

(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
22. Oktober 2009 (22.10.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/127408 A1

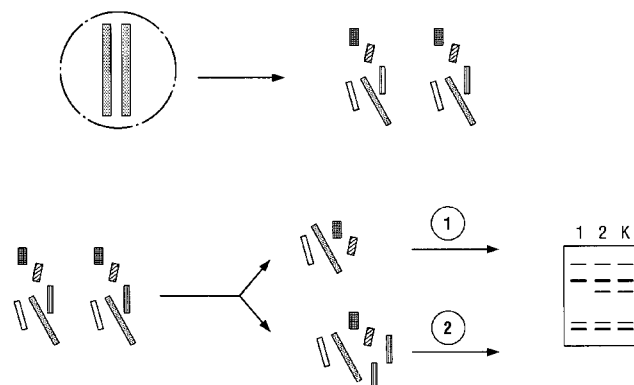
- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/002759
- (22) Internationales Anmeldedatum:
15. April 2009 (15.04.2009)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2008 019 132.9
16. April 2008 (16.04.2008) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **OLYMPUS LIFE SCIENCE** [DE/DE]; Research Europa GmbH, Sauerbruchstrasse 50, 81377 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MANN, Wolfgang** [DE/DE]; Hornungsreuth 22a, 95512 Neudrossenfeld (DE).
- (74) Anwalt: SAUER, Philippe; 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, AO, 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, ST, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROCESS FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE COPIER NUMBER OF A PREDETERMINED SEQUENCE IN A SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER KOPIENZAHL EINER VORBESTIMMTEN SEQUENZ IN EINER PROBE

Fig. 2



(57) Abstract: A process for the quantitative determination of the number of at least one predetermined sequence in a biological sample comprises the steps: a) providing a biological sample which contains a nucleic acid, b) fragmenting the nucleic acid present in the biological sample, c) dividing the sample obtained in step b) into at least two subsamples, d) adding in each case at least two primer pairs to each of the at least two subsamples, where in each case the same primer pairs are added to each of the subsamples and where the individual primer pairs are adapted to amplify, in one amplification reaction, in each case different parts-sequences of the at least one predetermined sequence, e) carrying out an amplification reaction with each of the at least two subsamples obtained in step d), f) determining the number of different amplicates obtained by the amplification reactions in step e) for the individual subsamples, and determining the number of subsamples with which in each case identical amplicates have been obtained.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2009/127408 A1



Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

Ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Anzahl wenigstens einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe umfasst die Schritte: a) Bereitstellung einer Nukleinsäure enthaltenden biologischen Probe, b) Fragmentierung der in der biologischen Probe enthaltenen Nukleinsäure, c) Aufteilen der in dem Schritt b) erhaltenen Probe in wenigstens zwei Teilmengen, d) Zugabe von jeweils wenigstens zwei Primerpaaren zu jeder der wenigstens zwei Teilmengen, wobei jeder der Teilmengen jeweils dieselben Primerpaare zugegeben werden, und wobei die einzelnen Primerpaare daran angepasst sind, in einer Amplifikationsreaktion jeweils unterschiedliche Teilsequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz zu amplifizieren, e) Durchführen einer Amplifikationsreaktion mit jeder der wenigstens zwei in dem Schritt d) erhaltenen Teilmengen, f) Bestimmen der Anzahl der mit den Amplifikationsreaktionen in dem Schritt e) für die einzelnen Teilmengen erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte und Bestimmen, mit wie vielen Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind.

Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz in einer Probe

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Anzahl wenigstens einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe, vorzugsweise in einer Einzelzelle, und insbesondere ein Verfahren zur Bestimmung der absoluten Kopienzahl von Allelen pro Zelle.

10

In der molekularen Diagnostik gewinnen Verfahren zum Quantifizieren von Sequenzen, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der Kopienzahl von Nukleinsäuresequenzen pro Zelle, eine immer bedeutendere Rolle. Da eine Vielzahl von zum Teil schweren Erkrankungen durch Abweichungen von der normalen Kopienzahl von Nukleinsäuresequenzen im Genom verursacht werden, lassen sich durch eine Bestimmung der Kopienzahl bestimmter Chromosomen oder bestimmter Genabschnitte entsprechende Krankheiten schon im Frühstadium der Entwicklung zuverlässig diagnostizieren.

20

Beispiele für zum Teil schwere Anomalien, welche auf eine erhöhte Kopienzahl ganzer Chromosomen zurückzuführen sind, sind die Trisomie 18 (Edward's Syndrom), Trisomie 13 (Patau-Syndrom) sowie Trisomie 21 (Down-Syndrom). Bei jeder dieser Krankheiten beträgt die Kopienzahl des entsprechenden Chromosoms 18, 13 bzw. 21 pro Zelle drei, wohingegen gesunde Individuen lediglich zwei Kopien der vorgenannten Chromosomen pro Zelle aufweisen. In allen drei Fällen führt die Erhöhung der Kopien-

25

zahl des betreffenden Chromosoms zu schwersten Entwicklungsstörungen. Während Träger der Trisomie 21 in ihrer Entwicklung drastisch gehemmt sind und teilweise schwere Fehlbildungen aufweisen, versterben die Träger der Trisomie 18 und Trisomie 13 meistens innerhalb des ersten
5 Lebensjahres.

Neben Krankheiten, welche auf eine erhöhte Kopienzahl ganzer Chromosomen zurückzuführen sind, ist auch eine Vielzahl von Erkrankungen bekannt, welche auf einer veränderte Kopienzahl von Genen oder Genabschnitten beruhen.
10

Ursache für die Huntington-Krankheit, einer progressiv verlaufenden neurodegenerativen Erkrankung gekennzeichnet durch abnormale, unwillkürliche Bewegungen bei zunehmendem Verfall der geistigen und körperlichen Fähigkeiten, soll die Hintereinanderschaltung von mehr als 37 Kopien eines bestimmten Motivs (CAG) sein, wobei die Prädisposition zur Krankheitsausbildung mit der Anzahl der Wiederholungen dieses Motivs im Genom zunimmt. Weitere Beispiele für instabile Trinukleotidsequenzen beim Menschen sind das Kennedy-Syndrom und die spinocerebrale Ataxie-1.
15
20

Zudem ist bekannt, dass sich bestimmte Protoonkogene durch Genamplifikation im Genom vervielfältigen können. Derartige Amplifikationen sind in dem Chromosomensatz oftmals als so genannte "*double minutes*" (D.M.) oder als "*homogeneously staining regions*" (HSR) zu erkennen. Aufgrund der enormen Erhöhung der Gen-Kopienzahl kann das zugehörige Protein in den Zellen in sehr großen Mengen produziert werden, was eine verstärkte Aktivierung der Zellproliferation - ohne Veränderung des Einzelgens an sich - ermöglicht. Insbesondere das myc-Protoonkogen soll von
25
30 der Amplifikation besonders oft betroffen sein.

Aufgrund des Bedarfs an Verfahren zur Quantifizierung von Sequenzkopien in einer biologischen Probe sind in der Vergangenheit eine Vielzahl entsprechender Verfahren vorgeschlagen worden.

5

Eines der grundlegenden Quantifizierungsverfahren, welches zumindest eine Aussage über die An- oder Abwesenheit von Nukleinsäuresequenzen und abhängig von der Verfahrensführung auch einen bedingten Rückschluss auf die Kopienzahl der betreffenden Nukleinsäuresequenzen pro Zelle erlaubt, ist das so genannte FISH-Verfahren (*fluorescence in situ hybridization*). Bei diesem Verfahren wird die zu untersuchende biologische Probe nach entsprechender Vorbehandlung, d.h. Denaturierung mit Formamid sowie Vorhybridisierung, mit einer oder mehreren verschiedenen Sonden, welche zuvor mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, unter Bedingungen inkubiert, welche eine Hybridisierung der Sonden mit dazu homologen Sequenzen in der biologischen Probe ermöglichen. Nach der Hybridisierung werden die Proben gewaschen, wobei unspezifische Hybridisierungssignale eliminiert werden. Abschließend werden die Fluoreszenzsignale des Präparats mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Jedes vorhandene Fluoreszenzsignal weist auf die Anwesenheit der mit dem entsprechenden Fluoreszenzmarker versehenen Sonde entsprechenden Sequenz hin. Die Intensität der Fluoreszenz kann einen bedingten Rückschluss auf die Anzahl der Sequenzkopien in der biologischen Probe zulassen. Wird hingegen bei der Wellenlänge einer der eingesetzten fluoreszenzmarkierten Sonden kein Signal oder nur ein unterhalb eines definierten Schwellenwerts liegendes Signal erhalten, kann auf die Abwesenheit der zu der entsprechenden Sonde korrespondierenden Sequenz in der biologischen Probe geschlossen werden. Allerdings kann die Abwesenheit eines entsprechenden Fluoreszenzsignals auch darin begründet liegen, dass in der entsprechenden Bin-

10
15
20
25
30

dungsstelle der nachzuweisenden Sequenz eine Mutation und/oder Mikrodeletion stattgefunden hat, weswegen die Sonde unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen nicht mehr an die vorbestimmte Sequenz bindet. Ein weiterer Nachteil des vorgenannten Verfahrens liegt darin, dass eine unerwünschte und zu falschen Ergebnissen führende Kreuzhybridisierung niemals vollständig ausgeschlossen werden kann. Zudem ist dieses Verfahren vergleichsweise teuer, zum einen weil zwingend Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden müssen, und zum anderen, weil es aufwändige Apparaturen, wie Fluoreszenzmikroskope, benötigt. Schließlich hängt die Aussagekraft dieses Verfahrens in ganz erheblichem Maße von der Qualität der eingesetzten Sonden ab; zuverlässige Ergebnisse werden nur erhalten, wenn die Sonden mit einer Effektivität von mehr als 90 % an die dazu korrespondierenden Bindungsstellen hybridisieren, so dass nur noch 10% der Zielsequenzen unhybridisiert vorliegen und demzufolge nicht mehr amplifiziert werden. Daraus folgt, dass eine falsche Wahl der Sonden, aber auch inadäquate Hybridisierungsbedingungen zu einem falschen Ergebnis führen. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, dass eine Mindestmenge an biologischer Probe eingesetzt werden muss, um überhaupt ein auswertbares Fluoreszenzsignal zu erhalten. Zudem darf die Sequenz eine minimale Länge nicht unterschreiten. Weiterhin ist es für ein valides Ergebnis notwendig, eine Vielzahl von Zellen zu analysieren, die einer Hybridisierung zugänglich waren. Aus diesem Grund ist die FISH-Analyse für die Einzelzelldiagnostik nicht adäquat. Darüber hinaus ist eine automatisierte Auswertung durch den Pathologen kaum möglich.

