

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101636505 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200780030321. 4

代理人 陶家蓉

(22) 申请日 2007. 08. 13

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006. 01)

102006038113. 0 2006. 08. 14 DE

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

CN 1763223 A, 2006. 04. 26,

2009. 02. 16

审查员 李康琦

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/058369 2007. 08. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02008/020008 DE 2008. 02. 21

(73) 专利权人 恰根有限公司

地址 德国希尔登

(72) 发明人 H·恩格尔 S·耶拉米利

M·科鲁兹 D·洛弗特

C·科菲哈格

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

权权利要求书 2 页 说明书 42 页

司 31100

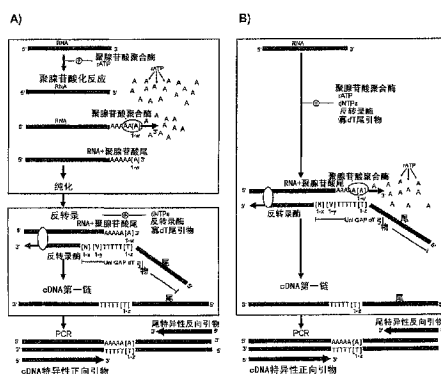
序列表 5 页 附图 18 页

(54) 发明名称

在酶反应中在样品中合成 cDNA 的方法

(57) 摘要

本发明涉及在样品、在酶反应中合成 cDNA 的方法,其中该方法包括步骤:同时准备具有聚腺苷酸化活性的第一种酶、具有反转录酶活性的第二种酶、缓冲液、至少一种核糖核苷酸、至少一种脱氧核糖核苷酸、锚定寡核苷酸;加入含有核糖核酸的样品;并将先前步骤的试剂温育一个或多个温度步骤,选择所述温度步骤以使第一和第二种酶显示活性。本发明还涉及一种反应混合物,含有具有聚腺苷酸化活性的第一种酶、具有反转录酶活性的第二种酶、可任选的缓冲液、可任选的至少一种核糖核苷酸、可任选的至少一种脱氧核糖核苷酸、和可任选的锚定寡核苷酸。此外,本发明还涉及含有相应反应混合物的试剂盒。



1. 在一个酶反应中在一个样品中合成 cDNA 的方法,其中该方法包括步骤:
 - (a) 准备一种反应混合物,所述反应混合物同时具有末端转移酶活性的第一种酶、具有反转录酶活性的第二种酶、缓冲液、至少一种核糖核苷酸、至少一种脱氧核糖核苷酸、锚定寡核苷酸;
 - (b) 在所述反应混合物中加入含有核糖核酸的样品 ;和
 - (c) 在一个或多个温度步骤中温育所述反应混合物中步骤 (a) 和 (b) 的试剂,选择这些温度步骤以使第一种酶和第二种酶显示活性。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述末端转移酶活性是聚腺苷酸化活性。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述样品含有核糖核酸,选自原核 RNA、真核 RNA、病毒 RNA、太古生物 RNA、miRNA、snoRNA、mRNA、tRNA、未聚腺苷酸化的 RNA、rRNA,及其混合物。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述锚定寡核苷酸选自聚腺苷酸化寡核苷酸、聚胞苷酸化寡核苷酸、聚胸苷酸化寡核苷酸、聚鸟苷酸化寡核苷酸、聚尿苷酸化寡核苷酸,额外含有 5' - 尾的聚腺苷酸化寡核苷酸,额外含有 5' - 尾的聚胞苷酸化寡核苷酸、额外含有 5' - 尾的聚胸苷酸化寡核苷酸、额外含有 5' - 尾的聚鸟苷酸化寡核苷酸、和额外含有 5' - 尾的聚尿苷酸化寡核苷酸。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述锚定寡核苷酸长 6-150 个核苷酸,可任选在 3' - 端具有锚定序列。
6. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述锚定寡核苷酸是脱氧核糖核酸 (DNA)、肽核酸 (PNA)、锁闭核酸 (LNA)、硫代磷酸脱氧核糖核酸、环己烯核酸 (CeNA), N3-P5- 氨基磷酸酯 (NP)、或三环脱氧核糖核酸 (tcDNA)。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述核糖核苷酸可选自腺嘌呤 -5' - 三磷酸、胸腺嘧啶 -5' - 三磷酸、胞嘧啶 -5' - 三磷酸、鸟嘌呤 -5' - 三磷酸、尿嘧啶 -5' - 三磷酸、具有碱基类似物的核糖核苷酸,其中所述核糖核苷酸可任选的被修饰或标记。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述脱氧核糖核苷酸可选自脱氧腺嘌呤 -5- 三磷酸 (dATP),脱氧胸腺嘧啶 -5- 三磷酸 (dTTP),脱氧胞嘧啶 -5- 三磷酸 (dCTP),脱氧鸟嘌呤 -5- 三磷酸 (dGTP),脱氧尿嘧啶 -5- 三磷酸 (dUTP),其中所述脱氧核糖核苷酸可任选被修饰或标记。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,标记脱氧核糖核苷酸选自放射性标记,例如 ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H ; 荧光染料,例如异硫氰酸荧光素 (FITC)、6- 羧基荧光素 (FAM)、(夹) 氧杂蒽、罗丹明、6- 羧基 -2,4,7,4,7- 六氯荧光素 (HEX)、6- 羧基 -4,5- 二氯 -2,7- 二甲氧基荧光素 (JOE)、N,N,N',N' - 四甲基 -6- 羧基罗丹明 (TAMRA)、6- 羧基 -X- 罗丹明 (ROX)、5- 羧基罗丹明 -6G (R6G5)、6- 羧基罗丹明 -6G (RG6)、罗丹明 110 ; 香豆素,例如 7- 羟基香豆素 ; 苯甲亚胺,例如 Hoechst 33258 ; 菲啶,例如德克萨斯红、溴乙啶、氮蒽染料、吡啶染料、吩噻嗪染料、紫菜碱染料、聚甲炔染料 ; 花青染料,例如 Cy3, Cy5, Cy7、BODIPY 染料、喹啉染料和 Alexa 染料。
10. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,修饰选自生物素化、地高辛标记和半抗原。
11. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,反应物中脱氧核糖核苷酸的浓度为至少 0.01mmol 和至多 10mmol。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,脱氧核糖核苷酸 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 以 0.2mmol-2mmol 的浓度存在。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,缓冲液 pH 是 6-10,并含有 Mg^{2+} 离子。

14. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,具有末端转移酶活性或聚腺苷酸化活性的酶选自原核来源、真核来源、病毒来源、古生物来源、以及植物来源的酶。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于,具有聚腺苷酸化活性的酶选自大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶、酵母聚腺苷酸聚合酶、牛聚腺苷酸聚合酶、青蛙聚腺苷酸聚合酶和人聚腺苷酸聚合酶。

16. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,具有反转录酶活性的酶选自来自病毒、细菌、太古细菌和真核细胞的酶,和特别是来自热稳定生物的酶,和能仅通过改变其基因序列诱变或通过相应的缓冲条件获得这种功能的酶。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述具有反转录酶活性的酶选自: HIV 反转录酶、M-MLV 反转录酶, EAIIV 反转录酶, AMV 反转录酶,嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) DNA 聚合酶 I, M-MLV RNA 酶 H, Superscript, Superscript II, Superscript III, MonsterScript (艾比中心), Omniscript, Sensiscript 反转录酶 (恰根公司), ThermoScript 和 Thermo-X (两者都来自英外特根公司), AccuScript 反转录酶 (斯特拉塔基因公司)。

18. 如权利要求 1- 所述的方法,其特征在于,温育步骤 c) 的试剂在一个或多个温度步骤中发生,选择所述温度步骤使第一和第二种酶显示活性。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其特征在于,所述反应还包含在约 65°C 到 95°C 的较高温度下的温度步骤。

20. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,随后用聚合酶链式反应扩增在该方法中产生的 cDNA,所述聚合酶链式反应包含反应随机引物和 / 或特异性引物,和 / 或可任选的一个或多个探针。

21. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (a) 的同时制备还包括制备具有 DNA 合成活性的热稳定性酶,和存在至少一种用于特异性检测 cDNA 的寡核苷酸。

22. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,反应还包括聚胞苷酸多核苷酸。

23. 一种反应混合物,其特征在于,含有具有聚腺苷酸化活性的第一种酶、具有反转录酶活性的第二种酶、可任选的缓冲液、可任选的至少一种核糖核苷酸、可任选的至少一种脱氧核糖核苷酸、和可任选的锚定寡核苷酸,可任选的随机引物、可任选的聚胞苷酸多核苷酸、和可任选的具有 DNA- 合成活性的酶。

24. 含有权利要求 23 所述的反应混合物的试剂盒。

25. 反转录 RNA 成 DNA 的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

- a. 制备含有 RNA 的样品;
- b. 加入具有反转录酶活性的第一种酶、缓冲液、至少一种脱氧核糖核苷酸、寡核苷酸;
- c. 在一个或多个温度步骤下温育所述试剂,选择所述温度步骤使酶显示活性;
- d. 其中反应物还含有聚胞苷酸多核苷酸。

26. 用于反转录的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含具有反转录酶活性的酶和聚胞苷酸多核苷酸。

在酶反应中在样品中合成 cDNA 的方法

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及分子生物学领域以及该领域中的研究,还涉及人和非人诊断。

[0003] 进行非聚腺苷酸化 RNA 分子,例如细菌 RNA 或小 RNA (如所谓的小 RNA (miRNA)) 的分析很困难,且需要特殊方法。最近,文献中公开了可能的方法。该方法包括几个依次进行的酶步骤,即首先用聚-(A)-聚合酶和合适的底物,例如 ATP 来给 RNA 加尾。然后,停止聚-(A)反应,纯化反应产物。接着,将产生的聚-(A)-RNA 加到反转录酶反应中,用合适的引物转换成 cDNA。

技术领域

[0004] 在实践中,接连进行的这两种酶反应很昂贵,并且有许多错误来源,例如核酸酶的输入,材料损失或移液误差等。

[0005] 小 RNA (miRNA) 的大小为 20-25 个核苷酸不等,代表了一类新的非编码 RNA 家族。

[0006] 它们通过所谓的“发夹前体”加工,并可在基因表达中作为负调节物。因此,它们向下调节许多基因 (Ambros, V., 2001, 小 RNA :具有大潜能的小调节物,细胞 (Cell) 107, 823-826)。小 RNA 首先作为长“原始转录物”被转录 (也被称为原始小 RNA) (Lee, Y., Jeon, K. 等, 2002, 小 RNA 成熟:分步加工亚细胞定位 (MicroRNA Maturation: Stepwise Processing Subcellular Localisation), 胚胎杂志 (Embo J.) 21, 4663-4670)。然后,这些“原始转录物”被缩短,从其缩短至约 70 个核苷酸。产生所谓的“茎环结构”,也称为“前-miRNA”。前-miRNA 被输出到胞质内。输出酶被称为 Exportin-5。它们在此被进一步加工,由此产生长约 22 个核苷酸的天然 miRNA 分子 (Lee, Y., 等., 2003, 核 RNA 的 III Droscha 引发小 RNA 加工,自然杂志 425, 415-419)。最新研究提出,miRNA 在发育和分化中起到了重要作用。总的说,小 RNA 能以两种不同的方式起调控作用。在植物中,miRNA 与其对应的 mRNA 以精确互补方式互补。这导致靶-mRNA 被包括 RNA 干扰 (RNAi) 的机制破坏。在动物中,miRNA 通过包括 Lin-4 和 Let-7 的机制阻止基因表达。在此,miRNA 并不与其对应的 mRNA 精确互补,但它们阻止蛋白的合成和功能 (Ambros, V., 2004, 动物小 miRNA 的功能,自然杂志, 431, 350-355)。由于最近才发现的 miRNA 的此决定性作用,它们的检测和分析具有决定性的重要性。

[0007] 在真核细胞中,18s, 5.8s 和 25/28s rRNA 的合成包括修饰核内所谓前体-rRNA (前-rRNA) 中的加工。rRNA 生物合成的复杂过程包括许多小的所谓“小核仁 RNA (snoRNA)”,它们在核仁内聚集。它们以所谓的小核仁核糖核酸蛋白颗粒 (snoRNP) 形式聚集 (Maxwell, E. S. 等, 1995, 小核仁 RNA, 生物化学年度综述 (Annual Review Biochem), 35, 897-934)。

[0008] 迄今确认的所有 snoRNA,除了 RNA 酶 MRP,属于两个家族。后者是盒 c/D 和盒 h/ACA 慢 RNA,可由其共同的序列基序分辨出 (Ballakin, A. D. et al., 1996, 核仁 RNA 世界:由具有相关功能的不同盒元件确定的两个主要小核仁 RNA 家族,细胞杂志, 86, 823-834)。snoRNA 基因的基因组组织在不同真核细胞中有很大的不同。在脊椎动物中,多数 snoRNA 通过“宿

主基因”被引入内含子内。而例外（例如 U3）是独立转录的。在酵母中，有 snoRNA 被引入内含子，但大部分 snoRNA 是作为单基因由单独的启动子转录的。通过共同启动子上游转录成簇的 snoRNA。由于小尺寸和缺乏聚腺苷酸化，snoRNA 的检测和分析是分子生物学上的一项挑战。

[0009] PCR 是常用的研究微生物的工具，也被用于分析 16S rRNA 基因。然而，在微生物样品中发现新基因受到仅能有条件合成的引物的限制。因此，对于 16S RNA，引物是从那些培养的微生物的已知序列衍生的 (Olson, D. J., 1986, 微生物生态学和进化：核糖体 RNA 方法，微生物学年度综述 (Annu. Rev. Microbial.) 40 :337-365)。基于分类学，已知序列（即用于提取 16S rRNA 基因）也可能存在于迄今未知的生物，可能微生物多样性被大大低估，而且也还未被分离。

[0010] 正如 16S rRNA 分子的分离有困难一样，原核 mRNA 分子的分离也有困难，因为缺乏对序列的了解，特别是由于缺少聚腺苷酸尾。

[0011] 本领域了解一种 2- 阶段方法。在该方法中，RNA 分子在酶聚腺苷酸聚合酶和底物三磷酸腺苷的帮助下反应，从而产生聚腺苷酸化的核糖核酸分子。由此生成的聚腺苷酸化核糖核酸在下一步中被纯化，然后在第三步中进行反转录。反转录利用聚腺苷酸化尾，从而同聚寡核苷酸一般以互补形式使聚腺苷酸化 RNA 尾与聚 -T- 寡核苷酸结合。聚 -T- 寡核苷酸的 3' 端现在被聚合酶使用，以产生脱氧核糖核苷酸链，其与存在的核糖核酸链互补。由此产生的链被称为“cDNA 第一链”。该 cDNA 可被用于 PCR 反应，从而使用随机引物或特异性引物产生扩增子 (amplificat)。Shi 等特别教导了通过寡 -dT 接头引物检测 miRNA，其中在 PCR 中使用特异性引物的接头 (Shi, R., 和 Chiang, V. L. (Shi, R. et al., 通过实时 PCR 定量小 RNA 表达的便利方法，生物技术 (Biotechniques), 2005, 39, 519-25)。

[0012] 该最近发表的方法也具有上述特殊核糖核酸分子具有明确缺陷。

[0013] 因此，一般说，二步法可能会引入污染物。纯化步骤导致稀少 RNA 的丧失。二步法需要灭活第一种酶和第一种酶和第二种酶的温育时间，都导致耗时巨大。另外，二步法的缺点是在同时处理两个或多个样品时，会产生弄混样品的危险。如本领域已知的，一旦有核酸酶，核糖核酸是相对敏感的。二步法，特别是在第一步后纯化的步骤，会有引入核酸酶的危险。最后，二或多步总是导致移液误差的风险增加。

发明内容

[0014] 因此，本发明的一个目的是准备一种实现 cDNA 合成的方法，该方法尽可能的防止污染物，耗时少，尽可能减少了样品弄混的风险，尽可能减少了引入核酸酶的危险，和最后尽可能排除了移液误差的风险。

[0015] 该目的是通过在一个酶反应中的一个样品中合成 cDNA 的方法实现的，该方法包括下列步骤：

[0016] (a) 同时准备具有聚腺苷酸化活性的第一种酶、具有反转录酶活性的第二种酶、缓冲液、至少一种核糖核苷酸、至少一种脱氧核糖核苷酸、锚定寡核苷酸；

[0017] (b) 加入含有核糖核酸的样品；和

[0018] (c) 在一个或多个温度步骤中温育步骤 (a) 和 (b) 的试剂，选择这些温度步骤，这样第一种酶和第二种酶能显示活性。

[0019] 迄今,对于酶性聚腺苷酸化和反转录酶的组合是否技术上可行仍然是有顾虑的。甚至更近,即在发现小 RNA 和 snoRNA(其代表了在分析和分离上的一种特殊的分子生物学挑战)后,酶反应还总是仍然连续进行,也显示了这一点(Want, J.F., et al., 从水稻(*Oryza sativa*) 鉴定 20 种小 RNA,核酸研究杂志(Nucleic Acid Res.), 2004, 32, 1688-95; Shi, R. 和 Chiang, V. L., 实时 PCR 定量小 RNA 表达的便利方法,生物技术(Biotechniques), 2005, 39, 519-25; Fu, H., et al., 用新方法鉴定人胎肝 miRNA; FEBS 通信(FEBS Lett), 2005, 579, 3849-54; Chen, C. L. et al., 植物中 snoRNA 的高多样性:来自水稻的 120 种 snoRNA 的鉴定和比较研究,核酸研究(Nucleic Acids Res), 2003, 31, 2601-13; Botero, L. M. et al., 环境 RNA 的聚(A) 聚合酶修饰和反转录酶 PCR 扩增,应用环境微生物学(Appl. Environ Microbiol), 2005, 71, 1267-75)。足够惊人的是,本领域技术人员长久以来就已经知道了这两个过程,即聚腺苷酸化和反转录(Sano, H., 和 Feix, G., 大肠杆菌的末端核糖腺苷酸转移酶,定性和应用,欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.), 1976, 71, 577-83)。总的说,根据聚-A 加尾步骤,本领域技术人员纯化了反应产物(Shi, R., et al., 实时 PCR 定量小 RNA 表达的便利方法,生物技术(Biotechniques), 2005, 39, 519-25)。其原因是由于反应缓冲液和反应所需底物的完全不同。

[0020] 本发明的另一个目的是准备一种简单的方法,以实现 cDNA 合成,并将该反应可任选的和第三次酶反应组合,从而能在同一反应容器中特异性检测产生的 cDNA。通过一个非常简单的操作,当要在一个或少许分析物中分析大量样品时,该“三合一”方法显示了特殊的优点。其理由是例如与实时 PCR 结合,它是一种非常快速简便的方法,显示大量要分析的样品。尽可能的避免了其它操作步骤和污染,从而使耗时变少,样品弄混的危险被减至最小,引入核酸酶的危险被减至最小,和最后,尽可能的排除了移液误差的危险。

[0021] “三合一”反应是通过一种方法实现的,该方法用于在样品中在一次酶反应中合成 cDNA,然后是另一次酶反应,任选扩增,任选与检测结合(实时在扩增过程中或下游),该方法包括以下步骤:

[0022] (a) 同时准备具有聚腺苷酸化活性的第一种酶、具有反转录酶活性的第二种酶、缓冲液、至少一种核糖核苷酸、至少一种脱氧核糖核根酸、锚定寡核苷酸,具有核酸合成活性的至少第三种酶,至少一种引物,和可任选的一种探针;

[0023] (b) 加入含有核糖核酸的样品;和

[0024] (c) 在一个或多个温度步骤中温育步骤(a)和(b)的试剂,选择这些温度步骤以使第一种酶和第二种酶显示活性,和可任选的第三种酶有活性或无活性。可任选的,随后为一个或多个温度步骤,其中第一种和第二种酶活性较弱或无活性,第三种酶有活性。

[0025] 体内使用的聚-(A)-聚合酶底物是三磷酸腺苷(ATP)。对于一些聚-(A)-聚合酶,显示甚至可以将短尾结合到其它 NTP 上以作为底物(Martin, G., 和 Keller, W., 用酵母聚腺苷酸聚合酶和各种核苷酸加尾和 3'-末端标记, RNA, 1998, 4, 226-30)。

[0026] 足够惊人的是,本发明的发明人发现可以在一些要求下,在一个反应容器中同时进行这两个非常不同的酶反应。在本发明的一个优选例中,样品是核糖核酸,其选自原核核糖核酸、真核核糖核酸、病毒核糖核酸、来源于太古生物的核糖核酸、小核糖核酸(miRNA)、小核仁核糖核酸(snoRNA)、信使核糖核酸(mRNA)、转运核糖核酸(tRNA)、一般的未聚腺苷酸化的核糖核酸,以及核糖体核糖核酸(rRNA),和甚至上述两种或更多种核糖核酸的混合

物。当然样品中可已经包含聚腺苷酸化 RNA。

[0027] 在本发明的一个特别优选例中,样品是核糖核酸,选自原核核糖核酸、miRNA、snoRNA 和 rRNA。在本发明的最优选例中,样品包含核糖核酸,其选自 miRNA 和 snoRNA。也优选与其它物质结合的不同类型和不同量的核糖核酸组成的其它混合样品。

[0028] 此外,本发明的发明人已发现在某些条件下,能够在一个反应容器中同时进行两种非常不同的酶反应,并将其与第三种酶反应结合,用于特异性检测生成的 cDNA,优选具有核酸合成活性。在本发明的一个优选例中,样品是核糖核酸,选自原核核糖核酸、真核核糖核酸、病毒核糖核酸、来源于太古生物的核糖核酸、小核糖核酸 (miRNA)、小核仁核糖核酸 (snoRNA)、信使核糖核酸 (mRNA)、转运核糖核酸 (tRNA)、一般的未聚腺苷酸化的核糖核酸,以及核糖体核糖核酸 (rRNA),和甚至上述两种或更多种核糖核酸的混合物。当然样品中可已经包含聚腺苷酸化 RNA。

