



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 30 811 T2 2007.02.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 069 190 B1**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 30 811.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 114 422.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **05.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.02.2007**

(30) Unionspriorität:
20262699 16.07.1999 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:
Shimadzu Corp., Kyoto, JP

(72) Erfinder:
**Tonoike, c/o Shimadzu Corporation, Hiroshi,
Kyoto-shi, Kyoto 604-8511, JP; Nishimura, c/o
Shimadzu Corporation, Naoyuki, Kyoto-shi, Kyoto
604-8511, JP**

(74) Vertreter:
Wilhelms, Kilian & Partner, 81541 München

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Ampifizierung von RNA**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Bereich der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Amplifikation von RNA, insbesondere ein Verfahren zur Synthese von RNA mittels einer Reserve-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (im Folgenden mit RT-PCR abgekürzt).

[0002] Bei den in der vorliegenden Beschreibung verwendeten Ausdrücken für Substanzen umfasst die Singularform sowohl Singular als auch Plural.

Beschreibung des Stands der Technik

[0003] In einem RT-PCR-Verfahren wird eine RNA unter Verwendung einer reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) überführt und anschließend die cDNA durch ein PCR-Verfahren amplifiziert. Da ein RT-PCR-Verfahren eine quantitative Analyse sogar mit Spuren von RNA ermöglicht, wird es derzeit als analytisches Verfahren mit der höchsten Sensitivität betrachtet, welche wesentlich ist zur Detektion eines Virus mit RNA-Gen(en), zur quantitativen Detektion einer mRNA, zur Analyse eines exprimierten Gens durch Basensequenzierung und zur Analyse und Herstellung eines Expressionsprodukts durch cDNA-Klonierung.

[0004] Bei einem PCR-Verfahren, welches in einem RT-PCR-Verfahren anschließend an eine RT-Reaktion durchgeführt wird, handelt es sich um ein Verfahren, mit dem ein bestimmtes, gewünschtes DNA-Fragment durch einige hunderttausend Wiederholungen einer DNA-Synthese-Reaktion zwischen Primern, die einen bestimmten Bereich einer DNA-Kette begrenzen, amplifiziert werden kann. Ein PCR-Verfahren ist in der Japanischen Patentoffenlegung Nr. S61-274697, bei der es sich um eine Erfindung von Mullis et al. handelt, offenbart.

[0005] Ein weiteres, seit kurzem verwendetes Verfahren zur Amplifikation einer RNA ist das NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)-Verfahren. Dieses Verfahren ermöglicht die Durchführung einer Amplifikations-Reaktion direkt von einer RNA und ist somit in einem Test geeignet, der RNA als Template verwendet.

[0006] Da das NASBA-Verfahren keinen Denaturierungsschritt wie die PCR beinhaltet, erfordert es keine thermischen Zyklen und kann somit eine Amplifikation bei einer konstanten Temperatur bewirken.

[0007] Da jedoch jedes der RNA-Amplifikations-Verfahren, einschließlich der oben beschriebenen, auf einer enzymatischen Reaktion basiert, ist bekannt, dass die Reaktion in hohem Maße durch Pigmente, Proteine, Saccharide oder unbekannte Verunreinigungen, die in einer biologischen Probe enthalten sind, inhibiert werden kann.

[0008] Demgemäß ist ein Verfahren vor der oben beschriebenen RNA-Amplifikation erforderlich, um eine Zelle, einen Pilz, ein Bakterium oder ein Virus (im Folgenden als RNA-Einschlusskörper bezeichnet) von einer Probe zu trennen und anschließend eine RNA aus einem derartigen RNA-Einschlusskörper vor der oben beschriebenen Nukleinsäuresynthese zu extrahieren. Bei einem derartigen Verfahren handelt es sich konventionell um ein Verfahren, in dem eine biologische Probe beispielsweise mit einem Enzym, einem grenzflächenaktiven Stoff oder einem chaotropischen Mittel behandelt und dann die RNA beispielsweise mit Phenol oder Phenol/Chloroform extrahiert wird. Seit kurzem werden Ionenaustauscher-Harze, Glasfilter, Glaskügelchen oder Reagenzien mit Proteinkoagulierender Wirkung in Verfahren zur Extraktion von RNA angewendet.

[0009] Da jedoch jedes der oben beschriebenen Verfahren Probleme hinsichtlich der vollständigen Entfernung der Verunreinigungen aufweist, wenn es zur Reinigung einer RNA in einer Probe verwendet wird, und häufig die Nukleinsäure in einer Probe nicht mit einer konstanten Ausbeute wiedergewonnen werden kann, kann eine anschließende RNA-Amplifikation nicht erfolgreich stattfinden, insbesondere, wenn der Gehalt der betreffenden Nukleinsäuren in einer Probe gering ist. Außerdem beinhaltet jede dieser Aufreinigerungsverfahren eine komplizierte, zeitaufwendige Durchführung; zudem besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Kontamination während der Durchführung des Verfahrens.