Ein anderes fluoreszenzbasierendes Verfahren ist die CGH-Analyse (*comparative genomic hybridization*). Bei diesem Verfahren wird die Nukleinsäure der zu analysierenden Probe komplett mit einem Farbstoff 1 markiert. Die gleiche Menge an Nukleinsäuren einer Referenzprobe wird mit

einem Farbstoff 2 markiert. Beide Reaktionsansätze werden gemeinsam auf einem gespreiteten Metaphasechromosomensatz hybridisiert, wobei die in beiden Reaktionsansätzen enthaltenen Sequenzen um die Bindungsstellen an den gespreiteten Chromosomen kompetieren. Im Wesentlichen wird sich an allen Hybridisierungsstellen ein Verhältnis von Farbstoff 1 zu Farbstoff 2 von 1:1 einstellen. Enthält die zu analysierende Probe amplifizierte Bereiche (mehr als die gewöhnliche Kopienzahl der Referenz), so wird der Farbstoff 1 an dieser Hybridisierungsstelle überwiegen. Im Fall einer Deletion in der zu untersuchenden Probe wird man nur den Farbstoff 2 an dieser Hybridisierungsstelle detektieren. Die Referenzmessung erlaubt eine relative Aussage über die Häufigkeit von Sequenzen in der zu analysierenden Probe. Allerdings ist auch dieses Verfahren, da absolute Fluoreszenzintensitäten gemessen werden müssen, aufwändig und teuer. Zudem erfordert auch dieses den Einsatz einer bestimmten, vergleichsweise hohen Ausgangsmenge.

Eine spezielle Variante ist die *Array-CGH*, in der nicht auf Chromosomen, sondern auf immobilisierte Sequenzen, deren physikalische Adresse im Genom bekannt ist, hybridisiert wird.

20

Ein weiteres bekanntes Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuresequenzen ist die Real-Time-PCR-Methode, bei der eine PCR (*polymerase chain reaction* bzw. Polymerasekettenreaktion) mit fluoreszenzmarkierten Primern durchgeführt wird und die Zunahme des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Zyklenzahl beobachtet wird. Der Schwellenwert-PCR-Zyklus (auch *Threshold-Cycle*) wird dem Reaktionszeitpunkt zugeordnet, bei dem sich das Fluoreszenzsignal signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt und die PCR-Produktbildung exponentiell verläuft. Dieser korreliert mit der Anfangskopienzahl der zu vermehrenden DNA-Sequenz. Auf diese Weise lassen sich DNA-Proben anhand des Ver-

30

gleichs mit einer DNA-Verdünnungsreihe relativ quantifizieren. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt jedoch darin, dass die Menge an Ausgangsmaterial nicht beliebig verkleinert werden kann, da mit wenigen Startmolekülen, beispielsweise 10 bis 100 Kopien, als Ausgangsmaterial der stochastische Fehler aufgrund der exponentiellen Amplifikation sehr groß wird, was
5 keine quantitative Aussagen mehr zulässt. Des Weiteren erfordert auch dieses Verfahren aufwändige und teure Apparaturen zur Messung der Fluoreszenzintensität.

10 Ein neueres Verfahren zur quantitativen Bestimmung einer Nukleinsäuresequenz ist die QF-PCR (*quantitative fluorescence PCR*), bei der in einem PCR-Ansatz parallel mehrere PCR's unter Einsatz unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Primer durchgeführt werden und die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte anschließend mit einem automatischen DNA-Scanner
15 laserdensitometrisch analysiert werden. Um einen aussagenkräftigen quantitativen Vergleich zwischen zwei nebeneinander amplifizierten PCR-Produkten treffen zu können, müssen die beiden PCR-Teilreaktionen mit gleicher Effizienz ablaufen und die Fluoreszenzintensitäten der Reaktionsprodukte zum Zeitpunkt der exponentiellen Produktamplifikation quanti-
20 tativ analysiert werden. Auch andere auf optisch aktiv markierten Sonden basierende Verfahren, bspw. solche unter Einsatz von infrarotmarkierten Sonden, lösen das Problem nicht.

Ein auf der QF-PCR-Methodik basierendes Verfahren zur Feststellung
25 möglicher numerischer Aberrationen der Chromosomen 21, 18, 13, X und Y in Fruchtwasserproben ist von Lucchini et al. in Wissenschaftliche Informationen, September 2004 beschrieben worden. Dieses Verfahren basiert auf der *in-vitro*-PCR-Amplifikation von repetitiven und polymorphen STR (*short tandem repeats*)-Sequenzen mit fluoreszenzmarkierten Primern.
30 Nach Abschluss der PCR werden die amplifizierten PCR-Produkte mittels

Kapillarelektrophorese quantifiziert. Werden bei diesen Verfahren chromosomenspezifische STR-Systeme eingesetzt, so lassen sich aus der Anzahl der erhalten unterschiedlichen PCR-Produkte Rückschlüsse auf die Kopienzahl des entsprechenden Chromosoms schließen. Werden beispielsweise bei der Reaktion mit einem chromosomenspezifischen STR-System bei der Kapillarelektrophorese drei Peaks erhalten, wobei die Peakhöhen untereinander 1:1:1 betragen, so enthält das untersuchte Individuum drei verschiedene Allele des entsprechenden Chromosoms (triallelische Trisomie). Werden hingegen bei dem Verfahren zwei Peaks erhalten, wobei das Verhältnis der Peaks untereinander 2:1 beträgt, so weist das untersuchte Individuum pro Zelle zwei gleiche Allele des Chromosoms sowie ein anderes Allel des Chromosoms (diallelische Trisomie) auf. Im Fall, dass nur zwei Peaks mit identischer Peakhöhe erhalten werden, weist das Individuum zwei Allele auf, so dass keine Trisomie vorliegt (heterozygoter Fall). Allerdings lässt dieses Verfahren in dem Fall, dass lediglich ein Peak erhalten wird, keine Aussage über die An- oder Abwesenheit einer Trisomie zu, da dieses Ergebnis sowohl im Fall einer monoallelischen Trisomie als auch im Fall einer monoallelischen Disomie erhalten wird. Ein auf dieser Technologie beruhendes Verfahren zum Nachweis von Trisomie 13 wird auch in der DE 101 02 687 A1 offenbart. Um auch zwischen einer monoallelischen Disomie und einer monoallelischen Trisomie unterscheiden zu können, wird bei diesem Verfahren vorgeschlagen, mit der PCR drei verschiedene, für das Chromosom 13 spezifische STR-DNA-Bereiche zu amplifizieren. Allerdings weist auch dieses Verfahren den Nachteil auf, dass fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt werden müssen. Zudem erfordert es den Einsatz einer Mindestmenge an DNA, da andernfalls der stochastische Fehler aufgrund der exponentiellen Amplifikation sehr groß wird und keine quantitative Aussage für die diallelische Trisomie mehr möglich ist. Ein weiterer Nachteil des vorgenannten Verfahrens liegt schließlich darin, dass dieses nur in einem engen PCR-Fenster mit einiger

Zuverlässigkeit funktioniert, da nur in diesem Fenster die Peakhöhen proportional zum Verhältnis des Ausgangsmaterials sind. Des weiteren weist auch dieses Verfahren den Nachteil auf, dass die absolute Fluoreszenzintensität bestimmt werden muss.

5

Alle vorgenannten Verfahren basieren auf dem Einsatz von fluoreszenzmarkierten Primern und erfordern teure Apparaturen zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität. Zudem erfordern diese den Einsatz einer Mindestmenge an Ausgangsmaterial um zumindest einigermaßen zuverlässige

10 Ergebnisse zu erhalten.

15

In der DE 10 2005 045 560 A1 ist es vorgeschlagen worden, zur quantitativen Bestimmung der Anzahl einer vorbestimmten Sequenz und ggf. von zu der vorbestimmten Sequenz homologen Sequenzen in einer biologischen Probe mit einer definierten Menge einer biologischen Probe wenigstens eine Amplifikationsreaktion, welche daran angepasst ist, mehrere zueinander nicht homologe Sequenzen, die von der vorbestimmten Sequenz umfasst sind, zu amplifizieren, durchzuführen, bevor die Anzahl der bei der wenigstens einen Amplifikationsreaktion erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte bestimmt wird und die so bestimmte

20 Anzahl mit wenigstens einer Häufigkeitsverteilung verglichen wird. Dabei wird die Häufigkeitsverteilung durch getrenntes, jeweils mehrmaliges Durchführen der gleichen und unter denselben Reaktionsbedingungen wie der für die zu untersuchenden biologischen Probe eingesetzten wenigstens

25 einen Amplifikationsreaktion mit wenigstens zwei verschiedenen Referenzproben, welche jeweils eine bekannte, voneinander verschiedene Kopienzahl der vorbestimmten Sequenz aufweisen, sowie anschließendes Bestimmen der pro Referenzprobe erhaltenen Anzahl an unterschiedlichen Amplifikationsprodukten erhalten. Dieses Verfahren liefert gute Ergebnis-

se, erfordert jedoch eine große Vielzahl an durchzuführenden PCR-Reaktionen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Anzahl einer oder mehrerer vorbestimmter Sequenzen in einer biologischen Probe bereitzustellen, welches einfach und kostengünstig durchführbar ist, welches auch und gerade bei einer geringen Anzahl an in der zu untersuchenden biologischen Probe vorhandenen vorbestimmten Sequenzen zuverlässige Ergebnisse liefert und welches insbesondere mit geringen Mengen an Ausgangsmaterial durchführbar ist.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Anzahl wenigstens einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe, insbesondere zur Bestimmung der absoluten Kopienzahl von Allelen pro Zelle, gelöst, welches die nachfolgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellung einer Nukleinsäure enthaltenden biologischen Probe,
- b) Fragmentierung der in der biologischen Probe enthaltenen Nukleinsäure,
- c) Aufteilen der in dem Schritt b) erhaltenen Probe in wenigstens zwei Teilmengen,
- d) Zugabe von jeweils wenigstens zwei Primerpaaren zu jeder der wenigstens zwei Teilmengen, wobei jeder der Teilmengen jeweils dieselben Primerpaare zugegeben werden, und wobei die einzelnen Primerpaare daran angepasst sind, in einer Amplifikationsreaktion jeweils unterschiedliche Teilsequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz zu amplifizieren,

- e) Durchführen einer Amplifikationsreaktion mit jeder der wenigstens zwei in dem Schritt d) erhaltenen Teilmengen,
- f) Bestimmen der Anzahl der mit den Amplifikationsreaktionen in dem Schritt e) für die einzelnen Teilmengen erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte und Bestimmen, mit wie vielen Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind.

