



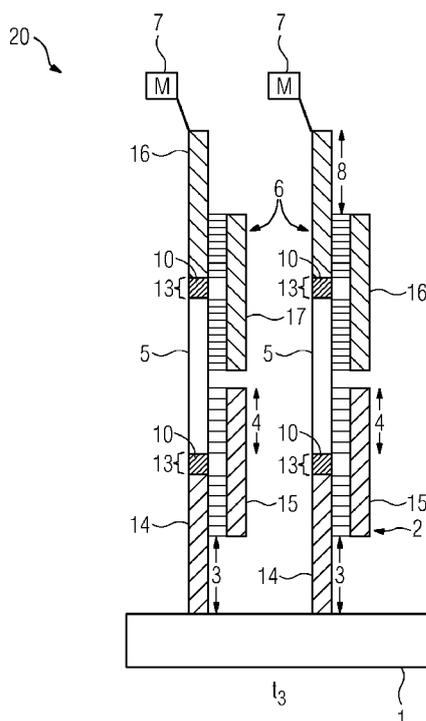
- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2015/058297
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
16. April 2015 (16.04.2015)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
10 2014 210 092.5 27. Mai 2014 (27.05.2014) DE
- (71) **Anmelder:** SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).
- (72) **Erfinder:** HOFMANN, Stefan; Am Europakanal 14,
91056 Erlangen (DE). GUMBRECHT, Walter; In der
Röte 1, 91074 Herzogenaurach (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,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** DEVICE AND METHOD FOR DETECTING AND QUANTIFYING SINGLE-STRANDED TARGET NUCLEIC ACIDS

(54) **Bezeichnung :** VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR DETEKTION UND QUANTIFIZIERUNG VON EINZELSTRÄNGIGEN ZIEL-NUKLEINSÄUREN

FIG 5



(57) **Abstract:** The invention relates to a device and a method for detecting and quantifying single-stranded target nucleic acids. The device comprises at least one solid carrier on which at least one double-stranded capture oligonucleotide and at least one double-stranded reporter oligonucleotide are immobilised. The capture oligonucleotide comprises at least one first oligonucleotide sequence that is partially complementary to a target nucleic acid, and the reporter oligonucleotide comprises at least one second oligonucleotide sequence that is partially complementary to the target nucleic acids. The device also comprises a reading unit for reading a marker of the reporter oligonucleotide on the carrier.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäuren. Die Vorrichtung umfasst wenigstens einen festen Träger, auf dem wenigstens ein doppelsträngiges Fänger-Oligonucleotid und wenigstens ein doppelsträngiges Reporter-Oligonucleotid immobilisiert sind. Das Fänger-Oligonucleotid umfasst wenigstens eine erste Oligonucleotid-Sequenz, welche zu einer Ziel-Nukleinsäuren teilweise komplementär ist und das Reporter-Oligonucleotid umfasst wenigstens eine zweite Oligonucleotid-Sequenz, welche zur Ziel-Nukleinsäuren teilweise komplementär ist. Weiterhin umfasst die Vorrichtung eine Ausleseeinheit zum Auslesen einer Markierung des Reporter-Oligonucleotids auf dem Träger.

WO 2015/180887 A1 

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, **Veröffentlicht:**
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, — *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz*
TG). *3)*

Beschreibung

Vorrichtung und Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäuren

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäuren.

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 spezifisch an komplementäre Sequenzen von mRNA-Molekülen anlagern und dadurch die Translationsrate der mRNA in das entsprechende Protein verändern. Die kurzen Nukleinsäure-
20 Moleküle 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 ausgewählte miRNAs in einem direkten Zusammenhang mit dem Entstehen bestimmter Krebserkrankungen
25 wie Brustkrebs, 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
30 über 1000 verschiedene miRNA-Moleküle vorkommen.

Aufgrund der wachsenden Bedeutung und der Vielzahl von miRNAs werden Verfahren zu deren spezifischen Identifizierung und Quantifizierung benötigt. Es sind verschiedene Verfahren zum
35 Nachweis von miRNAs bekannt, beispielsweise die Sequenzierung der miRNAs oder die Amplifikation 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.

10

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.

15

20

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

25

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.

30

35

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion von einzelsträngigen Nukleinsäuren bereit zu stellen, welches die genannten Probleme löst.

5

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Detektion von wenigstens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure in einer Probe umfasst wenigstens einen festen Träger, auf dem wenigstens ein doppelsträngiges Fänger-Oligonukleotid immobilisiert ist. Das Fänger-Oligonukleotid umfasst einen ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang und einen zweiten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang. Das erste Ende des ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrangs ist fest an den Träger gebunden. Der zweite Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang weist einen ersten Fänger-Oligonukleotid-Überhang an der vom Träger abgewandten Seite auf.

Weiterhin umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung ein doppelsträngiges Reporter-Oligonukleotid mit einem ersten und einem zweiten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang. Ein erstes Ende des zweiten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrangs umfasst einen ersten einzelsträngigen Reporter-Oligonukleotid-Überhang.

Der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang umfasst wenigstens eine erste Oligonukleotidsequenz, welche zu einem ersten Ziel-Nukleinsäurenabschnitt komplementär ist. Der erste Reporter-Oligonukleotid-Überhang umfasst wenigstens eine zweite Oligonukleotidsequenz, welche zu einem zweiten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt komplementär ist. Der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang hybridisiert somit mit dem ersten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt und der erste Reporter-Oligonukleotid-Überhang hybridisiert mit dem zweiten Ziel-Nukleinsäure-Abschnitt.

35

Weiterhin umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung eine Ausleseseinheit zum Auslesen einer Markierung des ersten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrangs auf dem Träger.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von wenigstens einer einzelsträngigen Zielnukleinsäure umfasst mehrere Schritte: Bereitstellen wenigstens eines festen Trägers auf dem wenigstens ein doppelsträngiges Fänger-Oligonukleotid immobilisiert ist. Das Fänger-Oligonukleotid umfasst einen ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang und einen zweiten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang. Das erste Ende des ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrangs ist an den Träger gebunden. Der zweite Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang weist einen ersten Fänger-Oligonukleotid-Überhang an der vom Träger abgewandten Seite auf.

Ein weiterer Schritt ist das in Kontaktbringen des Trägers mit wenigstens einer einzelsträngigen Zielnukleinsäure und wenigstens einem doppelsträngigen Reporter-Oligonukleotid bei einer ersten Hybridisierungsbedingung, wobei das Reporter-Oligonukleotid einen ersten und einen zweiten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang umfasst. Ein erstes Ende des zweiten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrangs umfasst einen ersten einzelsträngigen Reporter-Oligonukleotid-Überhang.