[0029] 在本发明的一个特殊优选例中,样品是核糖核酸,选自原核核糖核酸、miRNA、snoRNA 和 rRNA。在本发明的最优选例中,样品包含核糖核酸,其选自 miRNA 和 snoRNA。也优选伴有其它物质的不同类型和不同量的核糖核酸组成的其它混合样品。

[0030] 基于本发明的方法的这些优点,发明人可以显示可以有效和无污染的制备和定性 miRNA。

[0031] 在本发明的一个实施例中,锚定寡核苷酸是一种同聚寡核苷酸,选自聚腺苷酸化寡核苷酸、聚胞苷酸化寡核苷酸、聚胸苷酸化寡核苷酸、聚鸟苷酸化寡核苷酸、聚尿苷酸化寡核苷酸,额外含有 5' - 尾的聚腺苷酸化寡核苷酸,额外含有 5' - 尾的聚胞苷酸化寡核苷酸、额外含有 5' - 尾的聚胸苷酸化寡核苷酸、额外含有 5' - 尾的聚鸟苷酸化寡核苷酸、和额外含有 5' - 尾的聚尿苷酸化寡核苷酸。如上所述,优选额外含有 5' - 尾的聚胸苷酸化寡核苷酸。

[0032] 本发明的锚定寡核苷酸通常长 6-75 个核苷酸。然而它也可长达约 150 个核苷酸。如果锚定寡核苷酸是合成的,最大长度符合 DNA 合成的技术限制。锚定寡核苷酸可任选含有 5' - 尾和 / 或锚定序列。5' - 尾是在寡核苷酸 5' - 端的额外核苷酸序列,其用于例如引入克隆序列、引物和 / 或探针结合位点或任何其它序列。本领域技术人员可根据不同应用的需要鉴定合适的 5' - 尾序列。

[0033] 在锚定寡核苷酸的 3' - 端,可包含通常为 1-5 个额外核苷酸的额外锚定序列。锚定序列可长至少一个碱基,在一优选例中第一位是简并碱基,其含有所有碱基,除了用于锚定寡核苷酸同聚部分的碱基。然后可跟其它的碱基。后者也可以是简并的。在本文的一个优选例中,使用 N 变量,其中 N = A, C, G, T 或相应的类似物。

[0034] 一般说,锚定寡核苷酸是脱氧核糖核酸 (DNA)。然而,锚定寡核苷酸也可以是肽核酸 (PNA)、锁闭核酸 (LNA)、硫代磷酸 (phosphorus thioate) 脱氧核糖核酸、环己烯核酸 (CeNA), N3' - P5' - 氨基磷酸酯 (NP, phosphorus amidate)、和三环脱氧核糖核酸 (tcDNA)。然而优选作为脱氧核糖核酸 (DNA) 的锚定寡核苷酸。也可以是 RNA 和 DNA 混合物,或一种或多种修饰核酸或类似物的混合物,和其它的修饰物的混合物 (例如对应的碱基类似物,其可以与 RNA 或 DNA 在所选条件下杂交)。在一个特别优选例中,锚定寡核苷酸是还含有 5' 尾的聚 -(T) - 寡核苷酸,它是脱氧核糖核酸,长 15-150 个核苷酸,作为混合物存在。在寡核苷酸的 3' - 端可包含额外的锚定序列,通常长 1-5 个额外核苷酸。锚定序列可长至少

一个碱基,其中在一个优选例中第一位是简并碱基,其包含所有的碱基,除了用于锚定寡核苷酸同聚部分的碱基。然后可跟随其它的碱基。后者也可以是简并的。本文的一个优选例中,在本文的一个优选例中,使用 N 变量,其中 N = A, C, G, T 或相应的类似物。

[0035] 举例说,可提到本发明的下列锚定寡核苷酸:

[0036] 实施例 1 (SEQ ID NO :10) :5'TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAAGCT TCC CGT TCT CAG CC(T)_xVVN 3'

[0037] 实施例 2 (SEQ ID NO :11) :5' AACGAGACGACGACGACAGAC(T)_x VN 3'

[0038] 实施例 3 (SEQ ID NO :12) :5' AACGAGACGACGACAGAC(T)_x V3'

[0039] 实施例 4 (SEQ ID NO :13) :5' AACGAGACGACGACAGAC(T)_x N3'

[0040] 实施例 5 (SEQ ID NO :14) :5' AACGAGACGACGACAGAC(T)_x NN3'

[0041] 实施例 6 (SEQ ID NO :15) :5' AACGAGACGACGACAGAC(T)_xVNN3'

[0042] 实施例 7 (SEQ ID NO :16) :5' AACGAGACGACGACAGAC(T)_xVNNN3'

[0043] 实施例 8 (SEQ ID NO :17) :5' AACGAGACGACGACAGAC(T)_xNNN3'

[0044] 实施例 9 (SEQ ID NO :18) :5'TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAAGCT TCC CGT TCT CAG CC(T)_xVN3'

[0045] 实施例 10 (SEQ ID NO :19) :5' TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAAGCT TCC CGT TCT CAG CC(T)_x VNN3'

[0046] X 优选是 10-30 个碱基。

[0047] V 和 N 是简并碱基的单字母码, V = A, C, G ;N = A, C, G, T。

[0048] 对于本领域技术人员来说,其它合适的 5' - 尾序列的鉴定也是可能的。

[0049] 可任选的 5' - 尾包含额外的 1-100 个核苷酸,可用于随后的分析。因此在一个优选例中,5' - 尾可含有寡核苷酸的结合序列,例如一或多个 DNA 探针和 / 或一或多个 PCR 引物。优选选择用于 5' - 尾的序列以使其与本发明的方法相容。这包含例如,选择在发明方法中和随后的分析过程中不导致任何不需要的二级反应的序列。

[0050] 根据本发明,锚定寡核苷酸如图 12 所示。

[0051] 原则上,本发明的酶反应可在载体上或容器内进行,即反应可在反应容器中进行。这样的反应容器可以是例如反应试管或例如微量滴定板。反应可在芯片上发生。如果在芯片上发生,则可固定一种或多种组分。反应可在测试条或在微流系统中发生。本领域技术人员了解与载体或容器有关的大部分变化实施方式。

[0052] 在优选例中,核糖核苷酸是腺嘌呤 -5' - 三磷酸、胸腺嘧啶 -5' - 三磷酸、胞嘧啶 -5' - 三磷酸、鸟嘌呤 -5' - 三磷酸和 / 或尿嘧啶 -5' - 三磷酸。核糖核苷酸也可以是碱基类似物。可修饰或标记核糖核苷酸。原则上,重要的是核糖核苷酸能作为底物与酶在聚腺苷酸化作用中反应。

[0053] 本发明的脱氧核糖核苷酸可选自脱氧腺嘌呤 -5' - 三磷酸 (dATP),脱氧胸腺嘧啶 -5' - 三磷酸 (dTTP),脱氧胞嘧啶 -5' - 三磷酸 (dCTP),脱氧鸟嘌呤 -5' - 三磷酸 (dGTP),脱氧尿嘧啶 -5' - 三磷酸 (dUTP) 以及修饰和标记的脱氧核糖核苷酸。也可额外或替换使用一种或多种含有通用碱基或碱基类似物的脱氧核糖核苷酸。对于本发明实施重要的是所用的脱氧核糖核苷酸能实现 cDNA 合成。

[0054] 根据本发明,优选 dATP, dCTP, dTTP 和 dGTP 作为混合物同时存在。

[0055] 根据本发明,还可在混合物中使用脱氧尿嘧啶-5'-三磷酸。可联合在实际反应后进行的酶反应,它使用尿嘧啶-DNA糖基化酶(glycosylase),不会降解进一步使用的酶性产生的反应产物。

[0056] 如果标记脱氧核糖核苷酸,标记可选自: ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H ;荧光染料,例如异硫氰酸荧光素(FITC)、6-羧基荧光素(FAM)、(夹)氧杂蒽(xanthene)、罗丹明、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、5-羧基罗丹明-6G(R6G5)、6-羧基罗丹明-6G(RG6)、罗丹明110;香豆素,例如7-羟基香豆素;苯甲亚胺,例如Hoechst 33258;菲啶,例如德克萨斯红、溴乙啶、氮蒽染料、吡啶染料、吩噻嗪染料、紫菜碱染料、聚甲炔染料;花青染料,例如Cy3,Cy5,Cy7、BODIPY染料、喹啉染料和Alexa染料;包含生物素或一种或多种半抗原,能直接或间接检测核酸的标记(如地高辛);通过例如抗体,然后通过与抗体偶联的酶进行的酶检测等间接检测。此外,通过引入纳米颗粒(与抗体或亲和配体等偶联)也可以进行间接检测。

[0057] 也可通过5'-磷酸进行脱氧核糖核苷酸的修饰,其可实现更简单的克隆。通过引入反应基团例如氨基接头(或生物素),脱氧核糖核苷酸可以例如被固定化,或可实现直接或间接检测。

[0058] 特别优选的修饰选自荧光染料、半抗原、5'-磷酸、5'-生物素和5'-氨基接头。

[0059] 根据本发明,反应中脱氧核糖核苷酸的浓度为至少0.01mmol到至多10mmol。此浓度信息是单种脱氧核糖核苷酸的浓度。在一个优选例中,脱氧核糖核苷酸(分别是dATP, dCTP, dGTP和dTTP)以0.2mmol-2mmol的浓度存在。该浓度信息是混合物中单种脱氧核糖核苷酸的浓度。在本发明的一个特别优选例中,单种脱氧核糖核苷酸dATP, dCTP, dGTP和dTTP以每种0.5mmol的浓度存在。

[0060] 足够惊人的是,发明人确定,作为本发明的主题的一步酶反应可在6-10的窄缓冲液pH范围内,在镁离子(Mg^{2+})的存在下进行。因此,pH6-10在优选例中出现。

[0061] 在一个特别优选例中,本发明的缓冲液的pH为6.8-9。

[0062] 在本发明的另一个实施例中,本发明的缓冲液含有其它离子,选自 Mn^{2+} , K^+ , NH_4^+ , 和 Na^+ 。

[0063] 本发明的缓冲液含有例如 MgCl_2 , MgSO_4 , 乙酸镁, MnCl_2 , KCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , 和 NaCl 。作为缓冲物质,合适的有三羟甲基氨基甲烷(tris),两性离子缓冲剂(tricine), N,N-二(羟乙基)甘氨酸(bicine),HEPES,和其它在本发明pH范围内的缓冲物质,或者两种或多种合适缓冲物质的混合物也是合适的。

[0064] 本领域技术人员已知许多具有聚腺苷酸化活性的酶。根据本发明,它们选自原核来源、真核来源、病毒来源、和古生物来源的酶、以及植物来源的酶。

[0065] 本发明的聚腺苷酸化活性是一种酶活性,其使用核糖核酸的3'-端作为底物,在合适的缓冲液中在该3'-端能加上酶性核糖核苷酸,特别优选至少10-20个核糖核苷酸。在一优选例中,酶是能用腺嘌呤-5'-三磷酸作为底物的酶。根据本发明,该酶包括酶和当使用单链和双链RNA,例如发夹RNA(如前-miRNA等)时,具有本发明所述聚腺苷酸化活性的反应条件。基于要分析的RNA,本领域技术人员能选择酶和反应条件,从而使单链RNA(例

如成熟 miRNA) 或双链 RNA (例如前-miRNA) 或两者都能够用于分析。

[0066] 一般说,本发明的聚腺苷酸化活性是转录酶活性。

[0067] 在优选例中,具有聚腺苷酸化活性的酶是选自下列的酶:大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶、酵母聚腺苷酸聚合酶、牛聚腺苷酸聚合酶、青蛙聚腺苷酸聚合酶、人聚腺苷酸聚合酶、和植物聚腺苷酸聚合酶。其它酶也是本领域技术人员已知的,或可以通过分析已知聚腺苷酸聚合酶中的同源性新鉴定出来。在特别优选例中,具有聚腺苷酸化活性的酶是大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶。

[0068] 本发明具有反转录酶活性的酶根据本发明选自来自病毒、细菌、太古细菌和真核细胞,特别是来自热稳定生物的酶。这些还包括例如,来自内含子、反转座子或逆转录病毒的酶。一种具有反转录酶活性的酶是根据本发明,能以互补方式在核糖核酸中,在合适的缓冲条件下在与核糖核酸杂交的脱氧寡核苷酸或核糖寡核苷酸的 3' - 端上掺入脱氧核糖核苷酸的酶。这在一方面包括当然具有该功能的酶,也包括仅通过改变其基因序列,例如诱变,或通过相应缓冲条件获得该功能的酶。

[0069] 优选具有反转录酶活性的酶,该酶选自下组:HIV 反转录酶、M-MLV 反转录酶,EAIV 反转录酶,AMV 反转录酶,嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*)DNA 聚合酶 I, M-MLV RNA 酶 H, Superscript, Superscript II, Superscript III, MonsterScript(艾比中心(Epicenter)), Omniscript, Sensiscript 反转录酶(恰根公司(Qiagen)), ThermoScript 和 Thermo-X(两者都来自英外特根公司(Invitrogen))。根据本发明,还可使用仅在修饰基因序列后具有反转录酶活性的酶。还可使用具有提高的准确性的反转录酶活性。举例来说,本文描述了 AccuScript 反转录酶(斯特拉塔基因公司(Stratagene))。对本领域技术人员来说明显的是,甚至使用两种或更多具有反转录酶活性的酶混合物也是可以的。

[0070] 本领域技术人员知道大多数具有反转录酶活性的酶需要二价离子。因此,在上述优选例中,在需要二价离子的酶中存在二价离子。 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 是优选的。

[0071] 酶的优选组合是 HIV 反转录酶,或 M-MLV 反转录酶,或 EAIV 反转录酶,或 AMV 反转录酶或嗜热栖热菌 DNA 聚合酶 I 或 M-MLV RNA 酶 H, Superscript, Superscript II, Superscript III 或 MonsterScript(艾比中心)或 Omniscript 反转录酶(恰根公司)或 Sensiscript 反转录酶(恰根公司), ThermoScript, Thermo-X(两者都来自英外特根公司)或两种或多种具有反转录酶活性的酶与大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶的混合物。此外,组合包括 HIV 反转录酶、或 M-MLV 反转录酶、或 EAIV 反转录酶、或 AMV 反转录酶、或嗜热栖热菌 DNA 聚合酶 I 或 M-MLV RNA 酶 H, Superscript, Superscript II, Superscript III、或 MonsterScript(艾比中心)、或 Omniscript 反转录酶(恰根公司)、或 Sensiscript 反转录酶(恰根公司)、或 ThermoScript、Thermo-X(两者都来自英外特根公司)、或两种或更多具有反转录酶活性的酶与酵母聚腺苷酸聚合酶的混合物。

[0072] 本领域技术人员已知反转录中高温的效果是二级结构不会起到决定性作用。另外,在一些酶中,高温的作用是反转录的特异性提高,从而抑制假配对和假引发。因此,在本发明的一个实施例中使用嗜热性的反转录酶。优选在 45°C 到 85°C 之间,更优选在 55°C 到 80°C 之间,最优选 60°C 到 75°C 之间具有最佳核酸合成活性的酶。优选嗜热栖热菌 (Tth)DNA 聚合物 I。

[0073] 如果具有聚腺苷酸化活性的酶不是嗜热性酶,而具有反转录酶活性的酶是嗜热性

酶,可在本发明的几个温度步骤下进行反应,从而第一个温度步骤提供的所用温度是聚腺苷酸化活性的酶的最佳温度,第二个温度步骤提供的所用温度是反转录酶活性的酶的最佳温度。

[0074] 例如,如果使用 AMV 反转录酶,第二个温度步骤在 42℃ 进行,而第一温度步骤在 37℃ 进行,主要是使聚腺苷酸化活性的酶具有活性。然而在恒温下实施也是可能的。

[0075] 本领域技术人员能选择相关酶活性不受影响的温度。例如,如果使用大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶和来自嗜热栖热菌的 DNA 聚合酶的组合,温度过程如下:首先,在 37℃ 温育,然后为 55-70℃。根据本发明,因此可使用非热稳定性酶和热稳定性酶的组合。在这种情况下,温度步骤则依赖于两种酶中的哪一种具有聚腺苷酸化活性。根据本发明,优选具有反转录酶活性的酶是热稳定的。在相反的情况下,且本领域技术人员来说也是可信的,可在聚腺苷酸化步骤中在更高的温度下温育,而反转录酶活性的酶被部分或完全灭活。因此,如果两种酶都是热稳定的,也是优选的。

[0076] 此外,本领域技术人员已知酶进行反应的程度不同,因此本领域技术人员能够组合具有不同反应性的酶,使得不同长度的模板能够以不同方式被轻易转换成 cDNA。通过使用各种酶的对用量、一种或多种合适的温育温度和温育时间,本领域技术人员可得到满意的结果。

[0077] 本发明的方法优选包括其它聚胞苷酸多核苷酸。本发明的方法尤其优选含有额外的聚胞苷酸多核糖核苷酸。优选每 20 微升中掺入 1ng-300ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸,优选每 20 微升中掺入 10ng-150ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸,尤其优选每个反应中掺入 25-100ng 聚胞苷酸多核糖核苷酸,最优选每 20 微升反应物中掺入 50ng-75ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸。

[0078] 本发明的反应物可包含其它试剂,例如体积排阻物、单链结合性蛋白、DTT 和 / 或竞争性核酸。

[0079] 如果使用体积排阻物,它选自葡聚糖、聚乙二醇,在 EP 1411133A1 中提到了本发明的体积排阻物。

[0080] 在一优选例中,竞争性核酸是同聚核糖核酸,最优选聚腺苷酸核糖核酸。US6,300,069 中公开了例子。

[0081] 本发明的方法优选包含额外的聚胞苷酸多核苷酸。本发明的方法尤其优选包含额外的聚胞苷酸多核糖核苷酸。优选每 20 微升中掺入 1ng-300ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸,优选每 20 微升反应物中掺入 10ng-150ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸,尤其优选每个反应中掺入 25-100ng 聚胞苷酸多核糖核苷酸,最优选每 20 微升反应物中掺入 50ng-75ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸。

[0082] 对于本领域技术人员来说明显的是,防止竞争性核酸本身被用作聚腺苷酸聚合酶活性的底物是有利的。可能的解决方案是封闭竞争性核酸的 3' OH 基团。相应的方案,例如使用 3' 磷酸,掺入双脱氧核苷酸或反向碱基是本领域技术人员已知的。

[0083] 对于本领域技术人员来说明显的还有,能够防止竞争性核酸本身被当做反转录酶活性的底物是有利的。这可通过选择不能在给定反应条件下被转换成 cDNA 的竞争性核酸来确保。另一种可能的方案是封闭竞争性核酸的 3' -OH 基团。相应的方案,例如使用 3' 磷酸,掺入双脱氧核苷酸或反向碱基是本领域技术人员已知的。

[0084] 另外,本发明涉及一种反应混合物,含有具有聚腺苷酸化活性的第一种酶、具有反转录酶活性的第二种酶、可任选的缓冲液、可任选的至少一种核糖核苷酸、可任选的至少一种脱氧核糖核苷酸、和可任选的锚定寡核苷酸。锚定寡核苷酸优选包含同聚部分,锚定序列和/或尾。反应混合物还优选包含随机引物。额外使用随机引物的优点是甚至长转录物的5' - 端都能够有效被转化,这在定量分析中是重要的。反应混合物可含有本发明的方法所用的相同试剂。

[0085] 在本发明的一个实施例中,锚定寡核苷酸是一种同聚寡核苷酸,选自聚腺苷酸化寡核苷酸、聚胞苷酸化寡核苷酸、聚胸苷酸化寡核苷酸、聚鸟苷酸化寡核苷酸、聚尿苷酸化寡核苷酸,额外含有5' - 尾的聚腺苷酸化寡核苷酸,额外含有5' - 尾的聚胞苷酸化寡核苷酸、额外含有5' - 尾的聚胸苷酸化寡核苷酸、额外含有5' - 尾的聚鸟苷酸化寡核苷酸、和额外含有5' - 尾的聚尿苷酸化寡核苷酸。如上所述,优选可任选的额外具有5' - 尾的聚胸苷酸化寡核苷酸。

[0086] 本发明的锚定寡核苷酸通常长6-75个核苷酸。然而它也可长达约150个核苷酸。如果锚定寡核苷酸是合成的,最大长度符合DNA合成的技术限制。锚定寡核苷酸可任选含有5' - 尾和/或锚定序列。5' - 尾是在寡核苷酸5' - 端的额外核苷酸序列,其用于例如引入克隆序列、引物和/或探针结合位点或任何其它序列。本领域技术人员可根据不同应用的需要鉴定合适的5' - 尾序列。

[0087] 在锚定寡核苷酸的3' - 端,可包含通常为1-5个额外核苷酸的额外锚定序列。锚定序列可长至少一个碱基,在一优选例中第一位是简并碱基,其含有所有碱基,除了用于锚定寡核苷酸同聚部分的碱基。然后可跟其它的碱基。后者也可以是简并的。在本文的一个优选例中,使用N变量,其中N = A, C, G, T或相应的类似物。

[0088] 可任选的5' - 尾包含额外的1-100个核苷酸,可用于随后的分析。因此在一个优选例中,5' - 尾可含有寡核苷酸的结合序列,例如一或多个DNA探针和/或一或多个PCR引物。用于5' - 尾的序列优选的选择是与其与本发明的方法相容。这包含例如,选择在发明方法中和随后的分析过程中不导致任何不需要的二级反应的序列。

[0089] 本发明的反应混合物含有本发明的锚定寡核苷酸,其长度为10-150个核苷酸之间,任选在3' - 端携带本发明的锚定序列,其长1-5个核苷酸。本发明的反应混合物含有锚定寡核苷酸,其如上所述例如是脱氧核糖核酸(DNA)、肽核酸(PNA)或锁闭核酸(LNA)。在一个优选例中,本发明的反应混合物含有本发明的锚定寡核苷酸,它是聚胸苷酸寡核苷酸,还携带5' - 尾,其中寡核苷酸是脱氧核糖核酸,长10-75个核苷酸,以混合物存在;在3' - 端,存在锚定序列,其在每种情况下由一个核苷酸构成,选自A、G和C,可任选的后随5个额外的核苷酸,所述额外的核苷酸包括所有4种碱基A、C、G和T或对应的类似物。