Unter dem Begriff Fragmentierung wird im Sinne der vorliegenden Erfindung die Zerteilung von Nukleinsäuremolekülen in jeweils wenigstens zwei Nukleinsäuremoleküle verstanden. Die durch die Fragmentierung aus jedem Nukleinsäuremolekül entstehenden Nukleinsäurefragmente weisen demnach eine kürzere Moleküllänge auf als die Ausgangsmoleküle.

Ferner wird unter dem Begriff vorbestimmte Sequenz im Sinne der vorliegenden Erfindung jede beliebige Sequenz verstanden, welche von der in der biologischen Probe enthaltenen Nukleinsäure umfasst wird. Insbesondere kann es sich bei der vorbestimmten Sequenz um ein Chromosom, um ein Chromatid, um ein Gen oder um einen Genabschnitt handeln.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die in der in dem Schritt a) bereitgestellten Probe enthaltene Nukleinsäure zwischen dem Verfahrensschritt a) und dem Verfahrensschritt b) lysiert. Dies kann beispielsweise durch die Zugabe von Lysozym zu der Probe, durch die Erhitzung der Probe oder durch die Zugabe von denaturierenden Agentien, wie beispielsweise Harnstoff, Dithiothreitol (DTT) und dergleichen, zu der Probe erreicht werden.

Vorzugsweise werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die in der biologischen Probe enthaltenen Nukleinsäuremoleküle bei der Fragmentie-

rung in jeweils mindestens fünf Nukleinsäurefragmente fragmentiert, wobei die Fragmentierung beispielsweise durch Restriktionshydrolyse, durch Scherung, durch Ultraschall oder durch DNase-Verdau erfolgen kann. Die Verfahrensparameter bei der Fragmentierung, beispielsweise die Art des eingesetzten Restriktionsenzym oder die Frequenz und Dauer des Ultraschalls, können dabei so eingestellt werden, dass Fragmente mit einer gewünschten Länge erhalten werden.

Im Unterschied zu den Verfahren nach dem Stand der Technik wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht, wie beispielsweise bei der quantitativen PCR, QF-PCR, FISH und CGH, die absolute Fluoreszenzintensität von PCR-Produkten bestimmt sowie wie im Fall der FISH und CGH mit der Fluoreszenzintensität einer Kontroll- bzw. Referenzprobe verglichen, sondern es wird lediglich bestimmt, mit wie vielen Teilmengen jeweils die gleichen Amplifikationsprodukte erhalten worden sind. Insofern müssen in dem erfindungsgemäßen Verfahren keine fluoreszenzmarkierten Primer eingesetzt werden. Sofern diese zur Detektion der Anzahl an erhaltenen verschiedenen PCR-Produkten dennoch eingesetzt werden, muss nicht aufwendig die Fluoreszenzintensität der erhaltenen fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten bestimmt werden, sondern lediglich evaluiert werden, ob eine ggf. über einem definierten Schwellenwert liegende Fluoreszenz bei einer den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen entsprechenden Wellenlänge vorhanden ist oder nicht. Daher ist das erfindungsgemäße Verfahren ohne kostenaufwändige Apparaturen zur quantitativen Detektion von Fluoreszenz einfach und kostengünstig durchzuführen. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dessen schnelle und einfache Durchführbarkeit, weil bei diesem verglichen mit dem aus der DE 10 2005 045 560 A1 bekannten Quantifizierungsverfahren nur eine vergleichsweise geringe Anzahl an Amplifikationsreaktionen durchgeführt werden muss. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich sowohl für die Bestimmung

der relativen Anzahl wenigstens einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe als auch für die Bestimmung der absoluten Anzahl wenigstens einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe. Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden, um eine Trisomie in Rahmen einer *in vitro*-Fertilisation (IVF) oder im Rahmen der Analyse fetaler Zellen aus maternalem Blut zu bestimmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere auch zur quantitativen Bestimmung der Anzahl wenigstens einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe, welche nur eine geringe Menge an Nukleinsäure, beispielsweise nur wenige Zellen, enthält. Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren mit einer biologischen Probe durchgeführt, welche als Ausgangsmaterial nur eine Zelle, beispielsweise eine humane Zelle, wie beispielsweise einen Polkörper, eine tierische Zelle oder eine Pflanzenzelle enthält, bzw. mit einer in Suspension gehaltenen Einzelzelle.

Das Grundprinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht auf der Bestimmung der Kopienzahl einer vorbestimmten Nukleinsäuresequenz, wie beispielsweise der Kopienzahl eines Chromosoms, durch Fragmentierung der Nukleinsäure, Aufteilen der fragmentierten Probe in mehrere Teilmengen, Durchführen einer Multiplex-PCR mit jeder der Teilmengen, wobei in den mit den einzelnen Teilmengen durchgeführten Multiplex-PCR-Reaktionen jeweils die gleichen Primerpaare eingesetzt werden, bevor anschließend bestimmt wird, mit wie vielen Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind. Aus diesem Vergleich kann dann mit der geforderten Sicherheit die Kopienzahl der vorbestimmten Sequenz bestimmt werden. Dies sei an dem folgenden Gedankenexperiment erläutert.

Eine Zelle mag null, eine oder zwei Kopien einer vorbestimmten Sequenz, beispielsweise des Chromosoms 21, enthalten. Lysiert man die Zelle in der Zellsuspension und teilt die so erhaltene Probe in zwei Teilmengen auf, so wird sich das Chromosom 21 in dem Fall von Monosomie, d.h. wenn die

5 Zelle eine Kopie des Chromosoms 21 enthält, auf eine der beiden Teilmengen verteilen. Mithin enthält in diesem Fall nur eine der beiden Teilmengen das Chromosom 21. Hingegen können in dem Fall der Disomie, d.h. wenn die Zelle zwei Chromosome 21 enthält, alle beiden Teilmengen jeweils eine Kopie des Chromosoms 21 enthalten oder kann eine der Teil-

10 mengen kein Chromosom 21 enthalten und die andere Teilmenge zwei Kopien des Chromosoms 21 enthalten. Enthält die Probe keine Kopie des Chromosoms 21, wird sich dieses naturgemäß in keiner der beiden Teilmengen befinden.

15 Wird nun die zu bestimmende Sequenz, also das Chromosom 21, durch Fragmentierung in mehrere Teilsequenzen, beispielsweise durch Restriktionshydrolyse in 10 verschiedene Teilsequenzen zerlegt, beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass sich im Fall der Disomie zumindest ein Paar von gleichen Teilsequenzen auf beide Teilmengen verteilt, nahezu 100 %, wohin-

20 gegen im Fall der Monosomie wiederum jede Teilsequenz in maximal einer der beiden Teilmengen vorliegen kann. Im Fall der Nullisomie wird sich naturgemäß in keiner der beiden Teilmengen eine Teilsequenz des Chromosoms 21 befinden. Führt man nunmehr die Verfahrensschritte d) bis f) des erfindungsgemäßen Verfahrens durch, kann im Fall der Monosomie

25 jede Teilsequenz nur in einer der beiden Teilmengen nachgewiesen werden, wohingegen im Fall der Disomie zumindest einige der Teilsequenzen des Chromosoms 21 in beiden Teilmengen vorliegen und im Fall der Nullisomie in keiner der Teilmengen eine Teilsequenz des Chromosoms 21 vorliegt. Mithin kann durch die Aufteilung der fragmentierten Probe in

30 zwei Teilmengen und die anschließende Durchführung der Verfahrens-

schritte d) bis f), sofern während der Verfahrensschritte a) bis c) unter nicht denaturierenden Bedingungen gearbeitet wird, also die DNA während dieser Verfahrensschritte doppelsträngig vorliegt, bei einer hinreichend großen Zahl von während des Verfahrensschritts d) zugesetzten
5 Primerpaaren eindeutig entschieden werden, ob die Probe null, eine oder wenigstens zwei Kopien des Chromosoms 21 enthält. Durch eine Erhöhung der Anzahl an Teilmengen, in welche die fragmentierte Probe in dem Verfahrensschritt c) aufgeteilt wird, können auch die Fälle Nullisomie, Monosomie, Disomie, Trisomie etc. voneinander unterschieden werden,
10 und zwar auch in dem Fall, dass die DNA vor der Aufteilung in die Teilmengen denaturiert wird, also in Einzelstränge überführt wird.

Das vorstehende Gedankenexperiment ist für die Fälle Monosomie und Disomie in den Figuren 1 und 2 schematisch dargestellt.

15

In der Figur 1 wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine in der Figur 1 oben links durch einen Kreis symbolisierte Einzelzelle eingesetzt, welche eine Kopie der zu quantifizierender Sequenz, in diesem Fall des Chromosoms 21, enthält, welches durch den in dem Kreis enthaltenen
20 grauen Balken symbolisiert wird. Diese Einzelzelle wird in Suspension lysiert (nicht dargestellt), bevor der Suspension ein Restriktionsenzym zugesetzt wird, welches das in der Probe enthaltene Chromosom 21, wie oben in der Mitte und oben rechts in der Figur 1 dargestellt, in fünf definierte Teilsequenzen mit sich jeweils unterscheidender Länge fragmentiert. Anschließend wird die diese fünf Teilsequenzen enthaltende Probe,
25 wie in der Figur 1 unten links und mittig dargestellt, in zwei Teilproben aufgeteilt, wobei sich jede der fünf Teilsequenzen mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 50 % auf eine der beiden Teilmengen verteilt. In dem in der Figur 1 dargestellten Fall sind die beiden kurzen Teilsequenzen in der
30 Teilmenge 1 enthalten, während die drei längeren Teilsequenzen in der

Teilmenge 2 vorliegen. Den beiden Teilmengen werden anschließend jeweils 5 gleiche Primerpaare zugesetzt, von denen jedes der fünf Primerpaare für jeweils eine der zuvor durch die Fragmentierung erzeugten Teilsequenzen des Chromosoms 21 spezifisch ist. Dabei sind die 5 Primerpaare in dem in der Figur 1 dargestellten Fall so konzipiert, dass jedes der Primerpaare bei der nachfolgenden PCR ein unterschiedlich langes PCR-Produkt erzeugt. Dann wird mit den beiden Teilmengen sowie mit einer Kontrollprobe, welche ein Chromosom 21 enthält, jeweils eine PCR unter gleichen Bedingungen durchgeführt und anschließend wird jeweils eine Teilmenge aller drei PCR-Ansätze auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Wie dem in der Figur 1, unten rechts schematisch dargestellten Gel zu entnehmen ist, werden bei der Kontrollprobe (K) 5 verschiedene Banden erhalten, wobei für die Teilmenge 1 (1) lediglich 2 und für die Teilmenge 2 (2) lediglich 3 Banden erhalten werden, wobei keine der für die Teilmenge 1 erhaltenen Banden die gleich Länge wie die für die Teilmenge 2 erhaltenen Banden aufweist. Daraus kann mit hoher Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass in der Probe genau eine Kopie des Chromosoms 21 enthalten war. Durch eine Erhöhung der Anzahl an in den PCR-Reaktionen eingesetzten Primerpaaren von 5 auf beispielsweise 10 kann die statistische Sicherheit des erhaltenen Ergebnisses entsprechend erhöht werden.