Der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang umfasst wenigstens eine erste Oligonukleotidsequenz, welche zu einem ersten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt komplementär ist. Weiterhin umfasst der erste Reporter-Oligonukleotid-Überhang wenigstens eine zweite Oligonukleotidsequenz, welche zu einem zweiten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt komplementär ist, derart, dass der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang mit dem ersten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt und dem ersten Reporter-Oligonukleotid-Überhang mit dem zweiten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt hybridisieren.

Das Verfahren umfasst weiterhin den Schritt Ligieren der Ziel-Nukleinsäure an den ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang und an den ersten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang mittels einer Ligase. Weiterhin umfasst es ein erstes Waschen des Trägers bei stringenten Waschbedingungen derart, dass der

Träger von nicht ligierten Nukleinsäuren gereinigt wird. Ein weiterer Schritt ist das Auslesen einer Markierung des ersten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrangs auf dem Träger.

5 Der Begriff Ziel-Nukleinsäure bezeichnet eine einzelsträngige Nukleinsäure mit einer Länge von insbesondere etwa 17 bis etwa 50 Nukleotiden. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Insbesondere sind die Nukleinsäuren natürlich vorkommende Nukleinsäuren sowie chemisch hergestellte oder re-

10 kombinant hergestellte Nukleinsäuren.

Der Begriff „hybridisieren“ bezeichnet das Anlagern einer einzelsträngigen RNA oder DNA an eine mindestens abschnittsweise komplementäre einzelsträngige RNA oder DNA unter Aus-

15 bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils komplementären Basen, so dass sich in dem zueinander komplementären Abschnitt zwischen den zwei Nukleinsäure-Molekülen Basen-

paarungen bilden.

20 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

25 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

30 einen Zusatz von Reagenzien wie beispielsweise Formamid.

Mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Spezifität der Analyse der Ziel-Nukleinsäure deutlich erhöht. Die Ziel-Nukleinsäure wird

35 vollständig an das Reporter- und das Fänger-Oligonukleotid gebunden. Somit wird jede Base analysiert ohne definierte Abschnitte der Ziel-Nukleinsäure auszulassen. Vorteilhaft wird

dadurch die Diskriminierung von Ziel-Nukleinsäuren, die sich in randständigen Nukleotiden unterscheiden verbessert.

Weiterhin wird die Sensitivität vorteilhaft erhöht. Nach dem
5 Schritt der Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäure an den Doppelstrang des Fänger-Oligonukleotids, bzw. des Reporter-Oligonukleotids, und nach der anschließenden Ligation der Ziel-Nukleinsäure mit dem Fänger-Oligonukleotid und dem Reporter-Oligonukleotid ist die Ziel-Nukleinsäure sowohl fest
10 an den Träger, als auch fest an die Markierung gebunden. Im Waschschrift werden somit sehr gezielt nur ungebundene oder schwach gebundene Reporter-Oligonukleotide oder Nicht-Ziel-Nukleinsäuren vom Träger entfernt. Vorteilhaft verringert dies falsch-positive Signale erheblich und erhöht somit die
15 Sensitivität. Durch die Erhöhung der Sensitivität kann vorteilhaft ein Amplifizieren der Ziel-Nukleinsäure vor einer Analyse vermieden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein quantitatives Messverfahren, welches vorteilhaft sehr geringe Testzeiten zum Nachweise der Ziel-Nukleinsäure benötigt.
20

In einer vorteilhaften Weiterbildung und Ausgestaltung der Erfindung umfasst der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang und/oder der erste Reporter-Oligonukleotid-Überhang acht bis
25 25 Basen. Die Länge des jeweiligen Überhangs hängt von der Länge der Ziel-Nukleinsäure ab. Die Ziel-Nukleinsäure beziehungsweise deren Komplementärsequenz wird auf den Reporter- und Fänger- Oligonukleotid-Überhang aufgeteilt. Diese Aufteilung erfolgt typischerweise derart, dass jedes Nukleotid der
30 Zielnukleinsäure an einen Reporter- oder Fänger-Überhang hybridisiert werden kann. Es ist aber auch denkbar, dass eine Nukleotidfolge oder eine einzelne Base der Ziel-Nukleinsäure weder an das Reporter-Oligonukleotid noch an das Fänger-
35 Oligonukleotid gebunden ist. Dies ist insbesondere zur Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen vorteilhaft.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung umfasst das erste Ende des ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrangs sechs Thyminbasen. Das Fänger-Oligonukleotid ist vorteilhaft mit wenigstens einer
5 Thyminbase an den Träger gebunden.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung weist der erste Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang die Markierung auf. Besonders bevorzugt weist der
10 erste Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang die Markierung an seinem zum Träger, bzw. zur Ziel-Nukleinsäure, distalen Ende auf. Die Markierung wird dann während der Ligation fest über die Ziel-Nukleinsäure und den ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang an den Träger gebunden.

15 In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung ist die Ligase eine T4-DNA-Ligase. Die T4-DNA Ligase ist ein Enzym, das die ATP-abhängige Ligation von zwei einzelsträngigen RNA- oder DNA-Molekülen katalysiert.
20 Dabei wird eine kovalente Bindung des 3'-Hydroxylendes eines ersten Nukleinsäure-Moleküls an das 5'-Phosphorylende eines zweiten Nukleinsäure-Moleküls hergestellt. Die T4-DNA Ligase kann insbesondere zwei DNA-Moleküle miteinander, zwei RNA-Moleküle miteinander sowie ein DNA-Molekül mit einem RNA-
25 Molekül ligieren. Dies ist erforderlich, da das Reporter- und das Fänger-Oligonukleotid typischerweise DNA-Nukleotide umfassen und die Ziel-Nukleinsäure typischerweise RNA-Nukleotide umfasst. Allerdings ligiert die T4-DNA Ligase nur das 5'-Ende einer DNA mit einem 3'-Ende einer RNA. Sie li-
30 giert nicht ein 3'-Ende der DNA mit einem 5'-Ende der RNA. Daher wird in einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung das 3'-Ende der DNA mit wenigstens einem, bevorzugt vier, RNA-Nukleotiden als Chimär synthetisiert, um eine Ligation zu ermöglichen. Dies betrifft
35 insbesondere den ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang. Dieser ist mit seinem 5'-Ende an den Träger gebunden. Das 3'-Ende des ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrangs wird hier mit dem 5'-Ende der Ziel-Nukleinsäure ligiert. Es ist aber

ebenso denkbar, dass die Orientierung der Teilstränge gegenläufig auf dem Träger gebunden ist.

