

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
30. April 2015 (30.04.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/059040 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/072291

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. Oktober 2014 (17.10.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2013 221 402.2
22. Oktober 2013 (22.10.2013) DE

(71) Anmelder: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT**
[DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder: **GUMBRECHT, Walter**; In der Röte 1, 91074
Herzogenaurach (DE). **HOFMANN, Stefan**; Am
Europakanal 14, 91056 Erlangen (DE). **HUANG, Yiwei**;
Stettiner Str. 24, 91058 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

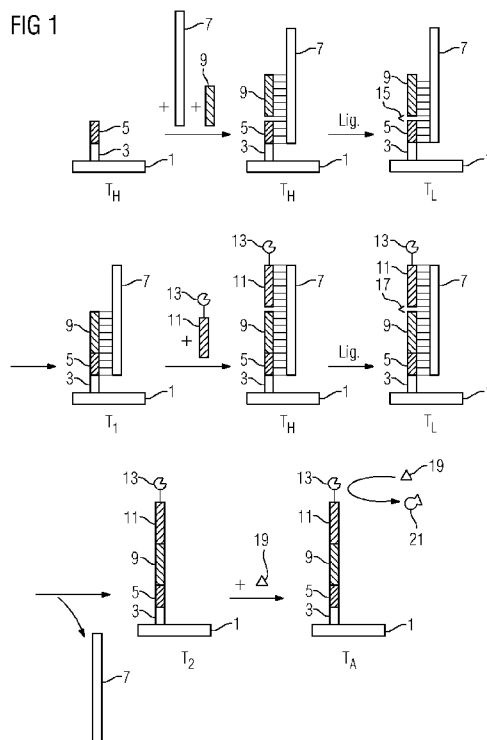
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AND QUANTIFYING A SINGLE-STRANDED TARGET NUCLEIC ACID

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR DETEKTION UND QUANTIFIZIERUNG VON EINER EINZELSTRÄNGIGEN ZIEL-
NUKLEINSÄURE



(57) Abstract: A method is described for detecting and quantifying at least one single-stranded target nucleic acid (9). The method comprises contacting at least one solid support (1) bearing at least one immobilized capture oligonucleotide (5) with at least one opposite-strand oligonucleotide (7) and at least one single-stranded target nucleic acid (9). The method further comprises ligating the target nucleic acid (9) with the capture oligonucleotide (5), contacting the support (1) with at least one reporter oligonucleotide (11) that has a label (13), and ligating the target nucleic acid (9) with the reporter oligonucleotide (11). Detection of the target nucleic acid (9) is effected by reading the label (13) of the reporter oligonucleotide (11) on the support (1).

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (9) beschrieben. Das Verfahren umfasst ein In-Kontaktbringen mindestens eines festen Trägers (1), auf dem mindestens ein Fänger-Oligonukleotid (5) immobilisiert ist, mit mindestens einem Gegenstrang-Oligonukleotid (7) und mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (9). Das Verfahren umfasst weiter ein Ligieren der Ziel-Nukleinsäure (9) mit dem Fänger-Oligonukleotid (5), ein In-Kontaktbringen des Trägers (1) mit mindestens einem Reporter-Oligonukleotid (11), das eine Markierung (13) aufweist, und ein Ligieren der Ziel-Nukleinsäure (9) mit dem Reporter-Oligonukleotid (11). Durch Auslesen der Markierung (13) des Reporter-Oligonukleotids (11) auf dem Träger (1) wird die Ziel-Nukleinsäure (9) detektiert.



Veröffentlicht:

- *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

Beschreibung

Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure.

- 10 Die Expression von Genen in Zellen unterliegt einer strengen Kontrolle und wird durch vielfältige molekulare Prozesse reguliert. Neben der komplexen Regulation der Transkription der Gene spielen auch Mechanismen auf der post-transkriptionalen Ebene, das heißt auf der Ebene der mRNA, eine wichtige Rolle.
- 15 Insbesondere können kurze, nicht-kodierende Nukleinsäure-Moleküle in die Genexpression eingreifen, indem sie sich hochspezifisch an komplementäre Sequenzen von mRNA-Molekülen anlagern und dadurch die Translation der mRNA in das entsprechende Protein regulieren. Die kurzen Nukleinsäure-Moleküle
- 20 sind häufig sog. microRNAs (kurz „miRNAs“), die in den letzten Jahren zunehmend das Interesse der molekularbiologischen und medizinischen Forschung geweckt haben. So konnte gezeigt werden, dass manche miRNAs in einem direkten Zusammenhang mit dem Entstehen bestimmter Krebserkrankungen wie Brustkrebs,
- 25 Lungenkrebs oder Leukämie stehen. Dabei weisen die Krebszellen eine erhöhte oder verminderte Anzahl spezifischer miRNAs auf. Auch bei immunologischen Erkrankungen, wie Rheuma, treten bestimmte miRNAs in veränderten Konzentrationen auf. Es wird davon ausgegangen, dass allein beim Menschen über 1000
- 30 verschiedene miRNA-Moleküle vorkommen.

- Aufgrund der wachsenden Bedeutung und der Vielzahl von miRNAs werden Verfahren zu deren spezifischer Detektion und Quantifizierung benötigt. Es sind verschiedene Verfahren zum Nach-
- 35 weis von miRNAs bekannt, beispielsweise die Sequenzierung der miRNAs oder die Amplifizierung von miRNAs mittels real-time PCR.

Die US 6,322,971 beschreibt ein hybridisierungsbasiertes Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure. Dabei wird die nachzuweisende Nukleinsäure mit einer zweiten, markierten Nukleinsäure kovalent verbunden, nachdem sich die beiden Nukleinsäuren an ein immobilisiertes Gegenstrang-Oligonukleotid angelagert haben und fehlende Nukleotide zwischen der nachzuweisenden und der markierten Nukleinsäure durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt worden sind. Ungebundene markierte Nukleinsäuren werden durch Temperaturerhöhung entfernt.

Die US 6,344,316 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, bei dem ein immobilisiertes Fänger-Oligonukleotid mit einem zweiten, markierten Oligonukleotid kovalent verbunden wird, nachdem sich die Oligonukleotide an die nachzuweisende Nukleinsäure als Gegenstrang angelagert haben. Nach dem Entfernen der nachzuweisenden Nukleinsäure durch Waschen bei hoher Temperatur bleibt die kovalent gebundene Markierung zurück.

Aus dem Stand der Technik ergeben sich verschiedene Probleme. Beispielsweise sind die Spezifität und die Sensitivität des miRNA-Nachweises unzureichend. Bei hybridisierungsbasierten Verfahren liegt die geringe Spezifität unter anderem daran, dass keine vollständige Hybridisierung der miRNA für den Identifizierungsprozess erforderlich ist. Aufgrund der geringen Sensitivität der Verfahren müssen die miRNAs häufig vor ihrem Nachweis amplifiziert werden. Dabei kann es zu einem Einbau von fehlerhaften Nukleotiden kommen, so dass die Spezifität des miRNA-Nachweises noch weiter begrenzt wird. Die Verfahren müssen außerdem bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden, weil die geringe Länge von miRNA-Hybriden mit niedrigen Schmelztemperaturen verbunden ist. Dadurch ist der miRNA-Nachweis weder besonders robust noch quantitativ auswertbar. Zudem ist für viele Verfahren ein prä-analytisches Markieren der miRNA notwendig, das die Gefahr von ungenauen Ergebnissen und von Artefakten mit sich bringt.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren, das diese Probleme löst, bereit zu stellen.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen gemäß
5 Anspruch 1 gelöst.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure umfasst die Schritte: Bereitstellen mindestens eines festen
10 Trägers, auf dem mindestens ein Fänger-Oligonukleotid immobilisiert ist, In-Kontaktbringen des Trägers bei einer ersten Hybridisierungsbedingung mit mindestens einem Gegenstrang-Oligonukleotid und mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure, das Gegenstrang-Oligonukleotid umfassend eine
15 Oligonukleotid-Sequenz mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid, eine Oligonukleotid-Sequenz komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure und eine Oligonukleotid-Sequenz mindestens abschnittsweise komplementär zu einem Reporter-Oligonukleotid, um das Fänger-
20 Oligonukleotid mindestens abschnittsweise und die Ziel-Nukleinsäure mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid zu hybridisieren, so dass ein erstes Ende der Ziel-Nukleinsäure und ein freies Ende des Fänger-Oligonukleotids mit benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids Basenpaarungen bilden. Es folgen die Schritte Ligieren des ersten Endes der
25 Ziel-Nukleinsäure mit dem freien Ende des Fänger-Oligonukleotids, um die Ziel-Nukleinsäure kovalent an das Fänger-Oligonukleotid zu binden, und Inkubieren des Trägers bei einer ersten Reaktionsbedingung derart, dass die Ziel-Nukleinsäure nur bei Gegenwart von an ihrem ersten Ende ligiertem Fänger-Oligonukleotid mit dem Träger verbunden bleibt und das Gegenstrang-Oligonukleotid nur bei Gegenwart einer Ziel-Nukleinsäure, die komplementär zu der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids und an
30 das freie Ende des Fänger-Oligonukleotids ligiert ist, mit dem Träger verbunden bleibt. Es folgen die Schritte In-Kontaktbringen des Trägers bei einer zweiten Hybridisierungsbedingung mit mindestens einem Reporter-Oligonukleotid, das

eine Markierung aufweist, um das Reporter-Oligonukleotid mindestens abschnittsweise mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid zu hybridisieren, so dass ein zweites Ende der Ziel-Nukleinsäure und ein erstes Ende des Reporter-Oligonukleotids mit benach-

5 barten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids Basenpaarungen bilden, Ligieren des zweiten Endes der Ziel-Nukleinsäure mit dem ersten Ende des Reporter-Oligonukleotids, um die Ziel-Nukleinsäure kovalent an das Reporter-Oligonukleotid zu binden, Inkubieren des Trägers bei einer zweiten Reaktionsbedingung derart, dass das Reporter-Oligonukleotid nur bei Gegenwart von an ihren beiden Enden ligierter Ziel-Nukleinsäure mit dem Träger verbunden bleibt, und Auslesen der Markierung des Reporter-Oligonukleotids auf dem Träger.

15 Der Begriff „Ziel-Nukleinsäure“ bezeichnet eine einzelsträngige Nukleinsäure mit einer Länge von etwa 10 bis etwa 50 Nukleotiden. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt sind natürlich vorkommende Nukleinsäuren sowie chemisch hergestellte oder rekombinant hergestellte Nukleinsäuren als Ziel-Nukleinsäure.