In der Figur 2 wird das gleiche Verfahren für den Fall einer biologischen Probe, welche zwei Chromosomen 21 (Disomie) enthält, schematisch wiedergegeben. In diesem Fall werden bei der Fragmentierung jeweils zwei Kopien der fünf Teilsequenzen des Chromosoms 21 erhalten. Jede dieser Teilsequenzen wird sich mit einer 50 %-igen Wahrscheinlichkeit auf eine der beiden Teilmengen verteilen, so dass die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich die beiden Kopien einer Teilsequenz in einer Teilmenge befinden, 50 % beträgt und die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich jeweils eine der

beiden Kopien einer Teilsequenz in einer Teilmenge befindet, wohingegen die andere Kopie derselben Teilsequenz in der anderen Teilmenge vorliegt, ebenfalls 50 % beträgt. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zumindest für eine der fünf verschiedenen Teilsequenzen die beiden Kopien der Teilsequenz auf zwei unterschiedliche Teilmengen verteilen, liegt mithin bei
5 mehr als 95 %. In dem in der Figur 2 dargestellten Fall sind von den beiden Kopien von vier der Teilsequenzen jeweils eine Kopie in der Teilmenge 1 und jeweils eine Kopie in der Teilmenge 2 enthalten, wohingegen die beiden Kopien der fünften Teilsequenz ausschließlich in der Teilmenge 2
10 enthalten ist. Nach der Durchführung der PCR-Reaktionen ergibt sich demnach bei der gelelektrophoretischen Analyse, dass für die Teilmenge 1 (1) vier Banden erhalten werden, wohingegen für die Teilmenge 2 (2) und für die Kontrolle (K) fünf Banden erhalten werden. Mithin weisen die Teilmengen 1 und 2 jeweils vier gleiche PCR-Produkte auf, woraus sich ergibt,
15 dass die Probe wenigstens zwei Chromosomen 21 enthielt. Die Fälle Monosomie und Nullisomie können aufgrund des Ergebnisses jedoch ausgeschlossen werden. Durch eine Erhöhung der Anzahl von Teilmengen, in welche die biologische Probe in dem Verfahrensschritt c) aufgeteilt wird, könnte auch die absolute Kopienzahl des Chromosoms 21 in der Probe
20 bestimmt werden, also bestimmt werden, ob das Chromosom 21 in der Probe mit 2, 3, 4, 5 etc. Kopien vorliegt.

Grundsätzlich können die Verfahrensschritte a) bis c) des erfindungsgemäßen Verfahrens unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, so dass die vorbestimmte Sequenz, sofern diese doppelsträngige DNA ist, in Form von doppelsträngiger Nukleinsäure auf die
25 einzelnen Teilmengen verteilt wird. Alternativ dazu ist es jedoch auch möglich, die Nukleinsäure in der biologischen Probe vor der in dem Verfahrensschritt c) erfolgenden Aufteilung der fragmentierten Probe in wenigstens zwei Teilmengen zu denaturieren, um vorhandene doppelsträngi-
30

ge Nukleinsäure zu einzelsträngiger Nukleinsäure zu überführen, weil einzelsträngige Nukleinsäure gleichermaßen wie doppelsträngige Nukleinsäure zu einem positiven PCR-Ergebnis führen kann. Diese Denaturierung kann beispielsweise vor oder nach der Fragmentierung gemäß dem Verfahrensschritt b) durchgeführt werden. In diesem Fall liegen demnach in dem Verfahrensschritt c) doppelt so viele auf die Teilmengen zu verteilende Kopien der fragmentierten vorbestimmten Sequenz vor wie in der biologischen Ausgangsprobe, nämlich im Falle einer Disomie beispielsweise vier einzelsträngige Kopien der fragmentierten vorbestimmten Sequenz, wohingegen in der biologischen Ausgangsprobe zwei doppelsträngige Kopien der unfragmentierten vorbestimmten Sequenz vorlagen. Auch in dem Fall, dass die vorbestimmte Sequenz bereits in der Ausgangsprobe einzelsträngig vorliegt, beispielsweise als RNA, kann eine Denaturierung vor der Durchführung des Verfahrensschritts c) erfolgen, beispielsweise um vor der enzymatisch erfolgenden Fragmentierung Sekundärstrukturen der einzelsträngigen Nukleinsäuren aufzubrechen.

Bezüglich der Art der eingesetzten Primerpaare ist das erfindungsgemäße Verfahren nicht limitiert, so dass grundsätzlich sowohl spezifische als auch unspezifische Primerpaare eingesetzt werden können. Allerdings ist der Einsatz spezifischer Primerpaare bevorzugt, weil damit die Länge der PCR-Produkte gezielt eingestellt werden kann und sichergestellt wird, dass nur die genetischen Teilsequenzen amplifiziert werden.

In Weiterbildung des Erfindungsgedankens wird es vorgeschlagen, die wenigstens zwei in dem Verfahrensschritt d) zugegebenen Primerpaare daran anzupassen, in einer Amplifikationsreaktion jeweils verschiedene, nicht überlappende Teilsequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz zu amplifizieren.

- Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es vorgesehen, die Fragmentierung in dem Verfahrensschritt b) derart durchzuführen und/oder die in dem Verfahrensschritt d) zugegebenen Primerpaare derart auszuwählen, dass die durchschnittliche
- 5 Länge der in dem Verfahrensschritt b) erhaltenen Nukleinsäurefragmente größer ist als die Länge der mit den in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaaren amplifizierbaren Teilsequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz.
- 10 Sofern die Fragmentierung durch Restriktionshydrolyse erfolgt, wird das Restriktionsenzym bzw. werden die Restriktionsenzyme vorzugsweise so ausgewählt, dass diese nicht in den zu amplifizierenden Sequenzbereichen schneiden. Dies kann beispielsweise dadurch gewährleistet werden, dass
- 15 zunächst in der Nukleinsäure vergleichsweise selten schneidende Restriktionsenzyme ausgewählt werden und dann in Abhängigkeit von den konkreten Schnittstellen die Primer so ausgewählt werden, dass die Schnittstellen der Restriktionsenzyme nicht in den von den Primerbindungsstellen umfassten Bereichen liegen.
- 20 Ein wesentlicher Verfahrensschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, dass nach der Durchführung der Amplifikationsreaktionen mit den einzelnen Teilmengen bestimmt wird, mit wie vielen Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind, um daraus die Anzahl der vorbestimmten Sequenz in der biologischen Probe zu bestimmen.
- 25 Diese Bestimmung, mit wie vielen Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind, setzt naturgemäß voraus, dass die unterschiedlichen Amplifikationsprodukte voneinander unterschieden werden, also die Anzahl der pro Teilmenge erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte bestimmt wird. Dies wird vorzugsweise durch
- 30 Elektrophorese, beispielsweise durch Gelelektrophorese, wie Polyacrylamid-

gelelektrophorese oder Agarosegelelektrophorese, oder durch Kapillarelektrophorese, durchgeführt. Alternativ dazu ist auch eine fluorometrische Bestimmung der Amplifikationsprodukte möglich.

- 5 Um bei dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung den Arbeitsaufwand bei der Elektrophorese, insbesondere, wenn Polyacrylamid-gelelektrophorese oder Agarosegelelektrophorese eingesetzt wird, zu erleichtern und um die Dauer der Elektrophorese zu verringern, wird es in Weiterbildung des Erfindungsgedankens vorgeschlagen, die in dem Ver-
10 fahrensschritt d) zugegebenen Primerpaare so auszuwählen, dass sich alle der mit den einzelnen Primerpaaren amplifizierbaren unterschiedlichen Teilsequenzen in ihrer Länge um jeweils wenigstens 10 Basenpaare, bevorzugt um wenigstens 25 Basenpaare, besonders bevorzugt um wenigstens 50 Basenpaare und ganz besonders bevorzugt um wenigstens 100
15 Basenpaare unterscheiden. Auf diese Weise werden keine besonderen Anforderungen an die Trennleistung bei der Gelelektrophorese gestellt.

- Um die Zuverlässigkeit des Ergebnisses des erfindungsgemäßen Verfahrens zu erhöhen, ist es gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungs-
20 form der vorliegenden Erfindung vorgesehen, ferner einen Verfahrensschritt g₁) durchzuführen, welcher das Vergleichen der in dem Verfahrensschritt f) für jede Teilmenge bestimmten Amplifikationsprodukte mit den mit wenigstens einer Kontrollprobe bei einer Amplifikationsreaktion erhaltenen Amplifikationsprodukten, wobei die mit der wenigstens einen
25 Kontrollprobe durchgeführte Amplifikationsreaktion mit denselben Primerpaaren wie in dem Schritt d) durchgeführt wird und die Kontrollprobe vorzugsweise eine bekannte Anzahl der vorbestimmten Sequenz enthält, umfasst. Auf diese Weise können anhand des Vergleichs des mit der Kontrollprobe erhaltenen Bandenmusters mit dem für die Kontrollprobe er-
30 warteten Bandenmusters etwaige Fehler bei der Durchführung der Ampli-

fikationsreaktion, wie beispielsweise ein temporärer Ausfall des Thermocyclers während der Amplifikationsreaktion, erkannt werden. So kann beispielsweise der Fall Nullisomie, bei dem für die mit den fragmentierten Teilmengen der Probe durchgeführten Amplifikationsreaktionen keine
5 Banden erwartet werden, validiert werden, weil in dem Fall, dass für die Kontrollprobe die erwarteten Banden erhalten werden, ein Fehler bei der Durchführung der Amplifikationsreaktion ausgeschlossen werden kann.