Weiterhin muss zur Ligation von DNA und RNA mit der T4-DNA-Ligase das 5'-Ende der DNA und der RNA phosphoryliert sein. Die Ziel-Nukleinsäure ist insbesondere eine miRNA. Diese liegt bereits natürlich im Körper phosphoryliert vor. Das Reporter- oder das Fänger-Oligonukleotid muss entsprechend phosphoryliert synthetisiert werden.

10

Allgemein müssen für die T4-DNA-Ligase zusammenfassend folgende Voraussetzungen zur Ligation gegeben sein: Die zu ligierenden 5'-Enden müssen phosphoryliert vorliegen. Im Falle, dass die Ziel-Nukleinsäure eine RNA ist, müssen die zu ligierenden 3'-Enden des Reporter- oder Fänger-Oligonukleotids RNA-Nukleotide umfassen. Dies kann als RNA-Strang oder als Chimär ausgebildet sein, wobei das Chimär grundsätzlich stabiler ist.

15

20

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung erfolgt vor dem Ligieren ein zweites Waschen des Trägers bei milden Waschbedingungen. Bei milden Waschbedingungen ist die Salzkonzentration gegenüber den harschen Waschbedingungen erhöht und/oder die Temperatur erniedrigt. Bei harschen Waschbedingungen wird hingegen mit niedrigen Salzkonzentrationen und/oder hohen Temperaturen gewaschen.

25

30

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung werden wenigstens zwei unterschiedliche Ziel-Nukleinsäuren, vorzugsweise 3 bis 130 unterschiedliche Nukleinsäuren, gleichzeitig ausgelesen. Vorteilhaft ist der Träger dann als Chip ausgebildet.

35

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung wird die Ligation bei 37 °C durchgeführt.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung und Weiterbildung der Erfindung erfolgt das Auslesen der Markierung mittels eines „branched DNA“-Tests und das Reporter-Oligonukleotid ist vorzugsweise ein „Preamplifier“. Der
5 „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
10 „Preamplifier“ (auf deutsch: Vorverstärker) eingesetzt, der direkt oder indirekt an die nachzuweisende Ziel-Nukleinsäure hybridisiert. In nachfolgenden Schritten werden sogenannte
15 „Amplifier“ (auf deutsch: Verstärker) an den „Preamplifier“ hybridisiert. „Preamplifier“ und „Amplifier“ sind kurze einzelsträngige Oligodesoxyribonukleotide. Dabei sind die
20 „Amplifier“ verzweigte Oligodesoxyribonukleotide, die Reportermoleküle binden. Die Signalamplifizierung wird erreicht, indem mehrere „Amplifier“ an einen „Preamplifier“ binden und jeder „Amplifier“ typischerweise mehrere Reportermoleküle bindet.

20 Durch eine 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
25 Sensitivität des Verfahrens weiter erhöht. In Abhängigkeit der eingesetzten Markierung, insbesondere Enzym-Markierung oder bDNA-Test, können insbesondere beim Einsatz eines Enzyms bei Testzeiten kleiner als 30 Minuten Konzentrationen der Ziel-Nukleinsäure von kleiner 10 pM detektiert werden. Für
30 den Einsatz eines bDNA-Test sind für Testzeiten kleiner als 45 Minuten Konzentrationen von kleiner als 100fM detektierbar.

Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die
35 Zeichnungen noch weiter erläutert.

Fig. 1 zeigt schematisch die Schritte des Verfahrens zur Analyse einer RNA zu den Zeitpunkten t1 bis t5.

Fig. 2 zeigt schematisch einen Träger mit zwei Fänger-Oligonukleotiden zum Zeitpunkt t1.

5 Fig. 3 zeigt schematisch einen Träger mit zwei Fänger-Oligonukleotiden, zwei Reporter-Oligonukleotiden und zwei miRNAs zum Zeitpunkt t2.

10 Fig. 4 zeigt schematisch einen Träger mit zwei Fänger-Oligonukleotiden und einem Reporter-Oligonukleotid zum Zeitpunkt t2'.

15 Fig. 5 zeigt schematisch einen Träger mit zwei Fänger-Oligonukleotiden und zwei Reporter-Oligonukleotiden, zwei miRNAs und den T4-DNA Ligasen zum Zeitpunkt t3.

20 Fig. 6 zeigt schematisch die miRNA mit einem Fänger-Oligonukleotid-Einzelstrang und mit einem Reporter-Oligonukleotid-Einzelstrang ligiert zum Zeitpunkt t4.

Fig. 7 zeigt schematisch Fänger-Oligonukleotid-Einzelstrang nach harschen Waschbedingungen ohne miRNA Anwesenheit zum Zeitpunkt t4'.

25 Figur 1 zeigt schematisch die Schritte des Verfahrens zur Detektion und Quantifizierung einer miRNA. In diesem Beispiel ist die Ziel-Nukleinsäure eine miRNA mit dem Namen miR-16 5. MiR-16 5 ist eine miRNA, welche in Lymphozyten die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 vermindern kann. Das
30 Verfahren lässt sich beispielhaft in fünf Schritte in Gegenwart der miRNA 5 unterteilen (Schritte t1, t2, t3, t4 und t5). In Abwesenheit einer Ziel-Nukleinsäure 5 umfasst das Verfahren in diesem Beispiel die Schritte t1, t2', t4' und t5'.

35

In Schritt t1 erfolgt das Bereitstellen eines Trägers 1 mit daran immobilisierten doppelsträngigen Fänger-Oligonukleotiden 2 (Figur 2). Hierbei ist der erste Fänger-

Oligonukleotid-Teilstrang 14 mit einem erste Ende eines zweiten einzelsträngigen Fänger-Oligonukleotid-Überhangs 3 über einen Spacer fest an den Träger 1 gebunden, d.h. immobilisiert. Der Spacer umfasst insbesondere sechs Thymin-Basen.
5 Alternativ kann der erste Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang 14 mit dem ersten Ende an den Träger gebunden sein, wobei kein Oligonukleotid-Überhang vorhanden ist.

Der erste einzelsträngige Fänger-Oligonukleotid-Überhang 4
10 umfasst eine Oligonukleotid-Sequenz, welche zur Ziel-Nukleinsäure miR-16 5 abschnittsweise komplementär ist.

Im zweiten beispielhaften Verfahrensschritt zum Zeitpunkt t_2 bzw. t_2' (Figur 3 und 4) wird nun das Reporter-Oligonukleotid
15 6 zum System hinzugegeben und die biologische Probe über den Träger 1 geführt.

