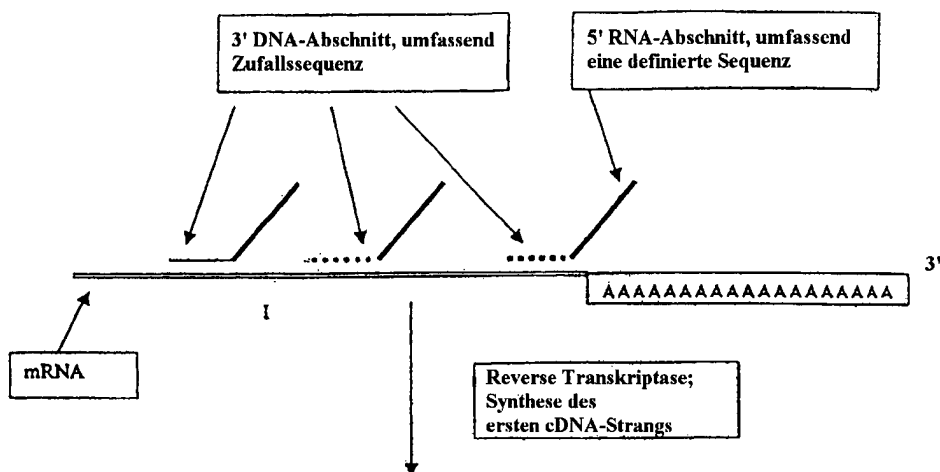
FIGUR 5A



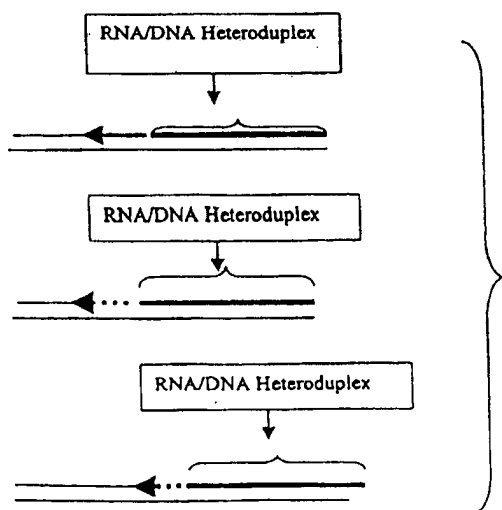