Aus diesem Grund wird die Amplifikationsreaktion mit der wenigstens
10 einen Kontrollprobe vorzugsweise parallel zu dem Schritt e) durchgeführt.

Alternativ zu der vorgenannten Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren anstelle des Verfahrensschritt g₁) auch den zusätzlichen Verfahrensschritt g₂) umfassen, welcher ein Vergleichen der in dem Schritt
15 f) für jede Teilmenge bestimmten Amplifikationsprodukte mit einem Datensatz umfasst, wobei der Datensatz Informationen zu den mit wenigstens einer Kontrollprobe bei einer Amplifikationsreaktion unter Einsatz der in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaaren erhältlichen unterschiedlichen Amplifikationsprodukten umfasst.

20

Grundsätzlich gilt, dass die statistische Sicherheit des mit dem erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltenen Ergebnisses umso größer ist, desto mehr Primerpaare in der Amplifikationsreaktion, vorzugsweise einer Multiplex-PCR, eingesetzt werden. Allerdings steigt mit zunehmender Anzahl
25 der eingesetzten Primerpaare der experimentelle Aufwand. Als Kompromiss zwischen diesen beiden gegenläufigen Tendenzen ist es bevorzugt, in dem Verfahrensschritt d) jeder der Teilmengen, pro zu bestimmender vorbestimmter Sequenz, jeweils 2 bis 50, bevorzugt 5 bis 25, besonders bevorzugt 8 bis 15, ganz besonders bevorzugt 10 bis 15 und höchst bevor-
30 zugt 12 Primerpaare zugegeben.

Auch für die Anzahl der in dem Verfahrensschritt c) erstellten Teilmengen gilt, dass, insbesondere für größere Kopienzahlen, die statistische Sicherheit des mit dem erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltenen Ergebnisses umso größer ist, in desto mehr Teilmengen die fragmentierte Probe in dem Verfahrensschritt c) aufgeteilt wird, wohingegen der experimentelle Aufwand mit zunehmender Anzahl an in dem Verfahrensschritt c) erstellten Teilmengen zunimmt. Als Kompromiss zwischen diesen beiden gegenläufigen Tendenzen ist es bevorzugt, die fragmentierte Probe in dem Verfahrensschritt c) in wenigstens 3 Teilmengen, vorzugsweise in wenigstens 4 Teilmengen und besonders bevorzugt in 5 bis 20 Teilmengen aufzuteilen. Vorzugsweise wird die in dem Verfahrensschritt b) erhaltene Probe in dem Verfahrensschritt c) so aufgeteilt, dass die hergestellten wenigstens zwei Teilmengen das gleiche Volumen aufweisen. Abgesehen davon, dass dies die Durchführung des Verfahrensschritt c) erleichtert, erleichtert dies auch spätere Berechnungen des Ergebnisses.

Um den apparativen und manuellen Aufwand möglichst gering zu halten, wird es in Weiterbildung des Erfindungsgedankens vorgeschlagen, die Amplifikationsreaktionen in dem Verfahrensschritt e) für alle Teilmengen parallel auf einem beispielsweise aus Glas bestehenden Substrat durchzuführen, wobei die einzelnen Teilmengen oder Teilproben dieser Teilmengen auf jeweils einer Reaktionsstelle des Substrats positioniert werden. Um eine feste Haftung der einzelnen Teilmengen bzw. Teilproben auf dem Substrat, insbesondere auch nach dem Überschichten mit dem nachfolgenden Öltropfen, zu gewährleisten, ist es gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung vorgesehen, dass jede der Reaktionsstellen auf dem Substrat einen zentralen hydrophilen Bereich umfasst, der außenseitig von einem ersten hydrophoben Bereich umgeben ist, der wiederum außenseitig von einem mittleren hydrophilen

Bereich umgeben ist, der außenseitig von einem zweiten hydrophoben Bereich umgeben ist.

5 Gute Ergebnisse werden bei dieser Ausführungsform insbesondere dann erhalten, wenn der zentrale hydrophile Bereich zumindest im Wesentlichen kreisrund ist und dieser außenseitig von einem zumindest im Wesentlichen kreisringförmig ausgebildeten ersten hydrophoben Bereich konzentrisch umgeben ist, der wiederum außenseitig von einem zumindest im Wesentlichen kreisringförmig ausgestalteten mittleren hydrophilen
10 Bereich konzentrisch umgeben ist, der außenseitig von dem zweiten hydrophoben Bereich umgeben ist.

Selbstverständlich müssen den Teilmengen der fragmentierten Probe vor der Durchführung der Amplifikationsreaktionen gemäß dem Verfahrensschritt e) die notwendige DNA-Polymerase und ggf. wenigstens eine aus
15 der aus pH-Puffersubstanzen, Salzen, Wasser und weiteren üblichen PCR-Zusatzstoffen bestehenden Gruppe ausgewählte Verbindung zur Einstellung von für die Durchführung der PCR geeigneten Bedingungen zugegeben werden.

20

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Kopienzahl einer in der biologischen Probe enthaltenen vorbestimmten Sequenz oder vorzugsweise die Kopienzahl mehrerer in der biologischen Probe enthaltenen vorbestimmten Sequenzen bestimmt werden. Vorzugsweise handelt es sich bei
25 der bzw. den vorbestimmten Sequenzen um Chromosomen, so dass mit dem erfindungsgemäßen Verfahren insbesondere die Kopienzahl von in der biologischen Proben vorliegenden 1 bis 23, besonders bevorzugt von 1 bis 10 und ganz besonders bevorzugt von 1 bis 5 Chromosomen bestimmt werden kann.

30

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das zuvor beschriebene erfindungsgemäße Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Anzahl n von x vorbestimmten Sequenz(en) in einer biologischen Probe die nachfolgenden Verfahrensschritte:

5 te:

- a) Bereitstellung einer DNA enthaltenden biologischen Probe,
- b) Fragmentierung der in der biologischen Probe enthaltenen DNA,
- c) Aufteilen der in dem Schritt b) erhaltenen Probe in y Teilmengen,
- 10 d) Zugabe von jeweils z Primerpaaren zu jeder der y Teilmengen, wobei jeder der Teilmengen jeweils dieselben Primerpaare zugegeben werden, und wobei die einzelnen Primerpaare daran angepasst sind, in einer PCR jeweils unterschiedliche Teilsequenzen der x vorbestimmten Sequenz(en) zu amplifizieren,
- 15 e) Durchführen einer PCR mit jeder der y in dem Schritt d) erhaltenen Teilmengen,
- f) Bestimmen der Anzahl der mit den PCR-Reaktionen in dem Schritt e) für die einzelnen Teilmengen erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte und Bestimmen, mit wie vielen der z Teilmengen
20 jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind.

Vorzugsweise ist x eine ganze Zahl zwischen 1 und 23, ist y eine ganze Zahl von größer gleich 4, bevorzugt von 5 bis 20, und ist z eine ganze Zahl, welche größer gleich $3 \cdot x$, vorzugsweise $5 \cdot x$ bis $25 \cdot x$ und besonders bevorzugt $8 \cdot x$ bis $15 \cdot x$ ist.

Wie insbesondere in dem vorstehenden Gedankenexperiment detailliert dargelegt, kann aus der Anzahl, mit wie vielen der z Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind, die Anzahl n der
30 vorbestimmten Sequenz(en) bestimmt werden. Für den einfachen Fall von

vier Teilmengen ($y=4$) und 8 eingesetzten Primerpaaren ($z=8$) bedeutet beispielsweise, wenn vor dem Verfahrensschritt c) keine Denaturierung der DNA in Einzelstrang-DNA vorgenommen wurde, das Ergebnis, dass mit keiner der Teilmengen gleiche Amplifikationsprodukte erhalten wurden, sondern die einzelnen Amplifikationsprodukte jeweils in nur einer
5 Teilmenge vorkommen, dass die Kopienzahl der vorbestimmten Sequenz in der biologischen Probe 1 (Monosomie) beträgt. Hingegen beträgt die Kopienzahl 0 (Nullisomie), wenn mit keiner der Teilmengen überhaupt ein Amplifikationsprodukt erhalten worden ist. Werden hingegen für wenigstens
10 zwei Teilmengen gleiche Amplifikationsprodukte erhalten, beträgt die Kopienzahl mindestens zwei und so weiter.

Vorzugsweise wird die Anzahl der in dem Verfahrensschritt e) eingesetzten Primerpaare so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit für ein falsch negatives Ergebnis bei maximal 5 % liegt. Dies kann beispielsweise durch den
15 nachfolgend wiedergegebenen statistischen Ansatz gewährleistet werden:

Mittels der nachfolgend beschriebenen Methode soll beispielsweise die Aussage ermöglicht werden, wie viele Kopien eines bestimmten Chromosoms in einer Probe vorhanden sind.
20

Die Wahrscheinlichkeit der richtigen Bestimmung der Kopienzahl hängt hierbei vor allen von folgenden Parametern ab:

- 25
- k = tatsächlich vorhandene Kopien
 - N = Anzahl der Teilreaktionen
 - (Multiplexgrad = Anzahl der untersuchten verschieden langen Banden pro Teilreaktion)
 - (Anzahl der untersuchten Zellen).

Folgende statistische Überlegungen verdeutlichen die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer korrekten Kopienzahl-Bestimmung:

- 1) Bestimmung aller möglichen Kombinationen bei der Aufteilung der vorhandenen Sequenzkopien auf die Teilreaktionen:

$$\text{Kombinationen mit Wiederholung } A_{\text{erwünscht}} = (N + k - 1)! / (N - 1)! * k!$$

Prinzipiell gelten hierbei folgende Voraussetzungen:

10

- a) Alle Elemente (= Teilreaktion, z.B. 1 bis 8) unterscheiden sich voneinander.
- b) Es werden einige Elemente ausgewählt (eine Teilreaktion mit Sequenzkopie gilt als "ausgewählt").
- c) Ein Element kann mehrmals ausgewählt werden (d.h. es können bei der anfänglichen Verteilung mehrere Sequenzkopien einer bestimmten Teilreaktion zugeteilt werden).