Für den Fall, dass die biologische Probe die Zielnukleinsäure miR-16 5 umfasst, ist dieser Schritt in Figur 3 gezeigt. In
20 Figur 3 ist schematisch dargestellt, dass das Fänger-Oligonukleotid 2 mit seinem ersten Fänger-Oligonukleotid-Überhang 4 mit einem ersten Abschnitt der miR16 5 hybridisiert. Weiterhin ist zu sehen, dass ein zweiter Abschnitt der miR-16 an einen zweiten Reporter-Oligonukleotid-Überhang 8,
25 welcher komplementär zu dem zweiten Abschnitt der miR-16 ist, hybridisiert. Das Reporter-Oligonukleotid 6 umfasst an einem zweiten Reporter-Oligonukleotid-Überhang 9 eine Markierung 7. Alternativ können die beiden Reporter-Oligonukleotid-Teilstränge 16, 17 am vom Träger aus gesehen distalen Ende
30 keinen Überhang haben, sondern in etwa gleich lang sein.

In diesem Beispiel sind die einzelsträngigen Abschnitte des Fänger-Oligonukleotids 4 und des Reporter-Oligonukleotids 9 in der Weise komplementär, dass kein freier Sequenzabschnitt
35 in der Mitte der miRNA 5 frei bleibt. Weiterhin umfasst der Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang ohne Markierung den zu einem Abschnitt der Ziel-Nukleinsäure komplementären Abschnitt.

Für den Fall, dass die biologische Probe keine Ziel-Nukleinsäure miR-16 5 umfasst, ist der Schritt zum Zeitpunkt t2' in Figur 4 schematisch dargestellt. Auch ohne die Anwesenheit einer Ziel-Nukleinsäure 5 können zwischen Reporter-Oligonukleotid 6 und Fänger-Oligonukleotid 2 schwache und unspezifische Bindungen entstehen.

In einem nächsten Verfahrensschritt zum Zeitpunkt t3 (Figur 5) wird nun Ligase zu dem System hinzugefügt. In diesem Beispiel handelt es sich um eine T4-DNA Ligase 13. Diese Ligase verbindet den ersten Fänger-Oligonukleotid -Teilstrang 14 an der Ligationsstelle 10 mit der miRNA 5 und dem ersten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang 16. Diese Verbindungen sind kovalente Bindungen. Das bedeutet, dass der erste Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang 14, die miRNA 5 und der erste Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang 16 fest miteinander verbunden sind. Zur Ligation der Einzelstränge 14, 5, 16 ist es erforderlich, dass diese unmittelbar aneinander grenzen. Dies wird dadurch gewährleistet, dass die beiden Überhänge 4, 9 die miRNA 5 vollständig komplementär binden.

Für den Fall, dass keine Ziel-Nukleinsäure 5 in der biologischen Probe vorliegt, kann die T4-DNA-Ligase 13 die Enden des Fänger-Oligonukleotids 2 und des Reporter-Oligonukleotids 6 nicht mit der Ziel-Nukleinsäure 5 ligieren.

Der Träger 1 wird anschließend bei einer Temperatur von 55°C für 10 Minuten mit einer salzhaltigen Pufferlösung gewaschen. Dadurch werden, in Anwesenheit der miR-16 5, die Basen-Paarungen des zweiten Fänger-Oligonukleotidteilstrangs 15 und des zweiten Reporter-Oligonukleotidteilstrangs 17 aufgeschmolzen und die gelösten Einzelstrang-Oligonukleotide 15, 17 mit dem Waschen entfernt. Dieser Waschschrift erfolgt mit einem Niedrigsalzpuffer.

Ist keine miR-16 5 vorhanden, löst sich während des Waschens des Trägers 1 bei 55°C unspezifisch gebundenes Reporter-Oligonukleotid 6 von dem Fänger-Oligonukleotid 2 ab. Das Re-

porter-Oligonukleotid 6 wird somit vom Träger 1 entfernt, so dass keine Markierung 7 auf dem Träger 1 verbleibt. Folglich wird beim Auslesen der Markierung 7 kein Signal gemessen. Figur 7 zeigt das Fänger-Oligonukleotid 2 nach diesem Waschprozess.

Auch für den Fall, dass eine miRNA anwesend ist, welche nicht komplementär zu dem Fänger-Oligonukleotid 2 oder Reporter-Oligonukleotid 6 ist, wird das Reporter-Oligonukleotid 6 mit der Markierung 7 gewaschen, da keine kovalente Bindung nach einer Ligation vorliegt. Somit wird auch kein Signal erzeugt. Dies sichert eine hohe Spezifität des Verfahrens für die jeweilige Ziel-miRNA.

Anschließend wird der Träger 1 auf eine Auslesetemperatur von 37°C gebracht bei der die Markierung 7 auf dem Träger 1 ausgewertet wird. Als Markierung 7 wird ein Enzym an das Reporter-Oligonukleotid 6 gekoppelt. In diesem Beispiel ist das Enzym bereits zu Beginn des Detektionsverfahrens an das Reporter-Oligonukleotid als Markierung gebunden. Alternativ kann die Kopplung des Enzyms in einem weiteren Verfahrensschritt an das Reporter-Oligonukleotid gebunden werden.

Zum Auslesen eines Signals wird ein Substrat auf den Träger 1 gegeben, das vom Enzym umgesetzt wird. Das Produkt dieser Reaktion wird elektrochemisch durch ein Redoxcycling an zwei Elektroden gemessen. Als Reporter-Enzym kann eine Esterase oder eine alkalische Phosphatase verwendet werden. Alternativ zu einer einfachen Enzymkopplung an das Reporter-Oligonukleotid 6, kann auch eine Signalamplifikation mit Hilfe eines „branched DNA“-Tests erfolgen. Dabei bildet in diesem Beispiel der „Preamplifier“ des bDNA Assays den Teilstrang des Reporters, der an die Ziel-Nukleinsäure ligiert wird.

Patentansprüche

1. Vorrichtung (20) zur Detektion von wenigstens einer
einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (5) in einer Probe, umfas-
5 send:

- wenigstens einen festen Träger (1), auf dem wenigstens ein
doppelsträngiges Fänger-Oligonukleotid (2) immobilisiert ist,
wobei das Fänger-Oligonukleotid (2) einen ersten Fänger- Oli-
gonukleotid-Teilstrang (14) und einen zweiten Fänger- Oligo-
10 nukleotid-Teilstrang (15) umfasst, wobei ein erstes Ende des
ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrangs (14) fest an den
Träger gebunden ist und wobei der zweite Fänger- Oligonukleo-
tid-Teilstrang (15) einen ersten Fänger-Oligonukleotid-
Überhang (4) an der vom Träger (1) abgewandten Seite auf-
15 weist,

- wenigstens ein doppelsträngiges Reporter-Oligonukleotid (6)
mit einem ersten und einem zweiten Reporter-Oligonukleotid-
Teilstrang (16, 17), wobei ein erstes Ende des zweiten Repor-
ter-Oligonukleotid-Teilstrangs (17) einen ersten
20 einzelsträngigen Reporter-Oligonukleotid-Überhang (9) um-
fasst,

- und wobei der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang (4) we-
nigstens eine erste Oligonukleotid-Sequenz umfasst, welche zu
einem ersten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt komplementär ist,
25 und wobei der erste Reporter-Oligonukleotid-Überhang (9) we-
nigstens eine zweite Oligonukleotid-Sequenz umfasst, welche
zu einem zweiten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt komplementär
ist, um den ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang (4) mit
dem ersten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt und den ersten Repor-
30 ter-Oligonukleotid-Überhang (9) mit dem zweiten Ziel-
Nukleinsäuren-Abschnitt zu hybridisieren;

- eine Ausleseeinheit zum Auslesen einer Markierung (7) des
ersten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrangs (16) auf dem Trä-
ger (1).