[0010] Da bei einer RNA stets das Risiko einer Degradation durch ein RNA-abbauendes Enzym (RNase) besteht, welches im Wesentlichen in allen biologischen Proben vorliegt, ist es erforderlich, die RNase schnell nach einer Aufreinigung zu inaktivieren und eine strikte Durchführung und Kontrolle ebenso während und nach

der Aufreinigung durchzuführen, um eine Kontamination mit einer RNase auszuschließen.

[0011] EP 0 590 327 A2 beschreibt ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen aus Blutproben mittels eines enzymatischen Amplifikations-Verfahrens, wobei keine Vorbehandlung der Blutprobe zum Vorreinigen der zu amplifizierenden Nukleinsäuresequenzen durchgeführt wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, eine neue Reaktionslösung zur Verfügung zu stellen, mit der eine RNA in einer biologischen Probe effizient amplifiziert werden kann, wobei Substanzen mit inhibitorischen Wirkungen auf die Nukleinsäuresynthese unterdrückt werden, wodurch ein Verfahren zur Amplifikation der RNA in der Probe zur Verfügung gestellt wird, in dem die Probe oder ein RNA-Einschlusskörper in der Probe direkt zu der Reaktionslösung gegeben wird.

[0013] Somit handelt es sich bei der vorliegenden Erfindung um ein Verfahren zur Amplifikation von RNA, welches die Zugabe einer Probe direkt zu einer Reaktionslösung zur Durchführung einer RNA-Amplifikations-Reaktion, bei der die in der Probe vorliegende RNA unmittelbar amplifiziert wird, umfasst. In diesem Verfahren kann eine Probe zu einer Reaktionslösung oder, alternativ, die Reaktionslösung zu der Probe gegeben werden; es besteht also keine bestimmte Reihenfolge hinsichtlich der Zugabe.

[0014] Obwohl ein RT-PCR-Verfahren in dem RNA-Amplifikations-Verfahren der vorliegenden Erfindung enthalten ist, ist das Verfahren nicht darauf beschränkt, und es können auch irgendwelche anderen Verfahren, die enzymatische Reaktionen zur Amplifikation einer RNA verwenden, angewendet werden.

[0015] In der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck "direkte Zugabe" die Zugabe "nachdem eine Zelle, ein Pilz, ein Bakterium, ein Virus usw. (im Folgenden als RNA-Einschlusskörper bezeichnet) vor der RNA-Amplifikation aus einer Probe isoliert wurde, wobei kein Verfahren notwendig ist, um eine RNA aus einem derartigen RNA-Einschlusskörper zu extrahieren".

[0016] In der vorliegenden Erfindung bezeichnet eine Probe einen RNA-Einschlusskörper in einer biologischen Probe oder eine biologische Probe selbst. Eine biologische Probe bezeichnet ein tierisches oder pflanzliches Gewebe, eine Körperflüssigkeit, einen ausgeschiedenen Stoff und Ähnliches; ein RNA-Einschlusskörper bezeichnet eine Zelle, einen Pilz, ein Virus und Ähnliches. Eine Körperflüssigkeit beinhaltet eine vom Blut stammende Probe, wie beispielsweise Blut, Plasma und Serum, sowie Spinalflüssigkeit, Speichelflüssigkeit, Milch und Ähnliches. Exkretionen beinhalten Urin, Kot und Ähnliches. Bei einer Zelle kann es sich beispielsweise um eine Leukozyte, die aus einer Blut- oder Spinalflüssigkeit isoliert wurde, sowie um eine Mundschleimhautzelle oder Ähnliches handeln.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur oben beschriebenen Amplifikation von RNA, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung zur Gen-Amplifikation bei 25°C 8,2 oder höher, bei 55°C 7,4 oder höher und/oder bei 70°C 7,1 oder höher ist.

[0018] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur oben beschriebenen Amplifikation von RNA, wobei ein Polyamin zu dem Reaktionssystem gegeben wird.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur oben beschriebenen Amplifikation von RNA, wobei ein sulfatiertes Polysaccharid und/oder Salze davon (im Folgenden wird beides als sulfatiertes Polysaccharid bezeichnet) zu dem Reaktionssystem gegeben wird.

[0020] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur oben beschriebenen Amplifikation von RNA, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung zur Gen-Amplifikation bei 25°C 8,2 oder höher, bei 55°C 7,4 oder höher und/oder bei 70°C 7,1 oder höher ist und/oder wenigstens ein Polyamid, ein sulfatiertes Polysaccharid und/oder Salze davon und Dithiothreitol zu dem Reaktionssystem gegeben werden.