15

- 2) Bestimmung der möglichen Kombinationen bei der Aufteilung der vorhandenen Sequenzkopien auf die Teilreaktionen, bei denen jeweils nur eine Kopie pro Teilreaktion vorliegt:

20

$$\text{Kombinationen mit Wiederholung } A_{\text{gesamt}} = N! / (N - k)! * k!$$

- Prinzipiell gelten hierbei folgende Voraussetzungen:

25

- a) und b) wie oben.
- c) Ein Element darf nicht mehrmals ausgewählt werden (d.h. bei der anfänglichen Verteilung der Sequenzkopien wird nur maximal eine Sequenz einer Teilreaktion zugeteilt).

30

Setzt man nun die "erwünschten" Ereignisse (2) ins Verhältnis zu allen möglichen Ereignissen (1) erhält man den Anteil der "erwünschten" Ereignisse und damit die Erfolgswahrscheinlichkeit einer richtigen Aussage der Methode bei Verwendung der entsprechenden Parameter.

$$\text{Wahrscheinlichkeit } P(\text{richtige Aussage}) = A_{\text{erwünscht}}/A_{\text{gesamt}} = (N - 1)! * N! / (N + k - 1)! * (N - k)!$$

10 Beispiel:

- k = 4
- N = 8
- Multiplexgrad = Anzahl der untersuchten verschieden langen Banden pro Teilreaktion).

15

Wahrscheinlichkeit für den erfolgreichen Nachweis aller 4 vorhandenen Sequenzkopien

$$= A_{\text{erwünscht}}/A_{\text{gesamt}} = ((8 - 1)! * 8!) / ((8 + 4 - 1)! * (8 - 4)!) = (7! * 8!) / (11! * 4!) = 0,2121.$$

20

Die Wahrscheinlichkeit, eine unrichtige Aussage zu treffen, liegt damit bei $1 - 0,2121 = 0,7878$. Dies gilt, wenn nur ein PCR-Produkt pro Teilmenge analysiert wird.

25

Wenn man allerdings mehrere PCR-Produkte pro Teilmenge analysiert (Multiplex – PCR), erhält man die Gesamtwahrscheinlichkeit durch Multiplikation der Einzelwahrscheinlichkeiten. Also z.B. für eine 3-Plex:

$$P(\text{Nachweis aller Banden}) = 0,7878 * 0,7878 * 0,7878.$$

30

Man kommt zu folgender Tabelle, abhängig vom Multiplex-Grad.

Multiplex-Grad	1	2	3	4	5	6
P(richtiges Ergebnis)	0,787	0,620	0,489	0,385	0,303	0,239

Multiplex-Grad	7	8	9	10	11	12	13
P(richtiges Ergebnis)	0,188	0,148	0,116	0,092	0,072	0,057	0,045

Bei einem Multiplex-Grad von 13 erreicht man hier also eine Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger gleich 5 %.

Da aber z.B. beim Nachweis von Chromosomen nach deren Denaturierung immer $2n$ Einzelstränge vorliegen, kann man bei der statistischen Aussage folgendermaßen vorgehen:

10

$P(\text{Erfolgreicher Nachweis von } n \text{ Chromosomen}) = P(\text{erfolgreicher Nachweis von genau } 2n \text{ Chromatiden}) + P(\text{erfolgreicher Nachweis von genau } (2n - 1) \text{ Chromatiden})$. So kann man aus dem Nachweis von 1 oder 2 Amplifikaten auf die Anwesenheit von einem Chromosom (= 2 Chromatiden) rück-

15 schließen, aus dem Nachweis von 3 oder 4 Amplifikaten auf die Anwesenheit von 2 Chromosomen (= 4 Chromatiden), aus dem Nachweis von 5 oder 6 Amplifikaten auf die Anwesenheit von 3 Chromosomen (= 6 Chromatiden) schließen usw.

20 $P(\text{Nachweis von genau } 2n \text{ Chromatiden}) + P(\text{Nachweis von genau } (2n - 1) \text{ Chromatiden}) =$

$$= (N - 1)! * N! / (N + k - 1)! * (N - k)! + (N! / k_0! * k_1! * k_2! * \dots * k_n!) / ((N + k - 1)! / (N - 1)! * k!)$$

wobei gilt:

- K_0 = Anzahl der Reaktionsgefäße, in denen keine Sequenzkopie vorliegt,
 5 K_1 = Anzahl der Reaktionsgefäße, in denen genau 1 Sequenzkopie vorliegt,
 K_2 = Anzahl der Reaktionsgefäße, in denen genau 2 Sequenzkopien vorliegen etc.

- 10 Im Falle des Nachweises von $2n-1$ Chromatiden liegen in einer der Teilreaktionen 2 Sequenzkopien vor und in allen anderen, wenn überhaupt, nur 1 Sequenzkopie: somit gilt hier:

$$K_0 = N - k + 1$$

$$K_1 = k - 2$$

$$K_2 = 1$$

- 15 $K_3, \dots, k_n = 0$

Also lautet die Formel:

20 $P(\text{Nachweis von genau } 2n \text{ Chromatiden}) + P(\text{Nachweis von genau } (2n - 1) \text{ Chromatiden}) =$

$$= ((N - 1)! * N!) / ((N + k - 1)! * (N - k)!) + (N! / (N - k + 1)! * (k - 2)!) / ((N + k - 1)! / (N - 1)! * k!)$$

Beispiel:

- 25 - $k = 4$
 - $N = 8$

Wahrscheinlichkeit für den erfolgreichen Nachweis aller 4 vorhandenen Sequenzkopien

$$= ((8 - 1)! * 8!) / ((8 + 4 - 1)! * (8 - 4)!) + (8! / (8-4+1)! * (4-2)!) / ((8+4 - 1)! / (8-1)! * 4!) = 0,212 + 0,509 = 0,721$$

Die Wahrscheinlichkeit, eine unrichtige Aussage zu treffen liegt, damit bei
 5 $1 - 0,721 = 0,278$. Dies gilt, wenn nur ein PCR Produkt pro Teilmenge analysiert wird.

Wenn mal allerdings mehrere PCR-Produkte pro Teilmenge analysiert
 (Multiplex – PCR), erhält man die Gesamtwahrscheinlichkeit durch Multi-
 10 plikation der Einzelwahrscheinlichkeiten. Also z.B. für eine 3-Plex:
 $P(\text{Nachweis aller Banden}) = 0,278 * 0,278 * 0,278 = 0,021$.

Man kommt, abhängig von dem Multiplex-Grad, zu folgender Tabelle.

Multiplex-Grad	1	2	3	4	5	6
P(richtiges Ergebnis)	0,278	0,077	0,021	0,006	0,001	0,0004

15

Hier erreicht man bereits bei einem Multiplex-Grad 3 eine Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger gleich 5 %.

Eine mögliche Auswertevariante der erzielten Amplifikationen wäre z.B.
 20 der Nachweis mittels Fluoreszenzfarbstoffen, wobei für jedes Fragment unterschiedlicher Größe jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff gewählt wird. Da hier nur interessant ist, ob Produkte amplifiziert wurden, die Menge an Produkt dagegen nicht interessiert, könnte so einfach mit einer Endpunktbestimmung die Fluoreszenz der einzelnen Wellenlängen gemessen
 25 werden, ohne dass ein Gel benutzt werden muss.

Mithin eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zur quantitativen Bestimmung der Anzahl n wenigstens einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe, wenn die Anzahl n pro vorbestimmter Sequenz in der biologischen Probe 0 bis 100, vorzugsweise 0 bis 10, besonders bevorzugt 0 bis 5 und ganz besonders bevorzugt 0, 1, 2, 3 oder 4 beträgt.

Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Verfahren mit Vorteil im Rahmen einer *in vitro*-Fertilisation (IVF) oder im Rahmen der Analyse fetaler Zellen aus maternalem Blut durchgeführt werden.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung anhand eines beispielhaften, die vorliegende Erfindung jedoch nicht beschränkenden Beispiels näher erläutert.

Beispiel

Mit zwei, jeweils Zellen enthaltenden biologischen Proben in Form einer Suspension wurde getrennt voneinander das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt, um die in den beiden Proben vorliegende Kopienzahl des Chromosoms 21 zu bestimmen. Während die erste Probe zwei Zellen enthielt, enthielt die zweite Probe lediglich eine Zelle.

Hierzu wurden die beiden Proben jeweils lysiert und mit einer Mischung aus den Restriktionsenzymen Xho I, Sac I und PacI bei 37 °C für 5 Minuten hydrolysiert (Cek-Kit, Advalytix Products bzw. Olympus Life Science Research Europa GmbH). Anschließend wurden die erhaltenen fragmentierten Proben jeweils in vier Teilmengen gleicher Volumina aufgeteilt, wonach jeder der erhaltenen Teilmengen 7 Primerpaare zugegeben wurde. Alle sieben Primerpaare waren für jeweils unterschiedliche Teilsequenzen

bzw. Subsequenzen des Chromosoms 21 spezifisch, wobei alle sieben Primerpaare so ausgewählt wurden, dass jedes Primerpaar ein unterschiedlich langes PCR-Produkt ergibt. Diese Probenansätze wurden auf jeweils eine Reaktionsstelle eines Glassubstrats pipettiert.

5

Dann wurde zu jeder Probe jeweils 1 µl einer PCR-Mischung, welche 0,5 µm 2x Multiplex PCR Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden), 0,005 µl Bromphenolblau (0,1 %), 0,06 µl 5x Q-Solution (Qiagen GmbH, Hilden) und 0,39 µl Wasser enthielt, zugegeben. Abschließend wurden die einzelnen Reaktionsansätze mit 5 µl Sealing Solution (Advalytix AG, München) bedeckt und mit dem nachfolgenden Temperaturprofil einer PCR unterzogen:

10

- 10 Minuten bei 94 °C,
- 35 Zyklen mit
 - 94 °C für 30 Sekunden,
 - 63 °C für 60 Sekunden und
 - 72 °C für 60 Sekunden, sowie
- 10 Minuten bei 72 °C.

15

20

Anschließend wurde jeweils eine Teilmenge jeder der 8 PCR-Produkte in eine Tasche eines Polyacrylamidgels pipetiert, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Silberfärbung detektiert.