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei der erste Fänger-
Oligonukleotid-Überhang (4) und/oder der erste Reporter-
Oligonukleotid-Überhang (9) acht bis 25 Basen umfassen.

3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das erste Ende des ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrangs (14) sechs Thymin-Basen umfasst.

5

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der erste Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang als Chimär mit wenigstens einem, insbesondere mit vier, RNA-Nukleotiden an seinem 3'-Ende ausgebildet ist.

10

5. Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von wenigstens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (5) mit den Schritten:

- a) Bereitstellen wenigstens eines festen Trägers (1) auf dem wenigstens ein doppelsträngiges Fänger-Oligonukleotid (2) immobilisiert ist, wobei das Fänger-Oligonukleotid (2) einen ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang (14) und einen zweiten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang (15) umfasst, wobei ein erstes Ende des ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrangs (14) fest an den Träger gebunden ist und wobei der zweite Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang (15) einen ersten Fänger-Oligonukleotid-Überhang (4) an der vom Träger (1) abgewandten Seite aufweist,
- b) In -Kontaktbringen des Trägers (1) mit wenigstens einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure (5) und wenigstens einem doppelsträngigen Reporter-Oligonukleotid (6) bei einer ersten Hybridisierungsbedingung,
- wobei das Reporter-Oligonukleotid (6) einen ersten und einen zweiten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang (16, 17) umfasst, wobei ein erstes Ende des zweiten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrangs (17) einen ersten einzelsträngigen Reporter-Oligonukleotid-Überhang (9) umfasst,
 - und wobei der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang (4) wenigstens eine erste Oligonukleotid-Sequenz umfasst, welche zu einem ersten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt komplementär ist,
 - und wobei der erste Reporter-Oligonukleotid-Überhang (9) wenigstens eine zweite Oligonukleotid-Sequenz umfasst, welche zu einem zweiten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt komplementär

ist, derart, dass der erste Fänger-Oligonukleotid-Überhang (4) mit dem ersten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt und dem ersten Reporter-Oligonukleotid-Überhang (9) mit dem zweiten Ziel-Nukleinsäuren-Abschnitt hybridisieren;

- 5 c) Ligieren der Ziel-Nukleinsäure (5) an den ersten Fänger-Oligonukleotid-Teilstrang (14) und an den ersten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrang (16) mittels einer Ligase (13);
d) Erstes Waschen des Trägers (1) bei stringenten Waschbedingungen derart, dass der Träger (1) von nicht-ligierten Nukleinsäuren gereinigt wird;
10 e) Auslesen einer Markierung (7) des ersten Reporter-Oligonukleotid-Teilstrangs (16) auf dem Träger (1).

6. Verfahren nach Anspruch 5 mit einer RNA als Ziel-Nukleinsäure.
15

7. Verfahren nach Anspruch 6 mit einer miRNA (5) als RNA.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7 mit einer T4-DNA-Ligase (13) als Ligase.
20

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei vor dem Ligieren ein zweites Waschen des Trägers (1) bei milden Waschbedingungen erfolgt.
25

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, wobei wenigstens zwei unterschiedliche Ziel-Nukleinsäuren, vorzugsweise drei bis 130 unterschiedliche Nukleinsäuren gleichzeitig ausgelesen werden.
30

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 10, wobei die Ligation bei 37°C durchgeführt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 11, wobei das Auslesen der Markierung (7) mittels eines „branched DNA“-Tests erfolgt und das Reporter-Oligonukleotid (6) vorzugsweise ein „Preamplifier“ ist.
35