[0090] 本发明反应混合物的锚定寡核苷酸如图12所示。

[0091] 本发明的反应混合物还包含如上对于本发明的方法所述的至少一种核糖核苷酸。特别是,本发明的反应混合物含有至少一种选自ATP, TTP, CTP, GTP, UTP或其对应碱基类似物的核糖核苷酸。核糖核苷酸可任选的如上所述被修饰或标记。本发明的反应混合物含有脱氧核糖核苷酸,如对于本发明的方法所述。特别是,本发明的反应混合物含有一种或多种脱氧核糖核苷酸,例如dATP, dCTP, dGTP, dUTP, 和/或dTTP。在优选例中,使用能实现cDNA合成的脱氧核糖核苷酸混合物。可任选修饰或标记这些脱氧核糖核苷酸。

[0092] 如果标记本发明的反应混合物中的脱氧核糖核苷酸,标记可选自:³²P,³³P,³⁵S,³H; 荧光染料,例如异硫氰酸荧光素 (FITC)、6-羧基荧光素 (FAM)、(夹)氧杂蒽、罗丹明、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素 (HEX)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素 (JOE)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明 (TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明 (ROX)、5-羧基罗丹明-6G (R6G5)、6-羧基罗丹明-6G (RG6)、罗丹明 110;Cy3、Cy5、Cy7;香豆素,例如 7-羟基香豆素;苯甲亚胺,例如 Hoechst 33258;菲啉,例如德克萨斯红、溴乙啉、氮蒽染料、咪唑染料、吩噻嗪染料、紫菜碱染料、聚甲炔染料;花青染料,例如 Cy3, Cy5, BODIPY 染料、喹啉染料和 Alexa 染料;包含生物素或一种或多种半抗原,能直接或间接检测核酸的标记(如地高辛);通过例如抗体,然后通过抗体偶联的酶进行的酶检测等间接检测。此外,通过引入纳米颗粒(与抗体或亲和配体等偶联)也可以进行间接检测。

[0093] 本发明反应混合物中在每种情况下包含浓度为 0.01mmol-10mmol 的脱氧核糖核苷酸。在每种情况下,每种脱氧核糖核苷酸 A、C、G 和 T 优选以 0.2mmol-2mmol 的浓度存在。特别优选的是脱氧核糖核苷酸 A、C、G 和 T 一起存在。在优选例中每种以 0.5mmol 的浓度存在。

[0094] 另外,本发明的反应混合物含有缓冲液。缓冲液 pH 为 6-10。另外,在本发明的反应混合物中发现 Mg²⁺ 离子。在一个特别优选例中,本发明的反应混合物含有 pH 为 6.8-9 的缓冲液。反应混合物还可包含额外的离子,可选自 Mn²⁺,K⁺,NH⁴⁺,和 Na⁺。两种不同酶活性的存在对于本发明的反应混合物来说是必要的。本发明的反应混合物含有至少第一种具有聚腺苷酸化活性的酶活性和其次,具有反转录酶活性的第二种酶活性。这些活性的优选例已在上文关于方法处进行了描述。另外,与上述方法相似,反应混合物可含有其它物质,例如体积排阻物、单链结合蛋白、DTT 或一种或多种竞争性核酸。

[0095] 如果使用体积排阻物,它优选选自葡聚糖、聚乙二醇。在 EP 1411133A1 中提到了本发明其它的体积排阻物。

[0096] 如果反应混合物可任选的含有竞争性核酸,其选自同聚核糖核酸和聚腺苷酸核糖核酸。US6,300,069 公开了本发明的其它竞争性核酸。

[0097] 本发明的反应混合物优选含有额外的聚胞苷酸多核苷酸。本发明的反应混合物尤其优选包含额外的聚胞苷酸多核糖核苷酸。优选每 20 微升中掺入 1ng-300ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸,优选每 20 微升反应物中掺入 10ng-150ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸,尤其优选每反应物中掺入 25-100ng 聚胞苷酸多核糖核苷酸,最优选每 20 微升反应物中掺入 50ng-75ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸。

[0098] 另外,本发明涉及试剂盒,其含有如上所述的反应混合物。在一优选例中,反应混合物存在于单个反应容器中。在另一个实施例,试剂盒包含一反应容器,含有本发明的具有聚腺苷酸化活性的酶、具有反转录酶活性的酶、可任选的脱氧核糖核苷酸、可任选的至少一种核糖核苷酸、可任选的含有 Mg²⁺ 的缓冲液,和可任选的一种或多种寡脱氧核糖核苷酸。可任选的,本发明试剂盒中的反应容器可含有额外成分,如对于本发明的反应混合物中所述的那样。另外,试剂盒可含有本发明锚定寡核苷酸的 5' - 尾的探针。另外,试剂盒可含有一种或多种额外的脱氧核糖核苷酸,例如检测反转录引入的尾序列的通用引物。反应混合物可以“片层形式”即冻干形式存在。其它的不含例如液体形式的制备方法也是本领域技术人员已知的。

[0099] 另外,试剂盒可任选的与 PCR 反应或实时 PCR 反应必需的试剂组合。这些试剂优选是为了至少一次 PCR 反应,其能实现本发明方法中产生的 cDNA 中至少一种的检测。

[0100] 另外,试剂盒可含有可任选的随机引物,以及可任选的一种或多种引物,或引物/探针,来检测一元或多元 PCR 反应和/或实时一元或多元 PCR 反应中的额外靶基因。

[0101] 反应混合物、本发明的方法或试剂盒可含有额外的靶特异性引物。靶特异性引物的长度的选择应当能实现 PCR 反应中的特异检测;靶引物的序列应当是特异性的,从而实现仅结合在产生的 cDNA 序列的一个位点上。一般说,这样的引物长 15-30 个核苷酸,优选 17-25 个核苷酸。

[0102] 在一个特别优选例中,反应混合物含有具有聚腺苷酸化活性的酶和具有反转录活性的酶,它们是二酶预混合物。在这样的特别优选例中,试剂盒在一个反应容器中含有二酶预混合反应混合物,在一个分开的容器中含有缓冲液、 Mg^{2+} 、rNTP、dNTP、可任选的本发明的一种锚定寡核苷酸,和可任选的随机引物,以及可任选的体积排阻试剂和/或竞争性核酸。

[0103] 本发明的方法如上所述可在一或多个温度步骤下进行。在一优选例中,本发明的方法在单个温度步骤下温育,在另一个温度步骤下灭活酶。因此,在产生酶活性的温育步骤的一个优选例中,温度为约 37°C。温育时间为约 1-120 分钟,优选 5-90 分钟,更优选 10-75 分钟,甚至更优选 15-60 分钟,还更优选 20-60 分钟,至最优选 50-70 分钟。正常情况下,过度温育时间并无害。在另一个酶变性的步骤中,温度为至少 65°C,但最高使用 100°C。优选使用约 80-95°C 的温度。变性进行至少 1 分钟,但最长 30 分钟。在一优选例中,变性 5 分钟。

[0104] 本发明产生 cDNA 的方法随后还可包含聚合酶链式反应。如果是这种情况,优选在本发明的反应混合物中加入对在 cDNA 合成中引入的尾特异的引物和/或一特异性引物。然后反应混合物还可含有热稳定 DNA-聚合酶。

[0105] 随后进行的 PCR 反应还可以是定量 PCR 反应。它可在阵列、微流系统、毛细管中进行,或还可以是实时 PCR。本领域技术人员还知道其它 PCR 的变化形式,它们也相等的包括在本发明的方法中。

[0106] 本发明还涉及反转录 RNA 为 DNA 的方法,其中该方法包括下列步骤:制备含有 RNA 的样品,加入具有反转录酶活性的第一种酶、缓冲液、至少一种脱氧核糖核苷酸、寡核苷酸,在一个或多个温度步骤中温育试剂,温度步骤的选择使酶显示活性,其中反应物含有额外的聚胞苷酸多核苷酸。

[0107] 优选具有反转录酶活性的酶是 HIV 反转录酶、M-MLV 反转录酶、EAIIV 反转录酶、AMV 反转录酶、嗜热栖热菌 DNA 聚合酶 I、M-MLVRNA 酶 H、Superscript、Superscript II、Superscript III、MonsterScript(艾比中心)、Omniscript 反转录酶(恰根公司)、Sensiscript 反转录酶(恰根公司)、ThermoScript、Thermo-X(都来自英外特根公司),或两种或多种具有反转录酶活性的酶与大肠杆菌聚腺苷酸聚合酶的混合物。特别优选的是 HIV 反转录酶。

[0108] 反应物优选含有聚胞苷酸多核糖核苷酸。每 20 微升中掺入 1ng-300ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸,优选每 20 微升反应物中掺入 10-150ng 聚胞苷酸多核糖核苷酸,尤其优选的是每反应物中掺入 25ng-100ng 聚胞苷酸多核糖核苷酸,最优选每 20 微升反应物中掺入 50ng-75ng 的聚胞苷酸多核糖核苷酸。

[0109] 在本发明的一个优选例中,样品是核糖核酸,其选自原核核糖核酸、真核核糖核酸、病毒核糖核酸、来源于太古生物的核糖核酸、小核糖核酸 (miRNA)、小核仁核糖核酸 (snoRNA)、信使核糖核酸 (mRNA)、转运核糖核酸 (tRNA)、一般的未聚腺苷酸化的核糖核酸,以及核糖体核糖核酸 (rRA),和上述两种或更多种核糖核酸的混合物。当然,样品中可已经包含聚腺苷酸化 RNA。

[0110] 作为模板,可用的 RNA 选自真核核糖核酸、mRNA、原核核糖核酸、miRNA、snoRNA 和 rRNA。在本发明最优选例中,样品含有选自 miRNA 和 snoRNA 的核糖核酸。优选其它来自伴随有其它物质的不同量的不同类的核糖核酸的混合样品。

[0111] 基于本发明的方法的这些优点,发明人可以显示可以有效和无污染的制备和定性 miRNA。可轻易的用该方法反转录少量 RNA。

[0112] 本发明还涉及一种用于反转录的试剂盒,其含有具有反转录酶活性的酶和聚胞苷酸多核苷酸,优选聚胞苷酸多核糖核苷酸。

[0113] 在一个实施例中, RNA 在样品被反转录前先被聚腺苷酸化。

[0114] 实施例

[0115] 实施例 1

[0116] 证明在同一反应容器中聚腺苷酸化反应和反转录的联合的一步法的可行性;各种缓冲液对于检测 22 聚 RNA 寡核苷酸的效力的影响

[0117] 在本实验中,证明了在同一反应容器中聚腺苷酸化反应和反转录的联合的一步法的可行性。为此,在不同条件下进行联合一步法。这在一方面,是补充了聚腺苷酸聚合酶的缓冲液,在另一方面是补充了反转录酶的缓冲液。此外,还测试了聚腺苷酸聚合酶和反转录酶缓冲液混合物。作为对照,用与图 1A 类似的二步法进行了反应。

[0118] 如表 1 所示,整理了反应。

[0119] 表 1 :聚腺苷酸反应和反转录

[0120]

	批次 1	批次 2	批次 3	批次 4 a/b	
	a/b	a/b	a/b		
	最终浓度的数据			二步法	
试剂	PAP 缓冲	RT 缓冲液	两种缓冲液的	1.) PAP 反	2.) RT

[0121]

	液		混合物	应	反应
5x PAP 缓冲液	1x		1x	1x	
10x RT 缓冲液		1x	1x		1x
MnCl ₂ , 25 mmol 溶液	2.5 mmol		2.5 mmol	2.5 mmol	
rATP, 10 mmol	1 mmol	1 mmol	1 mmol	1 mmol	
聚腺苷酸聚合酶, 2 U/μl	4 U (0.2 U/μl)	2 U (0.1 U/μl)	4 U (0.2 U/μl)	2 U (0.2 U/μl)	
dNTP Mix (dA, dT, dG, dC, 各 5 mmolh)	0.5 mmol	0.5 mmol	0.5 mmol		0.5 mmol
UniGAPdT 引物, 10 μmol	1 μmol	1 μmol	1 μmol		1 μmol
RNA 酶抑制剂, 10 U/μl	10 U	10 U	10 U		10 U
Sensiscript 反转录酶	1 μl	1 μl	1 μl		1 μl
无 RNA 酶水	可变	可变	可变	可变	可变
a) mleu7a	2x 10E9 拷贝	2x 10E9 拷贝	2x 10E9 拷贝	2x 10E9 拷贝	10 μl of PAP 反应物 1.)
b) 负对照(代替 mleu7a 的 H ₂ O)	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	
a) 玉米 RNA	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	
b) 负对照(代替 玉米 RNA 的 H ₂ O)	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	
总体积	20 μl	20 μl	20 μl	10 μl	20 μl

[0122]

温育	1 小时, 37℃ 5 分钟, 93℃	1 小时 37℃, 然后 在 2) 反转录反应时再 一小时	1 小时, 37℃ 5 分钟, 93℃
----	------------------------	-------------------------------------	------------------------

[0123] PAP:聚腺苷酸聚合酶

[0124] RT:反转录

[0125] rATP:腺嘌呤 5' - 三磷酸

[0126] 为此,使用了表 2 所示的试剂。

[0127] 表 2:聚腺苷酸化反应和反转录的材料

[0128]

聚腺苷酸聚合酶	安本公司 (Ambion); 产品号 80U: 2030
Sensiscript RT 试剂盒	恰根公司; 产品号 50rxn: 205211

[0129]

腺嘌呤 5' - 三磷酸 (rATP)	阿美沙姆公司 (Amersham) ;产品号 25 μ mol :27-2056-01
RNase 抑制剂	普洛美卡公司 (Promega) ;产品号 : N2511
单 GAP dT 引物	5' -TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
玉米 RNA	来自 1 克土生玉米壳和恰根公司 RNeasy 小制备试剂盒 (目录号 74106) ; 植物方案和 10x Upscale (Maxi Shredder 和 Column)
mleu7a RNA 寡核苷酸	5' -UGA GGU AGU AGG UGG UAU AGU U-3'

[0130] 在每种情况下,反应用模板 (1a, 2a, 3a, 4a, 都使用合成的 RNA 寡核苷酸,在玉米 RNA 的背景下) 或不用模板 (1b, 2b, 3b, 4b, 都加入了 H₂O 代替模板)。进行不用模板的反应作为非特异性背景可能发生的对照。选择玉米 RNA 作为背景 RNA, 因为要检测的 22- 聚 RNA 的序列不存在于玉米中。

[0131] 灭活酶 (见表 :93°C 5 分钟) 后,用 2 微升各批次 1a/b-4a/b 在实时 PCR 中作为模板。如表 3 所示,用 Quanti Tect SYBR 绿色 PCR 试剂盒 (目录号 204143) 和表 4 所示的引物以三倍批料进行了实时 PCR。

[0132] 表 3 :SYBR 绿色实时 PCR

[0133]

	终浓度
2x SYBR 绿色 PCR 主混合物	1x
Hum Uni 引物, 10 μ mol	0.5 μ mol
miRNA 引物 let7/short, 10 μ mol	0.5 μ mol
无 RNA 酶水	可变
PAP-/RT- 反应物	2 μ l
最终反应体积	20 μ l

[0134] 表 4 :SYBR 绿色 PCR 的材料

[0135]

QuantiTect SYBR 绿色 PCR Kit(200)	恰根公司 ;产品号 :204143
---------------------------------	-------------------

[0136]

let 7short(特异性 miRNA 引物)	5' -GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni 引物	5' -AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

[0137] 包含在通用尾引物 Hum Uni 引物中的序列 5' -AAC GAG ACG ACG ACAGAC-3' 如 US2003/0186288A1 中所述。

[0138] PCR 方案包括初步在 95℃ 下重新活化包含在 QuantiTect SYBR 绿色 PCR 主混合物中的 HotStarTaq 聚合酶 15 分钟,然后 94℃ 15 秒,52℃ 30 秒,和 72℃ 30 秒,共 40 轮(见表 5)。

[0139] 表 5 :SYBR 绿色实时 PCR 的 PCR 方案

[0140]

PCR 初步重新活化	15 分钟, 95℃	
变性	15 秒, 94℃	40x
退火	30 秒, 52℃	
延伸(获得数据)	30 秒, 72℃	
解链曲线		

[0141] 在 72℃ 延伸步骤时,获得荧光数据。用 ABI PRISM 7700(应用生物系统公司(Applied Biosystems)) 进行 PCR 分析,反应体积为 20 μ l。

[0142] 然后对 PCR 产物进行解链曲线分析。它是在 ABI PRISM 7000 实时 PCR 仪上进行的。

[0143] 表 6 :表 1 批料的实时 PCR 分析结果

[0144]

检测仪	PAP/RT	模板	Ct	Ct 剂	CV(%)
	1) PAP 缓冲液	a) mleu7a	25.64		
		2x10 ⁸ 拷贝+玉米 cDNA, 5 ng	25.22	25.50	0.95
			25.64		
	b) PAP -RT 反应物中的 H ₂ O		无 Ct		
			无 Ct	无 Ct	
			无 Ct		

[0145]

SYBR 绿色	2) RT 缓冲液	a) mleu7a	17.43		
		2x10 ⁸ 拷贝+玉米 cDNA, 5 ng	17.31	17.32	0.58
			17.23		
		b) PAP-RT 反应物中的 H ₂ O	无 Ct		
			无 Ct	无 Ct	
			无 Ct		
	3) 两种缓冲液的混合物	a) mleu7a	30.41		
		2x10 ⁸ 拷贝 + 玉米 cDNA, 5 ng	30.23	30.28	0.36
			30.21		
		b) PAP-RT 反应物中的 H ₂ O	无 Ct		
			无 Ct	无 Ct	
			无 Ct		
	4) 二步法	a) mleu7a	25.54		
		2x10 ⁸ 拷贝 + 玉米 cDNA, 5 ng	25.74	25.64	0.39
			25.65		
		b) PAP-RT 反应物中的 H ₂ O	无 Ct		
			无 Ct	无 Ct	
			无 Ct		

[0146] 然后在琼脂糖凝胶电泳的辅助下检测 PCR 产物的相同性。为此,将各 10 微升的 PCR 反应物加到 2% 琼脂糖凝胶上,用溴乙锭染色,并分离。使用 100bp 梯 (英外特根公司,目录号 15628-050) 作为尺寸标准。结果如图 3 所示。

[0147] 实施例 2:

[0148] 在同一反应容器中进行聚腺苷酸聚合酶反应和反转录的联合一步法之可再现性和特异性的证明

[0149] 在本实验中,聚腺苷酸聚合酶反应和反转录的联合一步法的可行性应当能在相同的反应容器中得到再现。为此,以 22 聚 RNA 寡核苷酸的检测为例,分析了在同一反应容器中分析聚腺苷酸聚合酶反应和反转录的一步法的效力。使用采用标准条件的模板的反转录反应作为检测特异性的对照。

[0150] 为此,在各种条件下进行联合一步法。在一方面,缓冲液补充有聚腺苷酸聚合酶,另一方面,缓冲液补充有反转录酶 (表 7、8)。

[0151] 表 7:所进行的反应的设计和成分

[0152]

设计	缓冲液	模板
反应 1	PAP 缓冲液中的一步法	RNA 50 ng + mleu7a 2x10 ⁹ 拷贝
反应 2		RNA, 50 ng
反应 3		负对照: H ₂ O
反应 4	RT 缓冲液中的一步法	RNA 50 ng + mleu7a 2x10 ⁹ 拷贝
反应 5		RNA, 50 ng
反应 6		负对照: H ₂ O
反应 7	标准 RT	RNA 50 ng + mleu7a 2x10 ⁹ 拷贝
反应 8		RNA, 50 ng

[0153] 表 8 :联合聚腺苷酸聚合酶 / 反转录反应和标准反转录反应的组分

[0154] 来自最终浓度的数据

[0155]

试剂	反应 1, 2, 3 PAP 缓冲液	反应 4, 5, 6 RT 缓冲液	反应 7, 8 标准 RT
5x PAP 缓冲液	1x		
10xRT 缓冲液		1x	1x
MnCl ₂ , 25mmol	2.5mmol		
rATP, 10mmol	1mmol	1mmol	
聚腺苷酸聚合酶, 2U/μl	2U (0.1U/μl)	2U (0.1U/μl)	
dNTP Mix (dA, dT, dG, dC, 各 5 mmol)	0.5mmol	0.5mmol	0.5mmol
UniGAPdT 引物, 10 μmol	1 μmol	1 μmol	1 μmol
RNA 酶抑制剂, 10U/μl	10U	10U	10U
Sensiscript 反转录酶	1 μl	1 μl	1 μl
无 RNA 酶水	可变	可变	可变
mleu7a ; 反应 1, 4, 7	2x10 ⁹ 拷贝	2x10 ⁹ 拷贝	2x10 ⁹ 拷贝
RNA : 反应 1, 2, 4, 5, 7, 8	50ng	50ng	50ng

反应 3、6 中的负对照 (用 H ₂ O 取代 RNA)	H ₂ O	H ₂ O	
--	------------------	------------------	--

[0156]

总体积	20 μ l	20 μ l	20 μ l
-----	------------	------------	------------

[0157]

温育	1 小时 37°C 5 分钟, 93°C
----	-------------------------

[0158]

所有反应批料然后分成：

批料 a) 取出 10 μ l, 4°C 保藏；

对于所有批料 b) : 再次加入 Uni GAP dT 引物 [1 μ mol] 和 0.5 μ l Sensiscript 反转录酶至 10 微升, 再次进行反转录 (37°C 1 小时), 然后灭活反转录酶 (5 分钟, 93°C)。