25

Eine Photographie des Polyacrylamidgels ist in der Figur 3 wiedergegeben. In der Figur 3 bezeichnen die Zahlen 1 bis 4 die Spuren für die einzelnen Teilmengen der PCR-Reaktionen jeweils für die beiden eingesetzten Proben, während in der linken unbeschrifteten Spur ein Längenmarker aufgetragen wurde. Das Ergebnis ist in den beiden in der Figur 3 rechts neben der Photographie wiedergegebenen Tabellen zusammengefasst. Die erste

30

Zeile der Tabellen gibt die einzelnen Spuren des Gels wieder, also die den Teilmengen 1 bis 4 entsprechenden Spuren 1 bis 4 für die erste Probe und die den Teilmengen 1 bis 4 entsprechenden Spuren 1 bis 4 für die zweite Probe. Darunter ist in jeder Spalte die Anzahl der Banden für die sieben
5 möglichen PCR-Produkte angegeben, welche für jede einzelne Teilmenge erhalten worden sind, also "0" oder "1".

Wie sich der Figur 3 entnehmen lässt, wurden für die erste Probe, deren PCR-Produkte für die einzelnen Teilmengen in den linken vier Spuren des
10 Polyacrylamidgels aufgetragen wurden, maximal in drei der vier Teilmengen gleiche PCR-Produkte erhalten, wohingegen für die zweite Probe, deren PCR-Produkte für die einzelnen Teilmengen in den rechten vier Spuren des Polyacrylamidgels aufgetragen wurden, maximal in zwei der vier Teilmengen gleiche PCR-Produkte erhalten worden sind.

15

Daraus ergibt sich, dass die erste Probe wenigstens drei Kopien des Chromosoms 21 enthielt, wohingegen die zweite Probe wenigstens zwei Kopien des Chromosoms 21 enthielt.

20

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Anzahl wenigstens
5 einer vorbestimmten Sequenz in einer biologischen Probe, insbesondere zur Bestimmung der absoluten Kopienzahl von Allelen pro Zelle, umfassend die Schritte:
 - a) Bereitstellung einer Nukleinsäure enthaltenden biologischen
10 Probe,
 - b) Fragmentierung der in der biologischen Probe enthaltenen Nukleinsäure,
 - c) Aufteilen der in dem Schritt b) erhaltenen Probe in wenigstens zwei Teilmengen,
 - 15 d) Zugabe von jeweils wenigstens zwei Primerpaaren zu jeder der wenigstens zwei Teilmengen, wobei jeder der Teilmengen jeweils dieselben Primerpaare zugegeben werden, und wobei die einzelnen Primerpaare daran angepasst sind, in einer Amplifikationsreaktion jeweils unterschiedliche Teilsequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz zu amplifizieren,
20
 - e) Durchführen einer Amplifikationsreaktion mit jeder der wenigstens zwei in dem Schritt d) erhaltenen Teilmengen,
 - f) Bestimmen der Anzahl der mit den Amplifikationsreaktionen
25 in dem Schritt e) für die einzelnen Teilmengen erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte und Bestimmen, mit wie vielen Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind.
- 30 2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine vorbestimmte Sequenz ein Chromosom, ein Chromatid, ein Gen oder ein Genabschnitt ist.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe eine Einzelzelle oder eine in Suspension gehaltene Einzelzelle ist, wobei die Einzelzelle vorzugsweise eine humane Zelle, eine tierische Zelle oder eine Pflanzenzelle, besonders bevorzugt ein Polkörper, ist.
- 10
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmentierung der in der biologischen Probe enthaltenen Nukleinsäure in dem Schritt b) durch Restriktionshydrolyse, durch Scherung, durch Ultraschall oder durch DNase-Verdau durchgeführt wird.
- 15
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure doppelsträngige DNA ist und diese nach dem Schritt a) und vor dem Schritt c) zu Einzelsträngen denaturiert wird.
- 20
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaare jeweils für Teilssequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz spezifische Primerpaare sind.
- 25
- 30 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens 2 in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaare daran angepasst sind, in einer Amplifikationsreaktion jeweils verschiedene, nicht überlappende Teilsequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz zu amplifizieren.

5

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fragmentierung in dem Schritt b) derart durchgeführt wird und/oder die in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaare derart ausgewählt werden, dass die durchschnittliche Länge der in dem Schritt b) erhaltenen Nukleinsäurefragmente größer ist als die Länge der mit den in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaaren amplifizierbaren Teilsequenzen der wenigstens einen vorbestimmten Sequenz.

10

15

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaare so ausgewählt werden, dass sich alle der mit den einzelnen Primerpaaren amplifizierbaren unterschiedlichen Teilsequenzen in ihrer Länge um jeweils wenigstens 10 Basenpaare, bevorzugt um wenigstens 25 Basenpaare, besonders bevorzugt um wenigstens 50 Basenpaare und ganz besonders bevorzugt um wenigstens 100 Basenpaare unterscheiden.

25

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in dem Schritt f) bestimmte Anzahl der für die einzelnen Teilmengen erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte und/oder die Bestimmung, mit wie vielen Teilmengen jeweils gleiche

30

Amplifikationsprodukte erhalten worden sind, durch Gelelektrophorese oder durch Kapillarelektrophorese erfolgt.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, dass
dieses ferner den Schritt g₁) Vergleichen der in dem Schritt f) für
jede Teilmenge bestimmten Amplifikationsprodukte mit den mit we-
nigstens einer Kontrollprobe bei einer Amplifikationsreaktion erhal-
10 tenen Amplifikationsprodukten, wobei die mit der wenigstens einen
Kontrollprobe durchgeführte Amplifikationsreaktion mit denselben
Primerpaaren wie in dem Schritt d) durchgeführt wird, umfasst.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
15 die Amplifikationsreaktion mit der wenigstens einen Kontrollprobe
parallel zu dem Schritt e) durchgeführt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass
20 dieses ferner den Schritt g₂) Vergleichen der in dem Schritt f) für
jede Teilmenge bestimmten Amplifikationsprodukte mit einem Da-
tensatz umfasst, wobei der Datensatz Informationen zu den mit we-
nigstens einer Kontrollprobe bei einer Amplifikationsreaktion unter
Einsatz der in dem Schritt d) zugegebenen Primerpaaren erhältli-
25 chen unterschiedlichen Amplifikationsprodukten umfasst.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
in dem Schritt d) jeder der Teilmengen, pro zu bestimmender vorbe-
30 stimmter Sequenz, jeweils 2 bis 50, bevorzugt 5 bis 25, besonders

bevorzugt 8 bis 15, ganz besonders bevorzugt 10 bis 15 und höchst bevorzugt 12 Primerpaare zugegeben werden.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, dass
die in dem Schritt b) erhaltene Probe in dem Schritt c) in wenigstens
3 Teilmengen, vorzugsweise in wenigstens 4 Teilmengen und beson-
ders bevorzugt in 5 bis 20 Teilmengen aufgeteilt wird.
- 10 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Amplifikationsreaktionen in dem Schritt e) für alle Teilmengen
parallel auf einem Substrat aus beispielsweise Glas durchgeführt
werden, wobei die einzelnen Teilmengen oder Teilproben dieser
15 Teilmengen auf jeweils einer Reaktionsstelle des Substrats positio-
niert werden.
17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet, dass
20 jede der Reaktionsstellen auf dem Substrat einen zentralen
hydrophilen Bereich umfasst, der außenseitig von einem ersten
hydrophoben Bereich umgeben ist, der wiederum außenseitig von
einem mittleren hydrophilen Bereich umgeben ist, der außenseitig
von einem zweiten hydrophoben Bereich umgeben ist.
25
18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet, dass
der zentrale hydrophile Bereich zumindest im Wesentlichen kreis-
rund ist, welcher außenseitig von einem zumindest im Wesentlichen
30 kreisringförmig ausgebildeten ersten hydrophoben Bereich konzen-

trisch umgeben ist, der wiederum außenseitig von einem zumindest im Wesentlichen kreisringförmig ausgestalteten mittleren hydrophilen Bereich konzentrisch umgeben ist, der außenseitig von dem zweiten hydrophoben Bereich umgeben ist.

5

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in der biologischen Proben vorliegende Kopienzahl von 1 bis 23, bevorzugt von 1 bis 10 und besonders bevorzugt von 1 bis 5 Chromosomen bestimmt wird.

10

20. Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Anzahl n von x vorbestimmten Sequenz(en) in einer biologischen Probe nach einem der vorhergehenden Ansprüche umfassend die Schritte:

15

- a) Bereitstellung einer DNA enthaltenden biologischen Probe,
- b) Fragmentierung der in der biologischen Probe enthaltenen DNA,
- c) Aufteilen der in dem Schritt b) erhaltenen Probe in y Teilmengen,
- d) Zugabe von jeweils z Primerpaaren zu jeder der y Teilmengen, wobei jeder der Teilmengen jeweils dieselben Primerpaare zugegeben werden, und wobei die einzelnen Primerpaare daran angepasst sind, in einer PCR jeweils unterschiedliche Teilsequenzen der x vorbestimmten Sequenz(en) zu amplifizieren,
- e) Durchführen einer PCR mit jeder der y in dem Schritt d) erhaltenen Teilmengen,
- f) Bestimmen der Anzahl der mit den PCR-Reaktionen in dem Schritt e) für die einzelnen Teilmengen erhaltenen unter-

20

25

30

schiedlichen Amplifikationsprodukte und Bestimmen, mit wie vielen der z Teilmengen jeweils gleiche Amplifikationsprodukte erhalten worden sind.

- 5 21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet, dass
 x eine ganze Zahl zwischen 1 und 23 ist,
 y eine ganze Zahl von größer gleich 4, bevorzugt von 5 bis 20, ist
und
10 z eine ganze Zahl ist, welche größer gleich $3 \cdot x$, vorzugsweise $5 \cdot x$
bis $25 \cdot x$ und besonders bevorzugt $8 \cdot x$ bis $15 \cdot x$ ist.
22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet, dass
15 aus der Anzahl, mit wie vielen der z Teilmengen jeweils gleiche
Amplifikationsprodukte erhalten worden sind, die Anzahl n der vor-
bestimmten Sequenz(en) bestimmt wird.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
20 dadurch gekennzeichnet, dass
die zu bestimmende Anzahl n pro vorbestimmter Sequenzen in der
biologischen Probe 0 bis 100, vorzugsweise 0 bis 10, besonders be-
vorzugt 0 bis 5 und ganz besonders bevorzugt 0, 1, 2, 3 oder 4 be-
trägt.
- 25 24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
dieses im Rahmen einer *in vitro*-Fertilisation (IVF) oder im Rahmen
der Analyse fetaler Zellen aus maternalem Blut durchgeführt wird.