FIG 1

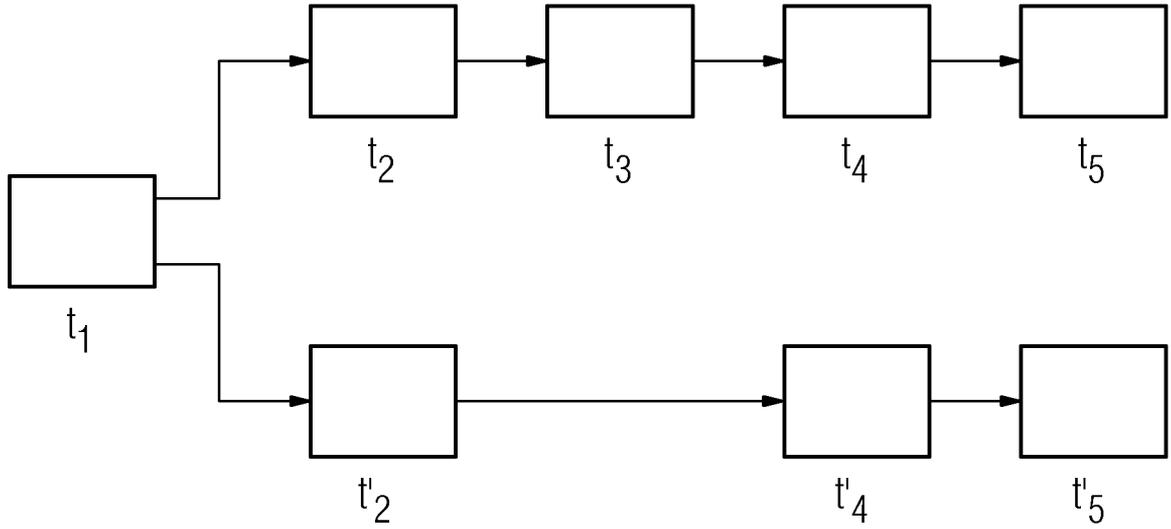


FIG 2

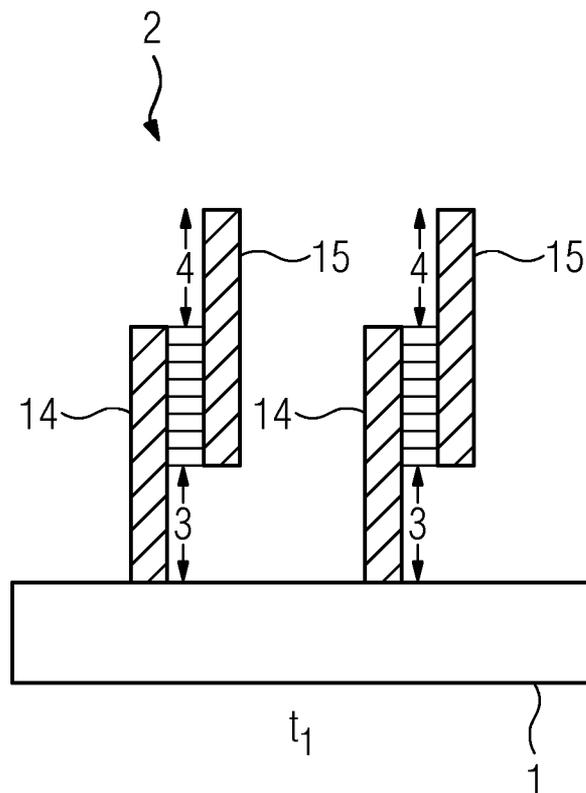


FIG 3

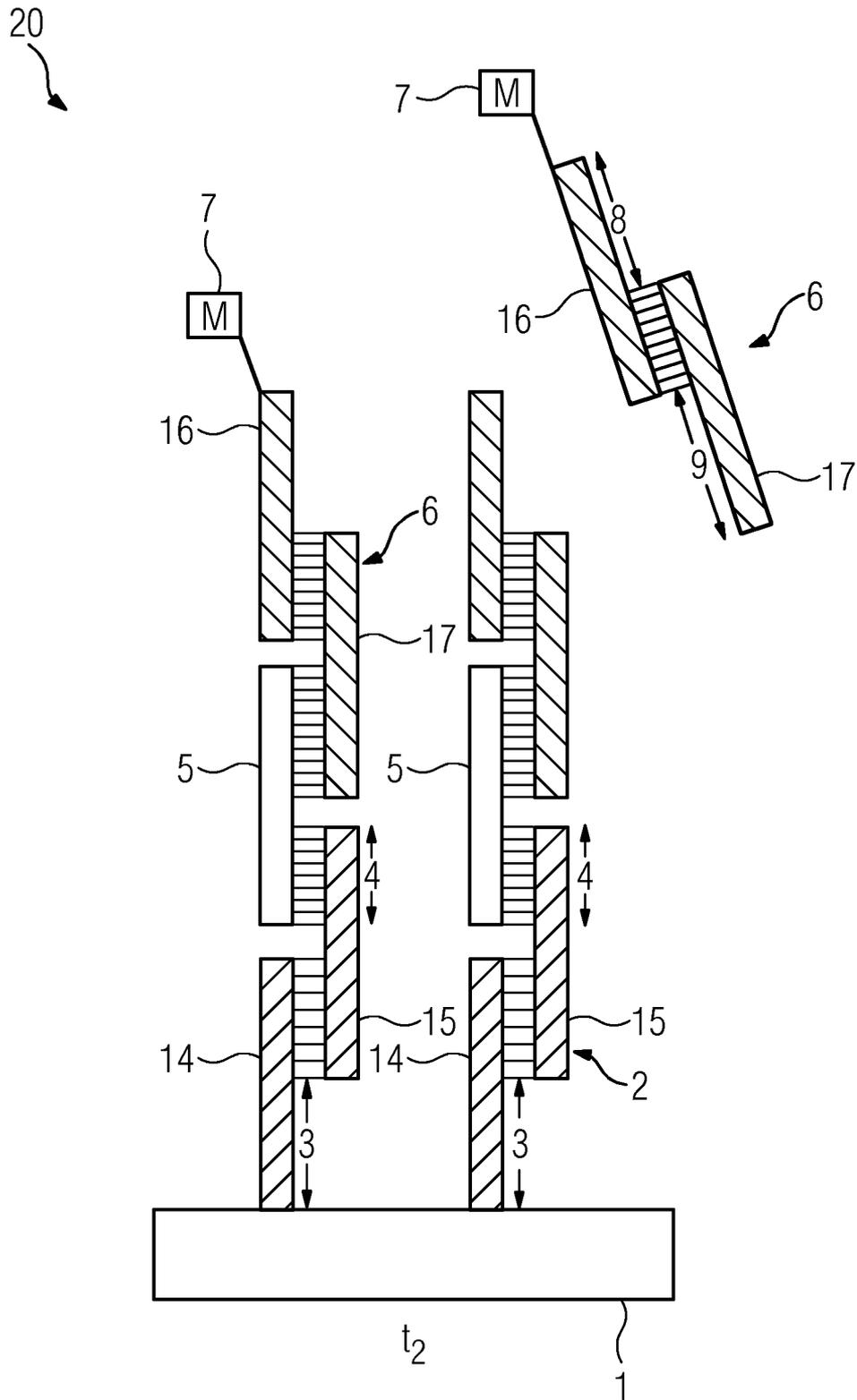


FIG 4

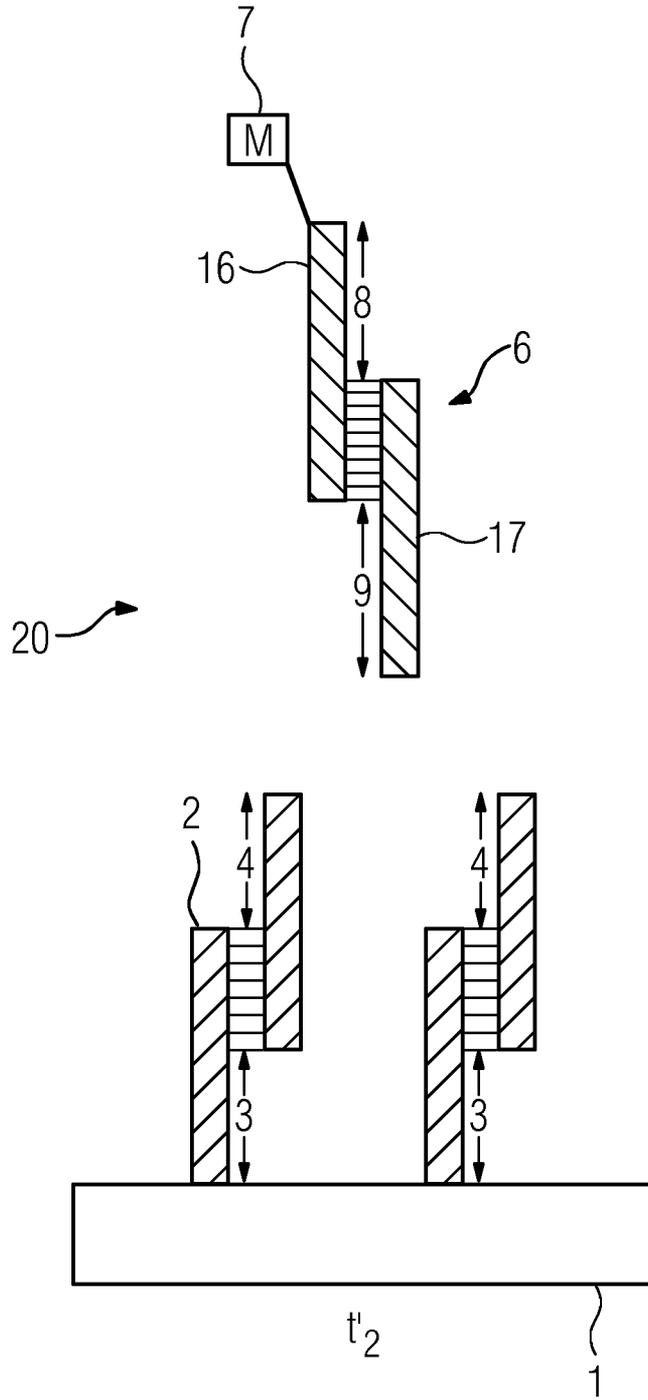


FIG 5

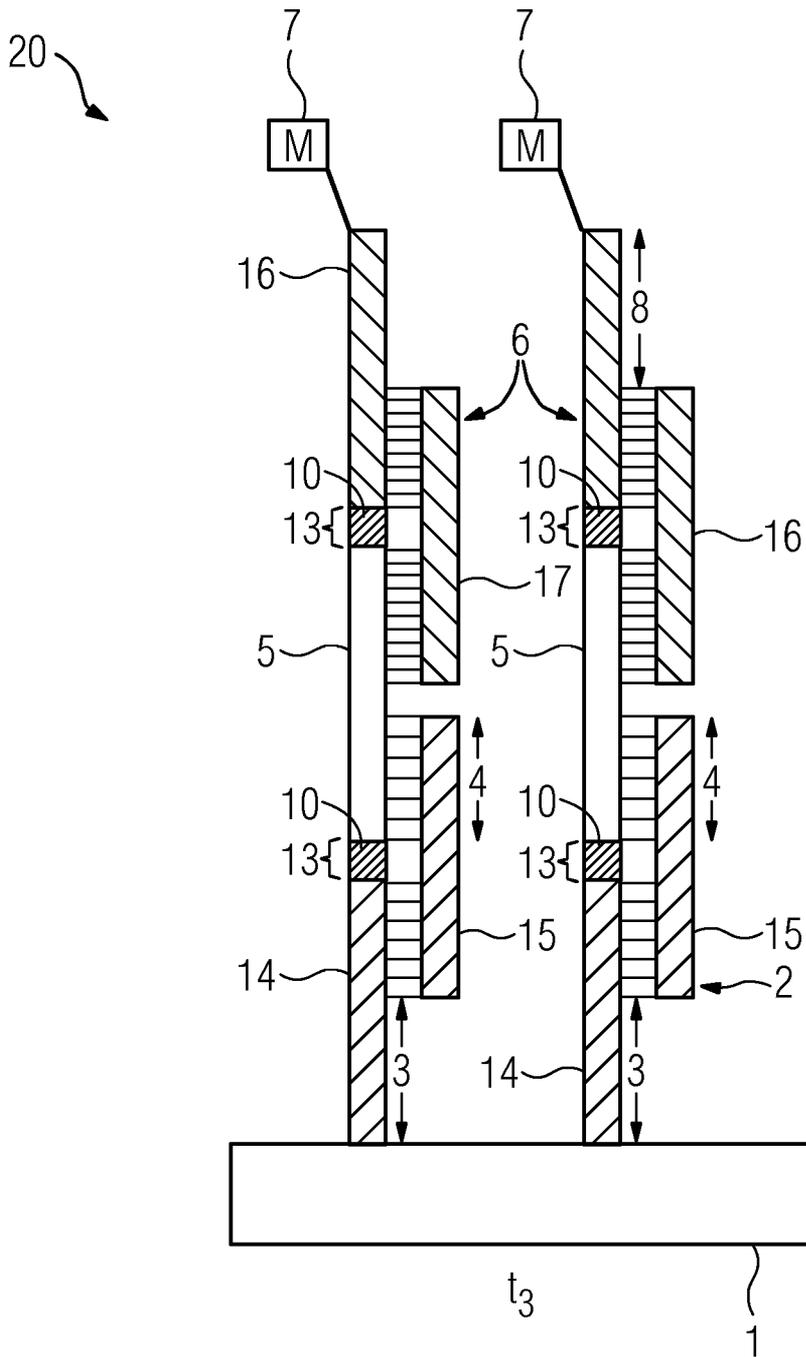


FIG 6

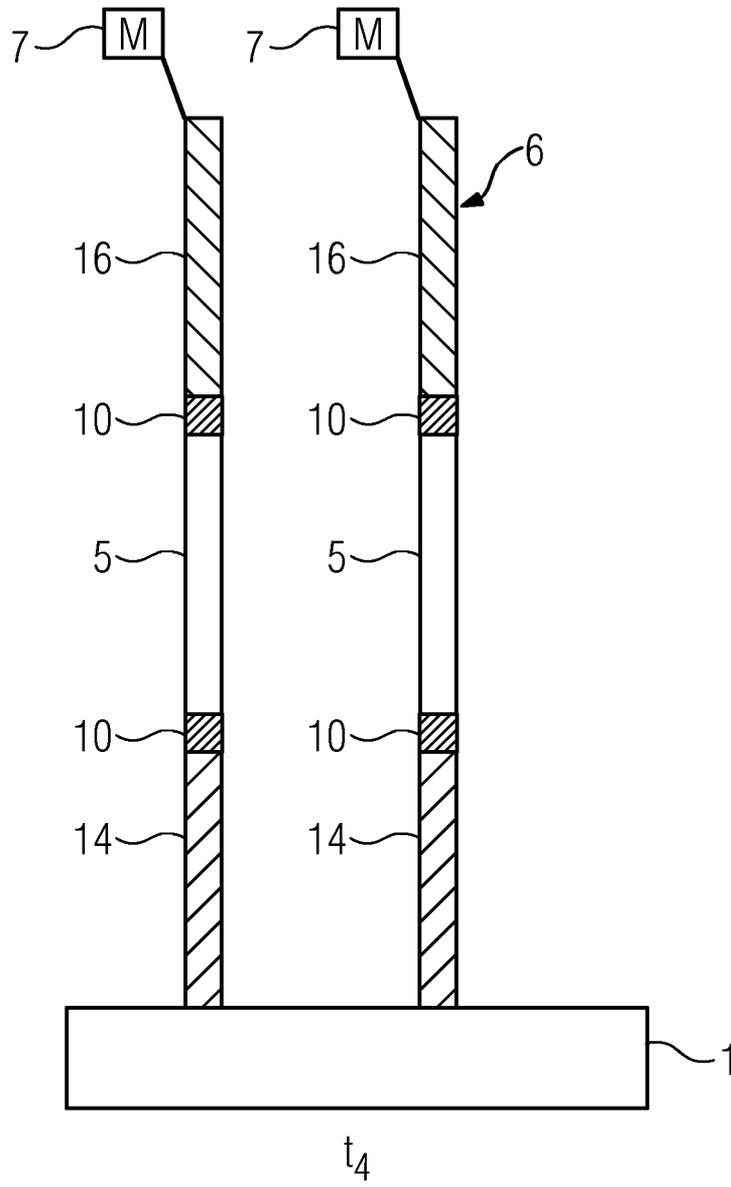
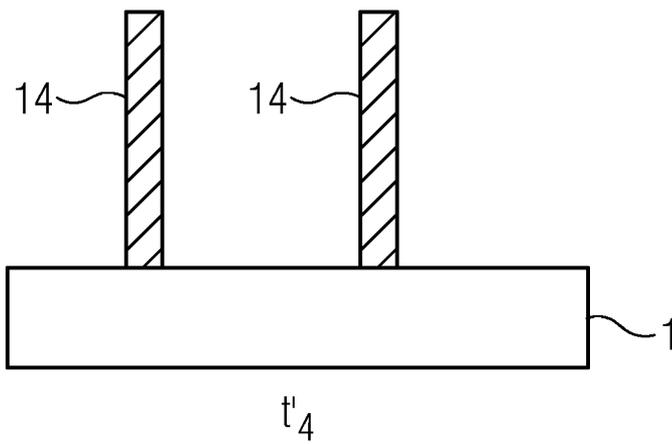


FIG 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/058297

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/087630 A1 (SIEMENS AG [DE]) 20 June 2013 (2013-06-20) page 4, line 7 - page 23, line 32; figure 1	1-12
X	----- Christopher Pöhlmann: "Elektrochemische Detektion von RNA mittels Nukleinsäurehybridisierung", 1 January 2009 (2009-01-01), XP055052872, Bayreuth Retrieved from the Internet: URL:http://d-nb.info/1001560736/34 [retrieved on 2013-02-08] paragraphs [2.7.4], [2.7.8], [03.2] ----- -/--	1-12

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 3 July 2015	Date of mailing of the international search report 13/07/2015
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 Westphal-Daniel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/058297

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTOPHER POHLMANN 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 the whole document	1-12
A	----- US 6 103 463 A (CHETVERIN ALEXANDER B [RU] ET AL) 15 August 2000 (2000-08-15) cited in the application column 3, line 45 - column 54, line 21	1-12
A	----- US 6 344 316 B1 (LOCKHART DAVID J [US] ET AL) 5 February 2002 (2002-02-05) cited in the application column 2, line 27 - column 67, line 40	1-12