Für das erfindungsgemäße Verfahren wird zunächst mindestens ein fester Träger bereit gestellt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der feste Träger ein Chip, vorzugsweise ein Silizium-Chip. Silizium-Chips können kostengünstig hergestellt werden und bieten die Möglichkeit, zusätzliche Elemente wie beispielsweise Elektroden, Temperatursensoren oder Kühl- und Heizelemente einfach auf dem Chip zu integrieren.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist mindestens eine Elektrode, vorzugsweise eine Goldelektrode, auf der Oberfläche des Trägers integriert. Nukleinsäuren und Oligonukleotide lassen sich auf einfache Weise auf Goldoberflächen immobilisieren. Die Elektrode kann für ein elektrochemisches Auslesen der Markierung verwendet werden, insbesondere zum Messen eines Stroms.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist der feste Träger eine Temperatursteuerung und/oder einen Temperatursensor auf. Damit kann eine Temperatur des festen Trägers eingestellt bzw. gemessen werden. In einer weiteren Ausführungsform umfasst der feste Träger Kühl- und/oder Heizelemente zum Abkühlen bzw. Erwärmen des Trägers.

Auf dem festen Träger ist mindestens ein Fänger-Oligonukleotid immobilisiert. Der Begriff „Oligonukleotid“ bezeichnet eine Nukleinsäure. Der Begriff umfasst sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäuren. Der Begriff umfasst sowohl RNA-Moleküle, sog. Oligoribonukleotide, als auch DNA-Moleküle, sog. Oligodesoxyribonukleotide.

Das Fänger-Oligonukleotid umfasst eine Oligonukleotid-Sequenz, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Gegenstrang-Oligonukleotid ist. Der Abschnitt des Fänger-Oligonukleotids, dessen Sequenz komplementär zu dem Gegenstrang-Oligonukleotid ist, weist vorzugsweise eine Länge von bis etwa 30 Nukleotide auf.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Fänger-Oligonukleotid ein einzelsträngiges Fänger-Oligonukleotid.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Fänger-Oligonukleotid ein Oligodesoxyribonukleotid.

In einer weiteren Ausführungsform ist das Fänger-Oligonukleotid über eine Thiol-Gruppe auf dem Träger immobilisiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Fänger-Oligonukleotid über einen Spacer auf dem Träger immobilisiert. Die Verwendung des Spacers ermöglicht die effiziente Hybridisierung des Fänger-Oligonukleotids mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid. Der Spacer ist vorzugsweise aus Thymidinnukleotiden aufgebaut. Er kann über eine Thiol-Gruppe auf dem Träger immobilisiert sein.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird anschließend der Träger bei einer ersten Hybridisierungsbedingung mit mindestens einem Gegenstrang-Oligonukleotid und mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure in Kontakt gebracht.

Das Gegenstrang-Oligonukleotid ist ein einzelsträngiges Oligonukleotid, das mindestens die folgenden Oligonukleotid-Sequenzen umfasst: eine Oligonukleotid-Sequenz, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid ist, eine Oligonukleotid-Sequenz, die komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure ist, und eine Oligonukleotid-Sequenz, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Reporter-Oligonukleotid ist. Somit können das Fänger-Oligonukleotid und das Reporter-Oligonukleotid jeweils mindestens abschnittsweise und die Ziel-Nukleinsäure mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid hybridisieren.

Die Abschnitte des Gegenstrang-Oligonukleotids, deren Sequenzen komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid oder dem Reporter-Oligonukleotid sind, weisen vorzugsweise jeweils eine Länge von bis etwa 30 Nukleotide auf.

Der Begriff „hybridisieren“ bezeichnet das Anlagern einer einzelsträngigen RNA oder DNA an eine mindestens abschnittsweise komplementäre einzelsträngige RNA oder DNA unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils komplementären Basen, so dass sich in dem zueinander komplementären Abschnitt zwischen den zwei Nukleinsäure-Molekülen Basenpaarungen bilden. Der Begriff „Basenpaarung“ umfasst sowohl Watson-Crick-Basenpaarungen als auch nicht Watson-Crick-Basenpaarungen wie die sog. Wobble-Basenpaarung. Eine typische Wobble-Basenpaarung ist eine Basenpaarung von Guanin mit Uracil, die sich beispielsweise beim Anlagern einer DNA an eine RNA bilden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids, die komplementär zu

der Ziel-Nukleinsäure ist, vollständig komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure. Somit kann die Ziel-Nukleinsäure vollständig mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid hybridisieren. Vollständiges Hybridisieren bedeutet, dass jede einzelne Base der Ziel-Nukleinsäure eine Basenpaarung mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid bildet und damit kein einziger Basen-Mismatch vorliegt.

Die Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid ist, grenzt unmittelbar an die Oligonukleotid-Sequenz an, die komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure ist. Dadurch bilden das erste Ende der Ziel-Nukleinsäure und das freie Ende des Fänger-Oligonukleotids mit unmittelbar anschließend benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids Basenpaarungen. Damit sind die zu ligierenden Enden des Fänger-Oligonukleotids und der Ziel-Nukleinsäure benachbart angeordnet und können ohne ein vorheriges Auffüllen von fehlenden Nukleotiden unmittelbar miteinander ligiert werden. Weil fehlende Nukleotide für das Ligieren des Fänger-Oligonukleotids mit der Ziel-Nukleinsäure nicht aufgefüllt werden müssen, kann das Verfahren besonders einfach und schnell durchgeführt werden.

An das andere Ende der Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids, die komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure ist, grenzt unmittelbar die Oligonukleotid-Sequenz an, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Reporter-Oligonukleotid ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Ziel-Nukleinsäure vollständig komplementär zu der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids, so dass die Ziel-Nukleinsäure hochspezifisch nachgewiesen und/oder quantifiziert werden kann.

Der Begriff „Hybridisierungsbedingung“ bezeichnet mindestens einen Parameter oder eine Kombination von Parametern, bei

dem/der mindestens einer der Hybridisierungsschritte des Verfahrens durchgeführt wird. Die Hybridisierungsbedingung ist eine Bedingung, bei der sich das Fänger-Oligonukleotid, die Ziel-Nukleinsäure und/oder das Reporter-Oligonukleotid an die jeweils dazu komplementären Abschnitte des Gegenstrang-Oligonukleotids unter Bildung von Basenpaarungen anlagern. Die Parameter umfassen vorzugsweise eine Temperatur, eine Salzkonzentration, eine Ionenstärke, einen pH-Wert und/oder einen Zusatz von Reagenzien wie beispielsweise Formamid.

Die Hybridisierungsbedingung ist insbesondere eine Temperatur.

Die erste Hybridisierungsbedingung ist die Hybridisierungsbedingung, bei der das Fänger-Oligonukleotid mindestens abschnittsweise und die Ziel-Nukleinsäure mit den jeweils dazu komplementären Abschnitten des Gegenstrang-Oligonukleotids hybridisieren. Die erste Hybridisierungsbedingung wird vorzugsweise in Abhängigkeit der Sequenz und der Länge des Fänger-Oligonukleotids und der Ziel-Nukleinsäure gewählt. Die Wahl der ersten Hybridisierungsbedingung kann weiterhin davon abhängen, ob das Fänger-Oligonukleotid, das Gegenstrang-Oligonukleotid bzw. die Ziel-Nukleinsäure RNA- und/oder DNA-Moleküle sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erste Hybridisierungsbedingung eine Temperatur von 40°C bis 45°C, besonders bevorzugt eine Temperatur von 45°C, bei 66 mM Tris/HCl pH 7,6; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol (DTT); 1 mM Adenosintriphosphat (ATP); 7,5% PEG6000 und 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA).

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiter das Ligieren des ersten Endes der Ziel-Nukleinsäure mit dem freien Ende des Fänger-Oligonukleotids, um die Ziel-Nukleinsäure kovalent an das Fänger-Oligonukleotid zu binden. Die Begriffe „Ligieren“ und „Ligation“ bezeichnen die Ausbildung einer kovalenten chemischen Bindung zwischen zwei einzelsträngigen

Oligonukleotiden an deren Zucker-Phosphat-Rückgrat. Der Begriff umfasst die Bindung des 3'-Hydroxyl-Endes einzelsträngiger RNA oder DNA an das 5'-Phosphoryl-Ende einer zweiten RNA oder DNA, wobei auch ein Ligieren von RNA und DNA umfasst ist. Die Herstellung der kovalenten Bindung kann durch Enzyme, die sog. Ligasen, vorzugsweise DNA-Ligasen, katalysiert werden und ist ATP-abhängig.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiter das Inkubieren des Trägers bei einer ersten Reaktionsbedingung derart, dass die Ziel-Nukleinsäure nur bei Gegenwart von an ihrem ersten Ende ligiertem Fänger-Oligonukleotid mit dem Träger verbunden bleibt und das Gegenstrang-Oligonukleotid nur bei Gegenwart einer Ziel-Nukleinsäure, die komplementär zu der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids und an das freie Ende des Fänger-Oligonukleotids ligiert ist, mit dem Träger verbunden bleibt.

Der Begriff „Reaktionsbedingung“ bezeichnet mindestens einen Parameter oder eine Kombination von Parametern, bei dem/der mindestens einer der Inkubationsschritte des Verfahrens durchgeführt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Reaktionsbedingung eine geeignete Bedingung für das Aufschmelzen von Basenpaarungen von Fänger-Oligonukleotid, Ziel-Nukleinsäure, Reporter-Oligonukleotid und Gegenstrang-Oligonukleotid. Die Parameter umfassen vorzugsweise eine Temperatur, eine Salzkonzentration, eine Ionenstärke, einen pH-Wert und/oder einen Zusatz von Reagenzien wie beispielsweise Formamid.

Die Reaktionsbedingung ist insbesondere eine Temperatur.

Die erste Reaktionsbedingung ist die Reaktionsbedingung, bei der die Basenpaarung des Gegenstrang-Oligonukleotids mit dem Fänger-Oligonukleotid und die Basenpaarung des Gegenstrang-Oligonukleotids mit der Ziel-Nukleinsäure aufschmilzt, falls die Ziel-Nukleinsäure zu der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids nicht komplementär

ist. In diesem Fall werden die Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils gepaarten Basen aufgehoben und das Gegenstrang-Oligonukleotid löst sich von dem Träger. In diesem Fall ist die Ziel-Nukleinsäure auch nicht an ihrem ersten Ende mit dem Fänger-Oligonukleotid ligiert, so dass sich die Ziel-Nukleinsäure bei Inkubieren des Trägers bei der ersten Reaktionsbedingung ebenfalls von dem Träger löst.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erste Reaktionsbedingung eine höhere Temperatur und/oder eine geringere Ionenstärke als die erste Hybridisierungsbedingung. Dadurch wird das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils gepaarten Basen bei der zweiten Reaktionsbedingung erleichtert.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erste Reaktionsbedingung eine Temperatur von 45°C bis 55°C, besonders bevorzugt eine Temperatur von 50°C, bei 20 mM Tris/HCl pH 7,6 und 20 mM NaCl.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird anschließend der Träger bei einer zweiten Hybridisierungsbedingung mit mindestens einem Reporter-Oligonukleotid in Kontakt gebracht, um das Reporter-Oligonukleotid mindestens abschnittsweise mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid zu hybridisieren. Das Reporter-Oligonukleotid umfasst eine Oligonukleotid-Sequenz, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Gegenstrang-Oligonukleotid ist. Der Abschnitt des Reporter-Oligonukleotids, dessen Sequenz komplementär zu dem Gegenstrang-Oligonukleotid ist, weist vorzugsweise eine Länge von bis etwa 30 Nukleotide auf.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Reporter-Oligonukleotid ein einzelsträngiges Reporter-Oligonukleotid.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Reporter-Oligonukleotid ein Oligodesoxyribonukleotid.