FIGUR 5B



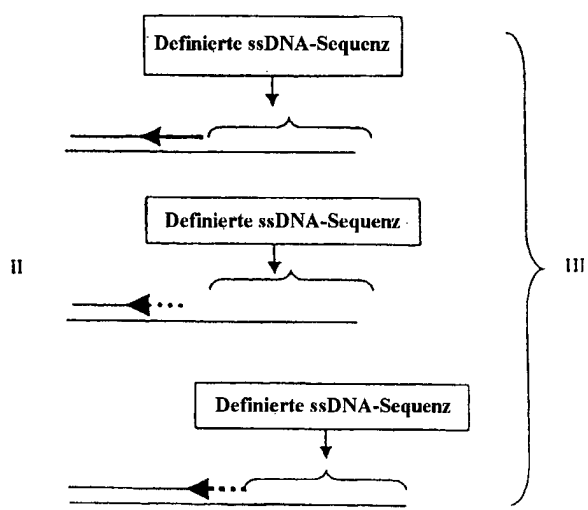
FIGUR 6A



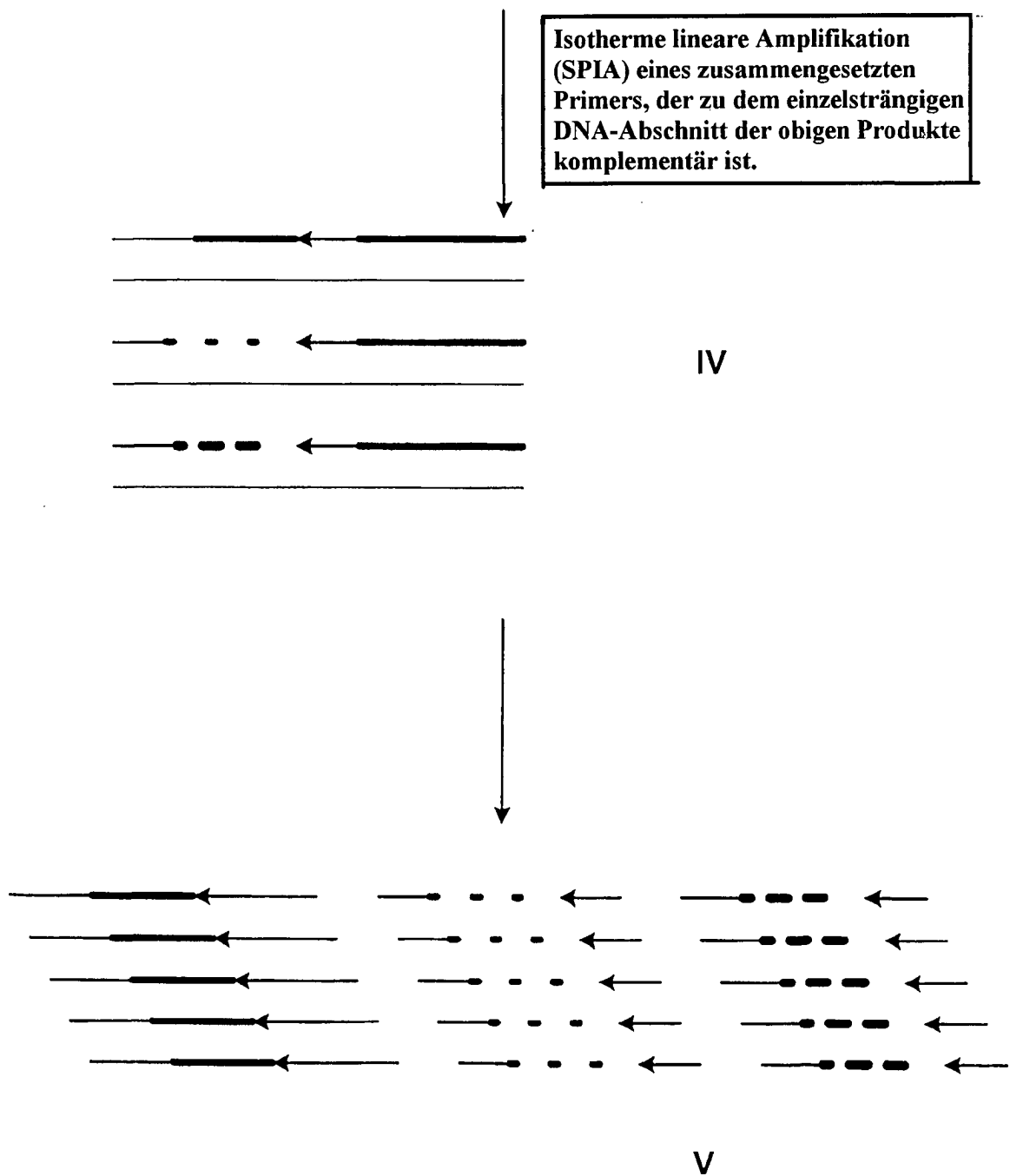
FIGUR 6B



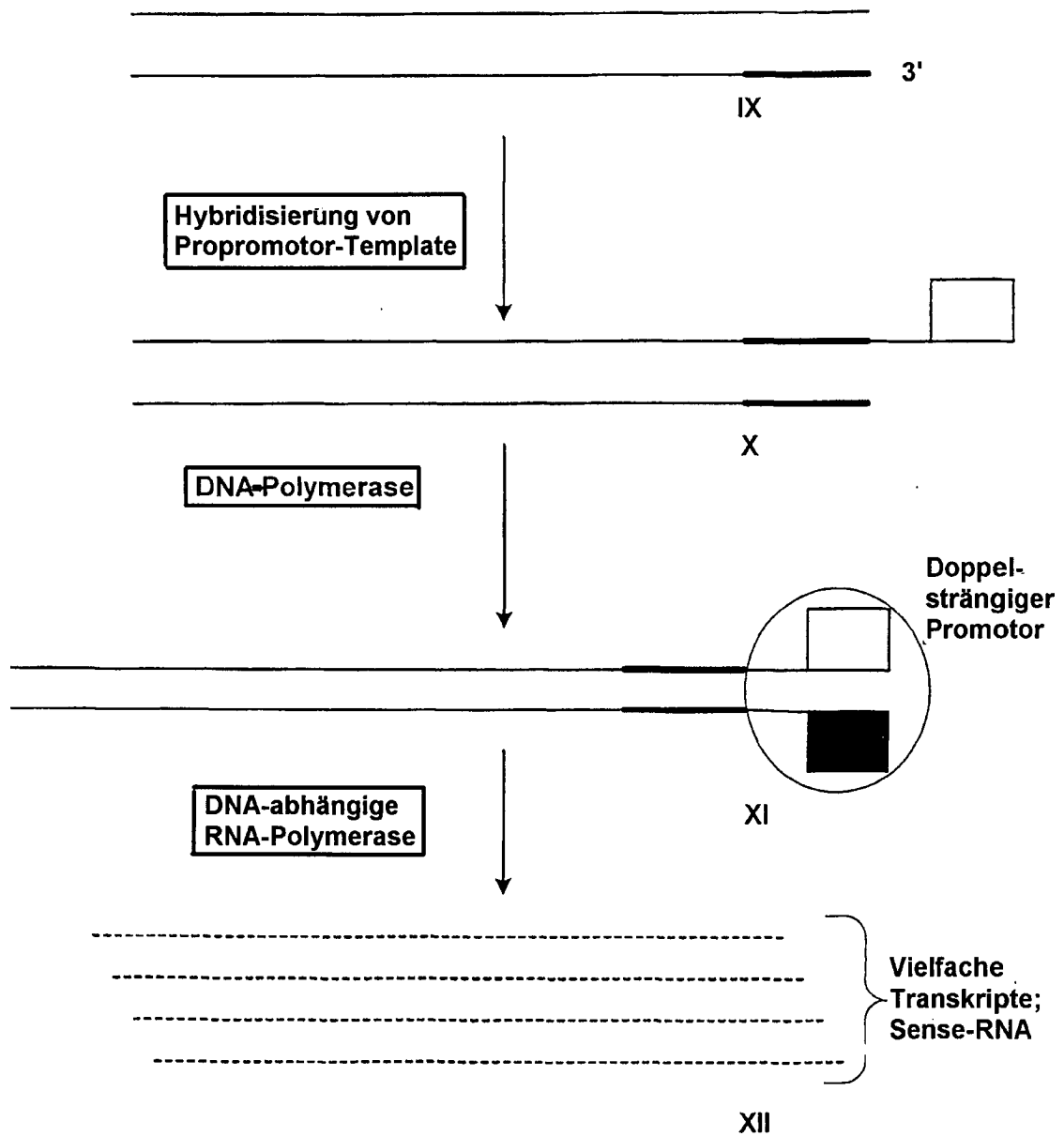