A	----- US 6 238 866 B1 (YEH HOMER R [US] ET AL) 29 May 2001 (2001-05-29) -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/058297

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013087630	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

US 6103463	A	15-08-2000	AT 278807 T 15-10-2004
			AU 3728093 A 13-09-1993
			CA 2130562 A1 02-09-1993
			DE 69333650 D1 11-11-2004
			DE 69333650 T2 12-01-2006
			EP 0675966 A1 11-10-1995
			EP 1382386 A2 21-01-2004
			US 6103463 A 15-08-2000
			US 6322971 B1 27-11-2001
			US 2003162210 A1 28-08-2003
			US 2005266441 A1 01-12-2005
			US 2010197509 A1 05-08-2010
			US 2011021361 A1 27-01-2011
			WO 9317126 A1 02-09-1993

US 6344316	B1	05-02-2002	EP 0880598 A1 02-12-1998
			US 6344316 B1 05-02-2002
			US 6858711 B2 22-02-2005
			US 2003064364 A1 03-04-2003
			US 2005158772 A1 21-07-2005
			US 2005191646 A1 01-09-2005

US 6238866	B1	29-05-2001	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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2013/087630 A1 (SIEMENS AG [DE]) 20. Juni 2013 (2013-06-20) Seite 4, Zeile 7 - Seite 23, Zeile 32; Abbildung 1	1-12
X	----- Christopher Pöhlmann: "Elektrochemische Detektion von RNA mittels Nukleinsäurehybridisierung", 1. Januar 2009 (2009-01-01), XP055052872, Bayreuth Gefunden im Internet: URL:http://d-nb.info/1001560736/34 [gefunden am 2013-02-08] Absätze [2.7.4], [2.7.8], [03.2] ----- -/--	1-12

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

3. Juli 2015