[0021] Die vorliegende Erfindung ermöglicht die direkte Zugabe einer biologischen Probe zu einer Reaktionslösung zum Bewirken einer direkten Amplifikation einer RNA, die in der Probe vorliegt. Auf diese Weise ermöglicht die Erfindung eine bequeme, schnelle und hoch sensitive Detektion eines Fremdorganismus, wie beispielsweise eines RNA-Virus, einschließlich Hepatitis-C-Virus (HCV), welches latent in einer biologischen Probe vorliegt, eines Retrovirus, einschließlich des humanen Immunschwächevirus (HIV) sowie einer veränderten

Zelle, wie beispielsweise einer Karzinomzelle, die sich als Zelle völlig von einer Wirtszelle unterscheidet. Die Erfindung ermöglicht außerdem die Detektion einer mRNA, die einer intrazellulären Transkription unterworfen wird, eine Analyse eines Expressionsgens durch Basensequenzierung und eine Analyse und Herstellung eines Expressionsprodukts durch cDNA-Klonierung, welche bequem und schnell durchgeführt werden können. Des Weiteren kann die Erfindung, in der eine direkte Amplifikation von RNA aus einer biologischen Probe angewendet wird, den RNA-Abbau durch eine RNase, die konventionell während der Extraktion und Aufreinigung von RNA auftritt, verhindert werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0022] [Fig. 1](#) zeigt die Ergebnisse einer Gel-Elektrophorese, die zur Detektion einer in Ausführungsbeispiel 1 amplifizierten RNA durchgeführt wurde.

[0023] [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse einer Gel-Elektrophorese, die zur Detektion einer in Ausführungsbeispiel 2 amplifizierten RNA durchgeführt wurde.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0024] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Amplifikation von RNA dar, welches die direkte Zugabe eines RNA-Einschlusskörpers zu einer biologischen Probe oder einer Probe selbst zu einer Reaktionslösung zum Bewirken einer RNA-Amplifikations-Reaktion umfasst, wobei die RNA unmittelbar amplifiziert wird.

[0025] In dem vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahren zur Amplifikation einer RNA ist der pH-Wert einer Reaktionslösung, zu der die Probe gegeben wird, 8,2 oder höher, bevorzugt 8,8 bis 9,2 bei 25°C, 7,4 oder höher, bevorzugt 8,0 bis 8,4, bei 55°C und/oder 7,1 oder höher, bevorzugt 7,7 bis 8,1, bei 70°C.

[0026] Wenn es sich bei der Probe um eine vom Blut stammende Probe, wie beispielsweise Blut, Plasma und Serum, handelt, ist der pH-Wert einer Reaktionslösung bevorzugt ungefähr 8,9 bei 25°C, ungefähr 8,1 bei 55°C und/oder ungefähr 7,8 bei 70°C.

[0027] Des Weiteren wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Amplifikation einer RNA ein Polyamin zu der Reaktionslösung in einem Nukleinsäure-Syntheseverfahren zur Amplifikation einer bestimmten RNA in einer Probe gegeben. Ein derartiges Polyamin kann zuerst zu einer Probe gegeben werden, die anschließend zu einer Reaktionslösung gegeben wird, oder das Polyamid kann alternativ direkt zu einer Reaktionslösung gegeben werden. Auch wenn ein Polyamin nicht gleichmäßig in einer Reaktionslösung enthalten ist (beispielsweise dann, wenn ein Polyamin zu einer Probe gegeben wird und die Probe zu einer Reaktionslösung gegeben wird, ohne dass gerührt wird), hat es die gleiche Wirkung. Es können entweder lediglich ein einziges Polyamin oder eine Kombination mehrerer verschiedener Polyamine verwendet werden.

[0028] Polyamin ist der allgemeine Name für einen Kohlenwasserstoff mit zwei oder mehr primären oder sekundären Aminogruppen. Während einige Polyamine in vivo vorkommen und in hohen Mengen in Geweben enthalten sind, die intensiver Proteinsynthese und Nukleinsäuresynthese unterliegen, wodurch sie verschiedene physiologische Wirkungen ausüben, besitzen die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Polyamine nicht notwendigerweise solche Wirkungen; es können jegliche Polyamine, bei denen es sich um Kohlenwasserstoffe mit zwei oder mehr primären oder sekundären Aminogruppen in ihrem Molekül handelt, ohne irgendwelche Einschränkungen verwendet werden.

[0029] Dabei handelt es sich z. B. typischerweise um ein gerades Polyamin mit zwei Aminogruppen in seinem Molekül (Ethylendiamin, Trimethylendiamin, Putrescin), ein gerades Polyamin mit drei Aminogruppen (Spermidin, Diethylentriamin), ein gerades Polyamin mit vier Aminogruppen (Spermin, Triethylentetramin), ein gerades Polyamin mit fünf Aminogruppen (Tetraethylenpentamin), ein gerades Polyamin mit sechs Aminogruppen (Pentaethylenhexamin), ein zyklisches Polyamin (1,4-bis(3-aminopropyl)-piperazin, 1-(2-Aminoethyl)piperazin, 1-(2-Aminoethyl)piperidin, 1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan und Tris(2-aminoethyl)amin und Ähnliches.