Die zweite Hybridisierungsbedingung ist die Hybridisierungsbedingung, bei der das Reporter-Oligonukleotid mindestens abschnittsweise mit dem dazu komplementären Abschnitt des Gegenstrang-Oligonukleotids hybridisiert. Die zweite Hybridisierungsbedingung wird vorzugsweise in Abhängigkeit der Sequenz und der Länge des Reporter-Oligonukleotids gewählt. Die Wahl der zweiten Hybridisierungsbedingung kann weiterhin davon abhängen, ob das Reporter-Oligonukleotid und das Gegenstrang-Oligonukleotid RNA- und/oder DNA-Moleküle sind. Die zweite Hybridisierungsbedingung kann mit der ersten Hybridisierungsbedingung übereinstimmen.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die zweite Hybridisierungsbedingung eine Temperatur von 35°C bei 66 mM

Tris/HCl pH 7,6; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM ATP; 7,5% PEG6000 und 1 mg/ml BSA.

Die Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Reporter-Oligonukleotid ist, grenzt unmittelbar an die Oligonukleotid-Sequenz an, die komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure ist. Dadurch bilden das zweite Ende der Ziel-Nukleinsäure und das erste Ende des Reporter-Oligonukleotids mit unmittelbar anschließend benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids Basenpaarungen. Damit sind die zu ligierenden Enden der Ziel-Nukleinsäure und des Reporter-Oligonukleotids benachbart angeordnet und können ohne ein vorheriges Auffüllen von fehlenden Nukleotiden unmittelbar miteinander ligiert werden. Weil fehlende Nukleotide für das Ligieren des Reporter-Oligonukleotids mit der Ziel-Nukleinsäure nicht aufgefüllt werden müssen, kann das Verfahren besonders einfach und schnell durchgeführt werden.

Das Reporter-Oligonukleotid weist eine Markierung auf. Der Begriff „Markierung“ bezeichnet eine Eigenschaft des Reporter-Oligonukleotids, die zum Anzeigen der Anwesenheit des Reporter-Oligonukleotids auf dem Träger verwendet werden kann. Die Markierung ist vorzugsweise ein Reportermolekül, das di-

rekt oder indirekt mit dem Reporter-Oligonukleotid verbunden ist und ein auslesbares Signal erzeugen kann. Das Reportertermolekül kann beispielsweise ein Enzym, insbesondere eine Esterase, oder ein Fluoreszenzfarbstoff sein. Das Reportertermolekül kann an einem zweiten Ende des Reporter-Oligonukleotids angebracht sein. Das Reportertermolekül kann auch zwischen den beiden Enden des Reporter-Oligonukleotids, beispielsweise an eine Base gebunden, mit dem Reporter-Oligonukleotid verbunden sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Markierung ein Abschnitt des Reporter-Oligonukleotids, der ein Adapter ist. An den Adapter wird in einem oder mehreren nachfolgenden Schritten mindestens ein Reportertermolekül direkt oder indirekt angebracht. Vorzugsweise ist der Adapter eine universell eingesetzte Oligonukleotid-Sequenz.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiter das Ligieren des zweiten Endes der Ziel-Nukleinsäure mit dem ersten Ende des Reporter-Oligonukleotids, um die Ziel-Nukleinsäure kovalent an das Reporter-Oligonukleotid zu binden.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiter das Inkubieren des Trägers bei einer zweiten Reaktionsbedingung derart, dass das Reporter-Oligonukleotid nur bei Gegenwart von an ihren beiden Enden ligierter Ziel-Nukleinsäure mit dem Träger verbunden bleibt.

Die zweite Reaktionsbedingung ist die Reaktionsbedingung, bei der die Basenpaarung des Gegenstrang-Oligonukleotids mit dem Fänger-Oligonukleotid, der Ziel-Nukleinsäure und dem Reporter-Oligonukleotid aufgeschmolzen wird. Dabei werden die Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils gepaarten Basen aufgebrochen. Ist die Ziel-Nukleinsäure nicht an beiden Enden ligiert, löst sich das Reporter-Oligonukleotid von dem Träger. Die zweite Reaktionsbedingung kann mit der ersten Reaktionsbedingung übereinstimmen.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die zweite Reaktionsbedingung eine höhere Temperatur und/oder eine geringere Ionenstärke als die zweite Hybridisierungsbedingung. Dadurch wird das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils gepaarten Basen bei der zweiten Reaktionsbedingung erleichtert.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die zweite Reaktionsbedingung eine Temperatur von 55°C bei 2 mM Tris/HCl pH 7,6 und 2 mM NaCl.

In einer Ausführungsform löst sich das Gegenstrang-Oligonukleotid von dem Träger, indem es sich von dem Fänger-Oligonukleotid, der Ziel-Nukleinsäure und dem Reporter-Oligonukleotid löst.

In einer weiteren Ausführungsform verbleibt das Gegenstrang-Oligonukleotid auf dem Träger. Um dies zu erreichen, weist die zweite Reaktionsbedingung im Vergleich zu der Reaktionsbedingung, bei der sich das Gegenstrang-Oligonukleotid von dem Träger löst, vorzugsweise eine niedrigere Temperatur und/oder eine höhere Ionenstärke auf. Aufgrund eines Energiegewinns durch die zwei Ligationen wirkt die Anwesenheit des Gegenstrang-Oligonukleotids, das mit dem Fänger-Oligonukleotid, der Ziel-Nukleinsäure und dem Reporter-Oligonukleotid durch Basenpaarungen verbunden ist, energetisch stabilisierend. Durch die Stabilisierung kann das Auslesen der Markierung auf dem Träger unter milderer Bedingungen im Vergleich zur Abwesenheit des Gegenstrang-Oligonukleotids durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiter das Auslesen der Markierung des Reporter-Oligonukleotids auf dem Träger. Mit der Anwesenheit der Markierung auf dem Träger wird nachgewiesen, dass die Ziel-Nukleinsäure an ihren beiden Enden ligiert wurde, wobei das erste Ende der Ziel-Nukleinsäure mit dem freien Ende des Fänger-Oligonukleotids und das zweite Ende der Ziel-Nukleinsäure mit dem ersten Ende des Reporter-

Oligonukleotid ligiert wurde. Da das Reporter-Oligonukleotid nur bei Gegenwart von an ihren beiden Enden ligierter Ziel-Nukleinsäure mit dem Träger verbunden bleibt, wird durch Nachweisen der Markierung des Reporter-Oligonukleotids auf dem Träger die Ziel-Nukleinsäure detektiert. Der Nachweis der Markierung auf dem Träger kann auch der Quantifizierung der Ziel-Nukleinsäure dienen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden zwei oder mehr Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens miteinander kombiniert. Dadurch kann das Verfahren besonders effizient durchgeführt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Schritt b) mit Schritt c) und/oder Schritt e) mit Schritt f) kombiniert. Dazu können die für das Ligieren erforderlichen Reagenzien wie beispielsweise Ligase schon in Schritt b) bzw. Schritt e) dem Träger zugeführt werden.

In einer weiteren Ausführungsform erfolgen Schritt b) und Schritt c) und/oder Schritt e) und Schritt f) nacheinander. Das Durchführen von Hybridisierung und Ligation in separaten Verfahrensschritten führt zu einer verbesserten Ligationseffizienz sowie zu geringeren unspezifischen Reaktionen. Zudem vereinfacht es die Anwendung des Verfahrens auf Ziel-Nukleinsäuren biologischer Proben.

Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, dass die Ziel-Nukleinsäure direkt detektiert und/oder quantifiziert wird. Insbesondere ist es nicht notwendig, die Ziel-Nukleinsäure chemisch oder enzymatisch zu modifizieren. Da bestimmte Ziel-Nukleinsäuren bevorzugt eine Modifizierung eingehen, kann die Quantifizierung von modifizierten Ziel-Nukleinsäuren zu ungenauen Ergebnissen führen. Diese Ungenauigkeiten werden durch den direkten Nachweis der Ziel-Nukleinsäure vermieden. Ferner werden Artefakte, die beim Modifizieren der Ziel-Nukleinsäure auftreten können, vermieden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist sehr sensitiv, so dass auch geringe Mengen der Ziel-Nukleinsäure nachgewiesen werden

können. Dadurch ist es nicht notwendig, die Ziel-Nukleinsäure vor der Identifizierung zu amplifizieren, so dass auch keine falschen Nukleotide in die Ziel-Nukleinsäure eingebaut werden. Dadurch wird die Spezifität des Verfahrens erhöht.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren weist dadurch, dass beide Enden der Ziel-Nukleinsäure an deren Identifizierung beteiligt sind, eine hohe Selektivität auf.

10 Durch die zwei Ligationen wird das Reporter-Oligonukleotid über die Ziel-Nukleinsäure und das Fänger-Oligonukleotid kovalent an den Träger gebunden. Damit ist der Nachweis der Markierung des Reporter-Oligonukleotids unabhängig von der Sequenz und der Länge der Oligonukleotide und der Ziel-

15 Nukleinsäure, die zu der Temperaturabhängigkeit der Anlagerung von Reporter-Oligonukleotid, Ziel-Nukleinsäure und Fänger-Oligonukleotid an das Gegenstrang-Oligonukleotid führen. Dies hat den Vorteil, dass das Auslesen der Markierung auch bei Bedingungen durchgeführt werden kann, bei denen keine

20 stabile Basenpaarung möglich ist. Dadurch kann das Auslesen der Markierung bei optimalen Bedingungen, beispielsweise bei einer optimal an die Art der verwendeten Markierung angepassten Auslesetemperatur und/oder Ausleseionenstärke durchgeführt werden, ohne dass auf eine stabile Basenpaarung Rücksicht genommen werden muss. Dadurch werden unspezifische Hintergrundsignale verringert und ein hochsensitives Auslesen der Markierung ermöglicht. Dies trägt zu der hohen Sensitivität des Verfahrens bei. Des Weiteren wird durch die stabile kovalente Bindung des Reporter-Oligonukleotids an den Träger

25 ein robustes und quantitativ auswertbares Auslesen der Markierung ermöglicht.