[0159] 此外, 为了检测随后 PCR 检测特异性, 进行了标准反转录反应 (表 7、8, 见上)。在聚腺苷酸聚合酶反应和反转录后, 分开样品。在每种情况下, 在一半样品中加入 Uni Gap dT 引物和反转录酶 (见表 7 上文)。其目的是为了排除由于少部分 A- 尾与 Uni Gap dT 引物意外结合而产生的假阳性信号。作为模板, 加入总 RNA, 它是从人血用 RNeasy Midi 试剂盒 (恰根公司, 德国希尔敦市, 目录号 75144) 分离的。

[0160] 用于各反应中组分和命名如上文表 7 所总结的。所检测到的 22- 聚 RNA 的序列对应于人 leu7a miRNA (EMBL 登录号 : [AJ421724](#)), 可在人血细胞, 例如白细胞中表达。然而, 由于用于分离 RNA 的 RNeasy 法纯化技术, 只能以非常低的效率纯化这样的小 RNA。RNeasy 法仅能确保大于 200 个碱基的 RNA 能结合在 RNeasy 柱的二氧化硅膜上 (恰根公司 RNeasy Midi/Maxi 手册, 06/2001, p. 9), 因此小 RNA, 例如 miRNA 会很大程度上被除去。

[0161] 此外, 在比所预期的内源性拷贝数多得多的浓度下使用合成的 22- 聚 RNA。如表 8 (见上) 所示总结了反应物。

[0162] 对此, 使用了如表 9 所述的试剂。

[0163] 表 9 : 聚腺苷酸化反应和反转录的材料

[0164]

聚腺苷酸聚合酶	安苳公司 ; 产品号 80U : 2030
Sensiscript RT Kit	恰根公司 ; 产品号 50rxn : 205211
腺嘌呤 5' - 三磷酸 (rATP)	阿美沙姆公司 ; 产品号 25 μ mol : 27-2056-01

[0165]

RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司 ; 产品号 : N2511
----------	----------------------

Uni GAP dT 引物	5' -TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV V(N-Q)-3'
RNA	用 RNeasy Midi 试剂盒 (恰根公司, 目录号 75144) 分离的来自人血的白细胞 RNA
mleu7a RNA 寡核苷酸	5' -UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

[0166] 酶灭活 (93°C 5 分钟) 后, 批料用水 1 : 2 稀释, 每 2 微升批料 1a/b-8a/b 在实时 SYBR 绿色 PCR 中用作模板。如表 9 (上文) 中所示, 用 QuantiTect SYBR 绿色 PCR 试剂盒 (目录号 204143) 和表 10 所示的引物以两倍批料进行实时 PCR。

[0167] 表 10 :SYBR 绿色实时 PCR 的成分

[0168]

	终浓度
2x SYBR 绿色 PCR 主混合物	1x
Hum Uni 引物, 10 μmol	0.5 μmol
miRNA 引物 let 7short, 10, μmol	0.5 μmol
无 RNA 酶水	可变
PAP-/RT 反应物 1 : 2 稀释过	2 μl
终反应体积	20 μl

[0169] 通用尾 - 引物 Hum Uni 引物中所包含的序列 AAC GAG ACG ACG ACA GAC 如 US2003/0186288A1 所述。PCR 方案包括初步在 95°C 下重新活化包含在 QuantiTect SYBR 绿色 PCR 主混合物中的 HotStarTaq 聚合酶 15 分钟, 然后 94°C 15 秒, 52°C 30 秒, 和 72°C 30 秒, 进行 40 轮循环 (见表 11)。

[0170] 表 11 :SYBR 绿色 PCR 的材料

[0171]

QuantiTect SYBR 绿色 PCR 试剂盒 (200)	恰根公司 ; 产品号 :204143
let 7short (特异性 miRNA 引物)	5' -GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'

[0172]

HumUni 引物	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
-----------	----------------------------------

[0173] 在 72℃延伸步骤时,获得荧光数据。用 Applied Biosystems 7500 快速实时 PCR 系统(应用生物系统公司)进行 PCR 分析,反应体积为 20 μl。然后进行解链曲线分析。

[0174] 联合一步聚腺苷酸化反应和反转录在聚腺苷酸聚合酶缓冲液和 RT 缓冲液中都是可能的,这得到了实时 PCR 分析的证实。优选缓冲条件已在文中描述(见上文)。当使用不同缓冲液时,它们在 Ct 值上显示有很大不同。

[0175] 为了监控特异性而进行的标准反转录反应(反应 3、6)都是阴性(无 Ct),不经聚腺苷酸化反应。这得到结论,即如预期的,没有 22-聚 RNA 的聚腺苷酸化(1、4、7)或天然存在的 miRNA(2、5、8)时,PCR 扩增不存在模板,因此不能产生信号(“无 Ct”)。

[0176] 在“RT 加倍”的批料中,在第一次温育后,为了产生可被 RT 反应检测的聚腺苷酸加尾的 UniGap dT 引物,可能在第一次反应中加入额外的 RT 酶和 Uni GapdT 引物。所有这些批料都显示无 Ct,即检测不到不良产物。

[0177] 也检测不到如用于 cDNA 合成的引物的聚腺苷酸加尾这类不良产物。

[0178] 实施例 3:

[0179] 用本发明的方法检测各种 miRNA

[0180] 在本实验中,应证实可用 miRNA 特异性 PCR 引物从用本发明包括共同反转录的聚腺苷酸反应的方法合成的 cDNA 模板检测到几个目标。为此,用 293RNA 作为模板进行了该过程。用于标准条件的模板的反转录反应用作检测特异性的对照。

[0181] 在随后的 SYBR 绿色 PCR 中,总的说在每种情况下,使用 4 种不同特异性 miRNA 引物和特异性引物尾之一。另外,位于人 β-肌动蛋白转录物 3'-端的引物与尾特异性引物一起使用,以检测聚腺苷酸化反应和反转录的效率。

[0182] 对于聚腺苷酸化反应和反转录(PAP+RT 反应),如表 16 所示,一起加入表 13 的试剂。

[0183] 表 13:聚腺苷酸化反应和反转录的材料

[0184]

聚腺苷酸聚合酶	安苾公司;产品号 80U:2030
---------	-------------------

[0185]

Sensiscript RT 试剂盒	恰根公司;产品号 50rxn:205211
腺嘌呤 5'-三磷酸(rATP)	阿美沙姆公司;产品号 25 μmol:27-2056-01
RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司;产品号:N2511
Uni GAP dT 引物	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'

293RNA :来自人细胞系 293(ATCC 号 :CRL-1573)	用恰根公司 RNeasy Midi 试剂盒分离
--------------------------------------	-------------------------

[0186] 表 16 :PAP+RT 反应

[0187]

试剂	终浓度
10x 缓冲液 RT	1x
rATP, 10mmol	1mmol
聚腺苷酸聚合酶 2U/ μ l	2U
dNTP Mix(ATGC, 各 5mmol)	0.5mmol
Uni GAP dT 引物, 10 μ mol	1 μ mol
RNA 酶抑制剂, 10U/ μ l	10U
Sensiscript 反转录酶	1 μ l
无 RNA 酶水	可变
a) 293RNA, 20ng/ μ l b) H ₂ O 作为负对照	5 μ l (100ng) 5 μ l
总体积	20 μ l
温育	1 小时, 37°C 5 分钟, 93°C

[0188] 在反应 a) 中, 加入 293RNA 作为负对照 (负对照), 在反应 b) 中, 加入水作为负对照。作为检测特异性的对照, 根据表 17 的图表进行了表 14 中所示试剂的标准反转录反应。

[0189] 表 14 :反转录的材料

[0190]

Sensiscript RT 试剂盒	恰根公司 ;产品号 50rxn :205211
RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司 ;产品号 :N2511
Uni GAP dT 引物	5' -TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
293RNA	用恰根公司 RNeasy Midi 试剂盒分离

[0191] 表 17 :标准 RT 反应

[0192]

试剂	2.)RT 反应
10x 缓冲液 RT	1x
dNTP 混合物 (ATGC, 各 5mmol)	0.5mmol
Uni GAP dT 引物, 10 μ mol	1 μ mol
RNA 酶抑制剂, 10U/ μ l	10U
Sensiscript 反转录酶	1 μ l
无 RNA 酶水	可变
c) 293RNA, 20ng/ μ l d) H ₂ O 作为负对照	5 μ l (100ng) 5 μ l
总体积	20 μ l
温育	1 小时, 37°C 5 分钟, 93°C

[0193] 在反应 c) 中, 加入 293RNA 作为负对照 (负对照), 而在 d) 中, 加入水作为负对照加入水作为负对照。然后样品在 37°C 下温育 1 小时。为了终止反应, 反应物在 93°C 温育 5 分钟, 用该温度步骤灭活酶。

[0194] 在酶被灭活后, 批料用水 1 : 2 稀释, 然后每 2 μ l 的各批料 a) 到 d) 用作实时 SYBR 绿色 PCR 的模板。PCR 的材料如表 15 所示。

[0195] 表 15 :SYBR 绿色 PCR 的材料

[0196]

QuantiTect SYBR 绿色 PCR 试剂盒 (200)	恰根公司 ; 产品号 : 204143
let 7short (特异性 miRNA 引物)	5' -GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'

[0197]

hsa-miR-24 (特异性 miRNA 引物)	5' -TGG CTC AGT TCA GCA GGA-3'
hsa-miR-15a (特异性 miRNA 引物)	5' -TAG CAG CAC ATA ATG GTT T-3'
hsa-miR-16 (特异性 miRNA 引物)	5' -TAG CAG CAC GTA AAT ATT G-3'
β -肌动蛋白 3' 引物	5' -GTA CAC TGA CTT GAG ACC AGT TGA ATA AA-3'

Hum Uni 引物	5' -AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
------------	--------------------------------

[0198] 吸取 10 个不同的反应批料。在反应 1-5(表 18) 中,在每种情况下使用 miRNA 特异性或 β -肌动蛋白 3' 引物和尾引物(Hum Uni)。

[0199] 表 18 :SYBR 绿色 PCR 反应 1-5

[0200]

SYBR 绿色 PCR 的成分	终浓度
2x SYBR 绿色 PCR 主混合物	1x
Hum Uni 引物, 10 μ mol	0.5 μ mol
各一种特异性 miRNA 引物 (10 μ mol) let 7short hsa-miR-24 hsa-miR-15a hsa-miR-16 或 β -肌动蛋白 3' 引物	0.5 μ mol
无 RNA 酶水	可变
PAP+RT 反应 a)b) 1 : 2 预稀释 标准 RT 反应 c)d) 1 : 2 预稀释 或 H ₂ O 作为负对照	2 μ l (5ng) 2 μ l (5ng) 2 μ l
终反应体积	20 μ l

[0201] 在反应 6-10(表 19),每种情况下仅使用一种引物,即 miRNA 特异性引物或尾特异性引物。

[0202] 在反应 6-10(表 19),每种情况下仅使用一种引物,即 miRNA 特异性引物或尾特异性引物。

[0203] 表 19 :仅用一种引物的对照反应 6-10

[0204]

SYBR 绿色 PCR 的组分	终浓度
2x SYBR 绿色 PCR 主混合物	1x
各一种特异性 miRNA 引物 (10 μ mol) let 7short hsa-miR-24 hsa-miR-15a hsa-miR-16 每种都加 3' Hum Uni 引物	0.5 μ mol

无 RNA 酶水	可变
PAP+RT 反应 a)b) 1 : 2 预稀释 标准 RT 反应 c) d) 1 : 2 预稀释 或 H ₂ O 作为负对照	2 μ l (5ng) 2 μ l (5ng) 2 μ l
终反应体积	20 μ l

[0205] 在反应中使用的引物的序列可见表 20。实时 PCR 以两倍批料进行。

[0206] 表 20 : 引物

[0207]

	引物
反应 1	β - 肌动蛋白 3' 引物 +Hum Uni
反应 2	let 7short+Hum Uni
反应 3	hsa-miR-24+Hum Uni
反应 4	hsa-miR-15 ^a +Hum Uni
反应 5	hsa-miR-16+Hum Uni
反应 6	HumUni
反应 7	let 7short
反应 8	hsa-miR-24
反应 9	hsa-miR-15a
反应 10	hsa-miR-16

[0208] 包含在通用尾引物 Hum Uni 引物中的序列 AAC GAG ACG ACG ACA GAC 如 US2003/0186288A1 中所述。

[0209] PCR 方案包括初步在 95℃ 下重新活化包含在 QuantiTect SYBR 绿色 PCR 主混合物中的 HotStarTaq 聚合酶 15 分钟, 然后 94℃ 15 秒, 52℃ 30 秒, 和 72℃ 30 秒, 进行 40 轮循环 (见表 21)。在 72℃ 延伸步骤时, 获得荧光数据。用 Applied Biosystems 7000 快速实时 PCR 系统 (应用生物系统公司) 进行 PCR 分析, 反应体积为 20 μ l, 然后进行解链曲线分析。

[0210] 表 21 : 3- 步 PCR 方案

[0211]

PCR 初步重活化	15 分钟, 95°C	
变性	15 秒, 94°C	40x
退火	30 秒, 52°C	
延伸	30 秒, 72°C	
解链曲线		

[0212] 显示了在标准条件下进行的反转录的效率和本发明方法对于 β -肌动蛋白系统（选来举例说明）的效率是相当的，由实时 PCR 中相当的 Ct 值证明（图 6）。

[0213] 当使用标准条件下产生的 cDNA 时，实时 PCR 得到了大于 38 的非常高的 Ct 值，意味着用 SybrGreen 进行的实时 PCR 检测具有非常高的特异性（图 6）。在 PCR 产物的琼脂糖凝胶分析中，检测到预期值的 PCR 产物（图 8），当使用在标准条件下产生的 cDNA 时，没有检测到产物。

[0214] miR24 产物代表获得物。在此，当使用在标准条件下产生的 cDNA 时，产生了错误大小的 PCR 产物（图 8，还见图 6）。一旦使用本发明方法产生的 cDNA，不能检测到该产物（图 8）。

[0215] 用于反转录或本发明方法的对照反应（其中水代替了 RNA 模板）都不显示信号，即在所述的实时 PCR 中不能获得 Ct 值（图 7，上部）。这也出现在仅使用一种引物的反应中（图 7，上部）。对于负对照，不获得 Ct 值，其中在 PCR 中用水代替了 cDNA（图 7）。

[0216] 实施例 4：

[0217] 使用聚腺苷酸化反应和反转录的联合一步法，随后用尾特异性探针检测实时 PCR 产生的 cDNA，来检测 miRNA

[0218] 在此实验中，进行了实时 PCR，其中使用了 Taqman 探针，它在尾引物（Uni GapdT）上有一特异性结合位点。通过探针检测代表了通过 SYBR 绿色实时 PCR 检测的一种可信的代替方法。使用探针还提供了多重 PCR 的可能性，即共扩增一种或多种额外的靶核酸，例如内部对照，其可以是例如管家基因。

[0219] 对于聚腺苷酸化反应和反转录（PAP+RT 反应），如表 24 中所示一起加入来自表 22 的试剂。

[0220] 表 22：聚腺苷酸化反应和反转录的材料

[0221]

聚腺苷酸聚合酶	安苳公司; 产品号 80 U: 2030
Sensiscript RT 试剂盒	怡根公司; 产品号 50rxn: 205211
腺嘌呤 5'-三磷酸 (rATP)	阿美沙姆公司; 产品号 25 μ mol: 27-2056-01
RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司; 产品号; N2511
Uni GAP dT 引物	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
mleu7a 寡核苷酸	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

[0222] 表 24 :PAP+RT 反应

[0223]

试剂	终浓度
10x 缓冲液 RT	1x
rATP, 10mmol	1mmol
聚腺苷酸聚合酶, 2U/ μ l	2U
dNTP 混合物 (ATGC, 各 5mmol)	0.5mmol
Uni GAP dT 引物, 10 μ mol	1 μ mol
RNA 酶抑制剂, 10U/ μ l	10U
Sensiscript 反转录酶	1 μ l
无 RNA 酶水	可变
mleu7 (10^9 拷贝 / μ l)	2 μ l (2×10^9 拷贝)
总体积	20 μ l

[0224]

温育	1 小时, 37℃ 5 分钟, 93℃
----	------------------------

[0225] 然后, 反应批料在 37℃温育, 然后 93℃灭活酶 5 分钟。

[0226] 灭活酶后, 用 2 微升未稀释的批料作为实时 PCR 模板, 其含有用于检测的 Taqman 探针。PCR 的材料如表 23 所示, 如表 25 所示一起加入。

[0227] 表 23 :QT 探针 PCR 的材料

[0228]

QuantiTect Probe PCR 试剂盒 (200)	恰根公司 Material No. :204343
let 7short(特异性 miRNA 引物)	5' -GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni 引物	5' -AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
Hum Uni 探针	5' -HEX-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-BHQ-3' 5' 报道染料 :HEX 3' 淬灭剂 :黑洞淬灭剂 1

[0229] 表 25 :QuantiTect 探针 PCR

[0230]

QuantiTect 探针 PCR 的材料	终浓度
2x QuantiTect 探针 PCR 主混合物	1x
Hum Uni 引物, 10 μmol	0.5 μmol
let 7short(特异性 miRNA 引物)	0.5 μmol
无 RNA 酶水	可变
PAP+RT 反应, 未稀释	2 μl (2x 10 ⁸ 拷贝)
终反应体积	20 μl

[0231] 以两倍批料进行每批实时 PCR。

[0232] 包含在通用尾引物 Hum Uni 引物中的序列 AAC GAG ACG ACG ACA GAC 如 US2003/0186288A1 中所述。从人 GAPDH 基因座中取出 Taqman 探针序列; 它不包含在 US2003/0186288A1 中。

[0233] PCR 方案包括初步在 95℃下重新活化包含在 QuantiTect 探针 PCR 主混合物中的 HotStarTaq 聚合酶 15 分钟, 然后 94℃ 15 秒, 52℃ 30 秒, 进行 45 轮循环 (见表 26)。

[0234] 表 26 :2- 步 PCR 方案

[0235]

PCR 最初重活化	15 分钟, 95°C	
变性	15 秒, 94°C	45x
退火	30 秒, 52°C	

[0236] 在 52°C 退火步骤时, 获得荧光数据。用 7700 序列检测系统 (应用生物系统公司) 进行 PCR 分析, 反应体积为 20 μ l。PCR 结果如表 27 所示

[0237] 表 27 :PCR 结果

[0238]

mleu7a	Ct	Ct 试剂	CV(%)
未稀释, 2x 10 ⁸	20.24	20.31	0.45
	20.37		

[0239] 可以使用尾特异性探针检测, 得到预期结果。

[0240] 实施例 5 :

[0241] 聚腺苷酸聚合酶浓度和温育时间在聚腺苷酸化反应和反转录的联合一步法中的影响

[0242] 在此试验中, 在本发明的方法中使用两种浓度的聚腺苷酸聚合酶 (2U 或 0.5U), 各 15 分钟或 1 小时。在每种情况下, 在 RT 缓冲液 (恰根公司) 和聚腺苷酸聚合酶缓冲液中测试所有条件。

[0243] 对于聚腺苷酸化反应和反转录 (PAP+RT 反应), 如表 30 中所述一起加入来自表 28 的试剂: 反应 a) 2U 聚腺苷酸聚合酶, 反应 b) 0.5U 聚腺苷酸聚合酶)。

[0244] 表 28 :聚腺苷酸化反应和反转录的材料

[0245]

聚腺苷酸聚合酶	安苾公司 ; 产品号 80U :2030
Sensiscript RT 试剂盒	恰根公司 ; 产品号 50rxn :205211
腺嘌呤 5' - 三磷酸 (rATP)	阿美沙姆公司 ; 产品号, 25 μ mol : 27-2056-01

[0246]

RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司 ; 产品号 :N2511
Uni GAP dT 引物	5' -TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'

玉米 RNA	使用恰根公司 RNeasy 小制备试剂盒 (目录号 74106) 根据植物方案获自 1 克土生玉米壳
mleu7a 寡核苷酸	5' -UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

[0247] 表 30 :PAP+RT 反应

[0248]

试剂	终浓度
10x 缓冲液 RT	1x
rATP, 10mmol	1mmol
聚腺苷酸聚合酶, 2U/μl	a) 2U b) 0.5U
dNTP 混合物 (ATGC, 各 5mmol)	0.5mmol
Uni GAP dT 引物, 10 μmol	1 μmol
RNA 酶抑制剂, 10U/μl	10U
Sensiscript 反转录酶	1 μl
无 RNA 酶水	可变
mleu7a 109 拷贝/μl	2 μl (2x109 拷贝)
玉米 RNA, 25ng/μl	2 μl (50ng)
总体积	20 μl
1.) 温育	1 小时, 37°C 5 分钟, 93°C
2.) 温育	15 分钟, 37°C 5 分钟, 93°C

[0249] 然后, 样品在 37°C 温育 (1.1 小时 / 2.15 分钟)。然后反应加热到 93°C 5 分钟, 灭活酶。

[0250] 然后在每种情况下, 对于每个反应, 在 SYBR 绿色 PCR 掺入未稀释的 2 微升。反应各进行两次。为此, 如表 31 所示加入来自表 29 的试剂, 然后如表 32 所示进行 PCR。

[0251] 表 29 :SYBR 绿色 PCR 的材料

[0252]

QuantiTect SYBR 绿色 PCR 试剂盒 (200)	恰根公司 ;产品号 :204143
let 7short(特异性 miRNA 引物)	5' -GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni 引物	5' -AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

[0253] 表 31 :SYBR 绿色 PCR

[0254]

SYBR 绿色 PCR 的组分	终浓度
2x SYBR 绿色 PCR 主混合物	1x
HumUni 引物, 10 μ mol	0.5 μ mol
let 7short(特异性 miRNA 引物)	0.5 μ mol
无 RNA 酶水	可变
PAP+RT 反应 1a)b)/2a)b)	2 μ l (2x10 ⁸ 拷贝)
终反应体积	20 μ l

[0255] 表 32 :3- 步 PCR 方案

[0256]