[0030] Die Menge (Konzentration) eines zugegebenen Polyamins kann in Abhängigkeit des Polyamintyps, des Probenotyps oder der Probenkonzentration und Ähnlichem variieren; die Wirkung kann bei einer höheren Konzentration erreicht werden, wenn die Anzahl der Aminogruppen in dem Molekül geringer ist, und bei einer niedrigeren Konzentration, wenn die Anzahl der Aminogruppen höher ist. Beispielsweise wird Ethylendiamin, welches zwei Aminogruppen aufweist, bevorzugt mit einer Konzentration von ungefähr 8 mM zugegeben, wäh-

rend Tetraethylenpentamin und Pentaethylenhexamin, welche fünf oder mehr Aminogruppen aufweisen, inhibitorische Wirkungen auf die Amplifikations-Reaktion haben, wenn sie mit 4 mM oder darüber zugegeben werden; somit werden sie bevorzugt mit Konzentrationen nicht über 2 mM zugegeben.

[0031] Des Weiteren wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Amplifikation einer RNA ein sulfatiertes Polysaccharid zu einer Reaktionslösung in einem Nukleinsäure-Syntheseverfahren zur Amplifikation einer bestimmten RNA in einer Probe gegeben. Ein derartiges sulfatiertes Polysaccharid kann zunächst zu einer Probe und anschließend zu einer Reaktionslösung gegeben werden, oder das sulfatierte Polysaccharid kann alternativ direkt zu einer Reaktionslösung gegeben werden. Auch wenn ein sulfatiertes Polysaccharid nicht gleichmäßig in einer Reaktionslösung enthalten ist (beispielsweise, wenn ein sulfatiertes Polysaccharid zu einer Probe gegeben wird und die Probe zu einer Reaktionslösung ohne Rühren gegeben wird), weist es die gleiche Wirkung auf. Es kann lediglich ein einziges sulfatiertes Polysaccharid oder eine Kombination mehrerer verschiedener sulfatierter Polysaccharide verwendet werden.

[0032] Obwohl Heparin und dessen Salze und Dextransulfat und dessen Salze die sulfatierten Polysaccharide darstellen, die bevorzugt in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind auch andere Substanzen, wie beispielsweise Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Funoran, sulfatiertes Agarose, Carrageenan, Porphyran, Fucoidan oder sulfatiertes Curdlan, geeignet.

[0033] Die Menge (Konzentration) eines zugegebenen sulfatierten Polysaccharids kann in Abhängigkeit des Typs des sulfatierten Polysaccharids, des Probenotyps oder der Probenkonzentration und Ähnlichem variieren; sie beträgt bevorzugt 0,4 bis 25 µg/ml in einer Reaktionslösung, wenn eine von Blut stammende Probe verwendet wird, und Heparin als sulfatiertes Polysaccharid verwendet wird. Bei Verwendung einer von Blut stammenden Probe und von Dextransulfat als sulfatiertes Polysaccharid beträgt die Konzentration bevorzugt 0,05 bis 8 µg/ml in einer Reaktionslösung.

[0034] Eine RT-Reaktionslösung enthält im Allgemeinen eine pH-Puffer-Lösung, Salze, wie beispielsweise MgCl₂ und KCl, Dithiotreitol (DTT), einen oder mehrere Primer, Desoxyribonukleotide, einen RNase-Inhibitor und eine reverse Transkriptase. Die oben beispielhaft genannten Salze können durch andere geeignete Salze ersetzt werden. Gegebenenfalls werden Proteine, wie beispielsweise Gelatine und Albumin, sowie grenzflächenaktive Stoffe und Ähnliches zugegeben.

[0035] Eine Reaktionslösung für eine PCR, die anschließend an eine RT-Reaktion in einer RT-PCR durchgeführt wird, enthält im Allgemeinen eine pH-Puffer-Lösung, Salze, wie beispielsweise MgCl₂ und KCl, Primer, Desoxyribonukleotide und eine hitzeresistente Polymerase. Die oben beispielhaft genannten Salze können durch andere geeignete Salze ersetzt werden. Außerdem können gegebenenfalls Proteine, wie beispielsweise Gelatine und Albumin, sowie Dimethylsulfoxid, grenzflächenaktive Stoffe und Ähnliches zugegeben werden.

[0036] Eine RT-PCR kann durchgeführt werden, indem ein Teil eines RT-Reaktionsprodukts zu einer PCR-Reaktionslösung gegeben wird (zwei Reaktionsgefäße – zwei Schritte) oder indem ein PCR-Reaktionsreagenz zu einem RT-Reaktionsprodukt gegeben wird (ein Reaktionsgefäß – zwei Schritte); sie kann auch als kontinuierliches Verfahren einer RT-Reaktion mit anschließender PCR, wobei alle für eine RT-PCR-Reaktion erforderlichen Reagenzien vorher bereitgestellt werden, durchgeführt werden (ein Reaktionsgefäß – ein Schritt).