30

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, dass das Gegenstrang-Oligonukleotid in Schritt d) nur

35 bei Gegenwart einer Ziel-Nukleinsäure, die komplementär zu der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids ist, mit dem Träger verbunden bleibt. Dadurch wird verhindert, dass sich das in Schritt e) hinzugefügte Re-

porter-Oligonukleotid an ein Gegenstrang-Oligonukleotid anlagert, an das keine Ziel-Nukleinsäure hybridisiert ist. Die Bindung von Reporter-Oligonukleotid an ein solches "negatives" Gegenstrang-Oligonukleotid kann selbst durch ein Waschen
5 des Trägers bei hoher Temperatur nur schwer vollständig gelöst werden. Daraus resultierende unspezifische Signale werden durch das Entfernen von Gegenstrang-Oligonukleotiden, an die keine komplementäre Ziel-Nukleinsäure hybridisiert ist, von dem Träger bevor der Träger mit dem Reporter-
10 Oligonukleotid in Kontakt gebracht wird, verhindert. Dadurch wird die Spezifität des Verfahrens erhöht.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt vor Schritt c) und/oder in Schritt d) und/oder vor Schritt f) und/oder in
15 Schritt g) und/oder vor Schritt h) zusätzlich ein Waschen des Trägers. Durch das Waschen werden ungebundene Nukleinsäuren, ungebundene Reporter-Oligonukleotide und/oder gelöste Gegenstrang-Oligonukleotide von dem Träger entfernt. Dadurch wird insbesondere ein Wiederanlagern des Gegenstrang-
20 Oligonukleotids an ein freies Fänger-Oligonukleotid auf dem Träger, an das keine Ziel-Nukleinsäure ligiert ist, und ein Anlagern des Reporter-Oligonukleotids an dieses Gegenstrang-Oligonukleotid während des Auslesen der Markierung vermieden. Dies erhöht die Spezifität des Nachweises der Markierung auf
25 dem Träger und damit die Spezifität der Detektion der Ziel-Nukleinsäure.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Waschen des Trägers vor Schritt c) bei einer stringenten Reaktionsbedingung. Der Begriff „stringente Reaktionsbedingung“ bezeichnet
30 eine Reaktionsbedingung, bei der nur vollständig hybridisierte Ziel-Nukleinsäure mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid verbunden bleibt, während sich Ziel-Nukleinsäure-Moleküle, deren Sequenz eine oder mehrere Basen-Mismatches gegenüber der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-
35 Oligonukleotids aufweist, vom Gegenstrang-Oligonukleotid lösen. Das Waschen des Trägers bei einer stringenten Reaktionsbedingung vor dem Ligieren des ersten Endes der Ziel-

Nukleinsäure mit dem freien Ende des Fänger-Oligonukleotids erhöht die Spezifität des Verfahrens.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erste Reaktionsbedingung eine stringente Reaktionsbedingung. Dadurch bleibt in Schritt d) nur vollständig mit der Ziel-Nukleinsäure hybridisiertes Gegenstrang-Oligonukleotid mit der Ziel-Nukleinsäure verbunden, während sich Gegenstrang-Oligonukleotide, an die ein Ziel-Nukleinsäure-Moleküle hybridisiert ist, dessen Sequenz eine oder mehrere Basen-Mismatches gegenüber der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids aufweist, von der Ziel-Nukleinsäure lösen. Dadurch wird die Spezifität des Verfahrens erhöht.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Ziel-Nukleinsäure eine RNA, vorzugsweise eine microRNA (miRNA). miRNAs sind nicht kodierende, einzelsträngige RNAs mit einer Länge von etwa 17 bis etwa 25 Nukleotiden, die in der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression wirksam sind. MiRNAs lagern sich hochspezifisch an komplementäre Sequenzen von mRNA-Molekülen an und regulieren dadurch die Translation der mRNA in das entsprechende Protein.

25 In einer weiteren Ausführungsform ist die Ziel-Nukleinsäure eine einzelsträngige small interfering RNA (siRNA). Ähnlich der miRNAs können auch siRNAs an der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression beteiligt sein, indem sie sich spezifisch an komplementäre Sequenzen von mRNA-Molekülen anlagern und die Translation der mRNA in das entsprechende Protein regulieren.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform werden mindestens zwei verschiedene Ziel-Nukleinsäuren, vorzugsweise drei bis 130 verschiedene Ziel-Nukleinsäuren gleichzeitig detektiert, wobei der in Schritt c) erzeugte Doppelstrang für alle Ziel-Nukleinsäuren eine gleiche Schmelztemperatur aufweist. Besonders bevorzugt werden 32 verschiedene Ziel-Nukleinsäuren

gleichzeitig detektiert. Diese können beispielsweise in jeweils vier Replikaten auf einem gemeinsamen Träger nachgewiesen werden.

5 Für die gleichzeitige Detektion verschiedener Ziel-Nukleinsäuren wird für jede Ziel-Nukleinsäure ein anderes Gegenstrang-Oligonukleotid verwendet. Die Gegenstrang-Oligonukleotide unterscheiden sich mindestens in der Oligonukleotid-Sequenz, die komplementär zu der Ziel-
10 Nukleinsäure ist.

Die Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids, die komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure ist, und die Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids, die
15 mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid ist, und die Sequenz des Fänger-Oligonukleotids werden so gewählt, dass der in Schritt c) erzeugte Doppelstrang für alle Ziel-Nukleinsäuren eine gleiche Schmelztemperatur aufweist. Der Doppelstrang wird durch den
20 Abschnitt des Fänger-Oligonukleotids, der komplementär zu dem entsprechenden Abschnitt des Gegenstrang-Oligonukleotids ist, und die Ziel-Nukleinsäure, die mit den jeweils dazu komplementären Oligonukleotid-Sequenzen des Gegenstrang-Oligonukleotids Basenpaarungen bilden, erzeugt. Der Begriff
25 „gleiche Schmelztemperatur“ bedeutet, dass die Schmelztemperatur des Doppelstrangs für verschiedene Ziel-Nukleinsäuren um höchstens 4°C, vorzugsweise um höchstens 2°C voneinander abweicht. Die gleiche Schmelztemperatur ist besonders bevorzugt eine identische Schmelztemperatur.

30 Die gleiche Schmelztemperatur und die Auftrennung der zwei Ligationen in separate Verfahrensschritte erlauben es, Schritt e) bei einer für alle Ziel-Nukleinsäuren einheitlichen ersten Reaktionsbedingung durchzuführen. Dies ist eine
35 Grundvoraussetzung, um verschiedene Ziel-Nukleinsäuren mit hoher Spezifität gleichzeitig auf einen gemeinsamen Träger zu detektieren und/oder quantifizieren (multiplexing).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform unterscheiden sich die Gegenstrang-Oligonukleotide außerdem in der Oligonukleotid-Sequenz, die mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Reporter-Oligonukleotid ist und es wird für jede Ziel-Nukleinsäure ein anderes Reporter-Oligonukleotid verwendet. Die Reporter-Oligonukleotide unterscheiden sich außerdem in ihrer Markierung, so dass die Signale, die beim Auslesen der Markierungen erhalten werden, jeweils einer bestimmten Ziel-Nukleinsäure zugeordnet werden können.

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt das Auslesen der Markierung auf dem Träger positionsspezifisch, um verschiedene Ziel-Nukleinsäuren gleichzeitig zu detektieren und/oder quantifizieren. Durch ein positionsspezifisches Auslesen der Markierung können auch mehrere zu untersuchende Proben mit einem einzigen Verfahren analysiert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Fänger-Oligonukleotid und/oder das Reporter-Oligonukleotid ein chimäres Oligonukleotid, das Ribonukleotide und Desoxyribonukleotide aufweist. Der Begriff „chimäres Oligonukleotid“ bezeichnet ein Oligonukleotid, das sowohl Ribonukleotide als auch Desoxyribonukleotide aufweist. Die Verwendung chimärer Oligonukleotide verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die bei reinen Oligoribonukleotiden häufig auftreten. Die Sekundärstrukturen sind sowohl für die Hybridisierung des Fänger-Oligonukleotids bzw. des Reporter-Oligonukleotids mit den jeweils dazu komplementären Abschnitten des Gegenstrang-Oligonukleotids als auch für deren Ligation mit der Ziel-Nukleinsäure hinderlich und würden somit die Sensitivität des Verfahrens beeinträchtigen.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das chimäre Oligonukleotid eine Mehrheit von Desoxyribonukleotiden auf. Dadurch bleibt die höhere Stabilität der Desoxyribonukleotide in dem chimären Oligonukleotid weitgehend erhalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist ein 3'-Hydroxyl-Ende des chimären Oligonukleotids mindestens ein Ribonukleotid, vorzugsweise vier Ribonukleotide auf. Weist das mit dem 5'-Phosphoryl-Ende der Ziel-Nukleinsäure zu ligierende 3'-Hydroxyl-Ende des Fänger-Oligonukleotids oder des Reporter-Oligonukleotids mindestens ein Ribonukleotid auf, kann für den Fall, dass die Ziel-Nukleinsäure eine RNA ist, eine RNA-RNA-Ligation erfolgen. Beispielsweise weisen miRNAs ein 5'-Phosphoryl-Ende auf, das mit Hilfe der erhältlichen Ligasen praktisch nicht mit dem 3'-Hydroxyl-Ende eines Oligodesoxyribonukleotids verbunden werden kann. Durch die Verwendung chimärer Oligonukleotide mit einem Ribonukleotid am 3'-Hydroxyl-Ende kann die Ligation mit dem 5'-Phosphoryl-Ende der miRNA erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird für das Ligieren eine T4 DNA Ligase verwendet. T4 DNA Ligase ist ein Enzym, das die ATP-abhängige Ligation eines 3'-Hydroxyl-Endes eines ersten Nukleinsäure-Moleküls an ein unmittelbar anschließend benachbartes 5'-Phosphoryl-Ende eines zweiten Nukleinsäure-Moleküls in doppelsträngigen DNA-, RNA/DNA- oder RNA-Molekülen katalysiert. Dabei wird eine kovalente Phosphodiesterbindung hergestellt.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Ligieren bei einer Ligationstemperatur. Die Ligationstemperatur liegt in einem Bereich, in dem die verwendete Ligase eine hohe enzymatische Aktivität aufweist. Wird T4 DNA Ligase verwendet, so liegt die Ligationstemperatur vorzugsweise bei 35°C bis 37°C, besonders bevorzugt bei 37°C.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Gegenstrang-Oligonukleotid ein Oligodesoxyribonukleotid. Oligodesoxyribonukleotide sind gegenüber Oligoribonukleotiden stabiler und bilden nur selten Sekundärstrukturen aus.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind das Gegenstrang-Oligonukleotid, das Fänger-Oligonukleotid und das

Reporter-Oligonukleotid Oligodesoxyribonukleotide, während die Ziel-Nukleinsäure eine RNA ist, so dass bei der Hybridisierung mindestens abschnittsweise RNA/DNA-Duplexe gebildet werden, welche thermodynamisch sehr stabil sind.

