(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
10. Juli 2008 (10.07.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/080531 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
B01J 19/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/010895

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Dezember 2007 (12.12.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 001 185.9 5. Januar 2007 (05.01.2007) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **ADVALYTIX AG** [DE/DE]; Sauerbruchstrasse 50, 81377 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **GAUER, Christoph** [DE/DE]; Wiener Platz 8, 81667 München (DE).

(74) Anwalt: **MANITZ, FINSTERWALD & PARTNER GBR**; Postfach 31 02 20, 80102 München (DE).

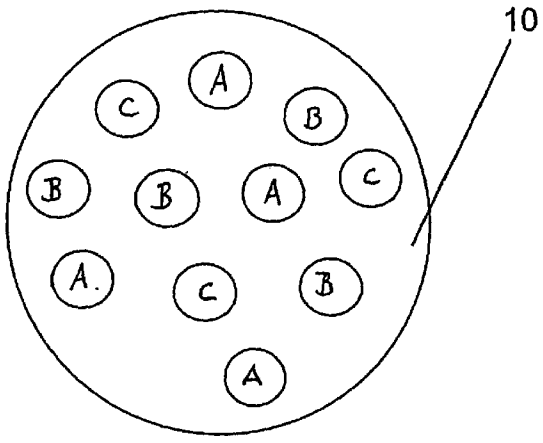
(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD, DEVICE, AND KIT FOR ANALYZING A LIQUID SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN, VORRICHTUNG UND KIT ZUR UNTERSUCHUNG EINER FLÜSSIGKEITSPROBE



(57) Abstract: The invention relates to a method for analyzing a liquid sample as to the presence of at least one of at least two predetermined, different types of sample macromolecules, the probability that said at least two predetermined types of different sample macromolecules are present in the sample being less than 20 percent. In said method, a support is provided that comprises at least one reaction center to which at least two types of probe macromolecules are bound. Said at least two types of probe macromolecules are complementary to the at least two predetermined types of different sample macromolecules in such a way as to be able to specifically react therewith. A marking step is carried out for marking at least the predetermined sample macromolecules, the sample is brought in contact with the at least one reaction center such that a reaction can take place between the predetermined sample macromolecules and the respective complementary probe macromolecules, uncombined sample material is removed, and the presence of sample macromolecules that are specifically bound to the at least one reaction center is verified. The invention further relates to a device and a kit for carrying out the method according to the invention as well as a method for producing a device according to the invention.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2008/080531 A2

MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Prüfung einer flüssigen Probe auf die Anwesenheit von wenigstens einer von wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle, wobei die wenigstens zwei vorbestimmten Sorten unterschiedlicher Proben-Makromoleküle jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 % in der Probe vorliegen und wobei ein Träger mit wenigstens einem Reaktionszentrum bereitgestellt wird, an dem wenigstens zwei Sorten von Sonden-Makromolekülen gebunden sind, die derart zu den wenigstens zwei vorbestimmten Sorten unterschiedlicher Proben-Makromoleküle komplementär sind, dass sie mit diesen spezifisch reagieren können, ein Markierungsschritt zur Markierung zumindest der vorbestimmten Proben-Makromoleküle durchgeführt wird, die Probe mit dem wenigstens einen Reaktionszentrum derart in Kontakt gebracht wird, dass eine Reaktion zwischen den vorbestimmten Proben-Makromolekülen und den jeweils komplementären Sonden-Makromolekülen stattfinden kann, ungebundenes Probenmaterial entfernt wird und das Vorhandensein von an dem wenigstens einen Reaktionszentrum spezifisch gebundenen Proben-Makromolekülen geprüft wird. Die Erfmdung betrifft weiterhin eine Vorrichtung und ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens und ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Verfahren, Vorrichtung und Kit zur Untersuchung einer Flüssigkeitsprobe

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Vorrichtung und ein Kit zur Untersuchung einer flüssigen Probe auf die Anwesenheit von vorbestimmten Sorten von Proben-Makromolekülen.

Zum Beispiel in der Diagnostik möchte man häufig die Anwesenheit von vorbestimmten Proben-Makromolekülen prüfen, wie zum Beispiel bestimmter Nukleinsäuresequenzen oder -teilsequenzen, Antikörpern, Antigenen, Proteinen etc. Beispielsweise müssen alle Proben in Blutbanken auf die Anwesenheit des HIV- und HCV-Virus geprüft werden. Vielfach werden dazu PCR-(Polymerase-Kettenreaktion-)gestützte Verfahren verwendet, die in der Regel in getrennten Reaktionen für die unterschiedlichen Teilsequenzen des HIV-Virus durchgeführt werden.

Es ist wünschenswert, wenn die Zahl der notwendigen Pipettierschritte und damit die Kosten sowie der Verbrauch von Reagenzien und Probenmaterial verringert werden. Letzteres ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn nur wenig Probenmaterial, zum Beispiel bei Blutproben von Säuglingen, vorliegt. Daher wurde vorgeschlagen, derartige Untersuchungsassays zu parallelisieren, d.h. zu "multiplexen", um mehrere Untersuchungen parallel durchführen zu können.

Aus EP 373 203 B1 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung bekannt, wie man zum Beispiel Nukleinsäureassays multiplexen kann. Dabei werden unterschiedliche Oligonukleotide auf Festkörperoberflächen in Form einer

Matrix aufgebracht (zum Beispiel gespottet) und dort so gebunden, dass sie sich unter den Hybridisierungsbedingungen nicht ablösen können.

Die so gebundenen Oligonukleotide bilden "Sonden", die in nicht überlappenden Zellen, so genannten Spots, angeordnet sind, die typischerweise Durchmesser von 50 bis 250 µm aufweisen. Eine Vielzahl von Spots in einer Matrix wird als Mikroarray bezeichnet.

Bringt man eine Probenflüssigkeit, die fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuresequenzen enthält, unter Hybridisierungsbedingungen auf die Festkörperoberfläche, so können die markierten Nukleinsäuresequenzen in der Probe mit den Oligonukleotiden der Spots hybridisieren. Wird im Anschluss die Probenflüssigkeit unter stringenten Bedingungen von der Festkörperoberfläche abgewaschen, bleiben nur diejenigen Nukleinsäuresequenzen der Probe auf dem Festkörper zurück, die spezifisch an entsprechende Sondenoligonukleotide gebunden sind. Durch ortsaufgelöstes Messen der Fluoreszenz lässt sich nun feststellen, an welchen Spots Nukleinsäuresequenzen der Probe gebunden wurden. Da die als Sonden gespotteten Oligonukleotide bekannt sind, lassen sich so Rückschlüsse auf die in der Probe enthaltenen Nukleinsäuresequenzen ziehen. Derartige Arrays werden zum Beispiel in der Diagnostik oder der Forschung zur Genexpressionsanalyse (gen expression profiling) oder CGH (comparative genomic hybridization) eingesetzt.

Ähnlich können zum Beispiel gentechnisch veränderte Organismen (GVO) mit Hilfe von Mikroarrays nachgewiesen werden, wobei zu den transgenen Elementen der GVOs komplementäre Moleküle als Sonden verwendet werden. Ein solcher Nachweis basiert zum Beispiel ebenfalls auf einer PCR-Reaktion und der anschließenden Hybridisierung mit dem PCR-Produkt.

Dabei kann zum Beispiel ausgenutzt werden, dass nach einer Verordnung der europäischen Union jeder zugelassene gentechnisch veränderte Organismus einen einmaligen, spezifischen Marker besitzen muss, welcher dann zum Beispiel mittels einer realtime-PCR oder ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-Reaktion nachgewiesen werden kann.

Bei derartigen Verfahren ist es notwendig, die Fehlerraten beim Herstellen der Arrays, insbesondere beim Aufbringen der Sonden-Moleküle, sehr gering zu halten. In konventionellen Mikroarrays definiert sich die Qualität des Produkts geradezu nach dem Grad der Einzigartigkeit der Sequenz in einem Spot. Es ist bei konventionellen Mikroarrays das Ziel, möglichst nur eine Population (100 % ohne Fehler) einer Sequenz pro Spot zu erreichen. Insbesondere bei In-Situ-Verfahren zur Herstellung solcher Mikroarrays ist die Fehlerrate von ausschlaggebender Bedeutung. Auch Anbieter von Kontakt- oder Nicht-Kontaktprintern, die als Alternative zum In-Situ-Verfahren zum Einsatz kommen, werben für ihre Produkte damit, dass es bei der Herstellung der Mikroarrays nicht zur "Verschleppung von Material" von einem Spot zum anderen kommt, wodurch ebenfalls dokumentiert wird, dass bei konventionellen Mikroarrays gerade der Nicht-Vermischung große Bedeutung beigemessen werden muss. Es ist dementsprechend ein aufwändiger und kostenintensiver Spottingprozess mit hoher Genauigkeit notwendig, der insbesondere auch an die Qualitätskontrolle hohe Anforderungen stellt. Zudem sind die Spotmorphologien von Spots unterschiedlicher Makromoleküle abhängig von der Molekülsorte selbst, so dass die Durchmesser der Spots solcher gespotteten Mikroarrays immer ein wenig schwanken können, wodurch zum Beispiel die Auswertung mit Hilfe automatischer Bilderkennung problematisch werden kann.

Schließlich ist für das Auslesen derartiger Mikroarrays mit Spots, die sich durch die aufgebrachten Makromoleküle unterscheiden, ein Scanner notwendig, der die entsprechende Ortsauflösung bietet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren, eine Vorrichtung und ein Kit zur Prüfung einer Flüssigkeitsprobe auf die Anwesenheit von wenigstens einer von wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle anzugeben, die die Information auf schnelle und kostengünstige Weise bereitstellen.

Diese Aufgabe wird mit einem Verfahren zur Prüfung einer Flüssigkeitsprobe mit den Merkmalen des Anspruchs 1, einer Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 30 bzw. mit einem Kit mit den Merkmalen des Anspruchs 49 gelöst. Unteransprüche sind auf bevorzugte Ausführungsformen gerichtet. Ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung ist Gegenstand des Anspruchs 48.

Bei dem erfindungsgemäßen Prüfverfahren wird die Anwesenheit von wenigstens einer von wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle geprüft. Dabei wird eine Flüssigkeitsprobe eingesetzt, von der anzunehmen ist, dass die wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 % in der Probe vorliegen. Der Begriff des Vorhandenseins von Proben-Makromolekülen soll für die Zwecke des vorliegenden Textes so verstanden werden, dass er zum Beispiel ein Vorhandensein in einer Menge oberhalb der verfahrenstechnisch bedingten Nachweisgrenze bedeutet.

Die Probenflüssigkeit kann zum Beispiel eine Lösung, eine Dispersion oder eine Suspension des zu untersuchenden Materials umfassen.

Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Prüfverfahren angewendet werden, um in einem einfachen und schnellen Schritt festzustellen, ob eine Blutprobe mit einem von mehreren ausgewählten Krankheitserregern oder ähnlichem infiziert ist. Bejahendenfalls kann die entsprechende Blutprobe, wenn sie zum Beispiel zur Transfusion vorgesehen war, aussortiert werden bzw. mit einem anderen Test spezifisch festgestellt werden, welcher Erreger tatsächlich vorliegt. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt die Erstinformation schnell zur Verfügung, so dass eine entsprechende Person zur Verringerung der Ansteckungsgefahr gleich isoliert werden kann, während dann erst untersucht wird, welcher der ausgewählten Krankheiterreger vorhanden ist.