FIGUR 6C



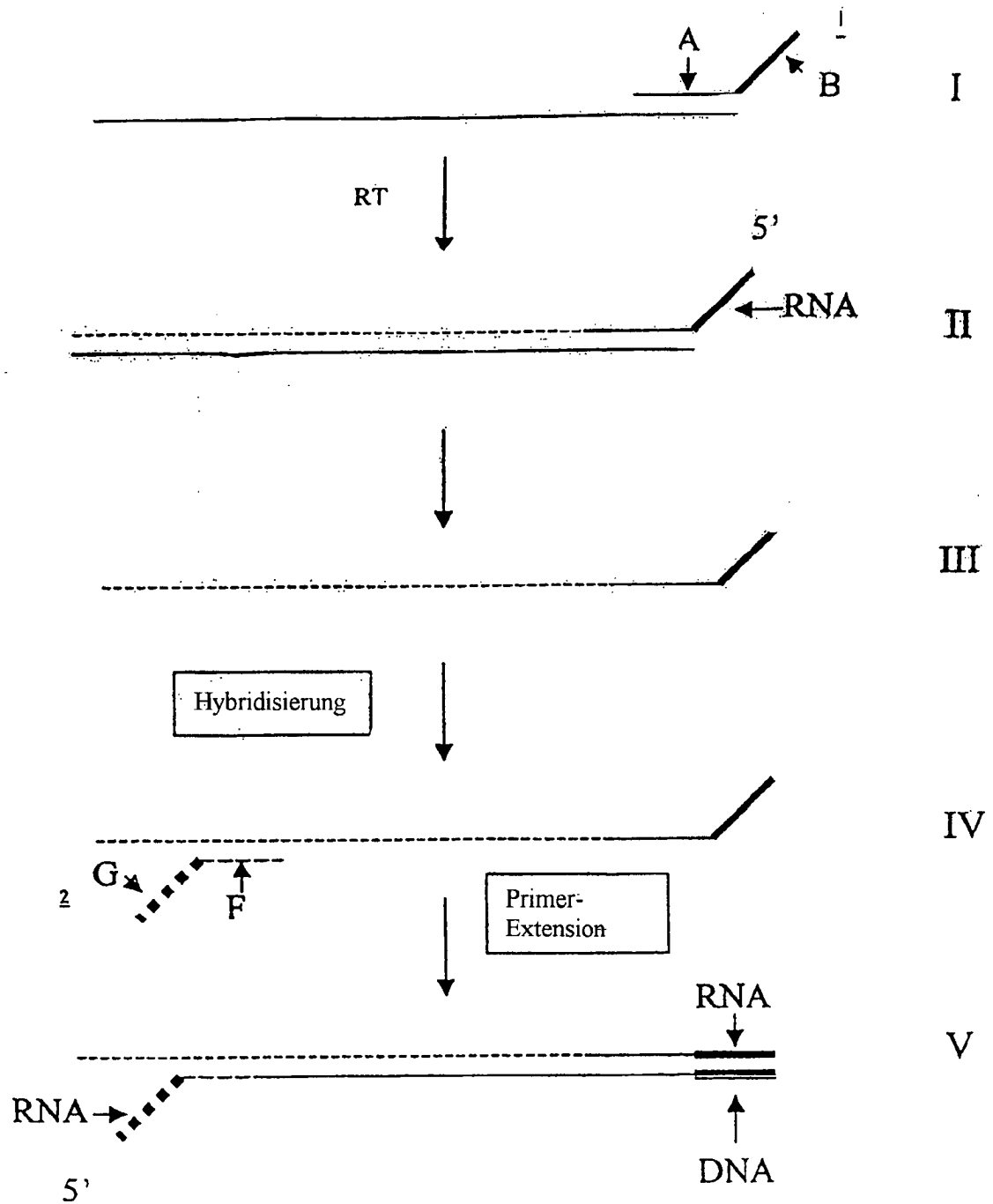
FIGUR 6D



FIGUR 7



FIGUR 8A