5

In einer weiteren Ausführungsform ist das Gegenstrang-Oligonukleotid ein Oligodesoxyribonukleotid und die Ziel-Nukleinsäure eine RNA, während das Fänger-Oligonukleotid und das Reporter-Oligonukleotid chimäre Oligonukleotide mit vorzugsweise mindestens einem Ribonukleotid am 3'-Hydroxyl-Ende sind.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Gegenstrang-Oligonukleotid eine Oligonukleotid-Sequenz, die vollständig komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid ist, und/oder eine Oligonukleotid-Sequenz, die vollständig komplementär zu dem Reporter-Oligonukleotid ist. Dadurch wird eine besonders stabile Hybridisierung des Gegenstrang-Oligonukleotids mit dem Fänger-Oligonukleotid und/oder dem Reporter-Oligonukleotid erreicht. Dies trägt zu einer zuverlässigen Detektion und Quantifizierung der Ziel-Nukleinsäure bei.

15

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Auslesen der Markierung mittels eines „branched DNA“-Tests. Der „branched DNA“-Test („branched DNA“, auf deutsch: verzweigte DNA), der auch unter der Bezeichnung „branched DNA Assay“ bekannt ist, ist ein Signalamplifizierungs-Assay zur Amplifizierung des Reportersignals. Dazu wird ein sogenannter „Preamplifier“ (auf deutsch: Vorverstärker) eingesetzt, der direkt oder indirekt an die nachzuweisende Ziel-Nukleinsäure hybridisiert. In nachfolgenden Schritten werden sogenannte „Amplifier“ (auf deutsch: Verstärker) an den „Preamplifier“ hybridisiert. „Preamplifier“ und „Amplifier“ sind kurze einzelsträngige Oligodesoxyribonukleotide. Dabei sind die „Amplifier“ verzweigte Oligodesoxyribonukleotide, die Reportermoleküle binden. Die Signalamplifizierung wird erreicht, indem mehrere „Amplifier“ an einen „Preamplifier“ binden und jeder „Amplifier“ typischerweise mehrere Reportermoleküle bindet.

25

30

35

Durch die Verzweigung der „Amplifier“ kann eine hohe Dichte der „Amplifier“ auf dem „Preamplifier“ erreicht werden, die zu einer hohen Sensitivität des „branched DNA“-Tests führt. Somit wird durch den Einsatz des „branched DNA“-Tests die

5 Sensitivität des Verfahrens weiter erhöht. Der „branched DNA“-Test ist auch für den Nachweis von mehreren verschiedenen Ziel-Nukleinsäuren im Multiplex-Verfahren geeignet. Hierbei werden die Spezifität und die Zuverlässigkeit der Detektion vorzugsweise durch kombinatorische Fluoreszenz erhöht.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Reporter-Oligonukleotid ein „Preamplifier“. In diesem Fall hybridisieren die „Amplifier“ direkt an das Reporter-Oligonukleotid, so dass zusätzliche Hybridisierungsschritte

15 entfallen. Dadurch kann das Auslesen der Markierung mittels des „branched DNA“-Tests besonders effizient durchgeführt werden.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt eine Phosphorylierung von einem Ende der Ziel-Nukleinsäure, des Fänger-Oligonukleotids und/oder des Reporter-Oligonukleotids. Der Begriff „Phosphorylierung“ bezeichnet das Anhängen eines Phosphatrestes an das 5'-Hydroxyl-Ende von RNA oder DNA. Das Ligieren von zwei unmittelbar anschließend benachbarten

25 Oligonukleotiden bzw. Nukleinsäure-Molekülen erfordert ein 5'-Phosphoryl-Ende an dem zweiten Nukleinsäure-Molekül. Das Vorliegen eines 5'-Phosphoryl-Endes des zweiten Nukleinsäure-Moleküls hängt unter anderem von dessen Synthese ab. Ein fehlendes 5'-Phosphoryl-Ende kann durch die Phosphorylierung an-

30 gefügt werden, damit das Fänger-Oligonukleotid mit der Ziel-Nukleinsäure und die Ziel-Nukleinsäure mit dem Reporter-Oligonukleotid ligiert werden können.

35

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Phosphorylierung eine enzymatische Phosphorylierung.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Phosphorylierung durch In-Kontaktbringen des zu phosphorylierenden Mo-

leküls mit einer T4 Polynukleotidkinase. T4 Polynukleotidkinase ist ein Enzym, das die Phosphorylierung von 5'-Hydroxyl-Enden von RNA- oder DNA-Molekülen katalysiert.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt vor Schritt f) und/oder g) ein erstes Auslesen der Markierung auf dem Träger und/oder in Schritt h) erfolgt ein zweites Auslesen der Markierung auf dem Träger. Bei dem ersten Auslesen der Markierung wird ein Referenzwert erhalten, während bei dem zweiten Auslesen der Markierung ein Messwert erhalten wird. Der Messwert wird vorzugsweise in Relation zu dem Referenzwert gesetzt. Dadurch können von verschiedenen Trägern gewonnene Daten untereinander verglichen werden. Der Referenzwert kann beispielsweise ein Maß für die Anzahl der Fänger-Oligonukleotide, die auf dem Träger immobilisiert sind, sein. Sind auf einem ersten Träger weniger Fänger-Oligonukleotide immobilisiert als auf einem zweiten Träger, dann ist sowohl der Referenzwert als auch der Messwert des ersten Trägers niedriger. Somit kann eine Kalibrierung der einzelnen Träger durchgeführt werden.

Ein Quotient aus dem Messwert und dem Referenzwert bleibt bei unterschiedlicher Anzahl an immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden auf unterschiedlichen Trägern näherungsweise konstant. Dadurch können Streuungen von Messwerten, die von verschiedenen Trägern gewonnen werden, eliminiert werden. Somit werden auch eine bessere Reproduzierbarkeit und niedrigere Standardabweichungen für die Werte, die beim Auslesen der Markierung erhalten werden, erreicht.

Weiterhin wird eine Kalibrierung einzelner Positionen auf dem selben Träger ermöglicht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgen das erste Auslesen und das zweite Auslesen bei einer gleichen Reaktionsbedingung. Dadurch wird sichergestellt, dass die Enzymaktivität, die von der Reaktionsbedingung, insbesondere

von der Temperatur, abhängig ist, bei dem ersten und den zweiten Auslesen gleich ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Markierung des Reporter-Oligonukleotids ein Enzym, vorzugsweise eine Esterase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Esterase die thermostabile Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Die Esterase 2 ist aus einer einzigen Proteinkette aufgebaut und kann somit auf einfache Weise an das Reporter-Oligonukleotid gekoppelt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Enzym kovalent an das Reporter-Oligonukleotid gebunden. Dadurch ist das Enzym stabil mit dem Reporter-Oligonukleotid verbunden und kann sich nicht aufgrund von Waschvorgängen oder den sich ändernden Temperaturen von dem Reporter-Oligonukleotid ablösen. Somit kann eine zuverlässige Detektion und Quantifizierung der Ziel-Nukleinsäure sicher gestellt werden.

In einer weiteren Ausführungsform ist die Markierung ein Fluoreszenzfarbstoff, der vorzugsweise kovalent an das Reporter-Oligonukleotid gebunden ist. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs ermöglicht ein besonders einfaches und schnelles Auslesen der Markierung. Ferner wird für das Auslesen kein Substrat benötigt, so dass das Verfahren besonders kostengünstig durchgeführt werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Markierung elektrochemisch ausgelesen. Bei einem elektrochemischen Auslesen werden an der Markierung, die vorzugsweise ein Enzym ist, Substrate zu redoxaktiven Reaktionsprodukten umgesetzt, so dass ein Strom oder eine Änderung der Spannung an einer Elektrode gemessen werden kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Auslesen durch Redoxcycling von p-Aminophenol und Quinonimin.

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt das Auslesen der Markierung auf dem Träger bei einer Auslesetemperatur. Die Auslesetemperatur liegt in einem Bereich, in dem das Enzym
5 eine hohe enzymatische Aktivität aufweist. Wird Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* als Markierung verwendet, so liegt die Auslesetemperatur vorzugsweise bei etwa 35°C.

10 In einer weiteren Ausführungsform erfolgt das Auslesen der Markierung auf dem Träger optisch. Ein optisches Auslesen der Markierung ist einfach und kostengünstig.

Im Folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens anhand schematischer Zeichnungen dargestellt.
15

Figur 1 zeigt die Identifizierung einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (9) mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Ziel-Nukleinsäure (9) ist miDNA-96. Die miDNA-96
20 weist ein 5'-Phosphoryl-Ende auf und ist eine synthetisch hergestellte DNA-Version vom miRNA-96. Es wird ein Silizium-Chip mit zwei integrierten Goldelektroden als fester Träger (1) verwendet, auf dem ein einzelsträngiges Fänger-Oligonukleotid (5) über einen Spacer (3) immobilisiert ist.
25 Der Chip wird zunächst für 15 Minuten bei 35°C mit einer Blockierungslösung („The Blocking Solution“, CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland) inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Oberfläche des Chips abzusättigen. Anschließend wird der Chip für 3 Minuten bei 45°C in einem ersten Waschpuffer,
30 der 20 mM Tris/HCl pH 7,6 und 20 mM NaCl aufweist, gewaschen. Darauf folgt ein erster Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens, in dem der Chip bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C mit 100 nM Gegenstrang-Oligonukleotid (7) und 10 nM miDNA-96 in einem Reaktionspuffer in Kontakt gebracht wird.
35 Der Reaktionspuffer weist 66 mM Tris/HCl pH 7,6; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Dithiothreitol (DTT); 1 mM Adenosintriphosphat (ATP); 7,5% PEG6000 und 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) auf. Das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) umfasst