In der Regel wird dabei davon ausgegangen, dass in der entsprechenden Blutprobe keine Infektion vorliegt, so dass insbesondere mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 % angenommen werden kann, dass kein Erreger vorliegt, dessen Anwesenheit getestet werden soll.

Analog kann zum Beispiel an Hand einer Blutprobe das Vorliegen einer sich genetisch manifestierenden Erbkrankheit geprüft werden.

Ein anderes Beispiel betrifft die Prüfung, ob in einem Nahrungsmittelprodukt gegebenenfalls unerlaubterweise gentechnisch veränderte Organismen (GVO) vorliegen. Auch hier geht man in der Regel davon aus, dass die zu untersuchende Probe keine solchen GVOs enthält. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lässt sich auf schnelle Weise feststellen, ob doch solche GVOs vorhanden sind. Sollte das erfindungsgemäße Prüfverfahren ergeben, dass solche GVOs vorhanden sind, kann in einem weiteren Untersuchungsschritt geprüft werden, um welche GVOs es sich genau handelt.

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet dementsprechend Flüssigkeitsproben, bei denen die wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 % vorliegen. Diese Wahrscheinlichkeit kann sich zum Beispiel aus entsprechenden Statistiken ergeben oder zum Beispiel dadurch, dass davon ausgegangen wird, dass ein Proband in der Regel nicht krank ist oder ein Nahrungsmittel nicht gentechnisch verändert wurde. Bevorzugte positive Ergebniswahrscheinlichkeiten sind weniger als 15 %, bevorzugt weniger als 10 %, besonders bevorzugt weniger als 5 % oder ganz besonders bevorzugt weniger als 1 %.

Es wird ein Träger bereitgestellt, der wenigstens ein Reaktionszentrum aufweist, an dem wenigstens zwei Sorten von bekannten Makromolekülen ("Sonden"-Makromoleküle oder "Fänger"-Makromoleküle) gebunden sind. Dazu werden die als Sonden-Makromoleküle einzusetzenden Makromoleküle vor dem Aufbringen auf das Reaktionszentrum abgemischt. An einem Reaktionszentrum ist die Anordnung der unterschiedlichen Sonden-Makromoleküle unerheblich und daher vorzugsweise statistisch verteilt. Bei dem erfindungsgemäßen Prüfverfahren wird also zumindest ein Reaktionszentrum eingesetzt, an dem unterschiedliche nachzuweisende Makromoleküle (Proben-Makromoleküle) spezifisch binden können. Bevorzugt kommen als unterschiedliche Sonden-Makromoleküle Makromoleküle zum Einsatz, deren Ähnlichkeit geringer als 90 %, bevorzugter geringer als 70 %, besonders bevorzugt geringer als 40 % und ganz besonders bevorzugt geringer als 10 % ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiterhin einen Markierungsschritt, der zur Markierung gegebenenfalls vorhandener Moleküle der zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle dient.

Sind keine Moleküle der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten in der Probe vorhanden, so wird in diesem Markierungsschritt auch keine Markierung solcher Proben-Makromoleküle stattfinden.

Grundsätzlich ist es auch unschädlich, wenn zusätzlich andere in der Probe vorhandene Moleküle markiert werden. Diese werden mit den speziell ausgewählten Sonden-Makromolekülen des Reaktionszentrums nicht spezifisch reagieren und insofern bei dem Schritt zur Entfernung ungebundenem Probenmateriales ohnehin entfernt. Vorzugsweise wird jedoch ein Markierungsschritt durchgeführt, der nur auf Proben-Makromoleküle der wenigstens zwei unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle wirkt.

Das wenigstens eine Reaktionszentrum wird vollständig mit der Probenlösung derart in Kontakt gebracht, dass eine Reaktion zwischen wenigstens einer Sorte Sonden-Makromoleküle mit Proben-Makromolekülen stattfinden kann, wenn Proben-Makromoleküle in der Probe vorhanden sind, die mit den am Reaktionszentrum gebundenen Sonden-Makromolekülen spezifisch reagieren können, also insbesondere dazu komplementär sind.

Nach Abwarten einer typischen Reaktionszeit wird ungebundenes Probenmaterial zum Beispiel durch einen stringenten Waschschritt entfernt. Schließlich wird das Vorhandensein von an dem wenigstens einen Reaktionszentrum spezifisch gebundenen Proben-Makromolekülen geprüft. Eine ortsaufgelöste Auswertung der Ergebnisse ist für ein Reaktionszentrum nicht nötig, so dass einfach das Gesamtergebnis für das jeweilige Reaktionszentrum, das zum Beispiel durch eine integrale Auswertung der Fluoreszenz erhalten werden kann, verwendet werden kann.

Im Vergleich zu bekannten Verfahren, bei denen konventionelle Mikroarrays eingesetzt werden, bei denen je Spot nur eine Sorte von Makromolekülen vorhanden ist, ist der Aufwand beim Spotten zur Herstellung des Trägers zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erheblich reduziert und die Anzahl der notwendigen Pipettierschritte sehr viel kleiner.

Werden zum Beispiel zum Herstellen eines Reaktionszentrums zehn unterschiedliche Sorten Sonden-Makromoleküle abgemischt und als ein Reaktionszentrum aufgespottet, so verringern sich die Herstellkosten um einen Faktor zehn gegenüber einem konventionellen Mikroarray mit Spots, an denen sich jeweils nur eine Sorte Sonden-Makromoleküle befindet.

Der Begriff "Reaktionszentren", an denen erfindungsgemäß jeweils mehrere Sorten Sonden-Makromoleküle vorliegen, wird im vorliegenden Text insbesondere zur Abgrenzung gegenüber "Spots" herkömmlicher Mikroarrays verwendet, bei denen an einem Spot jeweils nur eine Sorte Sonden-Makromoleküle vorgesehen ist.

Bei der Herstellung eines Trägers zur Durchführung des erfindungsgemäßen Prüfverfahrens werden die unterschiedlichen Sorten Sonden-Makromoleküle vor dem Aufbringen zum Beispiel abgemischt. Das Mischungsverhältnis der wenigstens zwei unterschiedlichen Sorten Sonden-Makromoleküle eines Reaktionszentrums kann zum Beispiel in vergleichenden Vorversuchen derart festgelegt werden, dass das Signal-Rausch-Verhältnis optimal ist. Solche Sonden-Makromoleküle, für deren komplementäre Proben-Makromoleküle die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins in der Probe geringer ist, können dazu zum Beispiel an dem Reaktionszentrum in größerer Menge vorgesehen sein, als solche Sonden-

Makromoleküle, für die die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins komplementärer Proben-Makromoleküle in der Probe größer ist.

Bei konventionellen Mikroarrays erhält man je Spot nur die Information für eine Sorte Proben-Makromoleküle. Die Spots müssen daher auf einem Mikroarray zahlreich und möglichst dicht angeordnet sein. In der Regel sind auf einem konventionellen Mikroarray ca. 1.000 bis 100.000 Spots mit einem Abstand eines Spotzentrums zum Zentrum eines benachbarten Spots von typischerweise 100-500 Mikrometer angeordnet. Infolgedessen müssen die einzelnen Spots sehr klein sein (Durchmesser etwa 50-250 Mikrometer), um auch mit einer kleinen Probenflüssigkeitsmenge ausreichend Information zu bekommen. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird jedoch mit einem Reaktionszentrum geprüft, ob überhaupt in der Probe solche Proben-Makromoleküle vorhanden sind, die zu den Sonden-Makromolekülen auf dem Reaktionszentrum komplementär sind. Man benötigt also nur einen sehr schnell und kostengünstig durchzuführenden Untersuchungsschritt zur Feststellung, ob gegebenenfalls eine weitere Untersuchung notwendig ist oder um zu entscheiden, ob die Probe vollständig aussortiert werden soll.

Da die Sonden-Makromoleküle eines Reaktionszentrums nicht wie bei bekannten Mikroarrays in räumlich getrennten Spots vorliegen, ergibt sich außerdem der Vorteil, dass zum Kontakt der Proben-Makromoleküle mit den Sonden-Makromolekülen nur minimale Wegstrecken zurückgelegt werden müssen. Für diffusionslimitierte Reaktionen bringt das einen erheblichen Zeitvorteil.

Bei einem konventionellen Mikroarray, bei dem an den Spots jeweils nur eine Sorte von Makromolekülen vorhanden ist, "sehen" die Proben-Makromoleküle der Probenflüssigkeit an unterschiedlichen Spots eine andere

Sorte von Sonden-Makromolekülen. Die Umgebung der Reaktion ist also auf jeden Fall unterschiedlich. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Umgebung selbst zum Beispiel eine Hybridisierung zwischen Sonden-Makromolekülen und Proben-Makromolekülen maßgeblich beeinflusst. Beim erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem Reaktionszentren eingesetzt werden, an denen Sonden-Makromoleküle abgemischt wurden, kann man dagegen von einer gleichmäßigen Verteilung der Moleküle an einem Reaktionszentrum ausgehen. Unterschiedliche Proben-Makromoleküle sehen dementsprechend beim erfindungsgemäßen Verfahren auch dieselbe Umgebung, so dass ein Einfluss der Umgebung auf die Reaktion wegfällt. Auch Gradienten, die auftreten können, weil die Probenlösung die Oberfläche zum Beispiel von links nach rechts benetzt und eine gewisse Zeit dazu braucht, können nicht vorkommen. Die Sonden-Makromoleküle sind statistisch verteilt und die Chance für ein Proben-Makromolekül, ein gegebenenfalls vorhandenes komplementäres Sonden-Makromolekül zu finden, ist dementsprechend im Durchschnitt höher.

Bei einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Nachweiserhöhungsschritt durchgeführt, bei dem die Wahrscheinlichkeit des Nachweises der Moleküle wenigstens einer der vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle erhöht wird, falls diese Sorte in der Probe tatsächlich enthalten ist.

Insbesondere, wenn zum Beispiel die Anwesenheit von vorbestimmten Proteinen oder Peptiden als Proben-Makromoleküle in der Probe geprüft werden soll, kann der Nachweiserhöhungsschritt einfacherweise einen Aufkonzentrierungsschritt für diese Proteine oder Peptide umfassen, vorzugsweise eine Fällung oder eine Dialyse.

Insbesondere, wenn zum Beispiel die Anwesenheit von vorbestimmen Nukleinsäuren, insbesondere zum Beispiel DNA, als Probenmoleküle in der Probe geprüft werden soll, umfasst der Nachweiserhöhungsschritt zum Beispiel einen Amplifikationsschritt, vorzugsweise einen spezifischen Amplifikationsschritt, der zum Beispiel mit fluoreszenzmarkierten Primern durchgeführt werden kann.

Die Anwendung eines Aufkonzentrierungsschrittes, insbesondere einer Fällung oder Dialyse, einerseits und die Anwendung eines Amplifikationsschrittes andererseits sind nicht auf die genannten Materialien beschränkt.

Befinden sich in der Probe trotz der angenommenen geringen Wahrscheinlichkeit für ein solches Vorhandensein Proben-Makromoleküle einer der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten, so wird in dem Nachweiserhöhungsschritt sichergestellt, dass auch bei sehr geringen Mengen ein Nachweis stattfindet. Befinden sich in der Probe keine der Proben-Makromoleküle, deren Anwesenheit geprüft werden soll, bleibt der Nachweiserhöhungsschritt wirkungslos, so dass korrekterweise auch kein Nachweis erfolgen wird.