[0037] Eine pH-Puffer-Lösung ist eine Kombination von Tris(hydroxymethyl)aminomethan und einer Mineralsäure, wie beispielsweise Salzsäure, Salpetersäure und Schwefelsäure, wobei Salzsäure die bevorzugte Mineralsäure darstellt. Ebenso können verschiedene andere pH-Puffer-Lösungen, wie beispielsweise Kombinationen von Tricin, CAPSO (3-N-Cyclohexylamino-2-hydroxypropansulfonsäure) oder CHES (2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure), mit Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid verwendet werden. Eine Pufferlösung, deren pH-Wert eingestellt ist, wird häufig mit einer Konzentration von 10 mM bis 100 mM in einer Genamplifikations-Reaktionslösung verwendet.

[0038] Ein "Primer" bezeichnet ein Oligonukleotid, welches als Synthese-Anfangspunkt für eine cDNA-Synthese oder eine Nukleinsäure-Amplifikation dient. Obwohl ein einzelsträngiger Primer bevorzugt ist, können ebenso doppelsträngige Primer verwendet werden. Bei Verwendung eines doppelsträngigen Primers wird der Primer bevorzugt vor der Reaktion in einen einzelsträngigen Primer überführt. Ein Primer kann durch ein bekanntes Verfahren synthetisiert oder aus einem natürlich vorkommenden Wildtyp isoliert werden.

[0039] Eine in einer RT-Reaktion verwendete reverse Transkriptase bezeichnet ein Enzym, welches eine

RNA revers in cDNA umschreiben (transkribieren) kann. Beispiele für eine derartige reverse Transkriptase sind eine von einem Vogel-Retrovirus, wie beispielsweise dem Rous-Associated-Virus (RAV) und dem Vogel-Myeloblastose-Virus (AMV), stammende reverse Transkriptase, eine von einem murinen Retrovirus (MMLV), wie beispielsweise dem murinen Moloney-Leukämie-Virus (MMLV), stammende reverse Transkriptase, oder die oben beschriebene Tth-DNA-Polymerase.

[0040] Bei der RT-Reaktion der vorliegenden Erfindung wird bevorzugt eine reverse Transkriptase verwendet, die von einem Vogel-Retrovirus, insbesondere von AMV, stammt.

[0041] Eine hitzeresistente Polymerase, die in einer PCR verwendet wird, bezeichnet eine Polymerase mit ausgezeichneter Hitzebeständigkeit, welche eine Nukleinsäure als Antwort auf eine Primer-Zugabe synthetisiert. Beispiele für eine geeignete hitzeresistente Polymerase sind die von *Thermus Aquaticus* stammende Taq-DNA-Polymerase, die von *Thermus Thermophilus* stammende Tth-DNA-Polymerase, die von *Pyrococcus* stammende KOD, Pfu- oder Pwo-DNA-Polymerase oder einer Mischung dieser hitzeresistenten Polymerasen. Tth-DNA-Polymerase kann bequem als einzelnes Enzym verwendet werden, um eine RT-PCR in dem Ein-Gefäß-Ein-Schritt-Verfahren durchzuführen, da Tth-DNA-Polymerase ebenso RT-Aktivität aufweist.

[0042] Das Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren gemäß der vorliegenden Erfindung entspricht einem gewöhnlichen Verfahren, mit dem Unterschied, dass eine Reaktionslösung verwendet wird, deren pH-Wert höher ist als der einer gewöhnlich verwendeten Lösung, und/oder dass ein Polyamin und/oder ein sulfatiertes Polysaccharid zugegeben werden. Auf diese Weise findet bei einer RT-Reaktion die Reaktion über etwa 30 Minuten bis 1 Stunde bei einer Temperatur, die für einen Primer und eine ausgewählte reverse Transkriptase geeignet ist, statt. Bei einer PCR wird eine DNA zunächst mittels Hitzedenaturierung in eine einzelsträngige DNA überführt (Denaturierungsschritt). Als zweites werden die Primer, die einen zu amplifizierenden Bereich eingrenzen, hybridisiert (Annealing-Schritt). Anschließend werden die Primer durch eine DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) verlängert (Polymerisationsschritt).

Beispiele

[0043] Die vorliegende Erfindung wird weiter in den folgenden Beispielen, welche die Erfindung in keiner Weise einschränken, beschrieben.

[Ausführungsbeispiel 1]

[0044] In diesem Experiment wurde humanes Blut direkt zu einer erfindungsgemäß zusammengesetzten Reaktionslösung gegeben, um eine RT-PCR unter Verwendung eines Primers, der spezifisch für eine humane Beta-Actin-mRNA ist, durchzuführen. In der RT-PCR wurde 1 µl des humanen Bluts zu 50 µl der Reaktionslösung gegeben.