drei Oligonukleotid-Sequenzen, die so angeordnet sind, dass sie unmittelbar aneinander grenzen. Eine Oligonukleotid-Sequenz ist vollständig komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid (5). Daran schließt sich eine Oligonukleotid-Sequenz an, die vollständig komplementär zu miRNA-96 ist. Darauf folgt eine Oligonukleotid-Sequenz, die vollständig komplementär zu einem Reporter-Oligonukleotid (11) ist. Der Chip wird für 5 Minuten bei 45°C inkubiert, so dass das Fänger-Oligonukleotid (5) und die miDNA-96 mit den jeweils dazu komplementären Abschnitten des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) vollständig hybridisieren. Wie in Figur 1 dargestellt, führt die Anordnung der Oligonukleotid-Sequenzen auf dem Gegenstrang-Oligonukleotid (7) dazu, dass ein unteres Ende der miDNA-96 und ein freies oberes Ende des Fänger-Oligonukleotids (5) jeweils mit benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) hybridisieren. Anschließend wird der Chip für 5 Minuten bei 45°C in dem Reaktionspuffer gewaschen. In einem nächsten Schritt wird der Chip mit 100 units/ml T4 DNA Ligase in Kontakt gebracht und für 5 Minuten bei einer Ligationstemperatur von 35°C in dem Reaktionspuffer inkubiert. In diesem Schritt ligiert die T4 DNA Ligase in einer ersten Ligation (15) die benachbarten Enden des Fänger-Oligonukleotids (5) und der miDNA-96 miteinander. Dadurch wird die miDNA-96 am unteren Ende kovalent an das Fänger-Oligonukleotid (5) gebunden. Der Chip wird anschließend bei einer ersten Reaktionstemperatur von 50°C in dem ersten Waschpuffer für 5 Minuten inkubiert. Da das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) vollständig an das Fänger-Oligonukleotid (5) und die miDNA-96 hybridisiert hat und die miDNA-96 an das Fänger-Oligonukleotid (5) ligiert ist, bleibt das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) auf dem Chip. In einem nächsten Schritt wird der Chip bei einer Hybridisierungs- und Ligationstemperatur von 35°C mit 250 nM Reporter-Oligonukleotid (11) und 100 units/ml T4 DNA Ligase in Reaktionspuffer in Kontakt gebracht. Das Reporter-Oligonukleotid (11) weist als Markierung (13) eine thermostabile Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* auf, die kovalent an das Reporter-Oligonukleotid (11) gebunden ist. Der Chip wird für

5 Minuten bei 35°C inkubiert, so dass das Reporter-Oligonukleotid (11) mit dem dazu komplementären Abschnitt des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) vollständig hybridisiert. Wie in Figur 1 dargestellt, führt die Anordnung der

5 Oligonukleotid-Sequenzen auf dem Gegenstrang-Oligonukleotid (7) dazu, dass ein oberes Ende der miDNA-96 und ein unteres Endes des Reporter-Oligonukleotids (11) mit benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) hybridisieren. In diesem Schritt ligiert die T4 DNA Ligase in einer zweiten

10 Ligation (17) die benachbarten Enden der miDNA-96 und des Reporter-Oligonukleotids (11) miteinander. Dadurch wird die miDNA-96 am oberen Ende kovalent an das Reporter-Oligonukleotid (11) gebunden. Der Chip wird anschließend bei einer zweiten Reaktionstemperatur von 55°C in einem zweiten

15 Waschpuffer, der 2 mM Tris/HCl pH 7,6 und 2 mM NaCl aufweist, für 15 Minuten inkubiert. Dadurch wird die Basenpaarung des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) mit dem Fänger-Oligonukleotid (5), der miDNA und dem Reporter-Oligonukleotid (11) aufgeschmolzen, so dass sich das Gegenstrang-Oligonukleotid (7)

20 löst. Anschließend wird der Chip für 3 Minuten bei 35°C in dem ersten Waschpuffer gewaschen, um das gelöste Gegenstrang-Oligonukleotid (7) zu entfernen. Anschließend wird die Esterase 2 auf dem Chip bei einer Auslesetemperatur von 35°C ausgelesen. Das Auslesen wird elektrochemisch durchgeführt. Dazu wird der Chip mit einem Substrat (19) der

25 Esterase 2 para-Aminophenol-butyrate in Kontakt gebracht. Das para-Aminophenol-butyrate fließt über den Chip und wird von der Esterase 2 zu einem Reaktionsprodukt (21) para-Aminophenol umgesetzt, welches redoxaktiv ist. Durch

30 Redoxcycling von para-Aminophenol und Quinonimin wird Strom erzeugt, der bei Stopp des Substratflusses über den Chip an der Goldelektrode gemessen wird. Die Messung des Stroms dient als Nachweis der Esterase 2 auf dem Chip, wobei eine Signalsteigerung die Gegenwart der miDNA-96 anzeigt.

35

Mittels dieses Verfahrens wurde eine Signalsteigerung von 36,6812 nA/s gemessen, wobei die Standardabweichung 1,3894 nA/s beträgt. Als Kontrolle (in Figur 1 nicht gezeigt) wurde

parallel ein Kontroll-Fänger-Oligonukleotid und ein Kontroll-Gegenstrang-Oligonukleotid eingesetzt. Auch das Kontroll-Gegenstrang-Oligonukleotid umfasst drei Oligonukleotid-Sequenzen, die so angeordnet sind, dass sie unmittelbar aneinander grenzen. Dabei ist eine Oligonukleotid-Sequenz vollständig komplementär zu dem Kontroll-Fänger-Oligonukleotid. Daran schließt sich eine Oligonukleotid-Sequenz an, die vollständig komplementär zu miRNA-21 ist. Darauf folgt eine Oligonukleotid-Sequenz, die vollständig komplementär zu dem Reporter-Oligonukleotid (11) ist und somit mit der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) übereinstimmt. Die miDNA-96 hybridisiert bei der Inkubation des Chips bei 45°C nicht mit dem Kontroll-Gegenstrang-Oligonukleotid, so dass der an der Kontrolle gemessene Strom ein unspezifisches Hintergrundsignal auf dem Chip anzeigt. Für die Kontrolle wurde in diesem Versuch eine Signalsteigung von 0,0061 nA/s gemessen, wobei die Standardabweichung 0,0124 nA/s beträgt.

Parallel dazu wurde unter gleichen Bedingungen ein herkömmliches Verfahren zur Identifizierung von miDNA-96 durchgeführt. In dem herkömmlichen Verfahren wird der Chip in einem Schritt mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid (7), der miDNA-96 und dem Reporter-Oligonukleotid (11) in Kontakt gebracht und die erste und die zweite Ligation (15, 17) erfolgen ebenfalls in einem gemeinsamen Schritt. Damit entfällt gegenüber dem erfindungsgemäßen Verfahren der Schritt des Inkubierens des Chips bei einer ersten Reaktionsbedingung.

Bei der Identifizierung von miDNA-96 mittels des herkömmlichen Verfahrens wurde eine Signalsteigung von 27,2097 nA/s gemessen, wobei die Standardabweichung 2,0325 nA/s beträgt. Im Vergleich dazu ist die mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens gemessene Signalsteigung mit 36,6812 nA/s etwa 30% höher. Dies zeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Sensitivität gegenüber dem herkömmlichen Verfahren aufweist.

Für die Kontrolle wurde im herkömmlichen Verfahren eine Signalsteigung von 0,1921 nA/s gemessen, wobei die Standardabweichung 0,0403 nA/s beträgt. Im Gegensatz dazu wurde im erfindungsgemäßen Verfahren lediglich eine Signalsteigung von
5 0,0061 nA/s gemessen. Damit beträgt das unspezifische Hintergrundsignal des erfindungsgemäßen Verfahrens weniger als 10% im Vergleich zu dem herkömmlichen Verfahren. Dies zeigt, dass unspezifische Signale durch das erfindungsgemäße Verfahren effektiv verhindert werden. Dadurch weist das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Spezifität als das herkömmliche Verfahren auf.
10

Figur 2 und Figur 3 zeigen das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung einer Nukleinsäure (23, 25), deren Sequenz
15 nicht oder nur abschnittsweise mit der Sequenz der zu identifizierenden miDNA-96 überein stimmt (Figur 2 bzw. 3). Eine solche Nukleinsäure (23, 25) wird als Negativkontrolle zur Verifizierung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt. Figur 2 zeigt, dass eine Nukleinsäure (23), deren Sequenz
20 nicht mit der Sequenz der miDNA-96 überein stimmt, bei der Inkubation des Trägers (1) bei der Hybridisierungstemperatur von 45°C nicht mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid (7) hybridisiert. Daher kann die T4 DNA Ligase das freie Ende des Fänger-Oligonukleotids (5) nicht mit einem Ende der Nukleinsäure
25 (23) ligieren. Während der Inkubation des Trägers (1) bei der ersten Reaktionstemperatur von 50°C löst sich das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) von dem Fänger-Oligonukleotid (5). Aufgrund des fehlenden Gegenstrang-Oligonukleotids (7) kann im nachfolgenden Schritt das Reporter-Oligonukleotid (11)
30 nicht an das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) binden. Dadurch wird das Reporter-Oligonukleotid (11) bei der zweiten Reaktitemperatur von dem Träger (1) entfernt, so dass keine Esterase 2 auf dem Träger (1) verbleibt. Folglich wird beim Auslesen der Esterase 2 kein Strom gemessen.

35 Figur 3 zeigt, dass eine Nukleinsäure (25), deren Sequenz abschnittsweise mit der Sequenz der miDNA-96 überein stimmt, bei der Inkubation des Trägers (1) bei der Hybridisierungs-