Ergibt das erfindungsgemäße Verfahren ein positives Ergebnis, so liegt in der Probe trotz der statistisch geringen Wahrscheinlichkeit wenigstens eine der wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle vor. Je nach Anwendung kann die Probe zum Beispiel aussortiert werden. Dies ist zum Beispiel denkbar, wenn es sich um eine Blutprobe für eine Transfusion handelt, die damit nicht mehr verwendbar ist. Bei anderen Anwendungen kann es jedoch sinnvoll sein, herauszufinden, zu welchen Sonden-Makromoleküle komplementäre Proben-Makromoleküle in der Probe vorhanden sind. Dies kann dann mit einem ande-

ren, zum Beispiel einem an sich bekannten, Verfahren in einem Diskriminierungsschritt genauer geprüft werden.

Für einen solchen Diskriminierungsschritt eignen sich zum Beispiel bei der Prüfung auf Anwesenheit von bestimmten Proteinen oder Peptiden als Proben-Makromoleküle Massenspektroskopie oder eine ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-Reaktion.

Bei einem Verfahren zur Überprüfung der Anwesenheit von vorbestimmten Nukleinsäuren, zum Beispiel DNA, als Probenmoleküle kann dieser Diskriminierungsschritt einen PCR-(Polymerase Chain Reaction-)Schritt, einen realtime-PCR-Schritt, eine Gelelektrophorese oder zum Beispiel einen Dot-Blot-Schritt umfassen.

Die Anwendung eines Diskriminierungsschrittes, insbesondere einer Massenspektroskopie, einer ELISA-Reaktion, eines PCR-Schrittes, einer Gelelektrophorese oder eines Dot-Blot-Schritts sind nicht auf die genannten Materialien beschränkt.

Die möglicherweise kostenintensiveren genaueren Analyseschritte des Diskriminierungsschritts werden allerdings nur notwendig, wenn bei dem erfindungsgemäßen Prüfverfahren überhaupt ein positives Ergebnis erzielt wird. Auf diese Weise wird eine signifikante Kostenersparnis erreicht, da die teureren Nachweisverfahren nur dann notwendig werden, wenn überhaupt ein positives Ergebnis in dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgetreten ist.

Hier zeigt sich ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens. Im Normalfall wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren keine Hybridisierung zwischen Sonden-Makromolekülen und Proben-Makromolekülen

stattfinden. Nur falls doch, muss gegebenenfalls in einer zweiten Untersuchung geklärt werden, welche Proben-Makromoleküle hybridisiert haben. Insofern geht das erfindungsgemäße Verfahren von einer Nullhypothese aus, d.h. zum Beispiel dass der untersuchte Organismus die durch die Sonden-Makromoleküle nachweisbaren Krankheiten nicht hat oder zum Beispiel dass ein Organismus keinen transgenen Abschnitt enthält und insofern nicht gentechnisch verändert worden ist. Das erfindungsgemäße Verfahren dient also in solchen Fällen als "Filter", um die Zahl kostenintensiver und zeitraubender nachfolgender Schritte zu reduzieren.

Aus dem Beschriebenen wird klar, dass ein Assay mit abgemischten Reaktionszentren insbesondere Vorteile bietet, wenn mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass es keine Reaktion gibt, d.h. keine der wenigstens zwei vorbestimmten Proben-Makromolekülsorten vorhanden ist.

Der Markierungsschritt für die Probenmoleküle der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten kann zum Beispiel radioaktiv oder elektrochemisch sein. Besonders einfach und vorteilhaft ist die Verwendung einer Fluoreszenzmarkierung, wobei zur Prüfung des Vorhandenseins von an dem wenigstens einen Reaktionszentrum gebundenen Proben-Makromoleküle am Ende des erfindungsgemäßen Verfahrens die Fluoreszenz untersucht wird.

Alternativ kann zum Beispiel ein Eppendorf Silverquant® Kit zur Markierung und eine Silberfärbung zum Nachweis verwendet werden.

Der Markierungsschritt für die vorbestimmten Proben-Makromoleküle kann vor oder nach dem In-Kontakt-Bringen der Probe mit dem wenigstens einen Reaktionszentrum erfolgen. Der Markierungsschritt kann aber auch nach dem Entfernen ungebundenen Probenmaterials vorgenommen

werden. In jedem Fall kann damit nachgewiesen werden, ob entsprechende Proben-Makromoleküle spezifisch an dem Reaktionszentrum gebunden wurden. Schließlich kann der Markierungsschritt auch ganz zu Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgenommen werden.

Besonders einfach ist der Nachweis, ob Proben-Makromoleküle einer der zwei vorbestimmten Sorten an den Reaktionszentren gebunden haben, wenn die Markierung, insbesondere die Fluoreszenzmarkierung, für alle Proben-Makromoleküle der zwei vorbestimmten Sorten gleich gewählt wurde.

Bei einer besonderen Ausgestaltung findet der Markierungsschritt für die Proben-Makromoleküle in einer Amplifikationsreaktion, insbesondere durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion) mit zum Beispiel fluoreszenzmarkierten Primern statt. Nur die mit den verwendeten Primern amplifizierbaren Sequenzen werden auf diese Weise spezifisch markiert. Die markierten Primer zur Erzeugung von PCR-Produkten können zum Beispiel in getrockneter Form an den Reaktionszentren selbst vorliegen. Wird bei solchen Ausgestaltungen des Verfahrens ein PCR-Puffer eingesetzt, mit dem auch die anschließende Reaktion zur spezifischen Bindung an den Sonden-Makromolekülen des wenigstens eines Reaktionszentrums durchgeführt werden kann, sind keine weiteren Pipettierschritte mehr notwendig.

Das Material zur Markierung kann dann zum Beispiel an dem Reaktionszentrum selbst vorliegen, zum Beispiel in getrockneter Form.

Eine weitergehende Parallelisierung kann erreicht werden, wenn mehrere Reaktionszentren mit jeweils wenigstens zwei Sorten von Makromolekülen als Sonden auf einem Träger eingesetzt werden, die vorzugsweise in Form eines Arrays angeordnet sind.

Auf so einem Array kann dann eine sehr viel geringere Anzahl von Reaktionszentren vorgesehen sein als Spots bei konventionellen Mikroarrays vorgesehen sein müssen, um eine ausreichende Informationsdichte zu erhalten. Zum Beispiel werden nur einige wenige oder einige zehn Reaktionszentren vorgesehen. Dadurch verringern sich die Herstellkosten des Arrays signifikant.

Vorzugsweise werden zum Beispiel nur zehn Reaktionszentren auf einem Träger aufgebracht. Werden zum Beispiel für die Bildung eines Reaktionszentrums zehn unterschiedliche Sorten Sonden-Makromoleküle abgemischt und aufgespottet, verringern sich die Herstellkosten um einen Faktor zehn gegenüber einem herkömmlichen Mikroarray, bei dem je Spot nur eine Sorte Sonden-Makromoleküle vorgesehen ist. Außerdem werden Qualitätsprobleme verringert, da nur eine geringe Anzahl an Reaktionszentren pro Träger vorgesehen sein muss.

Wird andererseits eine größere Zahl Reaktionszentren eingesetzt, ist die Informationsdichte aufgrund der unterschiedlichen Sorten Sonden-Makromoleküle an einem Reaktionszentrum gegenüber einem konventionellen Mikroarray mit Spots, die jeweils nur eine Sorte Sonden-Makromoleküle enthalten, entsprechend höher.

Beim Design solcher Arrays für das erfindungsgemäße Verfahren können die angenommenen Wahrscheinlichkeiten für die wenigstens zwei unterschiedlichen Sorten von Proben-Makromolekülen berücksichtigt werden, um das Verfahren zu optimieren. Dazu kann die Zahl der abgemischten Sorten Sonden-Makromoleküle pro Reaktionszentrum auf dem Array unterschiedlich sein. So wird zum Beispiel für Proben-Makromoleküle eines Erregers, der mit einer größeren Wahrscheinlichkeit auftritt, ein Reakti-

onszentrum erzeugt, in dem nur wenige verschiedene Sorten Sonden-Makromoleküle vorgesehen sind, während für Proben-Makromoleküle von Erregern, die mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit auftreten, solche Reaktionszentren abgemischt werden, die eine größere Anzahl von Sonden-Makromolekülen enthalten. Idealerweise wählt man das Array so, dass die Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis für alle Reaktionszentren in etwa gleich ist. Das kann zum Beispiel bedeuten, dass man zwischen ein und zehn verschiedenen Sonden-Makromoleküle je Reaktionszentrum abmischt.

Bei einer anderen Weiterführung des Erfindungsgedankens werden Sonden-Makromoleküle, die komplementär zu Proben-Makromolekülen eines bestimmten Organismus sind, jeweils mindestens zwei Reaktionszentren beigemischt. Macht man dies in vorbestimmter Weise für alle Organismen, deren Anwesenheit in der Probe untersucht werden soll, so lässt sich aus dem Muster fluoreszierender Reaktionszentren auf dem Array auch bei den abgemischten Reaktionszentren des erfindungsgemäßen Verfahrens der Organismus bestimmen bzw. zumindest eingrenzen.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Einsatz von Arrays mit abgemischten Reaktionszentren besteht darin, dass die Arrays kleiner werden, als sie bei konventionellen Mikroarrays sein müssen. Es können mehr unterschiedliche Testungen auf einem Träger gegebener Größe gemacht werden.

Bei dem für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Träger kann es sich zum Beispiel um eine Mikrotiterplatte handeln, deren einzelne Kavitäten als entsprechende Reaktionszentren eingesetzt werden, wobei eine einzelne Kavität mit einem entsprechenden Gemisch aus Sonden-Makromolekülen beschichtet ist.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Prüfverfahrens wird ein im Wesentlichen planarer Träger eingesetzt, wobei das wenigstens eine Reaktionszentrum von einem Bereich auf dem Träger umfasst ist, der andere Benetzungseigenschaften als seine Umgebung hat. Wird als Probenlösung zum Beispiel eine wässrige Lösung verwendet, so kann das Reaktionszentrum im Vergleich zu seiner Umgebung hydrophil gewählt werden. Das Reaktionszentrum kann dabei dem hydrophilen Bereich entsprechen oder in ihm enthalten sein. So lässt es sich erreichen, dass die Probenflüssigkeit sich in Form eines durch seine Oberflächenspannung zusammengehaltenen Tropfens auf dem hydrophilen Bereich hält, ohne in die hydrophobe Umgebung des Reaktionszentrums abzufließen. Auf diese Weise ist eine einfache Lokalisierung der Probenflüssigkeit am Reaktionszentrum möglich und es kann ein planarer Träger, zum Beispiel ein kostengünstiges Quarz- oder Glasplättchen, eingesetzt werden. Eine hydrophobe Umgebung lässt sich zum Beispiel durch Silanisierung erhalten.

Im Falle einer arrayförmigen Anordnung von Reaktionszentren können Gruppen von Reaktionszentren von einem gemeinsamen Bereich umfasst sein, der andere Benetzungseigenschaften als seine Umgebung hat. Derartige Bereiche können wiederum in einem übergeordneten Array angeordnet werden, so dass ein "Array-im-Array" vorliegt.