[0045] Der Primer für die RT-Reaktion war ein Oligonukleotid (BAR) mit der zur humanen Beta-Actin-mRNA komplementären Sequenz; in der anschließenden PCR wurde ein Oligonukleotid (BAF) mit der zu der in der RT-Reaktion synthetisierten cDNA komplementären Basensequenz zusätzlich verwendet. Um das von der RNA stammende Produkt von dem von der DNA stammenden Produkt in der RT-PCR zu unterscheiden, wurde der BAF-Primer auf das Exon 3 des humanes Beta-Actin-Gens und der BAR-Primer auf das Exon 4 gesetzt, wodurch ein Intron von 107 bp, welches durch die beiden Primer begrenzt wurde, erzeugt wurde. Entsprechend bestand bei der RT-PCR in diesem Experiment das von der RNA stammende Produkt aus 264 bp und das von der DNA stammende Produkt aus 370 bp. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind die folgenden:
BAF: 5' CAAGAGATGGCCACGGCTGCT 3' (Seq. ID No. 1)
BAR: 5' TCGTTCTGCATCCTGTCGGCA 3' (Seq. ID. No. 2)

[0046] Die verwendete RT-Reaktionslösung (pH 8,9) enthielt 10 mM Tris-HCl, 35 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 2 mM DTT, 0,4 µM des BAR-Primers, 50 Einheiten/50 µl Ribonuklease-Inhibitor (Takara shuzo, Kyoto, Japan) und 5 Einheiten/50 µl AMV XL reverse Transkriptase (Takara shuzo) zusammen mit einem Polyamin und einem sulfatierten Polysaccharid. In diesem Experiment wurde Triethyltetramin als Polyamin mit einer Konzentration von 2 mM zugegeben. Als sulfatiertes Polysaccharid wurde Heparin Na mit einer Konzentration von 0,8 µg/ml zugegeben.

[0047] In der auf die RT-Reaktion folgenden PCR wurden 20 pmol des BAF-Primers und 1,25 Einheiten der Taq-DNA-Polymerase (TaKaRa Taq: Takara shuzo) zu der oben beschriebenen RT-Reaktionslösung gegeben.

[0048] Die RT-Reaktion wurde 30 Minuten bei 55°C durchgeführt; anschließend wurde bei 95°C 5 Minuten behandelt, wodurch die reverse Transkriptase inaktiviert wurde.

[0049] Nach dieser Prozedur wurden der BAF-Primer und die Taq-DNA- Polymerase zugegeben, um eine PCR durchzuführen. Die PCR umfasste 50 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus 30 Sekunden bei 94°C, gefolgt von 30 Sekunden bei 68°C, gefolgt von 60 Sekunden bei 72°C bestand; dann wurde eine finale Polymerisation bei 72°C über 7 Minuten durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurden 5 µl der Reaktionslösung einer Elektrophorese auf einem 2,5%-igen Agarosegel in TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA), enthaltend 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, unterzogen, um das Amplifikationsprodukt zu detektieren.

[0050] [Fig. 1](#) zeigt die Ergebnisse der Elektrophorese eines Amplifikationsprodukts, welches durch eine RT-PCR, in der 1 µl humanes Blut direkt zu 50 µl der Reaktionslösung gegeben worden waren, erhalten wurde.

[0051] In dieser Figur bezeichnet "M" einen Größenmarker (250 ng ϕ X174-RF-DNA, erhalten durch Spaltung mit HincII), "1" zeigt die Ergebnisse der RT-PCR in Gegenwart der reversen Transkriptase, und "2" zeigt die Ergebnisse in Abwesenheit der reversen Transkriptase zum Vergleich.

[0052] Auf der Grundlage der oben beschriebenen Ergebnisse wurde ein Amplifikationsprodukt spezifisch für die humane Beta-Actin-mRNA (Pfeil) in der RT-PCR erhalten, die in Gegenwart von reverser Transkriptase unter Zugabe von humanem Blut direkt zu der Reaktionslösung durchgeführt worden war (Spur 1). Die oberhalb des Pfeils auftretenden Amplifikations-Produkte sind DNA-Amplifikations-Produkte, die während der PCR amplifiziert wurden.

[Ausführungsbeispiel 2]

[0053] In diesem Experiment wurde humanes Blut mit einer hypotonischen Lösung behandelt, um eine Hämolyse zu bewirken, und dann zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen und ein Leukozyten-Pellet zu erhalten, zu dem die Reaktionslösung wie bei Ausführungsbeispiel 1 gegeben wurde, um eine RT-PCR zu bewirken. Die RT-PCR und der Nachweis der RNA-Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese wurde unter Bedingungen durchgeführt, die denen in Ausführungsbeispiel 1 entsprachen.

[0054] Zu verschiedenen Mengen des Leukozyten-Pellets wurden 50 µl der Reaktionslösung gegeben, um die RT-PCR durchzuführen; die Ergebnisse der Elektrophorese der Amplifikationsprodukte sind in [Fig. 2](#) dargestellt.

[0055] In dieser Figur bezeichnet "M" einen Größenmarker (250 ng von ϕ X174-RF-DNA, erhalten durch eine Spaltung mit HincII), "2", "3", "4" und "5" zeigen die Ergebnisse der RT-PCR, in der das Leukozyten-Pellet, welches durch Behandlung von 10 µl, 20 µl, 40 ml bzw. 80 µl humanen Bluts hergestellt worden war, mit 50 µl der Reaktionslösung kombiniert wurde. "1" zeigt die Ergebnisse einer Kontroll-RT-PCR in Abwesenheit von Leukozyten.