FIGUR 8B

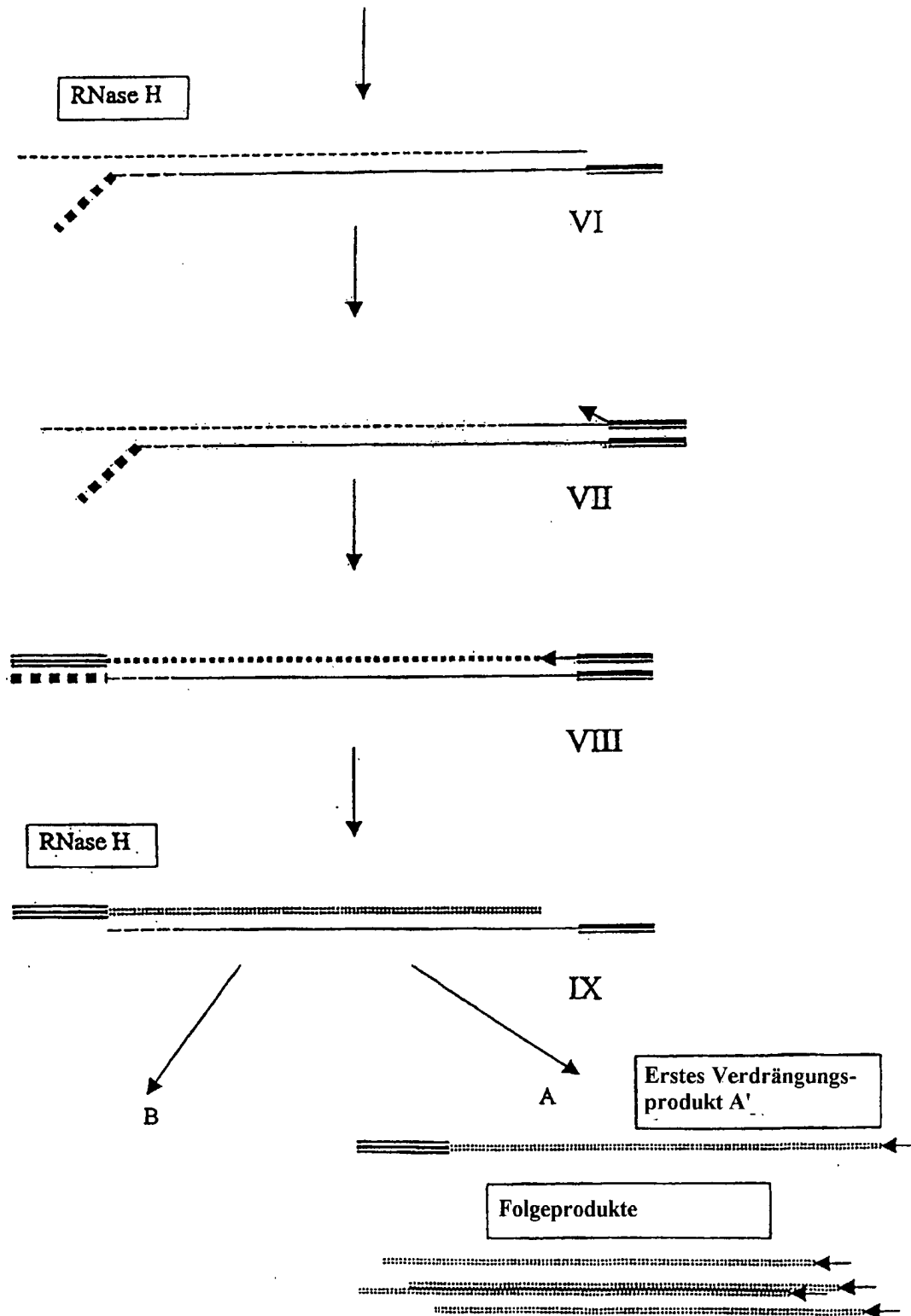
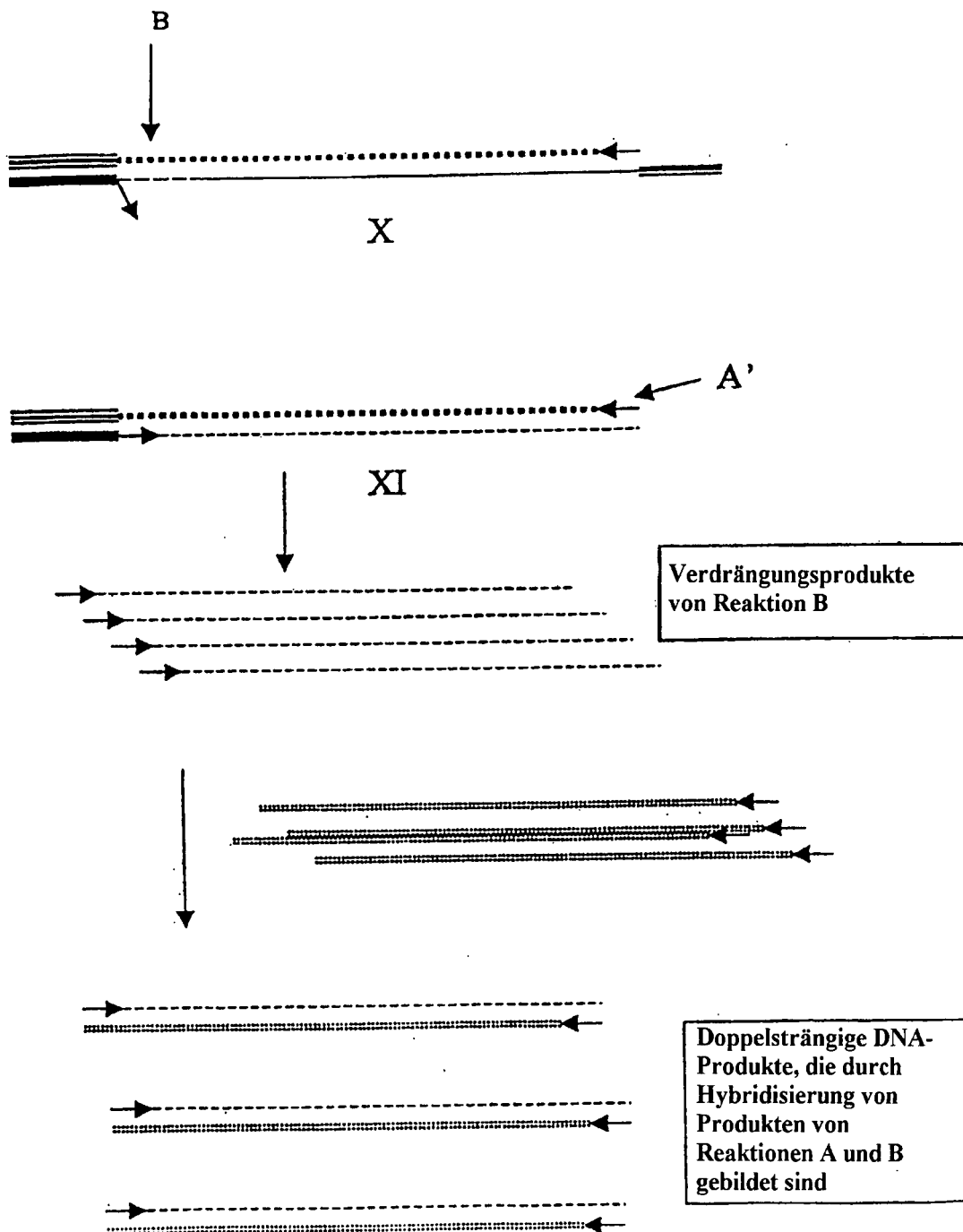