PCR 最初重活化	15 分钟, 95°C	
变性	15 秒, 94°C	45x
退火	30 秒, 52°C	
延伸	30 秒, 70°C	
解链曲线		

[0257] PCR 方案包括初步在 95°C 下重新活化 HotStarTaq 聚合酶 15 分钟, 其包含在 QuantiTect SYBR 绿色 PCR 主混合物中, 然后 94°C 15 秒, 52°C 30 秒, 72°C 30 秒进行 40 轮循环 (见上文表 32)。在 72°C 延伸步骤过程中, 获得荧光数据。用 AppliedBiosystems 7000 实时 PCR 系统 (应用生物系统公司) 进行 PCR 分析, 反应体积为 20 μ l, 接着进行解链曲线分析。

[0258] 可见聚腺苷酸化反应和反转录的一步法的效率对于聚腺苷酸聚合酶的浓度和温育时间都有依赖性 (图 9)。

[0259] 实施例 6 :

[0260] 用各种反转录酶进行本发明的方法

[0261] 本发明的方法使用 RT 缓冲液 (恰根公司) (反应 1-5) 中的总共 5 种不同的反转录酶 (见表 35), 此外, 为了比较, 在每种情况下缓冲液中都加有反转录酶 (反应 6-9)。

[0262] 表 35 : 所用的反转录酶和缓冲液

[0263]

1.) AMV 反转录酶	AMV 反转录酶 5x 反应缓冲液
2.) SuperScript III 反转录酶	5x 第一链缓冲液
3.) HIV 反转录酶	10x 第一链合成缓冲液
4.) M-MuLV 反转录酶	10x 反转录酶反应缓冲液
5.) Sensiscript 反转录酶	10x 缓冲液 RT

[0264] 对于聚腺苷酸化反应和反转录的一步法 (PAP+RT 反应), 对于反应 1-5 (反应缓冲液 : 缓冲液 RT (恰根公司)) 如表 36 所述, 对于反应 6-9 (额外的反转录酶, 每种情况下在缓冲液中补充) 如表 37 所述加入表 33 的试剂。

[0265] 表 33 : 聚腺苷酸化反应和反转录的材料

[0266]

聚腺苷酸聚合酶	安苳公司 ; 产品号 80U : 2030
AMV 反转录酶	普洛美卡公司 ; 产品号 300U : M5101
SuperScript III 反转录酶	英外特根公司 ; 产品号 10, 000U : 18080-044
HIV 反转录酶	安苳公司 ; 产品号 500U : #2045
M-MuLV 反转录酶	生物实验室公司 (BioLabs) ; 产品号 10, 000U : M0253S
Sensiscript RT 试剂盒	恰根公司 ; 产品号 50rxns : 205211

[0267]

腺嘌呤 5' - 三磷酸 (rATP)	阿美沙姆公司 ; 产品号 25 μ mol : 27-2056-01
RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司 ; 产品号 : N2511
Uni GAP dT 引物	5' - TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV V-3'

玉米 RNA	使用恰根公司 RNeasy 小制备试剂盒 (目录号 74106) 和 10 倍 Upscale (Maxi Shredder 和 Column) 根据植物方案,, 来自 1 克土生玉米壳 见上
mleu7a 寡核苷酸	5' -UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'

[0268] 表 36 :缓冲液 RT(恰根公司)中的 PAP+RT 反应

[0269]

试剂	终浓度
10x 缓冲液 RT	1x
rATP, 10mmol	1mmol
聚腺苷酸聚合酶, 2U/μl	1U
dNTP 混合物 (ATGC, 各 5mmol)	0.5mmol
Uni GAP dT 引物, 10 μmol	1 μmol
RNA 酶抑制剂 10U/μl	10U
1.) AMV 反转录酶 2.) SuperScript III 反转录酶 3.) HIV 反转录酶 4.) M-MuLV 反转录酶 5.) Sensiscript 反转录酶	24U 10U 1U 10U 1 μl
无 RNA 酶水	可变
Mleu7a 10 ⁹ 拷贝 / μl	2 μl (2x10 ⁹ 拷贝)
玉米 RNA, 20ng/μl	2 μl (40ng)
总体积	20 μl
温育	1 小时, 37°C

[0270]

	5 分钟, 93°C
--	------------

[0271] 表 37 :补充有反转录酶的缓冲液中的 PAP+RT 反应

[0272]

试剂	终浓度
6.) AMV 反转录酶 5x 反应缓冲液	1x
7.) 5x 第一链缓冲液	1x
8.) 10x 第一链合成缓冲液	1x
9.) 10x 反转录酶反应缓冲液	1x
rATP, 10mmol	1mmol
聚腺苷酸聚合酶, 2U/ μ l	1U
dNTP 混合物 (ATGC, 各 5mmol)	0.5mmol
Uni GAP dT 引物, 10 μ mol	1 μ mol
RNA 酶抑制剂, 10U/ μ l	10U
6.) AMV 反转录酶	24U
7.) 7.) SuperScript III 反转录酶	10U
8.) HIV 反转录酶	1U
9.) M-MuLV 反转录酶	10U
无 RNA 酶水	可变
mleu7a 10 ⁹ 拷贝 / μ l	2 μ l (2x10 ⁹ 拷贝)
玉米 RNA, 20ng/ μ l	2 μ l (40ng)
总体积	20 μ l
温育	1 小时, 37°C 5 分钟, 93°C

[0273] 然后, 样品在 37°C 温育 1 小时。然后反应加热到 93°C 5 分钟, 灭活酶。

[0274] 然后在每种情况下, 对于每个反应, 在 SYBR 绿色 PCR 掺入 2 微升。反应各测试两次。为此, 如表 38 所示加入来自表 34 的试剂, 然后如表 39 所示进行 PCR。

[0275] 表 34 : SYBR 绿色 PCR 的材料

[0276]

QuantiTect SYBR 绿色 PCR 试剂盒 (200)	恰根公司 ; 产品号 : 204143
Let 7short (特异性 miRNA 引物)	5' -GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni 引物	5' -AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'

[0277] 表 38 :SYBR 绿色 PCR

[0278]

SYBR 绿色 PCR 的组分	终浓度
2x SYBR 绿色 PCR 主混合物	1x
Hum Uni 引物, 10 μ mol	0.5 μ mol
let 7short(特异性 miRNA 引物)	0.5 μ mol
无 RNA 酶水	可变
PAP+RT 反应物, 未稀释	2 μ l (2x10 ⁸ 拷贝)
终反应体积	20 μ l

[0279] 表 39 :3 步 PCR 方案

[0280]

PCR 最初重活化	15 分钟, 95°C	
变性	15 秒, 94°C	45x
退火	30 秒, 52°C	
延伸	30 秒, 70°C	
解链曲线		

[0281] PCR 方案包括初步在 95°C 下重新活化 HotStarTaq 聚合酶 15 分钟, 其包含在 QuantiTect SYBR 绿色 PCR 主混合物中, 然后 94°C 15 秒, 52°C 30 秒, 72°C 30 秒进行 40 轮循环 (见表 39)。在 72°C 延伸步骤过程中, 获得荧光数据。用 AppliedBiosystems 7000 实时 PCR 系统 (应用生物系统公司) 进行 PCR 分析, 反应体积为 20 μ l, 接着进行解链曲线分析。

[0282] 对于标准反转录反应优化反转录酶的用量, 可能可解释观察到的 Ct 值中的差异。

[0283] 实施例 7:

[0284] 证明在同一反应容器中聚腺苷酸化反应、反转录和 PCR 的联合三步法的可行性; 各种添加物对于检测 22 聚 RNA 寡核苷酸的效率的影响

[0285] 在此实验中, 证明了在同一反应容器中聚腺苷酸聚合酶反应、反转录、和 PCR 的联合三步法的可行性。为此, 在下列条件下用所示批料进行联合三步法。

[0286] 作为对照, 用图 1B 所示的二步法进行反应。

[0287] 对于聚腺苷酸化反应、反转录和 PCR (PAP+RT 反应+PCR) 的三步法, 如表 41 所示使用表 40 的材料。

[0288] 表 40 :聚腺苷酸化反应, 反转录和 PCR 的材料

[0289]

聚腺苷酸聚合酶	艾比中心生物技术公司 (Epicenter Biotechnologies) ;产品号 400U : PAP5104
QuantiTect 多重 RT-PCR 试剂盒	恰根公司 ;产品号 200rxns :204643.
腺嘌呤 5' - 三磷酸 (rATP)	阿美沙姆公司 ;产品号, 25 μ mol : 27-2056-01
dNTP 混合物 (ATGC, 各 10mmol)	阿美沙姆公司 ;产品号恰根公司 Intern 1007430
RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司 ;产品号 :N2511
Uni GAP dT 引物	5' -TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
玉米 RNA	使用恰根公司 RNeasy 小制备试剂盒 (目录号 74106) 的植物方案和 10 倍 Upscale (Maxi Shredder 和 Column), 得自 1 克土生玉米壳 见上
mleu7a 寡核苷酸	5' -UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'
let 7short (特异性 miRNA 引物)	5' -GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni 引物	5' -AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
GAPDH-TM-HEX_BHQ 聚腺苷酸 RNA	5' HEX-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-BHQ 3', 阿美沙姆生物科学公司 (Amersham Biosciences) 产品

[0290]

随机 N8 引物 寡 dT 12	号 27-4110-01, 以 25 μ g/ μ l 溶于无 RNA 酶的水 NNNNNNNN TTTTTTTTTTTT-3' 磷酸
---------------------	---

[0291] 表 41 :PAP+RT 反应 +PCR, 使用 QuantiTect 多重 RT-PCR 主混合物 (恰根公司) 中的批料

[0292]

试剂	终浓度
2x QuantiTect 多重 RT-PCR 主混合物	1x
rATP, 10mmol	100 μ mol
聚腺苷酸聚合酶, 4U/ μ l	1U
dNTP 混合物 (ATGC, 各 10mmol)	0.5mmol
Uni GAP dT 引物, 10 μ mol	0.05 μ mol
RNA 酶抑制剂, 40U/ μ l	10U
QuantiTect 多重 RT 混合物	0.2 μ l
Hum Uni 引物, 10 μ mol	0.5 μ mol
let 7short (特异性 miRNA 引物)	0.5 μ mol
GAPDH-TM-HEX_BHQ	0.2 μ mol
无 RNA 酶水	可变
Poly A RNA, 25 μ g/ μ l	10ng/ μ l
N8 随机引物	0.05 μ mol
寡 dT12	5 μ mol
mleu7a 10^9 拷贝/ μ l	2 μ l (2x 10^9 拷贝)
玉米 RNA, 20ng/ μ l	2 μ l (40ng)
总体积	20 μ l

[0293] 反应各进行三次。为此, 如表 41 所述加入表 40 的试剂, 如表 42 所述进行反应。

[0294] 表 42 : 三合一反应的反应方案

[0295]

聚腺苷酸化反应和反转录	45 分钟, 37°C	
	15 分钟, 50°C	
PCR 最初重活化	15 分钟, 95°C	45x
变性	15 秒, 94°C	
退火/延伸	30 秒, 52°C	

[0296] 反应方案首先包括聚腺苷酸聚合酶和用 QuantiTect 多重反转录酶混合物的联合反应的条件 (45 分钟, 37°C, 和 15 分钟, 50°C)。然后, 95°C 温育 15 分钟, 以灭活聚腺苷酸聚合酶和反转录酶, 并活化包含在 QuantiTect 多重 RT-PCR 主混合物中的 HotStarTaq DNA 聚合酶。然后是 94°C 15 秒, 52°C 30 秒, 共 45 轮 PCR 循环 (见表 43), 以在实时 PCR 中扩增产生的 let7a-cDNA。为了检测, 使用对 Uni Gap dT 引物特异性的荧光标记探针。在 52°C 退火 / 延伸步骤中获得荧光数据。用 AppliedBiosystems 7500 快速实时 PCR 系统 (应用生物系统公司) 以 20 微升的反应体积进行该“三合一”反应。

[0297] 如图 14 所示, “三合一”反应能特异性检测玉米 RNA 背景下的合成性 22 聚 RNA 寡核苷酸。在玉米 RNA 背景下含有合成性 22 聚 RNA 寡核苷酸的样本提供了 20.61 的 Ct 值, 而玉米 RNA 的对照反应得到了 309.65 的 Ct 值。实验显示在给定的条件下可技术性使用“三合一”反应。

[0298] 实施例 8:

[0299] 用手工 PCR 引物“Hot Starts”进行本发明的“三合一”反应, 以促进联合三步法的反应。作为对照, 基于图 1B 进行了两步法的反应。

[0300] 如表 44 所示, 用表 43 所示材料进行了反应。

[0301] 表 43: 聚腺苷酸化反应, 反转录和 PCR 的材料

[0302]

聚腺苷酸聚合酶	艾比中心生物技术公司; 产品号 400 U: PAP5104
QuantiTect 多重 RT-PCR 试剂盒	恰根公司; 产品号 200 rxns: 204643
腺嘌呤 5'-三磷酸 (rATP)	阿美沙姆公司; 产品号 25 μ mol: 27-2056-01
dNTP 混合物 (ATGC, 10 mmol each)	阿美沙姆公司; 产品号恰根公司 Intern 1007430

[0303]

RNA 酶抑制剂	普洛美卡公司; 产品号: N2511
Uni GAP dT 引物	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV VN-3'
玉米 RNA	使用恰根公司 RNeasy 小制备试剂盒 (目录号 74106)的植物方案和 10 倍 Upscale(Maxi Shredder 和 Column), 得 自 1 克土生玉米壳 见上
mleu7a 寡核苷酸	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'
PCR 引物:	
let 7short (特异性 miRNA 引物)	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
Hum Uni 引物	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
GAPDH-TM-HEX_BHQ 添加物: 聚腺苷酸化 RNA 随机 N8 引物 寡 dT 12	阿美沙姆生物科学公司产品号 27-4110-01, 溶于 25 µg/µl 无 RNA 酶 水 NNNNNNNN TTTTTTTTTTTTT-3'磷酸

[0304] 表 44 :QuantiTect 多重 RT-PCR 主混合物 (恰根公司) 中的 PAP+RT 反应 +PCR
[0305]

试剂	终浓度
2xQuantiTect 多重 RT-PCR 主混合物	1x
rATP, 10mmol	100 µmol
聚腺苷酸聚合酶, 4U/µl	1U
dNTP 混合物 (ATGC, 各 5mmol)	0.5mmol

Uni GAP dT 引物, 10 μmol	0.05 μmol
-----------------------------------	----------------------

[0306]

RNA 酶抑制剂, 40U/ μl	10U
QuantiTect 多重 RT Mix	0.2 μl
无 RNA 酶水	可变
Poly A, 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	10ng/ μl
N8 随机引物	0.05 μmol
寡 dT12	5 μmol
mleu7a 10^9 拷贝/ μl	2 μl (2×10^9 拷贝)
玉米 RNA, 20ng/ μl	2 μl (40ng)
总体积	20 μl

[0307] 使用表 45 的 PCR 引物, 制备了引物混合物, 将每个反应所需的量加入到光学帽的顶盖上 (实时 PCR 容器的盖, 应用生物系统公司; 产品号 4323032)。然后, 在加热块上 37°C 温育盖 20 分钟, 直到液体蒸发, 从而干燥引物。

[0308] 盖中 PCR 引物干燥完成后, 如表 44 所示将试剂加到一起, 并加到光学管 (实时 PCR 容器, 应用生物系统公司; 产品号 4316567) 中, 密封并预处理光学帽, 如表 47 所示进行 PCR。

[0309] 反应每次测试三次。

[0310] 表 45 : PCR 盖中干燥的寡核苷酸混合物的组成

[0311]

	Oligo/rxn 量	重溶解后 PCR 中的终浓度
Hum Uni 引物	10pmol	0.5 μmol
let 7short (特异性 miRNA 引物)	10pmol	0.5 μmol
GAPDH-TM-HEX_BHQ	4pmol	0.2 μmol

[0312] 表 46 : “三合一”反应的反应方案

[0313]

聚腺苷酸化反应和反转录	45 分钟, 37°C	-
	15 分钟, 50°C	
温育	95°C, 3 分钟	
简单说, 倒转 8-Strip 反应容器, 使在盖中干燥的引物溶于反应混合物		
PCR 最初重活化	12 分钟, 95°C	
变性	15 秒, 94°C	45x
退火/延伸	30 秒, 52°C	

[0314] 反应方案首先包括聚腺苷酸聚合酶和用 QuantiTect 多重反转录酶混合物的联合反应的条件 (45 分钟, 37°C, 和 15 分钟, 50°C)。然后, 95°C 加热 3 分钟, 以灭活聚腺苷酸聚合酶和反转录酶。然后, 从装置中简单取下 PCR 管, 并将其倒置, 使存在于盖中的干燥的 PCR 引物重新溶解, 并使其能用于随后的 PCR 反应。随后 95°C 温育 12 分钟, 以活化包含在 QuantiTect 多重 RT-PCR 主混合物中的 HotStarTaqDNA 聚合酶。在此选择短 3 分钟的重新活化, 因为反应混合物先前已经为了灭活聚腺苷酸聚合酶和反转录酶而在 95°C 加热了 3 分钟。接着进行 45 轮的 PCR 循环, 即 94°C 15 秒, 52°C 30 秒 (见表 47), 以在实时 PCR 中扩增产生的 let7a-cDNA。为了检测, 使用对 Uni Gap dT 引物特异性的荧光标记探针。在 52°C 退火/延伸步骤中获得荧光数据。用 Applied Biosystems 7500 快速实时 PCR 系统 (应用生物系统公司) 以 20 微升的反应体积进行该“三合一”反应。

[0315] 附图

[0316] 图 1 显示了本发明的一步法 (B) 和现有技术已知的两步法 (A) 之间的比较。聚腺苷酸聚合酶: 本发明具有聚腺苷酸化活性的酶; 反转录酶: 本发明具有反转录酶活性的酶; rATP: 核糖核苷酸, 在此例如腺嘌呤 -5' - 三磷酸; dNTPs: 脱氧核糖核苷酸; 寡 dT 尾引物: 锚定寡核苷酸, 根据本发明有不同可能的例子; Uni GAP dT 引物: 锚定寡核苷酸的特定实施例; 尾: 作为锚定寡核苷酸可选部分的 5' 尾;

[0317] w: 定义为通过聚腺苷酸化活性结合的同聚物尾在本发明中的长度 (大于 10-20 个碱基); x, y: 定义为本发明锚定寡核苷酸的 3' - 锚定序列在本发明中的类型和长度; z: 定义为本发明锚定寡核苷酸的同聚部分的长度。

[0318] 图 2 显示了表 6 的 Ct 值的图解: 情况 a) 包含每一种情况下的模板, 情况 b) 仅加入 H₂O 而不是模板 (PAP 反应中的 H₂O)。在 b) 中, PCR40 轮循环 (进行的最大循环数) 也没有得到信号, 因此表示为“无 Ct”。

[0319] 图 3 显示了实施例 1 的实时 PCR 产物的琼脂糖凝胶分析。M: 100bp 梯 (英外特根公司, 目录号 15628-050)。2% 琼脂糖用 TAE 中的溴乙锭染色, 作为跑胶缓冲液。加样图: 1 号泳道: 标记, 然后在每种情况下彼此相邻点 3 个测试点: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b。

[0320] 图 4 显示了实时 PCR 分析表 8 所述批料的反应产物的 Ct 值的表格。在 3 和 6 中, PCR40 轮循环 (进行的最大循环数) 也没有得到信号, 因此表示为“无 Ct”。

[0321] 图 5 显示了实时 PCR 分析表 8 所示批料的反应产物的 Ct 值的图示。

[0322] 图 6 显示了用表 18 所述的批料 b) 和 e) 的反应产物进行实时 PCR 分析获得的 Ct 平均值的表格。

[0323] 在标准 RT 的 2、4 和 5 中, 仅在 38 轮循环后最早检测到信号, 或在 2) 中, 无信号, 因此表示为“无 Ct”。

[0324] 图 7 显示了表 18 批料 b) 和 d), 表 19 仅一个引物的对照, 批料 a)-d) 的实时 PCR 结果的表格。PCR40 轮循环 (进行的最大循环数) 也没有得到信号, 因此表示为“无 Ct”。

[0325] 图 8 显示了实施例 3 的实时 PCR 产物的琼脂糖凝胶分析。M:100bp 梯 (英外特根公司, 目录号 15628-050)。2% 琼脂糖, 用溴乙锭染色, 用 TAE 作为跑胶缓冲液。

[0326] 图 9 显示了表 30 中所述的批料 1a、b) 和 2a)、b) 的反应产物通过实时 PCR 分析获得的 Ct 平均值的表格。

[0327] 下部: 表 30 所述批料的反应产物通过实时 PCR 分析获得的 Ct 平均值的图示。

[0328] 图 10 显示了表 36, 1-5 和表 37, 6-9 中所述的批料的反应产物通过实时 PCR 分析获得的 Ct 平均值的表格。

[0329] 下部: 表 36, 1-5 和表 37, 6-9 中所述的批料的反应产物通过实时 PCR 分析获得的 Ct 平均值的图示。

[0330] 图 11 显示了所用的核酸序列清单。

[0331] 图 12 显示了本发明的锚定寡核苷酸。

[0332] 图 13 显示了本发明的一步“三合一”法 (B) 和现有技术已知的三步法 (A) 之间的比较。聚腺苷酸聚合酶: 本发明具有聚腺苷酸化活性的酶;

[0333] 反转录酶: 本发明具有反转录酶活性的酶;

[0334] rATP: 核糖核苷酸, 本文中以腺嘌呤 -5' - 三磷酸为例;

[0335] dNTP: 脱氧核糖核苷酸;

[0336] 寡 dT 尾引物: 本发明中具有各种可能例子的锚定寡核苷酸;

[0337] Uni GAP dT 引物: 锚定寡核苷酸的特定例子;

[0338] 尾: 作为锚定寡核苷酸一可选部分的 5' - 尾;

[0339] w: 定义为通过聚腺苷酸化活性结合的同聚物尾在本发明中的长度 (大于 10-20 个碱基);