Bei einer anderen erfindungsgemäßen Ausgestaltung sind einzelne Reaktionszentren von eigenen Bereichen mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften umgeben, wodurch eine besonders gute Lokalisierung und die Verwendung sehr geringer Materialmengen möglich ist.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn das wenigstens eine Reaktionszentrum oder die mehreren Reaktionszentren einer Gruppe von zwei konzentrischen, vorzugsweise runden Bereichen umgeben ist, wobei der innere Bereich andere Benetzungseigenschaften als der Bereich des Reaktionszentrums und als der äußere Bereich hat. So kann zum Beispiel der innere konzentrische Bereich im Vergleich zum Reaktionszentrum hydrophob sein und so den beschriebenen Lokalisierungseffekt für eine wässrige Flüssigkeit in Form eines Tropfens zur Verfügung stellen. Analog kann der äußere konzentrische Bereich dazu dienen und geeignete Benetzungseigenschaften aufweisen, einen Ölfilm auf dem Probenflüssigkeitstropfen so zu positionieren, dass er die Probenflüssigkeit während der Reaktion abdeckt und eine Verdampfung verhindert. Dies ist insbesondere von Vorteil, wenn kleine Probenvolumina verwendet werden, bei der auch geringe Verdampfungsmengen zu einer Verfälschung des Reaktionsergebnisses führen könnten.

Die Verhinderung der Verdampfung während der Reaktion ist insbesondere dann günstig, wenn eine PCR-Reaktion durchgeführt wird, die das Durchfahren eines entsprechenden Temperaturprofils erfordert.

Bei einer erfindungsgemäßen Verfahrensführung unter Verwendung eines individuellen abdeckenden Ölfilms für jedes Reaktionszentrum können Volumina von zum Beispiel 0,1 µl bis 10 µl Probenflüssigkeit untersucht werden, wobei das entsprechende Volumen des Öltropfens zum Beispiel um einen Faktor 2 bis 5 größer gewählt wird.

Im Falle einer arrayförmigen Anordnung kann auch jedes Reaktionszentrum von einem individuellen konzentrischen Bereich anderer Benetzungseigenschaften umgeben sein, um die Probenflüssigkeit an einem Reaktionszentrum zu halten, und das Array im Ganzen von einem Bereich ent-

sprechend angepasster Benetzungseigenschaften umgeben sein, der einen gemeinsamen Öltropfen auf dem Array hält, der die einzelnen Probenlösungstropfen gemeinsam abdeckt.

Um eine optimale Verteilung der Probenflüssigkeit auf dem Reaktionszentrum bzw. auf einem aus einzelnen Reaktionszentren gebildeten Arrays zu gewährleisten, können zusätzlich Schallwellen, insbesondere Oberflächenschallwellen in Richtung des auf dem Reaktionszentrum befindlichen Probenflüssigkeitsvolumens geschickt werden. Oberflächenschallwellen können zum Beispiel in an sich bekannter Weise mit Hilfe eines Interdigitaltransducers auf einem piezoelektrischen Chip erzeugt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders zur Prüfung der Anwesenheit von Nukleinsäuresequenzen und/oder für Hybridisierungsreaktionen.

Im Falle der Prüfung, ob gentechnisch veränderte Organismen vorhanden sind, wird zum Beispiel die Anwesenheit der entsprechenden transgenen Abschnitte geprüft.

Es können auch andere spezifische Reaktionen, beispielsweise Antikörper-Antigenbindungen ausgenutzt werden, wobei sich entweder die Antikörper oder die Antigene oder entsprechende Epitope als bekannte Sonden-Makromoleküle in gebundener Phase an dem Reaktionszentrum befinden. Soll die Anwesenheit solcher Substanzen in der Probe untersucht werden, so werden Sonden-Makromoleküle eingesetzt, die zu diesen Substanzen komplementär sind.

Analog können zum Beispiel auch Protein-, Proteid- oder Peptidreaktionen untersucht werden.

Das erfindungsgemäße Prüfverfahren kann insbesondere auch mit Probenmaterial durchgeführt werden, das nicht von nur einer Einzelzelle stammt, wodurch die Probenpräparation stark vereinfacht wird. Soll zum Beispiel die Anwesenheit bestimmter DNA-Stränge geprüft werden, können Probenmengen von mehr als 100 pg, mehr als 1 ng oder auch mehr als 10 ng (jeweils bezogen auf die isolierte DNA-Menge) eingesetzt werden, wobei dadurch inhärent DNA-Material von mehr als einer Zelle (die in der Regel etwa 6 pg DNA-Material aufweist) enthalten ist. Je höher die DNA-Menge ist, desto einfacher ist die Probenpräparation.

Im Falle von Protein-Proben kann vorteilhafterweise ebenfalls Material mehrerer Zellen verwendet werden, zum Beispiel in einer Menge von größer als 200 pg.

Proben-Makromoleküle, deren Anwesenheit geprüft werden soll, können zum Beispiel vollständige Sequenzen oder Teilsequenzen eines Organismus sein, dessen Anwesenheit geprüft werden soll.

Der Begriff Organismus wird für die Zwecke des vorliegenden Textes im weiten Sinne verstanden und soll bei seiner Verwendung für Krankheitserreger zum Beispiel auch Viren, Bakterien, Einzeller, Sporen, etc. und bei seiner Verwendung für gentechnisch veränderte Organismen zum Beispiel Sorten, Linien, Klone etc. umfassen.

Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren für Untersuchungen, bei denen die wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle zu unterschiedlichen Organismen gehören, so dass die Anwesenheit dieser unterschiedlichen Organismen in einem Schritt abgeprüft werden kann. Es werden dann an einem Reaktionszent-

rum Sonden-Makromoleküle vorgesehen, die zu den wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle der unterschiedlichen Organismen komplementär sind.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung weist einen Träger auf, auf dem wenigstens ein Reaktionszentrum angeordnet ist, an dem wenigstens zwei Sorten daran gebundener Sonden-Makromoleküle vorgesehen sind, die ohne vorbestimmte räumliche Anordnung an dem Reaktionszentrum gebunden sind und derart zu den vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle komplementär sind, dass sie mit diesen spezifisch reagieren können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung dient zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Prüfung einer Flüssigkeitsprobe auf die Anwesenheit von wenigstens einer von wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle, wobei die wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 % vorliegen. Die Sonden-Makromoleküle auf dem Träger der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden entsprechend ausgewählt. Vorteilhafterweise sind an einem Reaktionszentrum Sonden-Makromoleküle gebunden, die zu Proben-Makromolekülen unterschiedlicher Organismen komplementär sind, so dass die Anwesenheit dieser unterschiedlichen Organismen mit einem Reaktionszentrum geprüft werden kann.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann auf dem Träger ein einzelnes Reaktionszentrum oder mehrere, vorzugsweise in Form eines Arrays angeordnete Reaktionszentren mit jeweils wenigstens zwei Sorten von Sonden-Makromolekülen aufweisen.

Bei dem Träger kann es sich zum Beispiel um eine Mikrotiterplatte oder um einen im Wesentlichen planaren Träger handeln, wobei im letztgenannten Fall das wenigstens eine Reaktionszentrum von einem Bereich auf dem Träger umfasst sein kann, der andere Benetzungseigenschaften als seine Umgebung aufweist. Der planare Träger kann zum Beispiel ein Glas- oder Quarzplättchen oder ein Festkörperchip sein.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einem im Wesentlichen planaren Träger weist um das wenigstens eine Reaktionszentrum zwei konzentrische, vorzugsweise runde Bereiche auf, wobei der innere konzentrische Bereich andere Benetzungseigenschaften als das Reaktionszentrum und als der äußere Bereich hat.

Mehrere Reaktionszentren können auch jeweils zu einer zum Beispiel matrixförmigen Gruppe (zum Beispiel in Form einer 2x2- oder 9x9-Matrix oder einer anderen matrixförmigen Anordnung) zusammengefasst werden und von einem gemeinsamen Bereich anderer Benetzungseigenschaften umgeben sein. Solche Bereiche, die mehrere Reaktionszentren umfassen, können wiederum in einem übergeordneten Array (mit zum Beispiel 48, 96 oder 384 Bereichen) angeordnet sein ("Array-im-Array").

Im Falle einer arrayförmigen Anordnung der Reaktionszentren kann andererseits auch vorgesehen sein, dass die Benetzungseigenschaften derart gewählt sind, dass Probenlösungstropfen individuell an den einzelnen Reaktionszentren gehalten werden und ein abdeckender Ölfilm oberhalb des gesamten Arrays oder einer Gruppe von Reaktionszentren gehalten wird. Dazu sind zur Verwendung von zum Beispiel wässrigen Probenlösungen die Reaktionszentren von individuellen hydrophoben Bereichen und das gesamte Array oder eine Gruppe von Reaktionszentren von einem

Bereich, der zur Lokalisierung eines Öltropfens auf dem Array dient, umgeben.

Eine Weiterbildung der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist eine Einrichtung zur Erzeugung von Schallwellen, insbesondere von Oberflächenschallwellen auf, mit deren Hilfe eine optimale Verteilung und/oder Durchmischung der Probenflüssigkeit an einem Reaktionszentrum bzw. mehreren Reaktionszentren erreicht werden kann. Eine solche Einrichtung umfasst zum Beispiel einen Interdigitaltransducer auf einer piezoelektrischen Oberfläche. Die Abstrahlrichtung des Interdigitaltransducers ist dabei derart gewählt, dass sie in Richtung eines Reaktionszentrums liegt, so dass Probenflüssigkeit, die sich auf diesem Reaktionszentrum befindet, mit Hilfe der Oberflächenschallwellen, die mit diesem Interdigitaltransducer erzeugt werden, in Bewegung gesetzt werden kann.

Die Wirkungen und Vorteile der erfindungsgemäßen Vorrichtung und der beschriebenen und anderer besonderer Ausführungsformen ergeben sich in analoger Weise aus den oben bereits für das erfindungsgemäße Verfahren beschriebenen Ausgestaltungen und die dort für das erfindungsgemäße Verfahren und seine Ausgestaltungen erläuterten Effekte und Vorteile.

Wie bereits bei dem erfindungsgemäßen Prüfverfahren beschrieben, kann der Markierungsschritt der Probenmoleküle der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten auch nach dem Aufbringen der Probenflüssigkeit auf das Reaktionszentrum geschehen. Eine besonders praktische Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist dazu an dem Reaktionszentrum nicht nur die wenigstens zwei unterschiedlichen Sorten Sonden-Makromoleküle auf, sondern zusätzlich Material zur Markierung wenigstens der zwei unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle. Beim Aufbringen der Probenflüssigkeit auf das Reaktionszentrum findet dann nicht

nur die Reaktion zwischen den gegebenenfalls vorhandenen Proben-Makromolekülen und den komplementären Sonden-Makromolekülen statt, sondern gleichzeitig auch die Markierung der gegebenenfalls vorhandenen Proben-Makromoleküle.

Das Material zur Markierung kann insbesondere markierte Primer für eine oder mehrere PCR (Polymerase-Kettenreaktionen) und gegebenenfalls die für die PCR notwendigen anderen Bestandteile, zum Beispiel Polymerase, umfassen.