temperatur von 45°C in dem Abschnitt, der mit der Sequenz der
miDNA-96 übereinstimmt, mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid
(7) hybridisiert. Das erste Ende der Nukleinsäure (25) und
das freie Ende des Fänger-Oligonukleotids (5) hybridisieren
5 mit benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids
(7), so dass im nächsten Schritt die T4 DNA Ligase die be-
nachbarten Enden des Fänger-Oligonukleotids (5) und der Nuk-
leinsäure (25) miteinander ligiert. Damit wird die Nuklein-
säure (25) kovalent an das Fänger-Oligonukleotid (5) gebun-
10 den. Beim Inkubieren des Trägers bei der ersten Reaktionstem-
peratur von 50°C löst sich das Gegenstrang-Oligonukleotid (7)
von dem Fänger-Oligonukleotid (5) und der nur abschnittsweise
hybridisierten Nukleinsäure (25). Die Nukleinsäure (25)
bleibt durch die kovalente Bindung an das Fänger-
15 Oligonukleotid (5) auf dem Träger (1). Durch das Fehlen des
Gegenstrang-Oligonukleotids (7) kann das Reporter-
Oligonukleotid (11), das in einem nachfolgenden Schritt hin-
zugefügt wird, nicht an das Gegenstrang-Oligonukleotid (7)
binden und wird beim Waschen des Trägers (1) bei der zweiten
20 Reaktionstemperatur von 55°C von dem Träger (1) entfernt. Da-
mit verbleibt keine Esterase 2 auf dem Träger (1), so dass
beim Auslesen der Esterase 2 kein Strom gemessen wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (9), umfassend die Schritte
- 5 a) Bereitstellen mindestens eines festen Trägers (1), auf dem mindestens ein Fänger-Oligonukleotid (5) immobilisiert ist;
- 10 b) In-Kontaktbringen des Trägers (1) bei einer ersten Hybridisierungsbedingung mit mindestens einem Gegenstrang-Oligonukleotid (7) und mindestens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (9), das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) umfassend eine Oligonukleotid-Sequenz mindestens abschnittsweise komplementär zu dem Fänger-
- 15 Oligonukleotid (5), eine Oligonukleotid-Sequenz komplementär zu der Ziel-Nukleinsäure (9) und eine Oligonukleotid-Sequenz mindestens abschnittsweise komplementär zu einem Reporter-Oligonukleotid (11), um das Fänger-Oligonukleotid (5) mindestens abschnittsweise und die
- 20 Ziel-Nukleinsäure (9) mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid (7) zu hybridisieren, so dass ein erstes Ende der Ziel-Nukleinsäure (9) und ein freies Ende des Fänger-Oligonukleotids (5) mit benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) Basenpaarungen bilden;
- 25 c) Ligieren des ersten Endes der Ziel-Nukleinsäure (9) mit dem freien Ende des Fänger-Oligonukleotids (5), um die Ziel-Nukleinsäure (9) kovalent an das Fänger-Oligonukleotid (5) zu binden;
- 30 d) Inkubieren des Trägers (1) bei einer ersten Reaktionsbedingung derart, dass die Ziel-Nukleinsäure (9) nur bei Gegenwart von an ihrem ersten Ende ligiertem Fänger-Oligonukleotid (5) mit dem Träger (1) verbunden bleibt und das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) nur bei Gegenwart einer Ziel-Nukleinsäure (9), die komplementär zu der ent-
- 35 sprechenden Oligonukleotid-Sequenz des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) und an das freie Ende des Fänger-Oligonukleotids (5) ligiert ist, mit dem Träger (1) verbunden bleibt;

- e) In-Kontaktbringen des Trägers (1) bei einer zweiten Hybridisierungsbedingung mit mindestens einem Reporter-Oligonukleotid (11), das eine Markierung (13) aufweist, um das Reporter-Oligonukleotid (11) mindestens ab-
- 5 schnittsweise mit dem Gegenstrang-Oligonukleotid (7) zu hybridisieren, so dass ein zweites Ende der Ziel-Nukleinsäure (9) und ein erstes Ende des Reporter-Oligonukleotids (11) mit benachbarten Nukleotiden des Gegenstrang-Oligonukleotids (7) Basenpaarungen bilden;
- 10 f) Ligieren des zweiten Endes der Ziel-Nukleinsäure (9) mit dem ersten Ende des Reporter-Oligonukleotids (11), um die Ziel-Nukleinsäure (9) kovalent an das Reporter-Oligonukleotid (11) zu binden;
- g) Inkubieren des Trägers (1) bei einer zweiten Reaktionsbedingung derart, dass das Reporter-Oligonukleotid
- 15 (11) nur bei Gegenwart von an ihren beiden Enden ligierter Ziel-Nukleinsäure (9) mit dem Träger (1) verbunden bleibt;
- h) Auslesen der Markierung (13) des Reporter-
- 20 Oligonukleotids (11) auf dem Träger (1).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass vor Schritt c) und/oder in Schritt d) und/oder vor Schritt f) und/oder in Schritt g) und/oder vor Schritt h)
- 25 zusätzlich ein Waschen des Trägers (1) erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Waschen des Trägers (1) vor Schritt c) bei einer stringenten Reaktionsbedingung erfolgt.
- 30
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ziel-Nukleinsäure (9) eine RNA, vorzugsweise eine miRNA, ist.
- 35 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei verschiedene Ziel-Nukleinsäuren (9), vorzugsweise drei bis 130 verschiedene Ziel-Nukleinsäuren (9) gleichzeitig detektiert

werden, wobei der in Schritt c) erzeugte Doppelstrang für alle Ziel-Nukleinsäuren (9) eine gleiche Schmelztemperatur aufweist.

- 5 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fänger-Oligonukleotid (5) und/oder das Reporter-Oligonukleotid (11) ein chimäres Oligonukleotid, das Ribonukleotide und Desoxyribonukleotide aufweist, ist.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein 3'-Hydroxyl-Ende des chimären Oligonukleotids mindestens ein Ribonukleotid, vorzugsweise vier Ribonukleotide aufweist.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für das Ligieren eine T4 DNA Ligase verwendet wird.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gegenstrang-Oligonukleotid (7) ein Oligodesoxyribonukleotid ist.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Auslesen der Markierung (13) mittels eines „branched DNA“-Tests erfolgt und das Reporter-Oligonukleotid (11) vorzugsweise ein „Preamplifier“ ist.