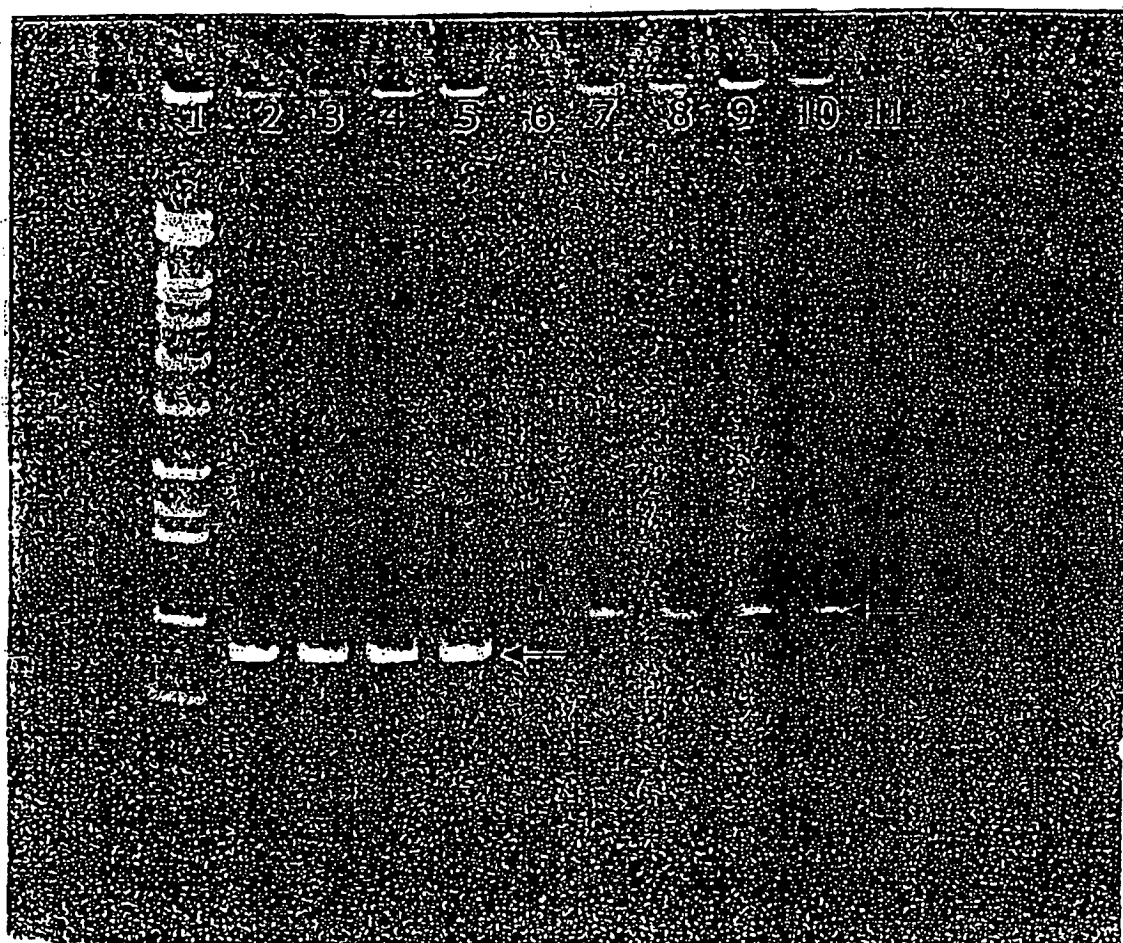


FIGURE 8C



FIGUR 9



Figur 10