Vorzugsweise ist das Material zur Markierung an dem wenigstens einen Reaktionszentrum unspezifisch gebunden, zum Beispiel getrocknet. Beim Aufbringen der Probenflüssigkeit löst sich das unspezifisch gebundene Material und steht für eine Markierung zur Verfügung. Die Probenlösung wird auf ein Reaktionszentrum aufgebracht und löst das unspezifisch gebundene Markierungsmaterial, zum Beispiel Fluorophore, auf, das dann mit den Probenmolekülen der Probenlösung reagieren kann, um diese zu markieren. Die derart vorbereiteten Vorrichtungen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Prüfungsverfahrens sind einfach zu handhaben und können als fertiges Untersuchungsmittel für ausgewählte Proben-Makromoleküle bereitgestellt werden.

Die Auswahl besonderer Materialien zur Markierung, deren Effekte und Vorteile wurden bereits oben mit Bezug zu den Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Prüfungsverfahrens erläutert.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kommt zumindest ein Reaktionszentrum zum Einsatz, auf dem wenigstens zwei Sorten von bekannten Sonden-Makromolekülen gebunden sind. Zur Herstellung einer solchen Anordnung werden die potentiellen Sonden-Makromoleküle vor dem Auf-

bringen auf die Festkörperoberfläche des Trägers zum Beispiel abgemischt und dann als ein Reaktionszentrum aufgespottet. Somit entsteht ein Reaktionszentrum, an dem unterschiedliche Proben-Makromoleküle einer Probenflüssigkeit spezifisch binden können.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Kit zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Prüfverfahrens, das eine erfindungsgemäße Vorrichtung und ein Markierungsmaterial, vorzugsweise in Form einer Markierungslösung, aufweist, das geeignet ist, wenigstens eine vorbestimmte Sorte von Proben-Makromolekülen zu markieren.

Das Material zur Markierung kann insbesondere markierte Primer für eine oder mehrere PCR (Polymerase-Kettenreaktionen) und gegebenenfalls die für die PCR notwendigen Puffer und Nukleotide umfassen. Schließlich kann das Material zur Markierung auch bereits die für die PCR notwendige Polymerase umfassen.

Die Vorteile und Effekte eines solchen erfindungsgemäßen Kits und seiner in den Unteransprüchen definierten speziellen Ausführungsformen ergeben sich aus den oben beschriebenen Vorteilen und Effekten des erfindungsgemäßen Prüfverfahrens und seiner besonderen Ausgestaltungen bzw. der erfindungsgemäßen Vorrichtung und ihrer bevorzugten Ausführungsformen.

Ausführungsformen des Kits, die den für das erfindungsgemäße Verfahren geschilderten Ausgestaltungen bzw. den für die erfindungsgemäße Vorrichtung geschilderten Ausführungsformen analog entsprechen, sind ebenfalls umfasst, ohne dass sie notwendigerweise für das Kit hier noch einmal gesondert aufgeführt oder erläutert werden.

Die für die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. das erfindungsgemäße Kit auszuwählenden Sonden-Makromoleküle für ein Reaktionszentrum werden zum Beispiel so zusammengestellt, dass sie häufig durchzuführenden Tests entsprechen. So können zum Beispiel für einen Test auf genetisch bedingte Erbkrankheiten in einem Reaktionszentrum entsprechende Sonden-Makromoleküle zusammengefasst werden, die mit für diese Erbkrankheiten charakteristischen Proben-Makromolekülen spezifisch reagieren würden, wenn diese vorhanden sind. Für einen Test, ob ein Organismus gentechnisch verändert wurde, können solche Sonden-Makromoleküle eingesetzt werden, die zu Proben-Makromolekülen komplementär sind, die charakteristisch für bestimmte gentechnisch veränderte Organismen sind.

Andere Auswahlkriterien können zum Beispiel in besonderen Klassen oder Gruppen nachzuweisender Organismen oder darin enthaltener Proben-Makromoleküle liegen.

Die Erfindung wird anhand besonderer Ausgestaltungen unter Bezugnahme auf die anliegenden Figuren im Detail erläutert, die in schematischer Darstellung erfindungsgemäße Verfahrensführungen und Vorrichtungen darstellen. Dabei zeigen

Fig. 1 ein Beispiel eines erfindungsgemäß ausgestalteten Reaktionszentrums,

Fig. 2 ein Array mehrerer Reaktionszentren,

Fig. 3 einen Detailausschnitt eines Arrays mehrerer Reaktionszentren einer Ausführungsform,

Fig. 4 eine Draufsicht auf ein Detail einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Fig. 5 einen Schnitt durch die erfindungsgemäße Vorrichtung gemäß der Linie IV-IV in Fig. 4, und

Fig. 6 eine Draufsicht auf ein Detail einer anderen Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Fig. 1 zeigt ein Reaktionszentrum 10, an dem Sonden-Makromoleküle A, B, C aufgebracht wurden. Typische Durchmesser solcher Reaktionszentren 10 liegen zwischen 50 µm und einigen Millimetern. A, B, C stehen hier beispielhaft für Makromoleküle, die mit entsprechenden Proben-Makromolekülen in einer auf dem Reaktionszentrum 10 aufzubringenden Probenflüssigkeit spezifisch reagieren können, von denen die Anwesenheit untersucht werden soll. In der schematischen Darstellung der Fig. 1 sind nur wenige Sonden-Makromoleküle jeder Sorte dargestellt. Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Anzahl in der Regel viel höher. Die Makromoleküle A, B, C sind an dem Reaktionszentrum 10 regellos angeordnet.

Die typische Länge der verwendeten Sonden-Makromoleküle liegt zwischen 15 und 100 Basenpaaren. Es können auch längere PCR-Produkte oder zum Beispiel Klone, Antikörper oder Antigene oder Epitope als Sonden-Makromoleküle verwendet werden. Auch Sonden-Makromoleküle mit weniger als 15 Basenpaaren sind möglich.

Zur Herstellung einer solchen Anordnung werden Sonden-Makromoleküle A, B, C vor dem Aufbringen auf die Festkörperoberfläche eines Trägers abgemischt und dann als ein Reaktionszentrum 10 aufgespottet. Somit

entsteht ein Reaktionszentrum, an dem unterschiedliche Proben-Makromoleküle einer Probenflüssigkeit spezifisch binden können.

Mehrere solcher Reaktionszentren 10, die entweder gleichartige oder auch unterschiedliche Sonden-Makromoleküle enthalten können, können auch in Form einer Matrix auf einer Festkörperoberfläche aufgebracht werden und so ein Array aus Reaktionszentren bilden. Eine solche Anordnung ist Gegenstand der schematischen Fig. 2, in der beispielhaft zwei der dargestellten Reaktionszentren mit den Bezugsziffern 10, 12 bezeichnet sind. Auf der Festkörperoberfläche 14 können sich mehr als die dargestellte Anzahl an Reaktionszentren in Form einer Matrix befinden, was durch die Punktlinien 13 angedeutet sein soll.

Die Reaktionszentren auf einem Träger können individuell angefertigt werden, wenn eine ganz bestimmte Auswahl von Proben-Makromolekülen auf ihrer Anwesenheit in einer Probenlösung getestet werden sollen. Alternativ können vorgefertigte Träger mit ausgewählten Reaktionszentren bereitgestellt werden, die typische Klassen oder Gruppen von Sonden-Makromolekülen derart zusammenfassen, dass entsprechende Klassen oder Gruppen von Proben-Makromolekülen auf ihrer Anwesenheit in einer Probenlösung getestet werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand eines ersten Beispiels erläutert, bei dem eine Probe zum Beispiel in Form einer Probenlösung auf die Anwesenheit von gentechnisch veränderten Organismen untersucht werden soll. Es handelt sich dabei zum Beispiel um eine Nahrungsmittelprobe, die daraufhin getestet werden soll, ob gentechnisch bestimmte Veränderungen vorgenommen wurden. Es wird dazu ein Reaktionszentrum 10 wie in Fig. 1 eingesetzt, bei dem Sonden-Makromoleküle A, B, C aufgebracht sind, die zu den Makromolekülen der gentechnisch veränder-

ten Organismen komplementär sind. Es können auf die Weise drei unterschiedliche gentechnisch veränderte Organismen abgeprüft werden, für die die zu den Sonden-Makromolekülen A, B, C komplementären Proben-Makromoleküle charakteristisch sind. Selbstverständlich ist eine andere, insbesondere sehr viel größere Anzahl möglich.

Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass die Nahrungsmittelprobe keine der zu prüfenden gentechnisch veränderten Organismen enthält.

Die Nahrungsmittelprobe wird einem Markierungsschritt unterzogen, bei dem Proben-Makromoleküle, die zu den abzutestenden gentechnisch veränderten Organismen gehören, fluoreszenzmarkiert werden, falls sie in der Probe vorhanden sind. Der entsprechende Markierungsschritt wird zum Beispiel mit Hilfe von einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch mit Fluoreszenz markierten Primern durchgeführt. Es wird hier nur ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, so dass alle Markierungen gleich sind. Dieser Schritt führt gleichzeitig zu einer Erhöhung der Menge entsprechender Proben-Makromoleküle der gentechnisch veränderten Organismen, wenn solche in der Probe tatsächlich vorhanden sind. Nach diesem Markierungs-/Nachweiserhöhungsschritt wird die Probe auf das Reaktionszentrum 10 aufgebracht. Es wird eine typische Reaktionszeit abgewartet und dann die Festkörperoberfläche, auf der sich das Reaktionszentrum 10 befindet, einem stringenten Waschschritt unterzogen. Im Anschluss wird die Fluoreszenz des Reaktionszentrums 10 untersucht. Haben an dem Reaktionszentrum fluoreszenzmarkierte Proben-Makromoleküle spezifisch gebunden, so lassen sich diese nach dem Waschschritt an dem Reaktionszentrum 10 nachweisen. Wenn dies der Fall ist, kann darauf geschlossen werden, dass zu den Sonden-Makromolekülen A, B, oder C komplementäre Proben-Makromoleküle in der Probe vorhanden waren und insofern auf die Anwesenheit entsprechender gentechnisch veränderter Organismen

zurückgeschlossen werden, für die die Proben-Makromoleküle charakteristisch sind.

In der Regel wird jedoch die Probe keinen gentechnisch veränderten Organismus enthalten, so dass keine Fluoreszenz gemessen werden kann.

Sollte jedoch Fluoreszenz nachgewiesen werden, wird als erstes Ergebnis festgestellt, dass entsprechende gentechnisch veränderte Organismen in der Probe vorhanden sind. In einem zweiten Schritt kann bei Bedarf überprüft werden, welche der drei gentechnisch veränderten Organismen vorliegen. Dies kann zum Beispiel in an sich bekannter Weise durch einen spezifischen PCR-Schritt oder eine Gelelektrophorese festgestellt werden. Dieser zeitaufwändige und kostenintensive Schritt ist dementsprechend nur notwendig, wenn zuvor an dem Reaktionszentrum ein Fluoreszenzsignal gemessen werden konnte. Ansonsten kann auf den zeitintensiven und kostenintensiven spezifischen Untersuchungsschritt verzichtet werden.

Um eine spezifische Markierung in der Probenlösung zu erreichen, wird zum Beispiel eine Polymerase-Kettenreaktion mit entsprechend markierten Primern durchgeführt, wobei zum Beispiel ein Puffer eingesetzt wird, mit dem auch die Reaktion zur spezifischen Bindung an den Sonden-Makromolekülen des Reaktionszentrums 10 durchgeführt werden kann.