1/3

FIG 1

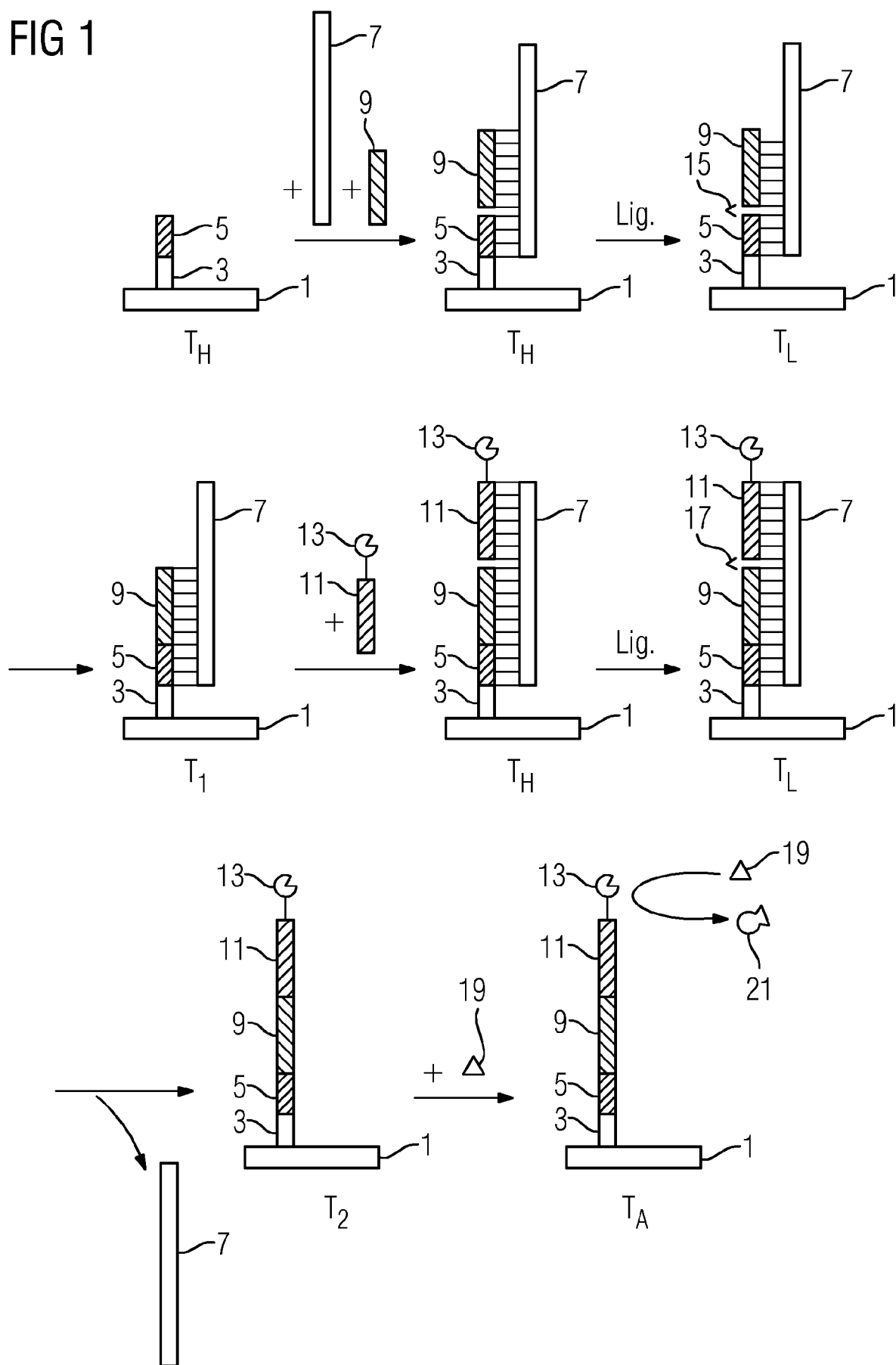


FIG 2

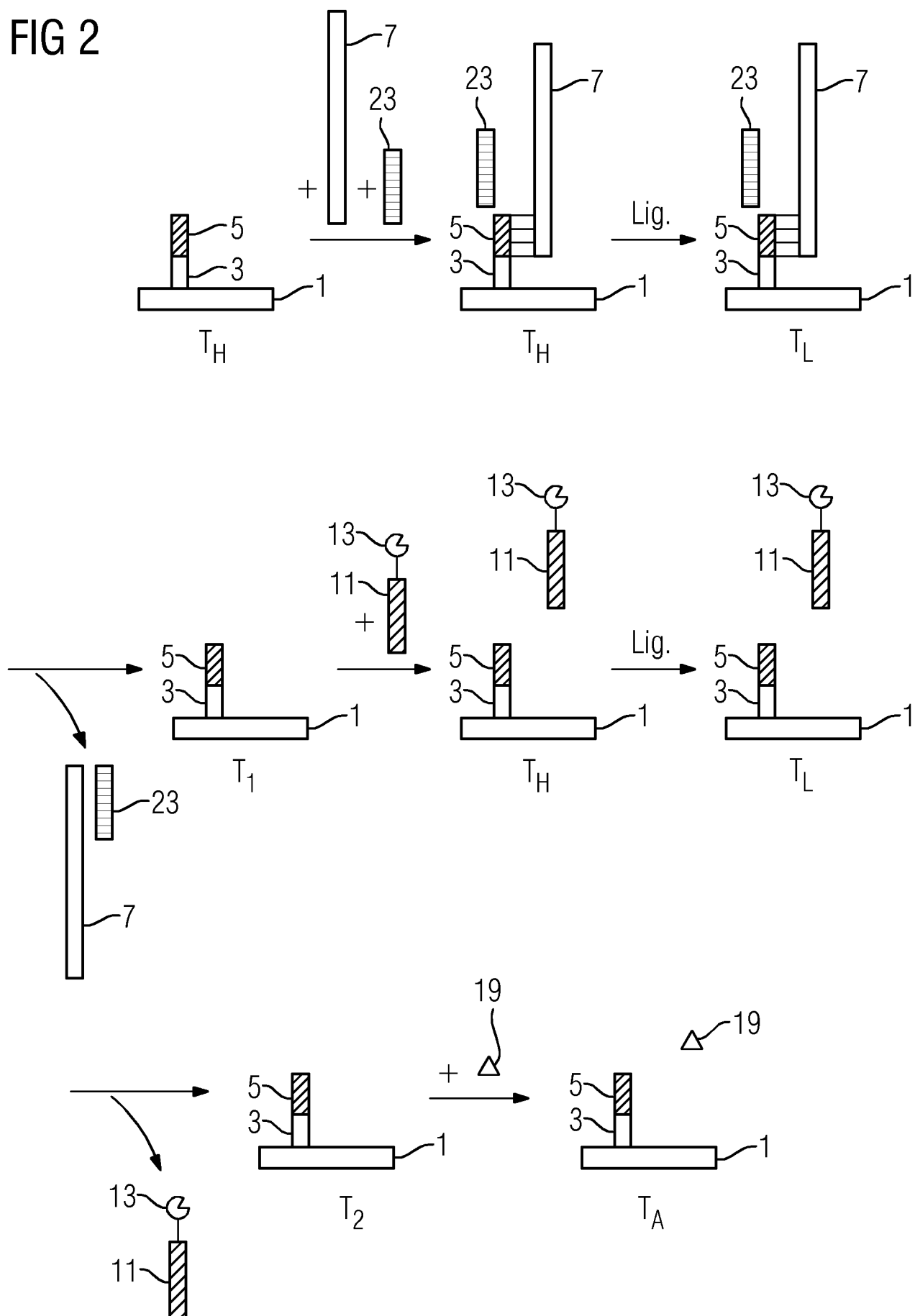
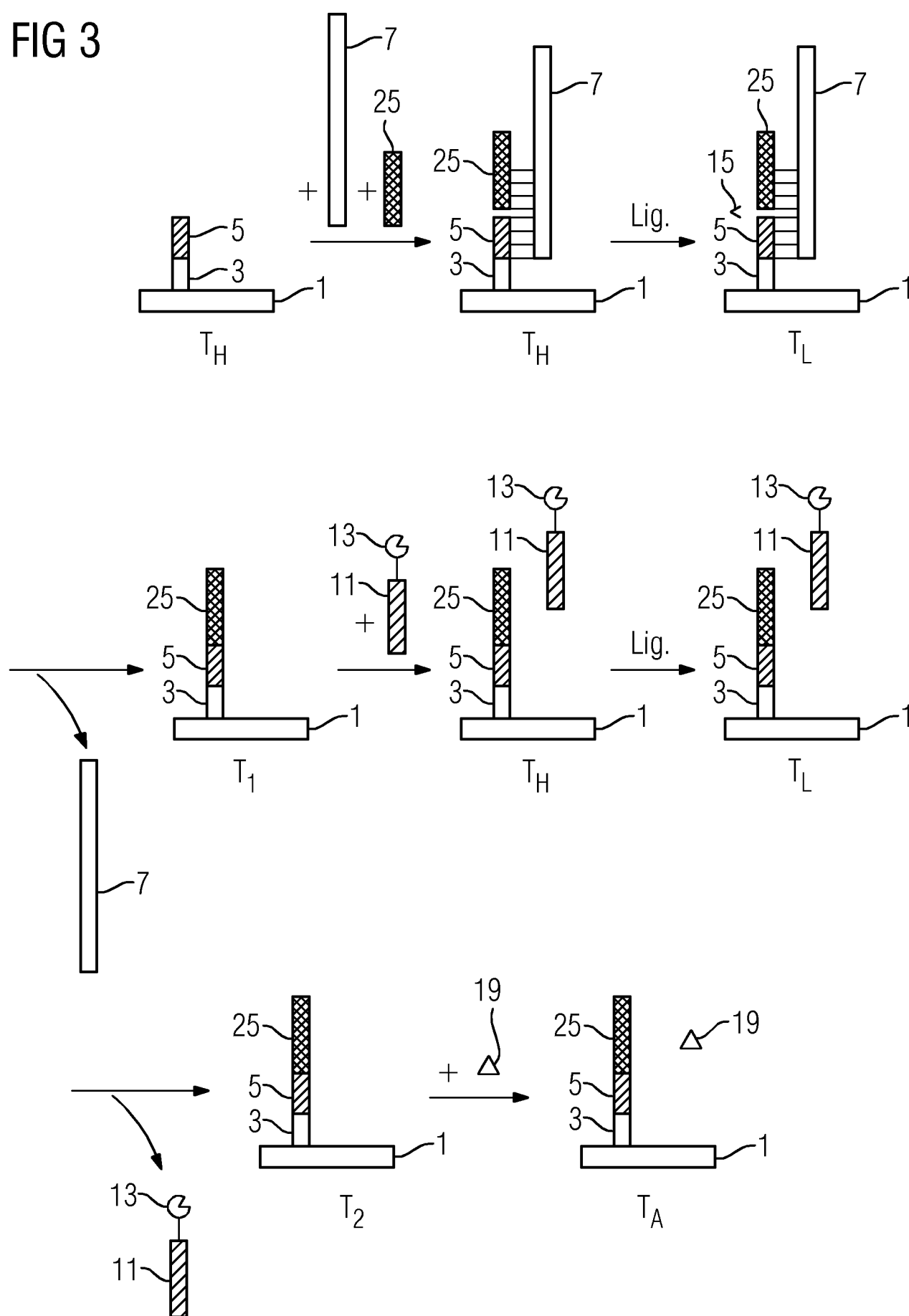


FIG 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/072291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 2012 204366 A1 (SIEMENS AG [DE]) 20 June 2013 (2013-06-20) abstract; claim 1; figure 1 paragraph [0039] - paragraph [0040] -----	1-10
A	WO 2009/101193 A1 (TWO INC [US]; LARMAN HARRY BENJAMIN [US]; CUPPOLETTI ANDREA [IT]; PIS) 20 August 2009 (2009-08-20) Anspruch 1; Absatz über S.5-6; Abb.1 S.8 Z.24-26; S.9 Z.2-4; S.9 Z.12-13 S.11 Z.12-14 -----	1-10
A	WO 2011/157617 A1 (FEBIT HOLDING GMBH [DE]; BEIER MARKUS [DE]) 22 December 2011 (2011-12-22) page 15 - page 16; figure 7 ----- -/-	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 2014

Date of mailing of the international search report

19/12/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Werner, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/072291

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PÖHLMANN CH. ET AL: "Electrochemical Detection of MicroRNAs via Gap Hybridization Assay", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 82, no. 11, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 4434-4440, XP055052418, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac100186p Schema 1; page 4437 Spalte 1, letzter Absatz und Spalte 2, Z.10-19 und Z.34-37; page 4436; figure 1 -----	1-10
A	QING WANG ET AL: "Electrochemical biosensors for detection of point mutation based on surface ligation reaction and oligonucleotides modified gold nanoparticles", ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 688, no. 2, 4 January 2011 (2011-01-04), pages 163-167, XP028145908, ISSN: 0003-2670, DOI: 10.1016/J.ACA.2011.01.004 [retrieved on 2011-01-13] Schema 1; page 165 -----	1-10
A	PANG L ET AL: "DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: A piezoelectric approach", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, vol. 358, no. 1, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 99-103, XP024942315, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2006.06.038 [retrieved on 2006-11-01] abstract; figure 1 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/072291

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 102012204366 A1	20-06-2013	CN 104114716 A	22-10-2014
		DE 102012204366 A1	20-06-2013
		EP 2768979 A1	27-08-2014
		US 2014357515 A1	04-12-2014
		WO 2013087630 A1	20-06-2013

WO 2009101193 A1	20-08-2009	CA 2715538 A1	20-08-2009
		EP 2250284 A1	17-11-2010
		WO 2009101193 A1	20-08-2009

WO 2011157617 A1	22-12-2011	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12Q1/68

ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 10 2012 204366 A1 (SIEMENS AG [DE]) 20. Juni 2013 (2013-06-20) Zusammenfassung; Anspruch 1; Abbildung 1 Absatz [0039] - Absatz [0040] -----	1-10
A	WO 2009/101193 A1 (TWO INC [US]; LARMAN HARRY BENJAMIN [US]; CUPPOLETTI ANDREA [IT]; PIS) 20. August 2009 (2009-08-20) Anspruch 1; Absatz über S.5-6; Abb.1 S.8 Z.24-26; S.9 Z.2-4; S.9 Z.12-13 S.11 Z.12-14 -----	1-10
A	WO 2011/157617 A1 (FEBIT HOLDING GMBH [DE]; BEIER MARKUS [DE]) 22. Dezember 2011 (2011-12-22) Seite 15 - Seite 16; Abbildung 7 ----- -/-	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Dezember 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/12/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Werner, Andreas

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PÖHLMANN CH. ET AL: "Electrochemical Detection of MicroRNAs via Gap Hybridization Assay", ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 82, Nr. 11, 1. Juni 2010 (2010-06-01), Seiten 4434-4440, XP055052418, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac100186p Schema 1; Seite 4437 Spalte 1, letzter Absatz und Spalte 2, Z.10-19 und Z.34-37; Seite 4436; Abbildung 1 -----	1-10
A	QING WANG ET AL: "Electrochemical biosensors for detection of point mutation based on surface ligation reaction and oligonucleotides modified gold nanoparticles", ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 688, Nr. 2, 4. Januar 2011 (2011-01-04), Seiten 163-167, XP028145908, ISSN: 0003-2670, DOI: 10.1016/J.ACA.2011.01.004 [gefunden am 2011-01-13] Schema 1; Seite 165 -----	1-10
A	PANG L ET AL: "DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: A piezoelectric approach", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, Bd. 358, Nr. 1, 1. November 2006 (2006-11-01), Seiten 99-103, XP024942315, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2006.06.038 [gefunden am 2006-11-01] Zusammenfassung; Abbildung 1 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/072291

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 102012204366 A1	20-06-2013	CN 104114716 A	22-10-2014
		DE 102012204366 A1	20-06-2013
		EP 2768979 A1	27-08-2014
		US 2014357515 A1	04-12-2014
		WO 2013087630 A1	20-06-2013

WO 2009101193 A1	20-08-2009	CA 2715538 A1	20-08-2009
		EP 2250284 A1	17-11-2010
		WO 2009101193 A1	20-08-2009

WO 2011157617 A1	22-12-2011	KEINE	