[0056] Auf der Grundlage der oben beschriebenen Ergebnisse wurde ein Amplifikationsprodukt spezifisch für die humane Beta-Actin-mRNA (Pfeil) bei jeglicher zugegebener Leukozytenmenge in der RT-PCR, in der eine Reaktionslösung der vorliegenden Erfindung zu dem humanen Leukozyten-Pellet gegeben wurde, erhalten. Die Amplifikationsprodukte oberhalb des Pfeils sind DNA-Amplifikationsprodukte, welche während der PCR amplifiziert wurden.

[0057] [Fig. 2](#) zeigt außerdem, dass ein Amplifikationsprodukt spezifisch für die humane Beta-Actin-mRNA erhalten wurde, sogar wenn Leukozyten, die durch Behandlung des Bluts erhalten wurden, in einer so hohen Menge wie 80 µl der RT-PCR unterzogen wurden (Spur 5).

[0058] Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine RT-PCR, welche eine Reaktionslösung der vorliegenden Erfindung verwendet, eine RNA-Analyse einer großen Leukozytenmenge ermöglicht. Demgemäß kann eine RNA, die in einem Teil der Zellen exprimiert wird, oder eine RNA, die in einer kleinen Menge in einer Zelle exprimiert wird, direkt aus einer Probe oder einem RNA-Einschlusskörper in einer Probe durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens analysiert werden.

Sequenzliste

<110> Shimadzu Corporation
 <120> Verfahren zur Amplifikation von RNA
 <130> P10242EPSHI
 <140> 00114422.9
 <141> 2000-07-05
 <150> JP 11-202626
 <151> 1999-07-16
 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 1
 caagagatgg ccacggctgc t
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 2
 tcgttctgca tcctgtcggc a

Patentansprüche

1. In einem Reaktionsgefäß durchgeführtes, zweistufiges RT-PCR-Verfahren zur Amplifikation von RNA in einem RNA-Einschlusskörper, ausgewählt aus einer Zelle, einem Pilz, einem Bakterium und/oder einem Virus, wobei der RNA-Einschlusskörper in einer biologischen Probe, ausgewählt aus einem tierischen Gewebe, einem pflanzlichen Gewebe, einer Körperflüssigkeit und/oder einem ausgeschiedenen Stoff, enthalten ist, mit den Stufen:

- a) Bereitstellen einer Reaktionslösung für reverse Transkription, enthaltend eine reverse Transkriptase und wenigstens ein Polyamid, sulfatiertes Polysaccharid, ein Salz davon oder eine Mischung davon, in dem Reaktionsgefäß,
- b) Inkubieren der biologischen Probe oder des RNA-Einschlusskörpers, der getrennt von der biologischen Probe vorliegt, ohne dass RNA aus dem RNA-Einschlusskörper aufgereinigt wurde, in der Reaktionslösung unter

Bedingungen, die die Herstellung eines reversen Transkriptions-Produkts ermöglichen, und
 c) Inkubieren des Produkts aus der reversen Transkription mit einer nachfolgend zugegebenen, hitzeresistenten DNA-Polymerase unter Bedingungen, die die Herstellung eines DNA-Synthese-Produkts ermöglichen.

2. In einem Reaktionsgefäß durchgeführtes, einstufiges RT-PCR-Verfahren zur Amplifikation von RNA in einem RNA-Einschlusskörper, ausgewählt aus einer Zelle, einem Pilz, einem Bakterium und/oder einem Virus, wobei der RNA-Einschlusskörper in einer biologischen Probe, ausgewählt aus einem tierischen Gewebe, einem pflanzlichen Gewebe, einer Körperflüssigkeit und/oder einem ausgeschiedenen Stoff, enthalten ist, mit den Stufen:

- a) Bereitstellen einer Reaktionslösung für reverse Transkription und DNA-Synthese, enthaltend eine reverse Transkriptase, eine hitzeresistente DNA-Polymerase und wenigstens ein Polyamid, sulfatiertes Polysaccharid, ein Salz davon oder eine Mischung davon, in dem Reaktionsgefäß,
- b) Inkubieren der biologischen Probe oder des RNA-Einschlusskörpers, der getrennt von der biologischen Probe vorliegt, ohne dass RNA aus dem RNA-Einschlusskörper aufgereinigt wurde, in der Reaktionslösung unter Bedingungen, die den Erhalt eines reversen Transkriptions-Produkts ermöglichen, und
- c) Inkubieren des Produkts aus der reversen Transkription mit der hitzeresistenten DNA-Polymerase unter Bedingungen, die den Erhalt eines DNA-Synthese-Produkts ermöglichen.