[0340] x, y: 定义为本发明锚定寡核苷酸的 3' - 锚定序列在本发明中的类型和长度;

[0341] z: 定义为本发明锚定寡核苷酸的同聚部分的长度;

[0342] PCR 引物: 用于特异性检测 cDNA 的至少一个寡核苷酸, 可任选至少一个探针;

[0343] PCR 酶: 使样本中所含 cDNA 被特异性检测的酶活性。

[0344] 图 14 显示了实施例 7 中的反应批料 (对应于表 41) 和表 42 的反应批料的“三合一”反应 (即在一反应容器中联合聚腺苷酸聚合酶反应、反转录和实时 PCR 分析) 的 Ct 平均值表格。

[0345] 下部: 实施例 7 中的反应批料 (对应于表 41) 和表 42 的反应批料的“三合一”反应 (即在一反应容器中联合聚腺苷酸聚合酶反应、反转录和实时 PCR 分析) 的 Ct 平均值图示。

[0346] 图 15 显示了实施例 8 中的反应批料 (对应于表 44) 和表 46 的反应批料的“三合一”反应 (即在一反应容器中联合聚腺苷酸聚合酶反应、反转录和实时 PCR 分析) 的 Ct 平均值表格。

[0347] 下部: “三合一”反应 (即在一反应容器中联合聚腺苷酸聚合酶反应、反转录和实

时 PCR 分析) 的 Ct 平均值图示。

[0348] 图 16 显示了不同量的 miRNAeasy RNA (10pg 到 1 μ g), 其用 miScript 在存在或不存在 100ng 聚腺苷酸或聚胞苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 用于实时 PCR; 在这种情况下, 测试了 miR-16 和 let-7a。

[0349] 图 17 显示了不同量的 miRNAeasy RNA (10pg 到 1 μ g), 其用 miScript 在存在或不存在不同量的聚腺苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 用于实时 PCR; 在这种情况下, 测试了 miR-16。

[0350] 图 18 显示了不同量的 miRNAeasy RNA (10pg 到 1 μ g), 其用 miScript 在存在或不存在不同量的聚胞苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 用于实时 PCR; 在这种情况下, 测试了 miR-16。

[0351] 图 19 显示了使用 10pg miRNAeasy RNA, 其用 miScript RT 试剂盒在存在或不存在 50ng 聚胞苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 用于实时 PCR 检测 GADPH。

[0352] 图 20 显示了不同量的 miRNAeasy RNA 的 (1-100ng), 其用 miScript 在存在或不存在不同量的聚胞苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 用于实时 PCR, 在这种情况下, 测试 GADPH。

[0353] 图 21 显示了使用 10pg 和 100pg miRNAeasy RNA, 其用 miScript RT 试剂盒在存在或不存在 50ng 聚胞苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 在实时 PCR 中测试, 用于检测 GADPH。

[0354] 图 22 显示了不同量的 miRNAeasy RNA (1-100ng), 其用 miScript 在存在或不存在不同量的聚胞苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 用于实时 PCR; 在这种情况下, 测试了 CDC2。

[0355] 图 23 显示了用 1ng miRNAeasy RNA, 其用 miScript RT 试剂盒在存在或不存在 50ng 聚胞苷酸的情况下反转录。如此产生的 cDNA 在实时 PCR 中测试, 用于检测 CDC2。

[0001]

序列表

<110> 恰根有限公司 (Qiagen GmbH)

<120> 在酶反应中在样品中合成 cDNA 的方法

<130> M3362 PCT BLN

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 1

ugagguagua gguuguauag uu

22

<210> 2

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (65)..(65)

<223> n 是 a, c, g, t 或 u

<400> 2

tggaacgaga cgacgacaga ccaagcttcc cgttctcagc cttttttttt tttttttttt
ttvvnn

60

65

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 3

aacgagacga cgacagac

18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

[0002]

<400> 4 gaggtagtag gttgtatag	19
<210> 5 <211> 18 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 5 tggctcagtt cagcagga	18
<210> 6 <211> 19 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 6 tagcagcaca taatggttt	19
<210> 7 <211> 19 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 7 tagcagcacg taaatattg	19
<210> 8 <211> 29 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	
<400> 8 gtacactgac ttgagaccag ttgaataaa	29
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成	

[0003]

<400> 9 caagcttccc gttctcagcc	20
<210> 10 <211> 53 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成 - 10-30 个聚 T	
<220> <221> misc_feature <222> (53)..(53) <223> n 是 a, c, g, 或 t	
<400> 10 tggaacgaga cgacgacaga ccaagctccc gttctcagcc tttttttttt vvn	53
<210> 11 <211> 30 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成 -10-30 个聚 T	
<220> <221> misc_feature <222> (30)..(30) <223> n 是 a, c, g, 或 t	
<400> 11 aacgagacga cgacagactt ttttttttvn	30
<210> 12 <211> 29 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成 -10-30 个聚 T	
<400> 12 aacgagacga cgacagactt ttttttttv	29
<210> 13 <211> 29 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成 -10-30 个聚 T	

[0004]

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n是a, c, g,或t

<400> 13
aacgagacga cgacagactt ttttttttn 29

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> 人T.

<220>
<223> 合成10-30个聚T

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(30)
<223> n是a, c, g,或t

<400> 14
aacgagacga cgacagactt ttttttttnn 30

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> 人T.

<220>
<223> 合成10-30个聚T

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(31)
<223> n是a, c, g,或t

<400> 15
aacgagacga cgacagactt ttttttttnn 31

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> 人T.

<220>
<223> 合成10-30个聚T

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(32)
<223> n是a, c, g,或t

<400> 16
aacgagacga cgacagactt ttttttttnn 32

[0005]

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成 10-30 个聚 T

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(31)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 17
aacgagacga cgacagactt tttttttttnn n 31

<210> 18
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成 10-30 个聚 T

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 18
tggaacgaga cgacgacaga ccaagcttcc cgtctcagcc tttttttttt vn 52

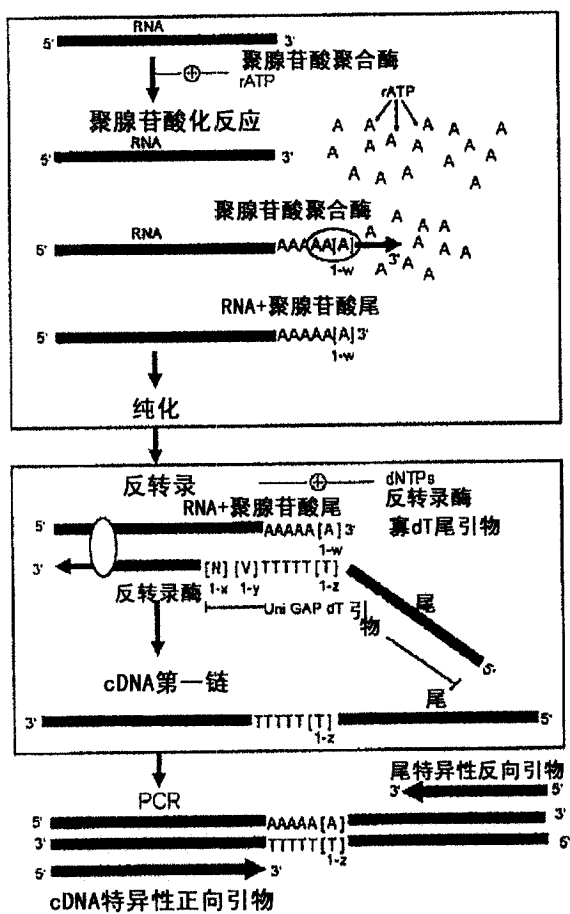
<210> 19
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成 10-30 个聚 T

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(53)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 19
tggaacgaga cgacgacaga ccaagcttcc cgtctcagcc tttttttttt vnn 53

A)



B)

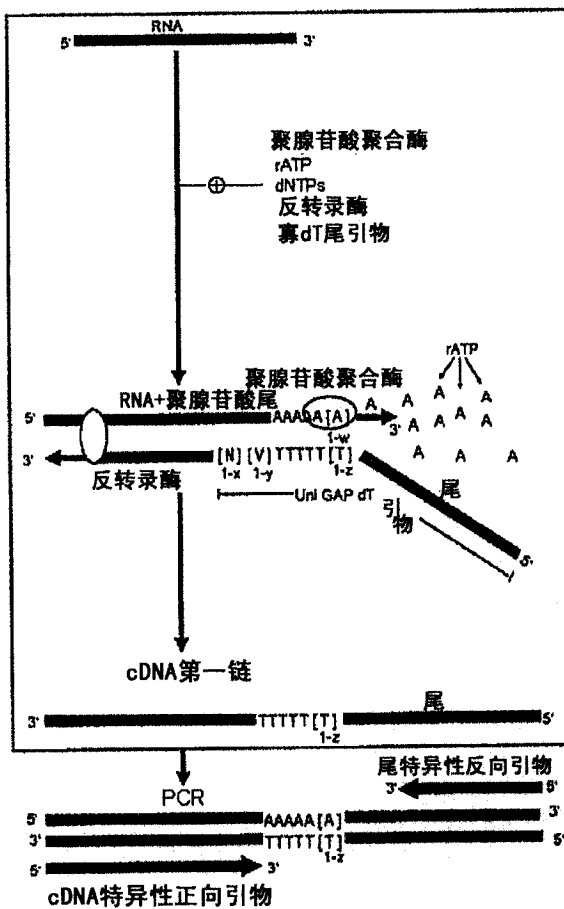


图 1

	a	b
1) PAP 缓冲液	25.50	无 Ct
2) RT 缓冲液	17.32	无 Ct
3) PAP RT 缓冲液的混合物	30.28	无 Ct
4) 二步法	25.64	无 Ct

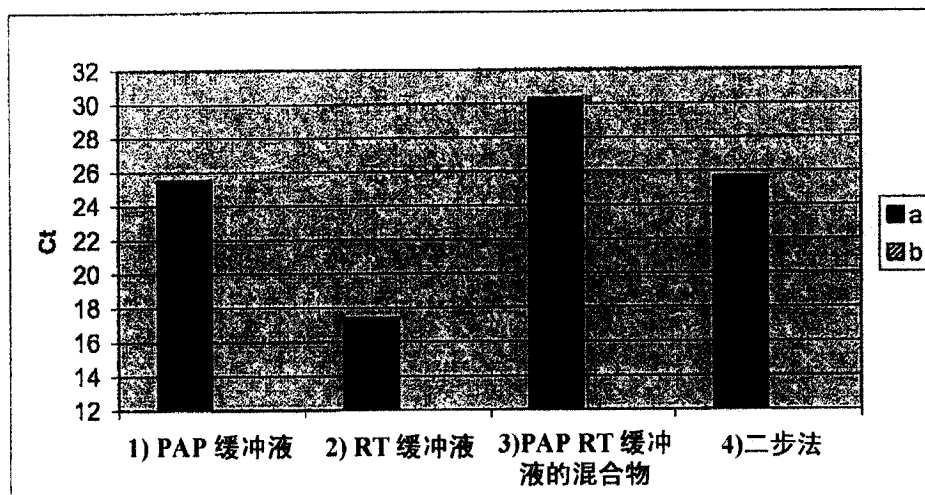


图 2

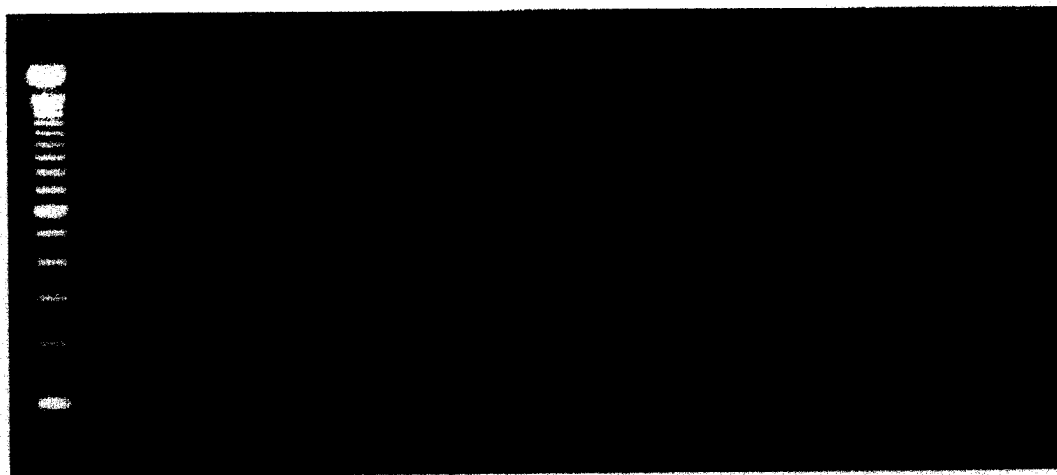


图 3

图4(表)和图5(图表)

		PAP 缓冲液	RT 缓冲液	标准 RT
反应: 1, 4, 7 RNA, 2.5 ng + mleu7a	a)	22.62	19.69	无 Ct
	b) 加倍 RT 反应	24.30	19.76	无 Ct
反应: 2, 5, 8 RNA, 2.5 ng	a)	34.69	31.41	无 Ct
	b) 加倍 RT 反应	34.20	32.77	无 Ct
反应 3, 6 PAP/RT 中的 H ₂ O	a)	无 Ct	无 Ct	
	b) 加倍 RT 反应	无 Ct	无 Ct	

图 4

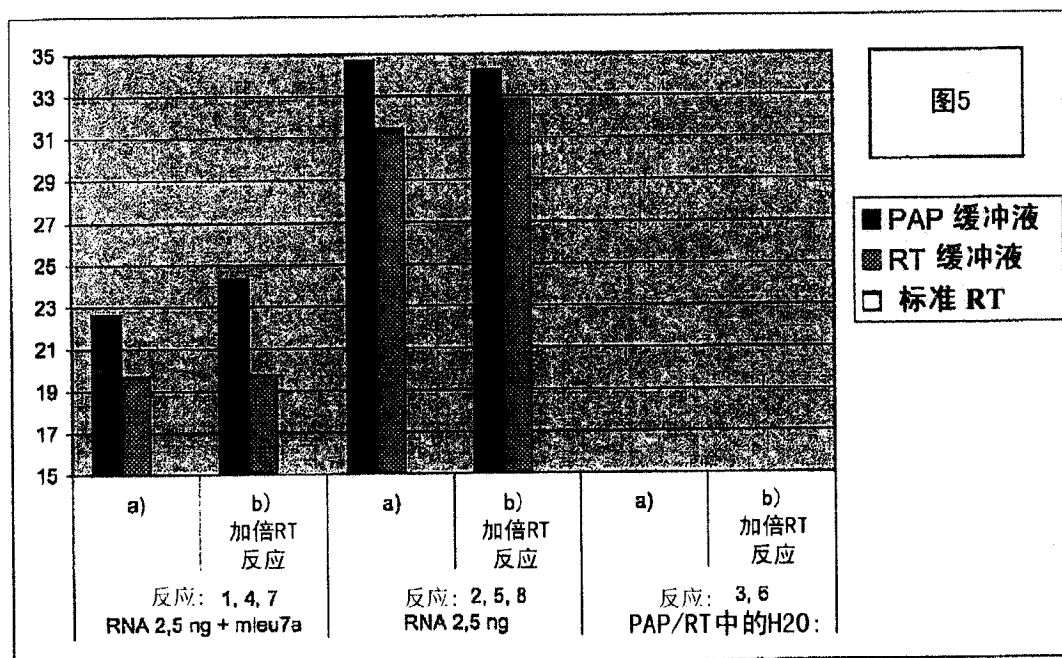


图 5

	1.) β -肌动蛋白 3' 引物	2.) leu 7short	3.) miR24	4.) miR15a	5.) miR16
b) PAP + RT	23.16	25.30	28.47	25.90	23.83
e)标准 RT	22.75	无 Ct	30.95	39.81	38.78

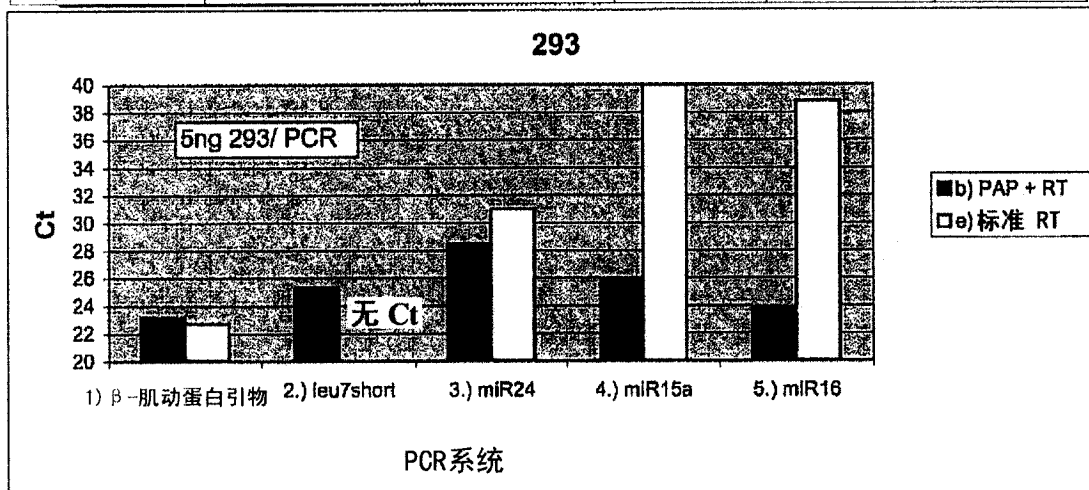


图 6

HumUni +	1.) β 肌动蛋白3' 引物	2.) leu7short	3.) miR24	4.) miR15a	5.) miR16
b) H ₂ O PAP + RT	无 Ct				
d) H ₂ O 标准 RT					
PCR中的H2O					

	6.) Hum Uni	7.) leu7short	8.) miR24	9.) miR15a	10.) miR16
a) 293 PAP + RT	无 Ct				
b) H ₂ O PAP + RT					
c) 293标准 RT					
d) H ₂ O 标准 RT					
PCR中的H2O					

图 7

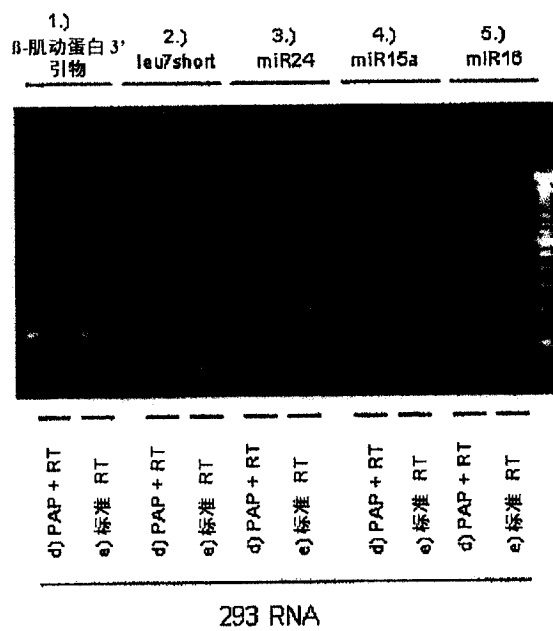


图 8

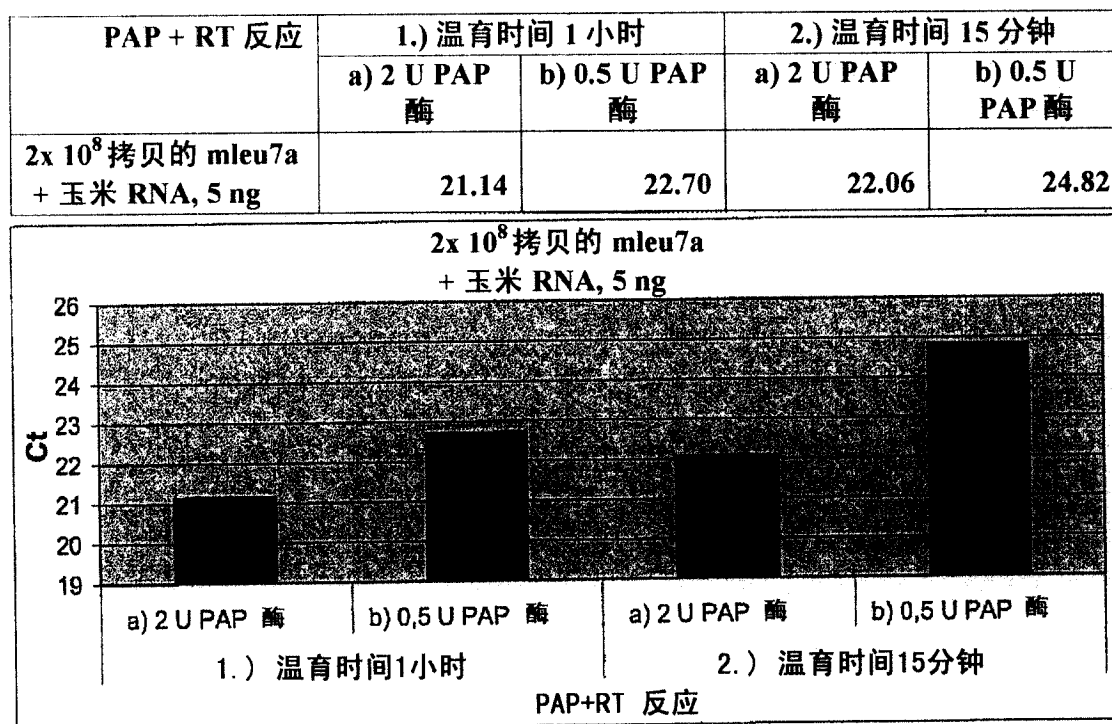


图 9

	反应	10x 缓冲液 RT (恰根公司)	反应	适合酶的 缓冲液
AMV 反转录酶, 24 U	1.)	19.95	6.)	20.23
SuperScript III 反转录酶, 10 U	2.)	16.78	7.)	15.80
HIV 反转录酶, 1 U	3.)	18.55	8.)	18.88
M-MuLV 反转录酶, 10 U	4.)	17.28	9.)	14.86
Sensiscript 反转录酶	5.)	20.75		