Das Material zur Markierung kann der Probenlösung zugeführt werden und zum Beispiel Teil eines Kits sein, das ein erfindungsgemäßes Reaktionszentrum oder ein erfindungsgemäßes Array von Reaktionszentren für die Prüfung der Anwesenheit bestimmter Proben-Makromoleküle und eine Markierungslösung mit dem Markierungsmaterial umfasst. Der Markierungsschritt kann vor der Reaktion durchgeführt werden, indem ein spezifisches Markierungsverfahren angewendet wird, bei dem nur die Proben-

Makromoleküle markiert werden würden, deren Anwesenheit in der Probenlösung untersucht werden soll. Andererseits ist es auch möglich, den Markierungsschritt erst nach der Reaktion bzw. nach dem Entfernen ungebundenen Probenmaterials vorzunehmen.

Bei einer anderen Verfahrensführung ist das Material zur Markierung an dem Reaktionszentrum 10 vorhanden, zum Beispiel in getrockneter Form. So ist es zum Beispiel möglich, entsprechend vorbereitete Untersuchungsvorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die auf dem wenigstens einen Reaktionszentrum unterschiedliche Sonden-Makromoleküle A, B, C zur spezifischen Reaktion mit Proben-Makromolekülen als auch die benötigten Fluoreszenzmarkierungsstoffe aufweisen. Es kann sich dabei zum Beispiel um markierte Primer für PCR handeln. Die Probenlösung wird auf ein solches Reaktionszentrum aufgebracht und löst die unspezifisch gebundenen Fluorophore auf, die dann mit den gegebenenfalls in der Probe vorhandenen Proben-Makromoleküle reagieren können, um diese zu markieren. Derartig vorbereitete Vorrichtungen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind einfach zu handhaben und können als fertiges Untersuchungsmittel für ausgewählte Proben-Makromoleküle in einer Probenlösung bereitgestellt werden.

Bei einem anderen Beispiel zur Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann in analoger Weise zum Beispiel eine Patientenblutprobe auf das Vorliegen genetisch manifestierter seltener Erbkrankheiten untersucht werden. Dazu enthält ein Reaktionszentrum 10 mehrere Sonden-Makromoleküle A, B, C, die zu Sequenzen oder Teilsequenzen komplementär sind, die charakteristisch für die zu untersuchenden genetisch manifestierten Erbkrankheiten sind. Auch hier wird in der Regel davon ausgegangen, dass solche genetisch manifestierten Erbkrankheiten nicht vorhanden sind, so dass die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens entsprechen-

der charakteristischer Sequenzen oder Teilsequenzen sehr klein, insbesondere kleiner als 20 % ist.

Ein anderes Beispiel dient der Untersuchung einer Blutprobe auf das vorliegen pathogener Erreger. Hier umfasst ein Reaktionszentrum zum Beispiel fünf verschiedene für unterschiedliche Erreger spezifische Bindungsstellen. Kommt es zu keiner spezifischen Bindung nach der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, so sind keine Erreger oberhalb der Nachweisgrenze in der Probe vorhanden.

Kommt es jedoch zu einer spezifischen Bindung und kann dementsprechend ein Fluoreszenzsignal gemessen werden, kann gegebenenfalls mit anderen, zum Beispiel an sich bekannten, Methoden geprüft werden, welcher Erreger tatsächlich vorliegt. Das Vorschalten des erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglicht es, dass bereits vor dem kosten- und zeitintensiven Testschritt, mit dem die genaue Art des Erregers festgestellt wird, der Patient isoliert wird, um zum Beispiel die Ansteckungsgefahr zu reduzieren.

Außerdem ist der kosten- und zeitintensive Schritt zur Feststellung der Art des Erregers nur dann notwendig, wenn überhaupt ein Signal bei dem erfindungsgemäßen Verfahren gemessen werden kann.

Eine Erhöhung der Anzahl der parallel durchführbaren Reaktionen kann erreicht werden, wenn mehrere unterschiedlich bestückte Reaktionszentren 10, 12 in Form einer Matrix angeordnet und ausgewertet werden, wie sie in Fig. 2 gezeigt ist.

Werden die oben geschilderten Experimente in einem Array aus Reaktionszentren 10, 12 durchgeführt, wie es in Fig. 2 gezeigt ist, können die

Zusammensetzungen der einzelnen Reaktionszentren auch unterschiedlich gewählt werden.

So können Sonden-Makromoleküle, die komplementär zu Proben-Makromolekülen eines bestimmten Organismus sind, jeweils mindestens zwei Reaktionszentren 10 beigemischt werden. Sollte in der Probe eine zu einem der Sonden-Makromoleküle komplementäre Proben-Makromolekülsorte vorhanden sein, so leuchten zwei Reaktionszentren bei der Fluoreszenzuntersuchung auf. Beispielhaft ist dieser Mechanismus in Fig. 3 dargestellt. Hier sind beispielhaft drei Reaktionszentren 10, 11, 12 gezeigt. Auf dem ersten Reaktionszentrum 10 befinden sich Sonden-Makromoleküle A und B. Auf dem zweiten Reaktionszentrum 11 Sonden-Makromoleküle A und C und auf dem dritten Reaktionszentrum 12 Sonden-Makromoleküle B und C. Befinden sich in der Probe Makromoleküle, die zu dem Sonden-Makromolekül A komplementär sind, so leuchten die ersten zwei Reaktionszentren 10, 11 bei der Fluoreszenzuntersuchung. Befinden sich in der Probe zum Beispiel Proben-Makromoleküle, die zu den Sonden-Makromolekülen C komplementär sind, so leuchten das zweite und das dritte Reaktionszentrum 11, 12 auf. Befinden sich Proben-Makromoleküle in der Probe, die komplementär zu den Sonden-Makromolekülen B sind, so leuchten das erste und das dritte Reaktionszentrum 10, 12 bei der Fluoreszenzuntersuchung auf. Eine Unterscheidung der vorhandenen Proben-Makromolekülsorten ist damit möglich.

Alternativ können auf jeweils zum Beispiel zwei Reaktionszentren Sonden-Makromoleküle aufgebracht werden, die komplementär zu Proben-Makromolekülen des gleichen Organismus sind, ohne dass die Sonden-Makromoleküle notwendigerweise gleich sind. Auch so kann aus dem Muster der fluoreszierenden Reaktionszentren auf den Organismus geschlossen werden.

Fig. 4 zeigt die Draufsicht auf ein Reaktionszentrum einer abgewandelten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Das Reaktionszentrum 10 ist hier von einem konzentrischen Bereich 16 umgeben, der im Vergleich zum Reaktionszentrum 10 hydrophob ist. Dies lässt sich zum Beispiel durch eine Silanisierung des Bereichs 16 erreichen. Der hydrophobe Bereich 16 ist von einem weiteren konzentrischen Bereich 18 umgeben, der solche Benetzungseigenschaften aufweist, dass er zur Lokalisierung eines durch seine Oberflächenspannung zusammengehaltenen Öltropfens dienen kann, also zum Beispiel im Vergleich zu seiner äußeren Umgebung entsprechend lipophil ist.

Die Bereiche mit den Bezugsziffern 10 und 18 können zum Beispiel gleiche oder ähnliche Benetzungseigenschaften aufweisen.

Fig. 5 zeigt einen Schnitt durch ein solches Reaktionszentrum entlang der Linie IV-IV, wie sie in Fig. 4 angedeutet ist. Außerdem ist ein Tropfen 22 von Probenlösung dargestellt, der von einem Ölfilm 24 bedeckt wird. Die Festkörperoberfläche, zum Beispiel ein Glasplättchen, ist mit 20 bezeichnet.

Die Probenlösung 22 wird durch ihre Oberflächenspannung zusammengehalten und verlässt den im Vergleich zum hydrophoben Bereich 16 hydrophilen Bereich des Reaktionszentrums 10 ohne äußere Krafteinwirkung nicht, wodurch sie am Reaktionszentrum 10 lokalisiert ist. Zum Schutz gegen Verdampfung wird oberhalb des Probenlösungstropfens 22 ein Öltropfen 24 aufgebracht, der den Bereich 18 aufgrund seiner Oberflächenspannung nicht verlässt. Insbesondere bei Verwendung von kleinen Probenvolumina von 0,1 µl bis 10 µl ist die Verwendung eines solchen Öltropfens 24 vorteilhaft, um ein Verdampfen zu verhindern.

Die Geometrie kann auch so gewählt sein, dass der Öltropfen mehrere Reaktionszentren und die darauf befindlichen Probenlösungstropfen abdeckt. Dazu kann vorgesehen sein, dass ein im Vergleich zu seiner äußeren Umgebung lipophiler Bereich zur Lokalisierung des Öltropfens mehrere einzelne Reaktionszentren umgibt, die ihrerseits jeweils einen eigenen sie umgebenden hydrophoben Bereich aufweisen, oder dass ein im Vergleich zu seiner äußeren Umgebung lipophiler Bereich einen hydrophoben Bereich umgibt, der eine Gruppe von Reaktionszentren (zum Beispiel jeweils eine 2x2- oder 9x9-Matrix oder eine andere matrixförmige Anordnung) umgibt, so dass diese Gruppe von einem gemeinsamen Proben-Flüssigkeitstropfen bedeckt wird. In solchen durch einen Öltropfen abzudeckenden Gruppen können die Reaktionszentren zum Beispiel jeweils matrixförmig (beispielsweise als 2x2- oder 9x9-Matrix) angeordnet sein.

Fig. 6 zeigt ein entsprechendes Beispiel, bei dem eine Gruppe 26 von in Form einen 3x3-Matrix angeordneten Reaktionszentren 10 von einem gemeinsamen hydrophoben Bereich 16 und einem dazu konzentrischen im Vergleich zu seiner äußeren Umgebung lipophilen Bereich 18 umgeben ist. Solche Gruppen 26 von Reaktionszentren 10 können wiederum auch in einem übergeordneten Array angeordnet werden, so dass ein "Array-im-Array" vorliegt, wobei das übergeordnete Array zum Beispiel 48, 96 oder 384 solcher Gruppen 26 umfassen kann.

Bei entsprechender Auswahl der Oberflächenbeschaffenheit kann ein konzentrischer Bereich auch sowohl hydrophob als auch lipophil wirken und die beschriebenen Aufgaben eines hydrophoben und eines lipophilen Bereiches übernehmen.

Eine zusätzliche Durchmischung der Probenlösung auf der Oberfläche des Trägers kann erreicht werden, wenn Oberflächenschallwellen in Richtung des Reaktionszentrums geschickt werden, die zum Beispiel mit Hilfe eines Interdigitaltransducers auf der Trägeroberfläche erzeugt werden, dessen Abstrahlrichtung auf das Reaktionszentrum gerichtet ist. Gegebenenfalls kann dazu das Trägermaterial piezoelektrisch ausgewählt oder beschichtet werden.