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/07/2015

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

Westphal-Daniel, K

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHRISTOPHER POHLMANN 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 das ganze Dokument	1-12
A	----- US 6 103 463 A (CHETVERIN ALEXANDER B [RU] ET AL) 15. August 2000 (2000-08-15) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 45 - Spalte 54, Zeile 21	1-12
A	----- US 6 344 316 B1 (LOCKHART DAVID J [US] ET AL) 5. Februar 2002 (2002-02-05) in der Anmeldung erwähnt Spalte 2, Zeile 27 - Spalte 67, Zeile 40	1-12
A	----- US 6 238 866 B1 (YEH HOMER R [US] ET AL) 29. Mai 2001 (2001-05-29) -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/058297

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2013087630	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

US 6103463	A	15-08-2000	AT 278807 T 15-10-2004
			AU 3728093 A 13-09-1993
			CA 2130562 A1 02-09-1993
			DE 69333650 D1 11-11-2004
			DE 69333650 T2 12-01-2006
			EP 0675966 A1 11-10-1995
			EP 1382386 A2 21-01-2004
			US 6103463 A 15-08-2000
			US 6322971 B1 27-11-2001
			US 2003162210 A1 28-08-2003
			US 2005266441 A1 01-12-2005
			US 2010197509 A1 05-08-2010
			US 2011021361 A1 27-01-2011
			WO 9317126 A1 02-09-1993

US 6344316	B1	05-02-2002	EP 0880598 A1 02-12-1998
			US 6344316 B1 05-02-2002
			US 6858711 B2 22-02-2005
			US 2003064364 A1 03-04-2003
			US 2005158772 A1 21-07-2005
			US 2005191646 A1 01-09-2005

US 6238866	B1	29-05-2001	KEINE