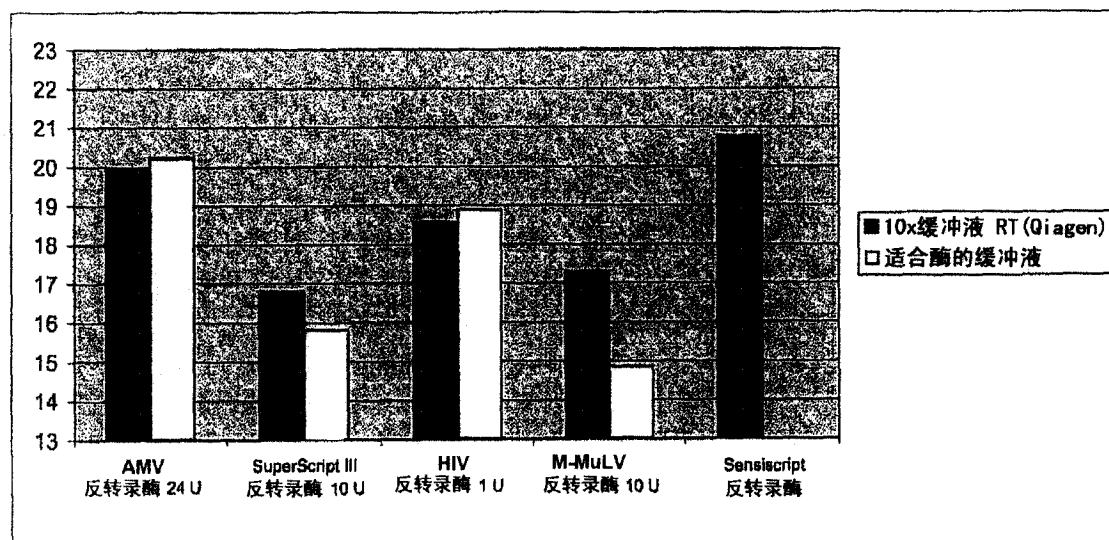


图 10

合成性miRNA		
SEQ ID NO. 1	mleu7a RNA	5'-UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U-3'
RT (尾) 引物		
SEQ ID NO. 2	Uni GAP dT	5'-TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN-3'
PCR引物		
SEQ ID NO. 3	Hum Uni	5'-AAC GAG ACG ACG ACA GAC-3'
SEQ ID NO. 4	Let 7short	5'-GAG GTA GTA GGT TGT ATA G-3'
SEQ ID NO. 5	hsa-miR-24	5'-TGG CTC AGT TCA GCA GGA-3'
SEQ ID NO. 6	hsa-miR-15a	5'-TAG CAG CAC ATA ATG GTT T-3'
SEQ ID NO. 7	hsa-miR-16	5'-TAG CAG CAC GTA AAT ATT G-3'
SEQ ID NO. 8	β-肌动蛋白3'	5'-GTA CAC TGA CTT GAG ACC AGT TGA ATA AA-3'
PCR探针		
SEQ ID NO. 9	Hum Uni	5'- HEX-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-BHQ-3' 5' 报道染料: HEX 3' 淬灭剂: 黑洞淬灭剂1

图 11

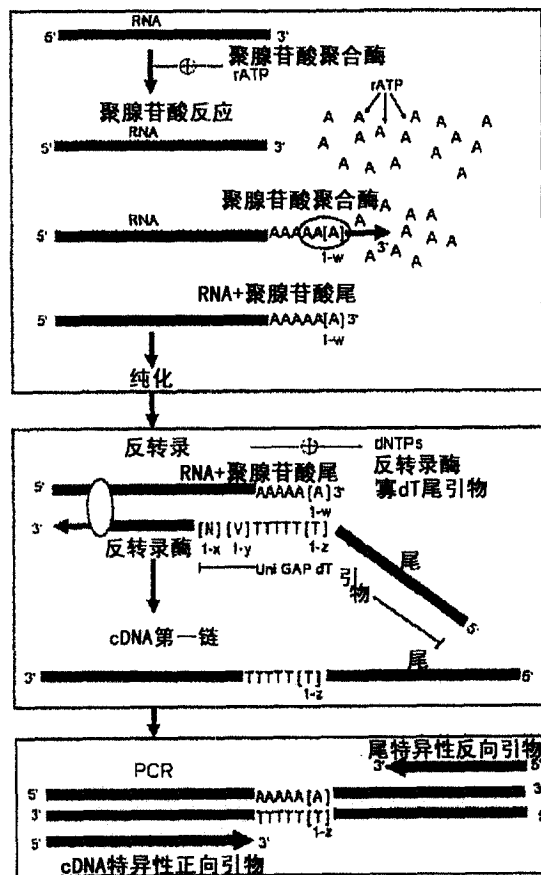
	5'-端 (5'-尾)	中间: 聚(A, C, G 或 T)	3'-端("引发核苷酸")
一般描述	不存在, 或随机, 长约 1-100 个核苷酸, 优选具有寡核苷酸结合序列, 或其混合物	优选聚(T); 一般长 15-50 个核苷酸, 当聚 T 时优选长 10-30 个核苷酸, 或其混合物	不存在或优选 VVN-3', VN-3', 或 V-3', 其中 V = A, C 或 G, 和 N = A, C, G 或 T
锚定寡核苷酸 1	$N_{(n=14-34)}$	聚(T) _(n=10-30)	VVN-3'
锚定寡核苷酸 2	$N_{(n=14-34)}$	聚(T) _(n=10-30)	VN-3'
锚定寡核苷酸 3	$N_{(n=14-34)}$	聚(T) _(n=10-30)	V-3'
锚定寡核苷酸 4	寡核苷酸的结合序列	聚(T) _(n=10-30)	VVN-3
锚定寡核苷酸 5	含有限制性界面的寡核苷酸的结合序列	聚(T) _(n=10-30)	VVN-3'
锚定寡核苷酸 6	$N_{(n=14-34)}$	聚(T) _(n=10-30)	VNN-3'
锚定寡核苷酸 7 (实施例 1)	TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (T) _x	聚(T) _(n=10-30)	VVN-3'
锚定寡核苷酸 8 (实施例 2)	AACGAGACGACGACAGAC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	VN 3'
锚定寡核苷酸 9 (实施例 3)	AACGAGACGACGACAGAC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	V 3'
锚定寡核苷酸 10 (实施例 4)	AACGAGACGACGACAGAC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	N 3'
锚定寡核苷酸 11 (实施例 5)	AACGAGACGACGACAGAC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	NN 3'
锚定寡核苷酸 12 (实施例 6)	AACGAGACGACGACAGAC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	VNN 3'
锚定寡核苷酸 13	AACGAGACGACGACAGAC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	VNNN 3'

图 12

(实施例 7)			
锚定寡核苷酸 14 (实施例 8)	AACGAGACGACGACAGAC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	NNN 3'
锚定寡核苷酸 15 (实施例 9)	TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	VN 3'
锚定寡核苷酸 16 (实施例 10)	TGG AAC GAG ACG ACG ACA GAC CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC(T) _x	聚(T) _(n=10-30)	VNN 3'

图 12(续)

A)



B)

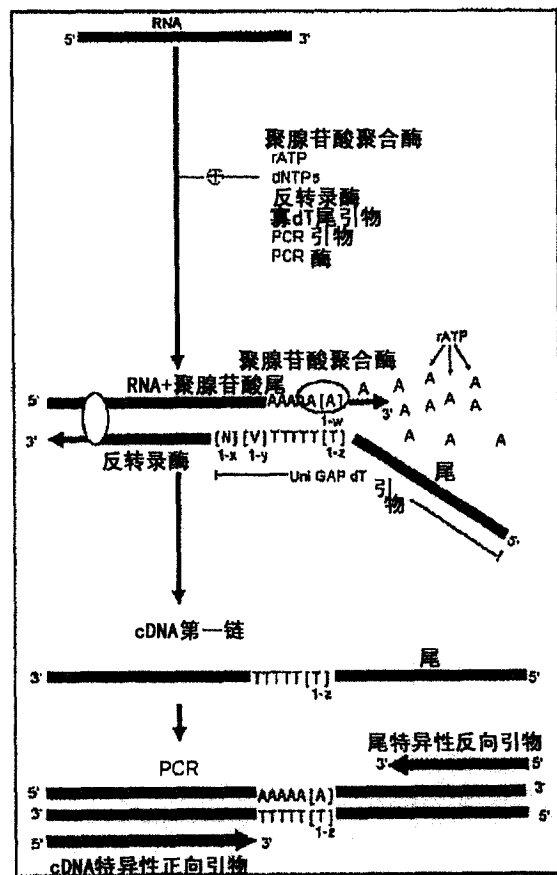


图 13

	Uni Gap dT-VVN
玉米 RNA	30.65
玉米 RNA/miRNA	20.61

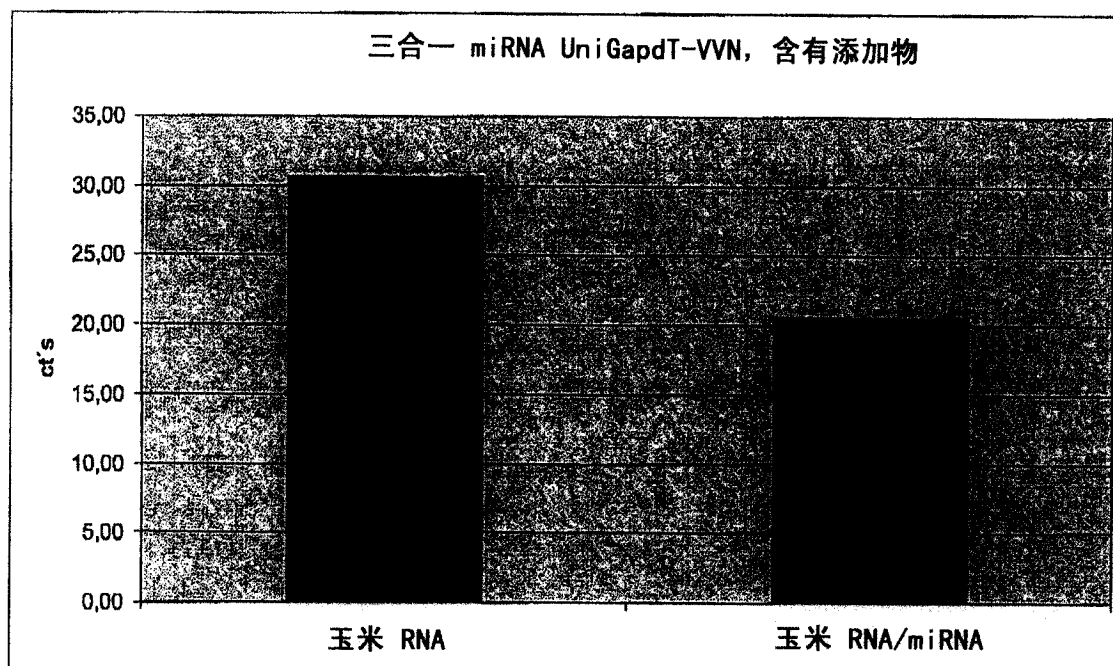


图 14

	Uni Gap dT-VVN		Uni Gap dT-VN		二步对照
	+ 添加物	- 添加物	+ 添加物	- 添加物	
玉米 RNA	无 Ct	无 Ct	无 Ct	无 Ct	N.D.
miRNA/ 玉米 RNA	33.23	28.44	25.54	29.30	29.67
无 Ct: PCR 循环 40 轮前无可检测信号; N.D.: 未实施					