Bezugszeichenliste

10, 11, 12	Reaktionszentren
13	Fortsetzungslinien
14	Reaktionsarray
16	hydrophober Bereich
18	lipophiler Bereich
20	Festkörperoberfläche
22	Probenflüssigkeitstropfen
24	Ölbedeckung
26	Gruppe von Reaktionszentren

Patentansprüche

1. Verfahren zur Prüfung einer flüssigen Probe (22) auf die Anwesenheit von wenigstens einer von wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle,
   - wobei die wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 % in der Probe vorliegen und das Verfahren folgende Schritte umfasst:
   - Bereitstellen eines Trägers (20) mit wenigstens einem Reaktionszentrum (10, 11, 12), an dem wenigstens zwei unterschiedliche Sorten von Sonden-Makromolekülen (A, B, C) gebunden sind, die derart zu den wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle komplementär sind, dass sie mit diesen spezifisch reagieren können,
   - Durchführen eines Markierungsschrittes zur Markierung von Proben-Makromolekülen zumindest der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle,
   - In-Kontakt-Bringen der Probe (22) mit dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) derart, dass eine Reaktion zwischen Proben-Makromolekülen der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle und den jeweils komplementären Sonden-Makromolekülen (A, B, C) stattfinden kann,
   - Entfernen von ungebundenem Probenmaterial, und
   - Prüfen des Vorhandenseins von an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) spezifisch gebundenen Proben-Makromolekülen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle und/oder die auf dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) vorhandenen Sonden-Makromoleküle (A, B, C)
   - Nukleinsäuresequenzen, insbesondere DNA, RNA oder PNA; oder
   - Antikörper, Antigene oder Epitope; oder
   - Peptide, Proteine oder Proteide; oder
   - eine Kombination aus zwei oder mehreren der vorgenannten Substanzen

   umfassen und/oder zu solchen Substanzen komplementär sind.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, bei dem die Prüfung auf Anwesenheit von wenigstens einer von zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle in der Probe (22) vorgenommen wird, die jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 15 %, bevorzugt weniger als 10 %, besonders bevorzugt weniger als 5 %, ganz besonders bevorzugt weniger als 1 % in der Probe vorliegen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) gebundenen Sonden-Makromoleküle (A, B, C) derart ausgewählt werden, dass sie komplementär zu jeweiligen Proben-Makromolekülen sind, die mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 %, bevorzugt weniger als 15 %, bevorzugter weniger als 10 %, besonders bevorzugt weniger als 5 % und ganz besonders bevorzugt weniger als 1 % in einer Probe vorkommen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die Anzahl der an dem mindestens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) gebundenen, unterschiedlichen Sorten Sonden-Makromoleküle (A, B, C) zwischen 2 und 50, bevorzugt zwischen 2 und 30 und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 und 10 liegt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Probe auf die Anwesenheit von vorbestimmten Proteinen oder Peptiden in der Probe (22) geprüft wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Probe auf die Anwesenheit von vorbestimmten Nukleinsäuren in der Probe (22) geprüft wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, mit einem Nachweiserhöhungsschritt, bei dem die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises der Moleküle wenigstens einer der vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle erhöht wird, falls diese Sorte Proben-Makromoleküle in der Probe (22) enthalten ist.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 6 und 8, bei dem der Nachweiserhöhungsschritt einen Aufkonzentrierungsschritt für die vorbestimmten Proteine oder Peptide umfasst, vorzugsweise eine Fällung oder eine Dialyse.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 7 und 8, bei dem der Nachweiserhöhungsschritt einen vorzugsweise spezifischen Amplifikationsschritt für die vorbestimmten Nukleinsäuren umfasst.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem im Falle eines positiven Ergebnisses des Prüfschrittes ein Diskriminierungsschritt durchgeführt wird, um festzustellen, welche der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle in der Probe (22) vorhanden ist.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 6 und 11, bei dem der Diskriminierungsschritt eine Massenspektroskopie oder eine ELISA-(Enzyme-linked Immunosorbent Assay-) Reaktion umfasst.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 7 und 11, bei dem der Diskriminierungsschritt einen PCR-(Polymerase chain reaction-)Schritt, einen realtime-PCR-Schritt, eine Gelelektrophorese oder einen Dot-Blot-Schritt umfasst.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, bei dem als Markierung Fluoreszenzmarkierung verwendet wird und zur Prüfung des Vorhandenseins von an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) nach der Reaktion gebundenen Proben-Makromolekülen die Fluoreszenz untersucht wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, bei dem gegebenenfalls vorhandene Proben-Makromoleküle der wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle während des Markierungsschrittes gleichartig markiert werden, insbesondere mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, bei dem zur Markierung der Proben-Makromoleküle eine oder mehrere PCR (Polymera-

sekettenreaktion(en)) mit entsprechend markierten Primern eingesetzt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem für die PCR ein Puffer eingesetzt wird, mit dem auch die Reaktion zur spezifischen Bindung an den Sonden-Makromolekülen (A, B, C) des wenigstens einen Reaktionszentrums (10, 11, 12) durchgeführt werden kann.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, bei dem die Markierung der Proben-Makromoleküle an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) nach dem Entfernen ungebundenen Probenmaterials erfolgt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, bei dem mehrere, vorzugsweise in Form eines Arrays angeordnete, Reaktionszentren (10, 11, 12) mit jeweils wenigstens zwei Sorten von gebundenen Sonden-Makromolekülen (A, B, C) auf einem Träger (20) eingesetzt werden.

20. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem die Auswahl der an einem Reaktionszentrum (10, 11, 12) des Arrays vorhandenen Sonden-Makromoleküle (A, B, C) nicht für alle Reaktionszentren (10, 11, 12) gleich ist, insbesondere sich für alle Reaktionszentren (10, 11, 12) des Arrays unterscheidet.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, bei dem ein im wesentlichen planarer Träger (20) eingesetzt wird, wobei das wenigstens eine Reaktionszentrum (10) von einem Bereich auf dem Träger (20) umgeben ist, der andere Benetzungseigenschaften als seine Umgebung (16) hat.

22. Verfahren nach Anspruch 21, bei dem mehrere Reaktionszentren einer Gruppe (26) von einem gemeinsamen Bereich umgeben sind, der andere Benetzungseigenschaften als seine Umgebung aufweist.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 oder 22, bei dem das wenigstens eine Reaktionszentrum oder die mehreren Reaktionszentren einer Gruppe von zwei konzentrischen Bereichen (16, 18) umgeben ist, wobei der innere konzentrische Bereich (16) andere Benetzungseigenschaften als das Reaktionszentrum (10) und als der äußere konzentrische Bereich (18) hat.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, bei dem die Probenflüssigkeit (22) während der Reaktion mit Öl (24) bedeckt wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, bei dem Schallwellen, vorzugsweise Oberflächenschallwellen, in Richtung der Probenflüssigkeit geschickt werden, nachdem die Probenflüssigkeit mit dem wenigstens einen Reaktionszentrum in Kontakt gebracht worden ist.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25, bei dem die Probe auf die Anwesenheit von vorbestimmten gentechnisch veränderten Organismen (GVO) geprüft wird, wobei die Anwesenheit von transgenen Sequenzen oder Teilsequenzen als Proben-Makromoleküle geprüft wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25, bei dem die Probe auf die Anwesenheit von vorbestimmten Krankheitserregern und/oder Viren und/oder Bakterien geprüft wird, wobei die Anwe-

senheit darin enthaltener Sequenzen oder Teilsequenzen als Proben-Makromoleküle geprüft wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27, bei dem die flüssige Probe Probenmaterial von mehreren Zellen umfasst.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, bei dem die wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle zu unterschiedlichen Organismen gehören.

30. Vorrichtung zur Prüfung einer flüssigen Probe (22) auf die Anwesenheit von wenigstens einer von wenigstens zwei vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle, wobei die wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 % in der Probe vorliegen, insbesondere zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 29, mit

- einem Träger (20) und
- wenigstens einem auf dem Träger (20) angeordneten Reaktionszentrum (10, 11, 12) mit wenigstens zwei Sorten daran gebundener Sonden-Makromoleküle (A, B, C), die ohne vorbestimmte räumliche Anordnung an dem Reaktionszentrum (10, 11, 12) gebunden sind und derart zu den Proben-Makromolekülen der vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle komplementär sind, dass sie mit diesen spezifisch reagieren können.

31. Vorrichtung nach Anspruch 30, bei der die auf dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) vorhandenen Sonden-Makromoleküle (A, B, C)

- Nukleinsäuresequenzen, insbesondere DNA, RNA oder PNA; oder
- Antikörper, Antigene, oder Epitope; oder
- Peptide, Proteine oder Proteide; oder
- eine Kombination aus zwei oder mehreren dieser Substanzen

umfassen und/oder zu solchen Substanzen komplementär sind.

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 oder 31 zur Prüfung einer flüssigen Probe (22), in der die wenigstens zwei vorbestimmten Sorten Proben-Makromoleküle jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 15 %, bevorzugt weniger als 10 %, besonders bevorzugt weniger als 5 %, ganz besonders bevorzugt weniger als 1 % vorliegen.

33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 32, bei der die an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) gebundenen Sonden-Makromoleküle (A, B, C) komplementär zu jeweiligen Proben-Makromolekülen sind, die mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von weniger als 20 %, bevorzugt weniger als 15 %, bevorzugter weniger als 10 %, besonders bevorzugt weniger als 5 % und ganz besonders bevorzugt weniger als 1 % in einer Probe vorkommen.

34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 33 mit mehreren, vorzugsweise in Form eines Arrays angeordneten, Reaktionszentren (10, 11, 12) mit jeweils wenigstens zwei Sorten von Sonden-Makromolekülen (A, B, C).

35. Vorrichtung nach Anspruch 34, bei der die Auswahl der Sonden-Makromoleküle (A, B, C) nicht für alle Reaktionszentren (10, 11, 12)

des Arrays gleich ist, bevorzugt für alle Reaktionszentren (10, 11, 12) des Arrays unterschiedlich ist.

36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 35 mit einem im wesentlichen planaren Träger (20), wobei das wenigstens eine Reaktionszentrum (10) von einem Bereich (16) auf dem Träger umgeben ist, der andere Benetzungseigenschaften als seine Umgebung hat.

37. Vorrichtung nach Anspruch 36, bei der mehrere Reaktionszentren einer Gruppe (26) von einem gemeinsamen Bereich umgeben sind, der andere Benetzungseigenschaften als seine Umgebung aufweist.

38. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 36 oder 37, bei der das wenigstens eine Reaktionszentrum oder die mehreren Reaktionszentren einer Gruppe (26) von zwei konzentrischen Bereichen (16, 18) umgeben ist, wobei der innere konzentrische Bereich (16) andere Benetzungseigenschaften als das Reaktionszentrum (10) und als der äußere konzentrische Bereich (18) hat.

39. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 38, bei der die Anzahl der an dem wenigstens einen Reaktionszentrum gebundenen unterschiedlichen Sorten Sonden-Makromoleküle (A, B, C) zwischen 2 und 50, bevorzugt zwischen 2 und 30 und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 und 10 ist.

40. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 39 mit einer Einrichtung zur Erzeugung von Schallwellen mit einer Abstrahlrichtung in Richtung des wenigstens einen Reaktionszentrums, vorzugsweise wenigstens eines Interdigitaltransducers zur Erzeugung von Oberflächenschallwellen.

41. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 40 zum Nachweis gentechnisch veränderter Organismen (GVO), wobei Makromoleküle als Sonden-Makromoleküle (A, B, C) eingesetzt werden, die zu den transgenen Sequenzen oder Teilsequenzen der gentechnisch veränderten Organismen komplementär sind.

42. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 40 zum Nachweis von Krankheitserregern, Viren und/oder Bakterien, wobei Sequenzen oder Teilsequenzen als Sonden-Makromoleküle eingesetzt werden, die zu Sequenzen oder Teilsequenzen der Krankheitserreger, Viren und/oder Bakterien komplementär sind.

43. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 42, bei der die wenigstens zwei Sorten der an dem wenigstens einen Reaktionszentrum gebundenen Sonden-Makromoleküle (A, B, C) zu Proben-Makromolekülen komplementär sind, die zu unterschiedlichen Organismen gehören.

44. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 43, bei der sich an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) Material zur Markierung von zumindest solchen Proben-Makromolekülen befindet, vorzugsweise unspezifisch gebunden ist, die zu den wenigstens zwei Sorten an dem Reaktionszentrum gebundener Sonden-Makromoleküle komplementär sind.

45. Vorrichtung nach Anspruch 44, bei der das Material zur Markierung fluoreszierend ist.

46. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 44 oder 45, bei der das Material zur Markierung für mehrere, vorzugsweise alle, Proben-Makromoleküle, die zu den an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) gebundenen Sonden-Makromolekülen komplementär sind, gleich ist.

47. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 44 bis 46, bei der das Material zur Markierung markierte Primer für eine oder mehrere PCR (Polymerasekettenreaktion(en)) umfasst.

48. Verfahren zur Herstellung einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 30 bis 47, bei dem

- eine Mischung von wenigstens zwei Sorten Sonden-Makromoleküle (A, B, C), die derart zu den Proben-Makromolekülen der vorbestimmten, unterschiedlichen Sorten Proben-Makromoleküle komplementär sind, dass sie mit diesen spezifisch reagieren können, hergestellt wird und
- als Reaktionszentrum (10, 11, 12) auf einen Träger (20) aufgespottet wird.

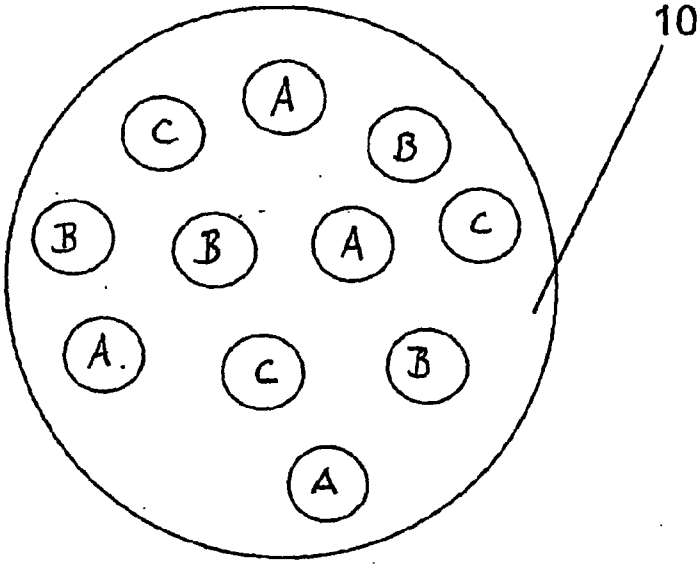
49. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 29, mit

- einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30 bis 43 und
- einem Markierungsmaterial, vorzugsweise in Form einer Markierungslösung, das geeignet ist, zumindest solche Proben-Makromoleküle zu markieren, die zu den wenigstens zwei Sorten an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) gebundener Sonden-Makromoleküle (A, B, C) komplementär sind.

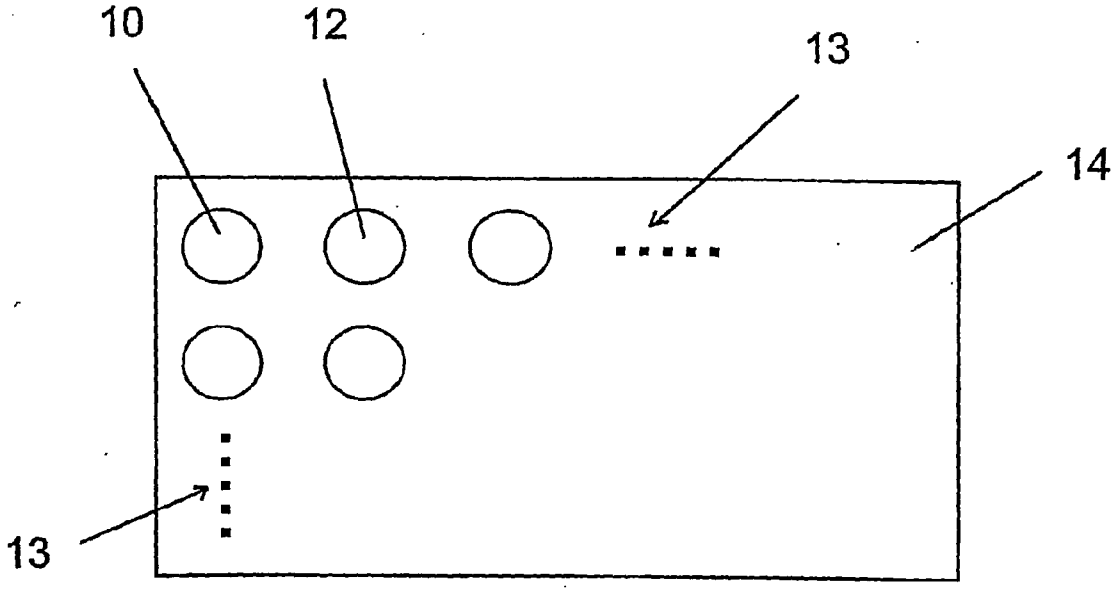
50. Kit nach Anspruch 49, bei dem das Markierungsmaterial fluoreszierend ist.

51. Kit nach einem der Ansprüche 49 oder 50, bei dem das Material zur Markierung für mehrere, vorzugsweise alle, zu den an dem wenigstens einen Reaktionszentrum (10, 11, 12) gebundenen Sonden-Makromolekülen komplementären Proben-Makromoleküle gleich ist.

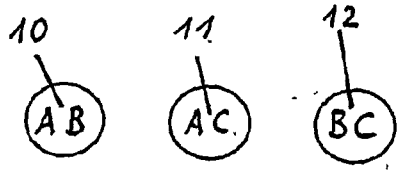
52. Kit nach einem der Ansprüche 49 bis 51, bei dem das Material zur Markierung markierte Primer für eine oder mehrere PCR (Polymerasekettenreaktion(en)) umfasst.



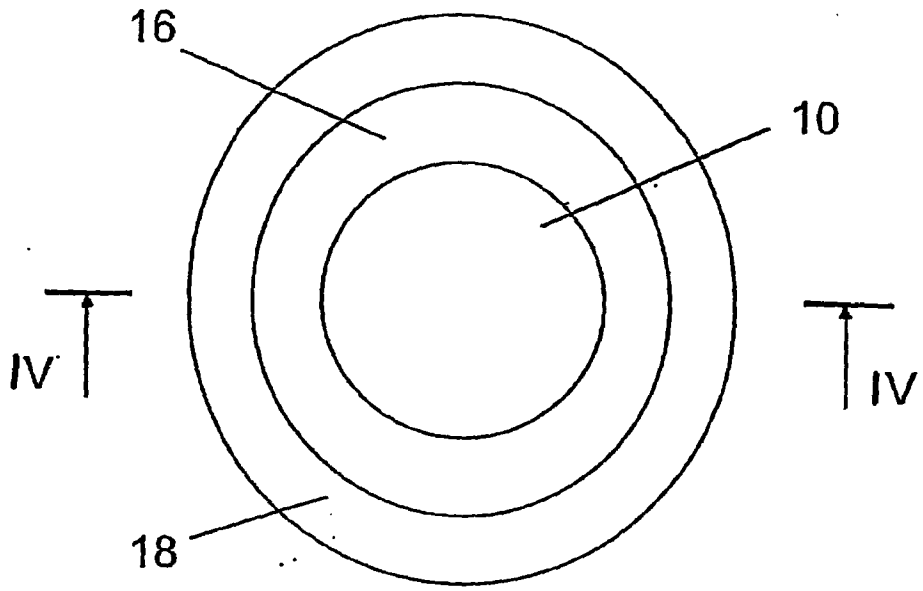
Figur 1



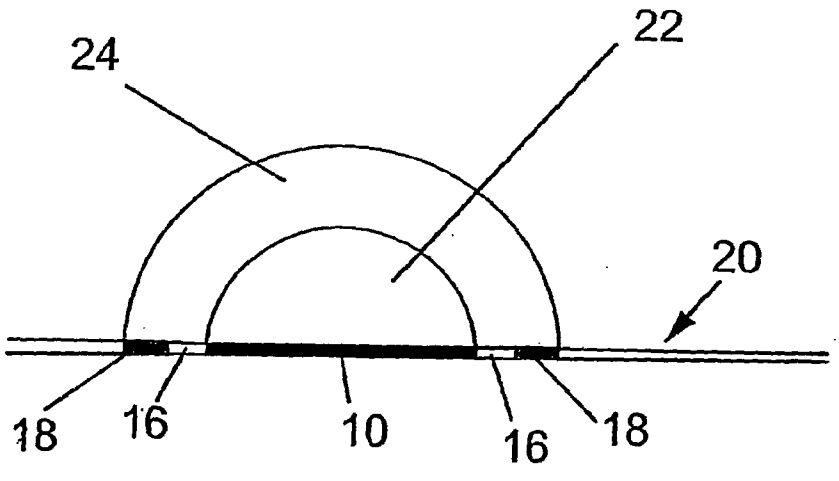
Figur 2



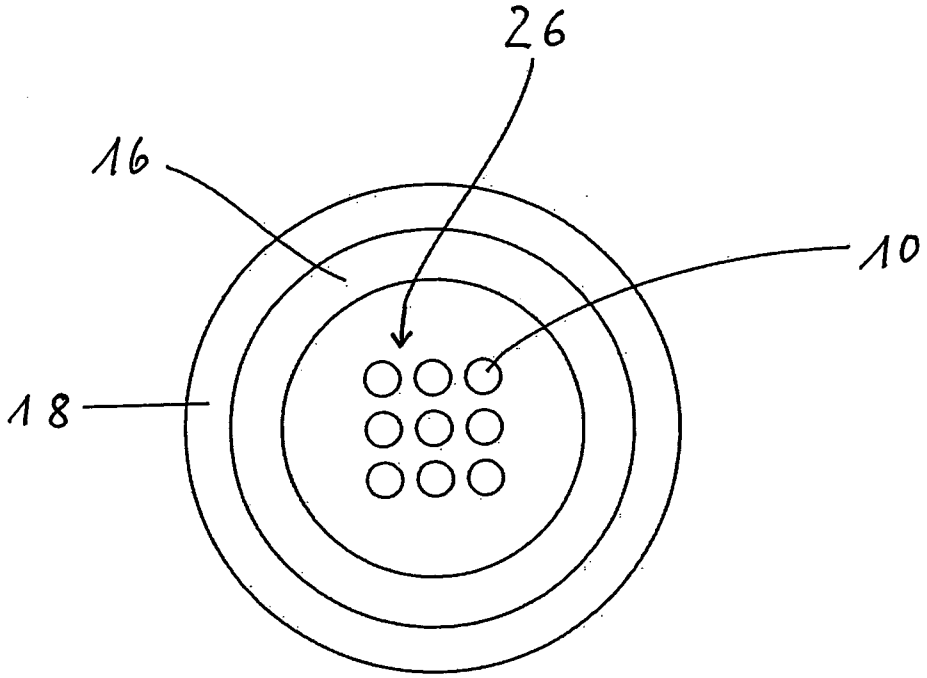
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6