3. In zwei Reaktionsgefäßen durchgeführtes, zweistufiges RT-PCR-Verfahren zur Amplifikation von RNA in einem RNA-Einschlusskörper, ausgewählt aus einer Zelle, einem Pilz, einem Bakterium und/oder einem Virus, wobei der RNA-Einschlusskörper in einer biologischen Probe, ausgewählt aus einem tierischen Gewebe, einem pflanzlichen Gewebe, einer Körperflüssigkeit und/oder einem ausgeschiedenen Stoff, enthalten ist, mit den Stufen:

- a) Bereitstellen einer Reaktionslösung für reverse Transkription, enthaltend eine reverse Transkriptase und wenigstens ein Polyamid, sulfatiertes Polysaccharid, ein Salz davon oder eine Mischung davon, in dem Reaktionsgefäß,
- b) Inkubieren der biologischen Probe oder des RNA-Einschlusskörpers, der getrennt von der biologischen Probe vorliegt, ohne dass RNA aus dem RNA-Einschlusskörper aufgereinigt wurde, in der Reaktionslösung unter Bedingungen, die den Erhalt eines reversen Transkriptions-Produkts ermöglichen,
- c) Bereitstellen einer Reaktionslösung für DNA-Synthese, enthaltend eine hitzeresistente DNA-Polymerase, in dem anderen Reaktionsgefäß, und
- d) Inkubieren des Produkts aus der reversen Transkription mit der hitzeresistenten DNA-Polymerase unter Bedingungen, die den Erhalt eines DNA-Synthese-Produkts ermöglichen.

4. Verfahren zur Amplifikation von RNA gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei in Stufe a) der pH-Wert der Reaktionslösung bei 25°C 8,2 oder höher, bei 55°C 7,4 oder höher und/oder bei 70°C 7,1 oder höher ist.

5. Verfahren zur Amplifikation von RNA gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Polyamin ausgewählt ist aus Ethylendiamin, Trimethylendiamin, Putreszin, Spermidin, Diethylentriamin, Spermin, Triethylentetramin, Tetraethylenpentamin, Pentaethylenhexamin, 1,4-Bis(3-aminopropyl)-piperazin, 1-(2-Aminoethyl)piperazin, 1-(2-Aminoethyl)piperidin, 1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan und Tris(2-aminoethyl)amin.

6. Verfahren zur Amplifikation von RNA gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das sulfatierte Polysaccharid und/oder dessen Salz(e) ausgewählt ist/sind aus Heparin und/oder Salzen davon und Dextransulfat und/oder Salzen davon.

7. Verfahren zur Amplifikation von RNA gemäß Anspruch 6, wobei Heparin und/oder dessen Salz(e) in einer Konzentration von 0,4 bis 25 µg/ml zu der Reaktionslösung gegeben wird/werden.

8. Verfahren zur Amplifikation von RNA gemäß Anspruch 6, wobei Dextransulfat und/oder dessen Salz(e) in einer Konzentration von 0,05 bis 8 µg/ml zu der Reaktionslösung gegeben wird/werden.

9. Verfahren zum Nachweis eines RNA-Virus, eines Retrovirus, einer veränderten (varianten) Zelle und einer mRNA, Verfahren zur Analyse eines Expressions-Gens durch Basensequenzierung oder Verfahren zur Analyse und Herstellung eines Expressionsprodukts durch cDNA-Klonierung, welches die Stufen eines Verfahrens gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 3 umfasst.

10. Verwendung eines Polyamins, ausgewählt aus Ethylendiamin, Trimethylendiamin, Putreszin, Diethy-

lentriamin, Spermin, Triethylentetramin, Tetraethylenpentamin, Pentaethylenhexamin, 1,4-Bis(3-aminopropyl)-piperazin, 1-(2-Aminoethyl)piperazin, 1-(2-Aminoethyl)piperidin, 1,4,10,13-Tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan und Tris(2-aminoethyl)amin, oder einer Mischung dieser Polyamine und/oder eines sulfatierten Polysaccharids, ausgewählt aus Dextransulfat, Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Funoran, sulfatierter Agarose, Carrageenan, Porphyran, Fucoidan, sulfatierem Curdlan und deren Salzen, oder einer Mischung dieser sulfatierten Polysaccharide für eine RT- und/oder RT-PCR-Reaktionslösung.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

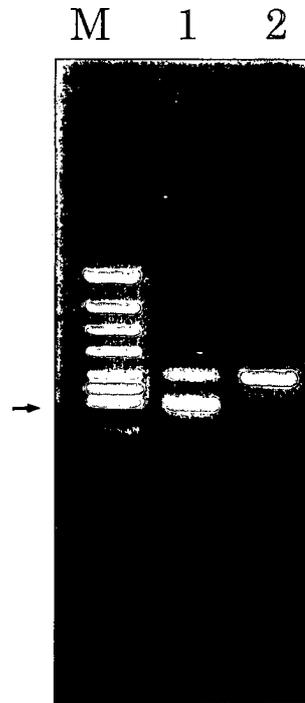


Fig. 2