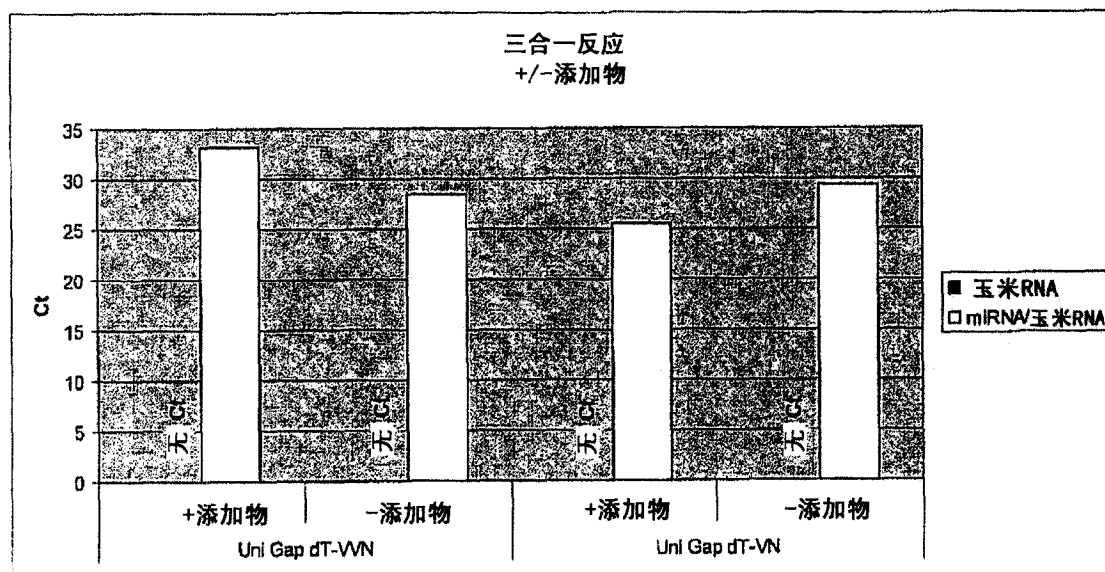


图 15

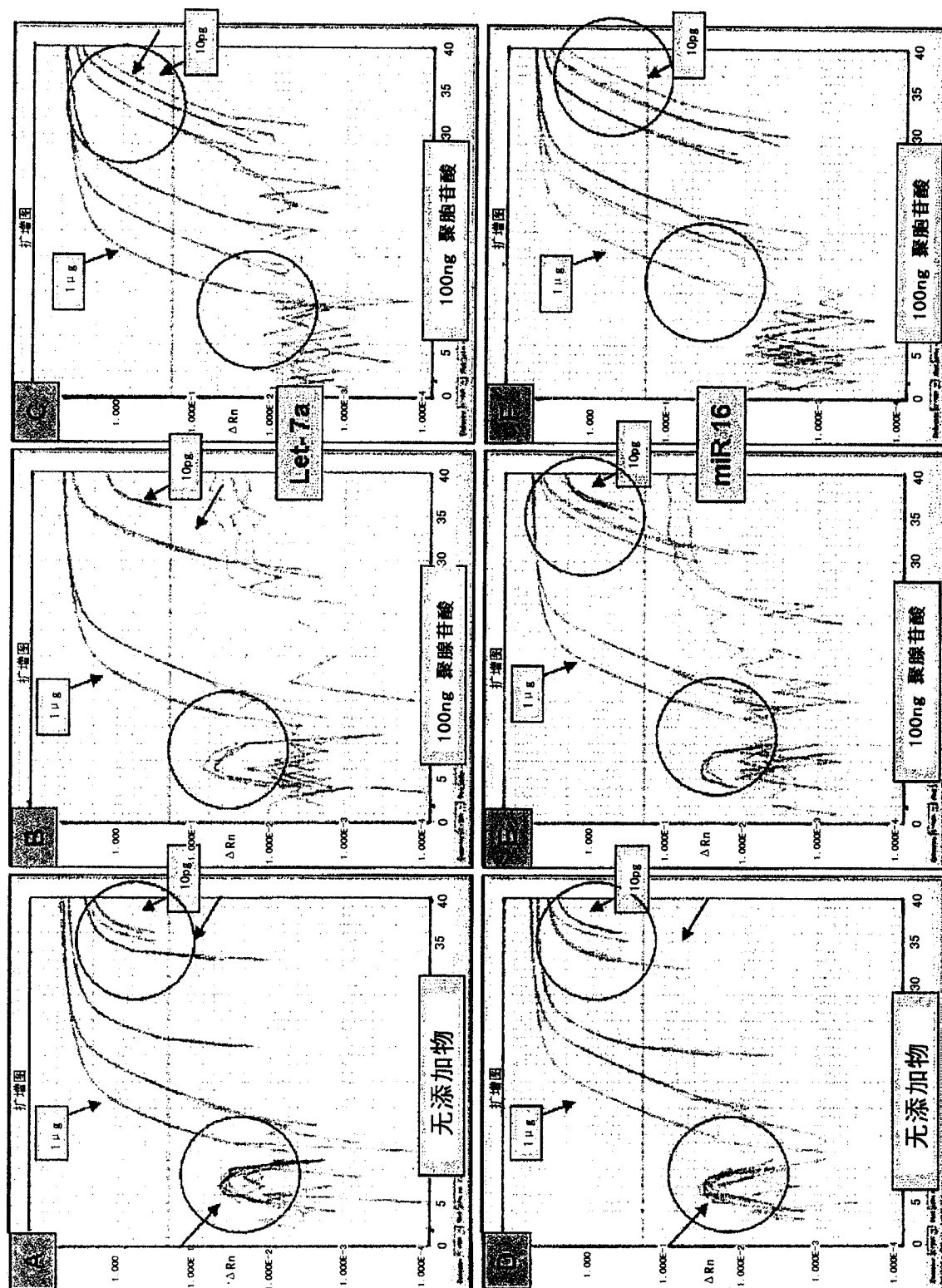


图 16

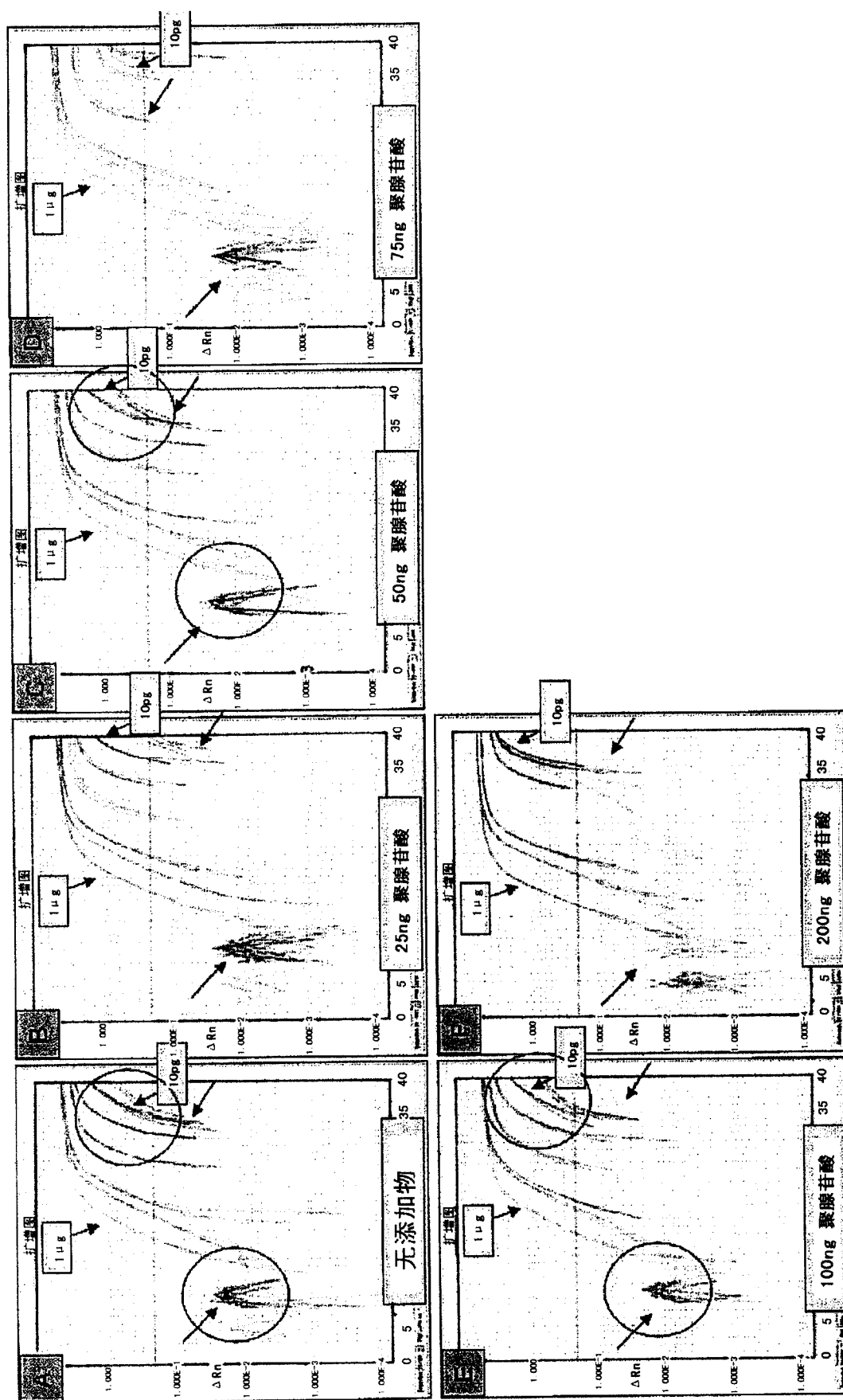


图 17

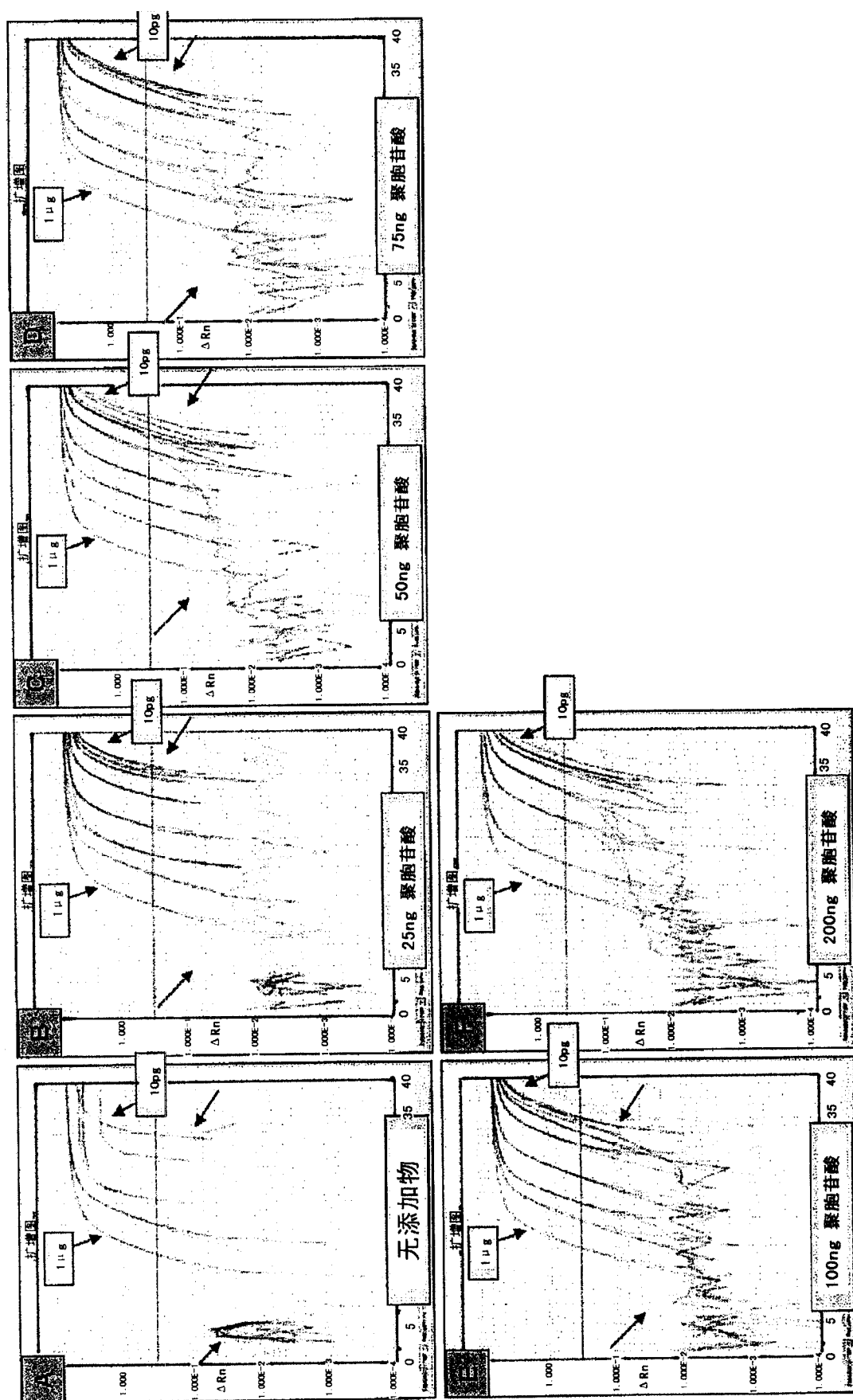


图 18

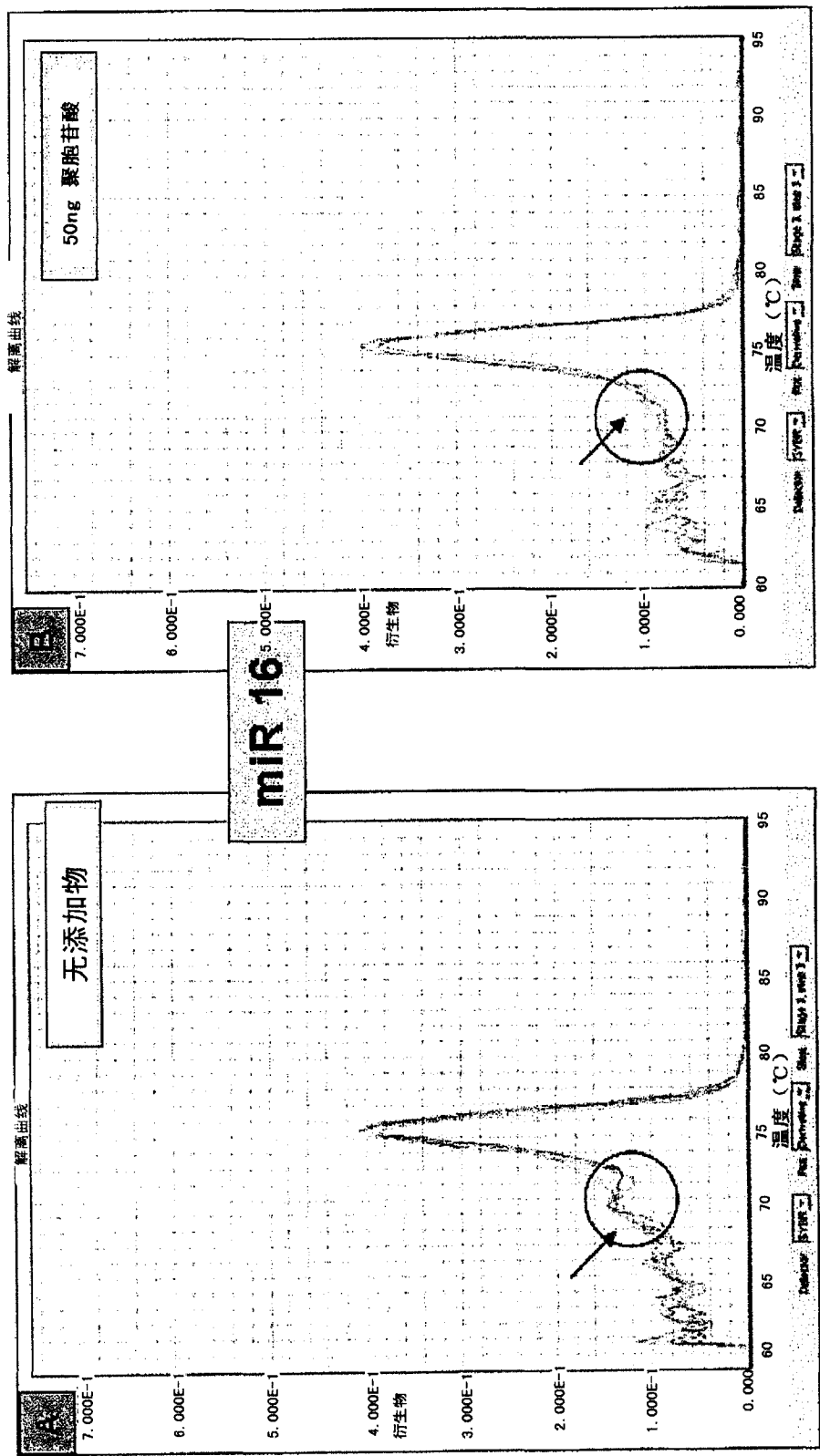


图 19

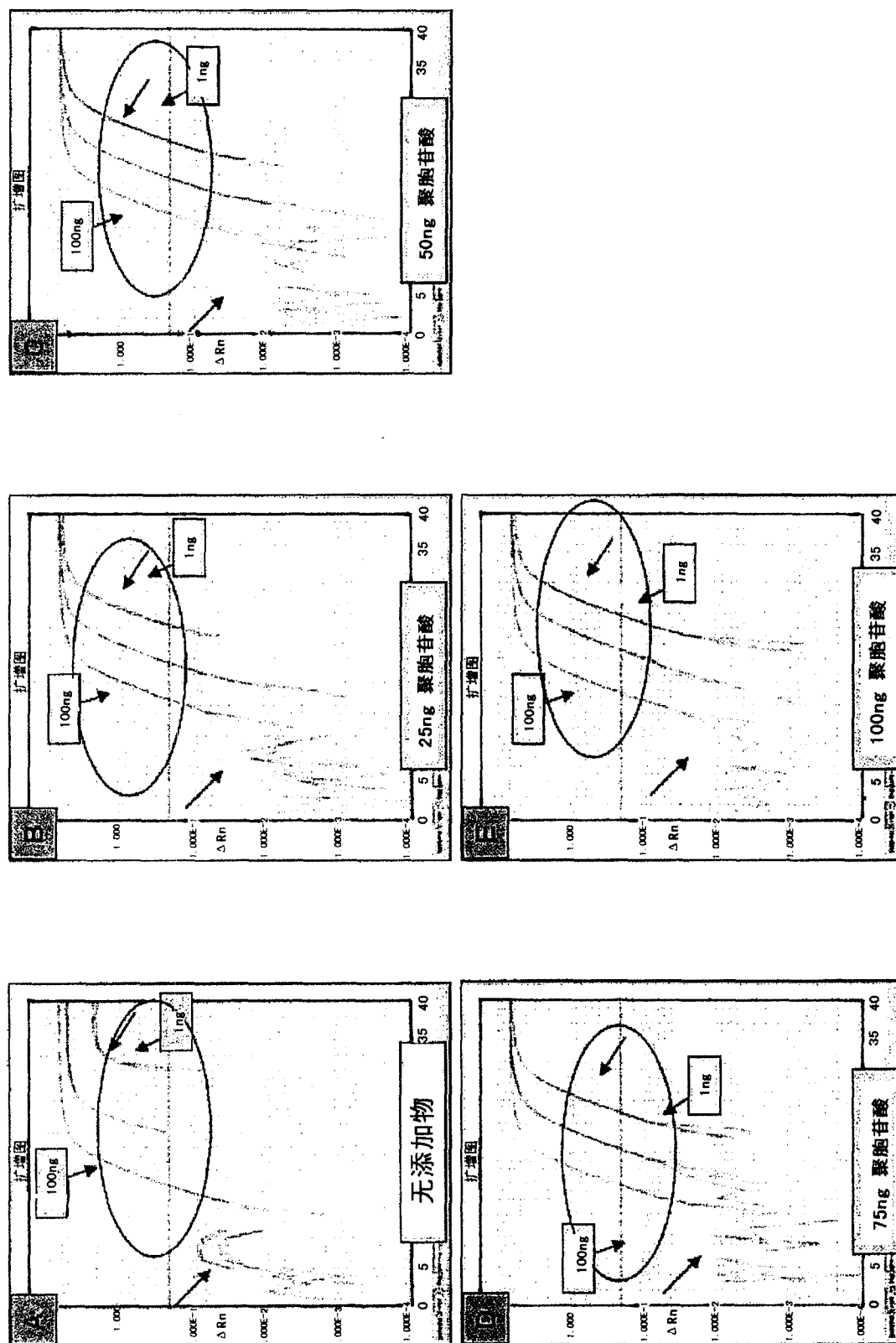


图 20

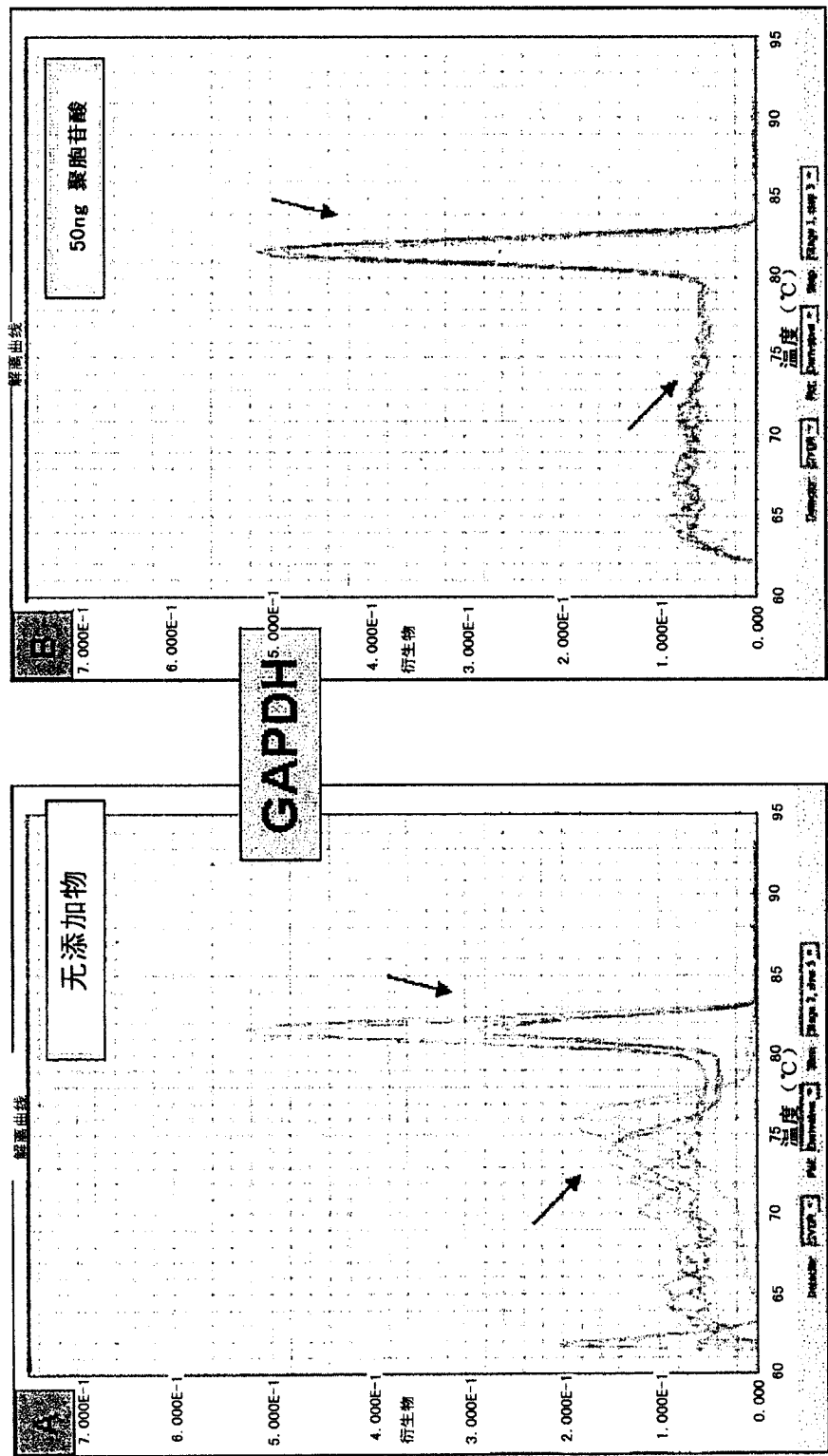


图 21

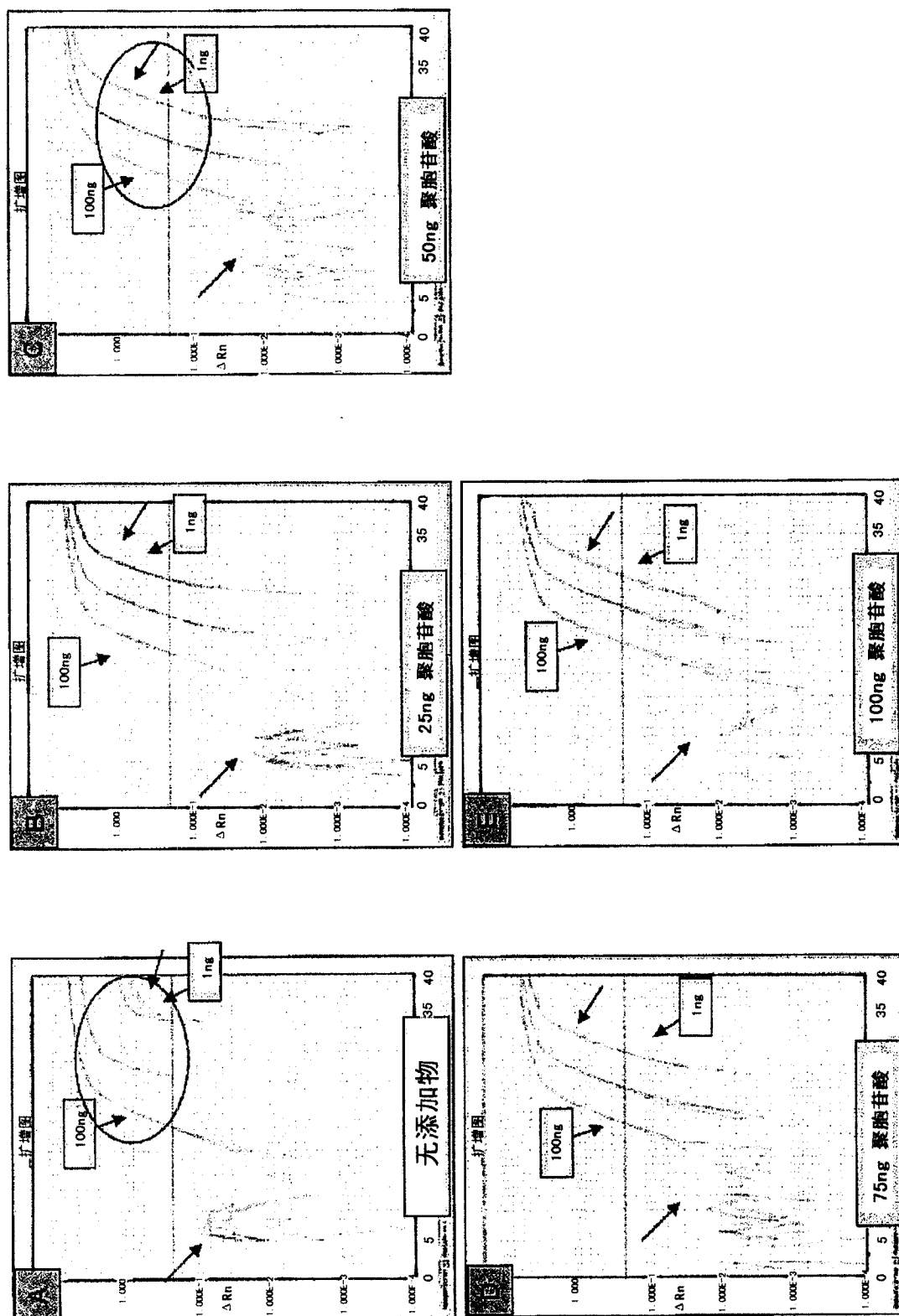


图 22

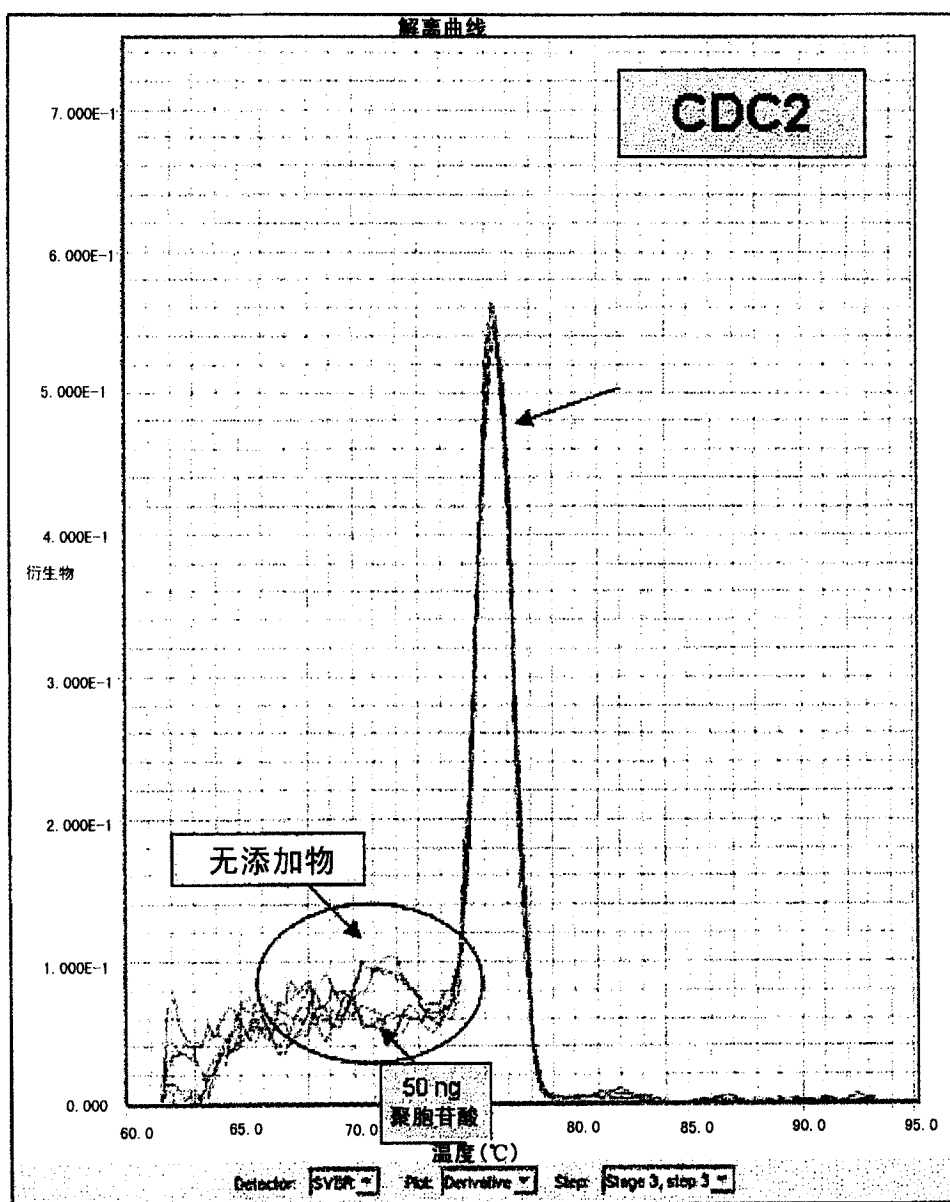


图 23