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die in der in dem Schritt a) bereitgestellten Probe enthaltene Nuk-
leinsäure zwischen dem Verfahrensschritt a) und dem Verfahrenss-
schritt b) lysiert wird.
- 5

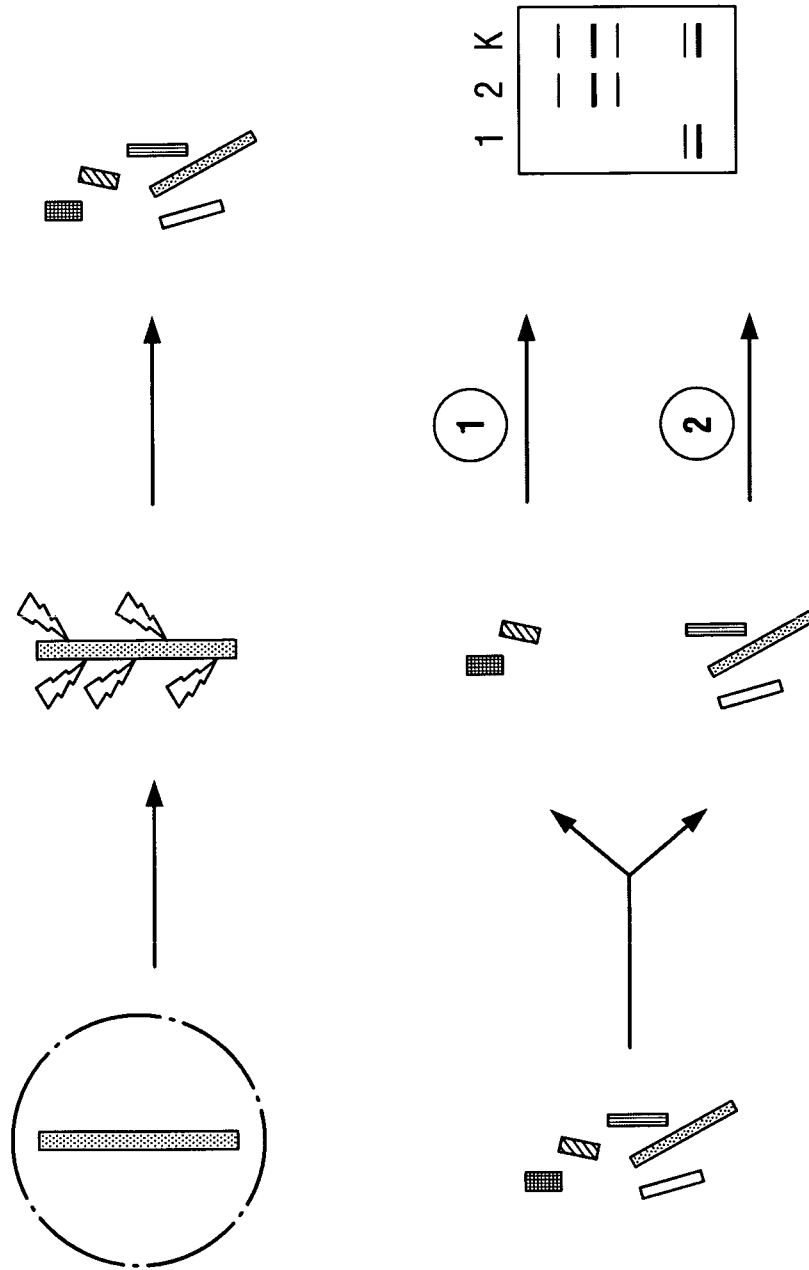


Fig. 1

Fig. 2

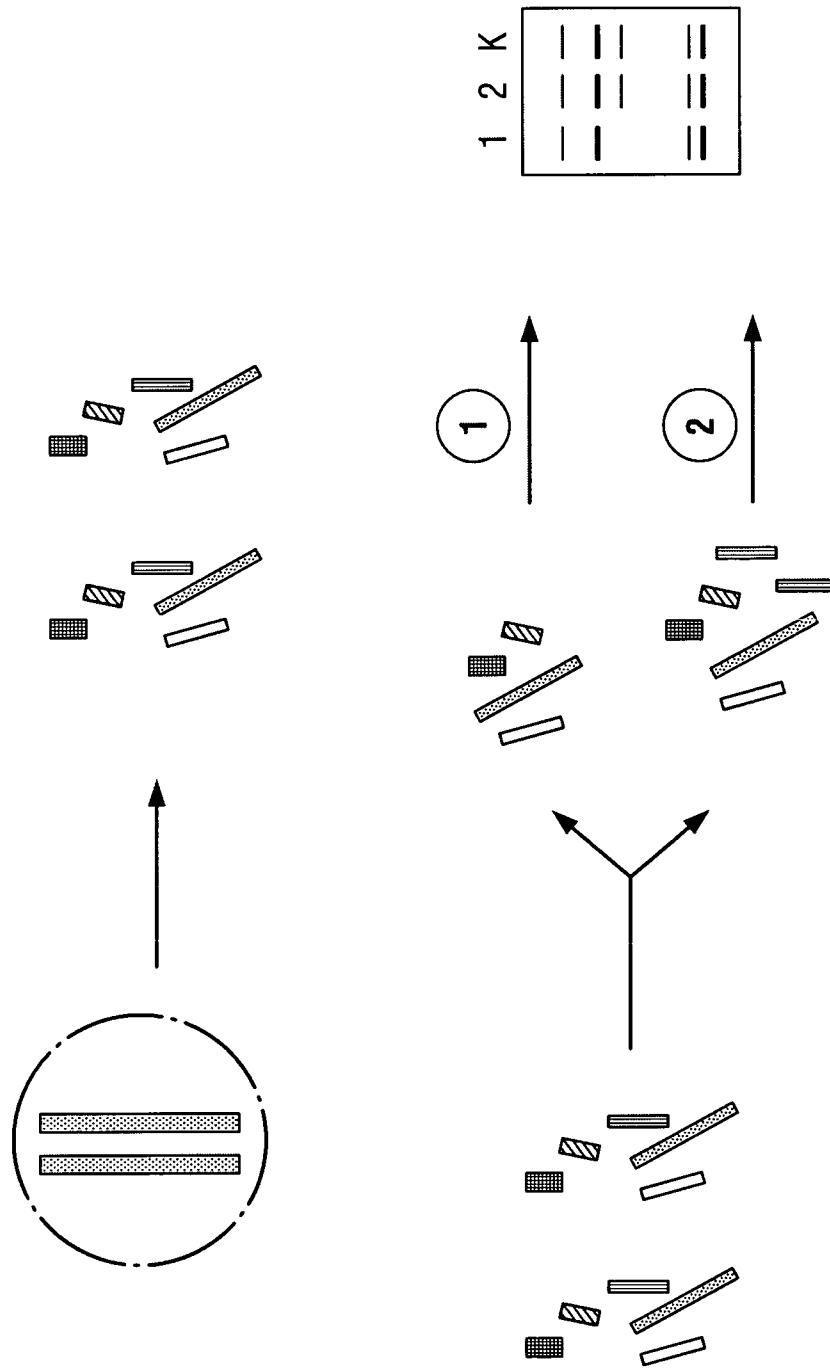
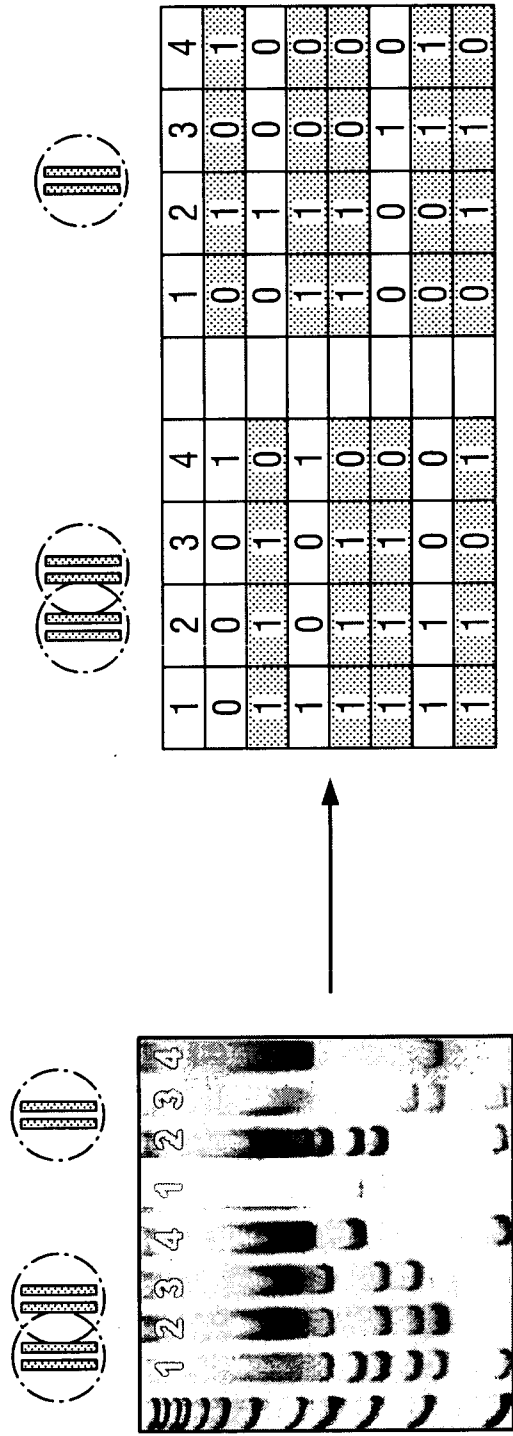


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/002759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

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 practical, 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 2006/010610 A2 (ALOPEX GMBH [DE]; ADVALYTIX AG [DE]; MANN WOLFGANG [DE]; GAUER CHRISTO) 2 February 2006 (2006-02-02)	1-15, 19-20, 23-25
Y A	page 25 - page 34; examples 1-3 page 7, line 14 - page 8, line 30 page 9, paragraph 3 - paragraph 4 page 12, line 23 - page 14, line 17 page 17, paragraph 3 - paragraph 4 claims 2-3, 6, 9	16-18 21-22
Y	DE 10 2006 014000 A1 (ADVALYTIX AG [DE]) 25 October 2007 (2007-10-25) claim 9	16-18
	----- -/--	

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 document 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.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 2009

Date of mailing of the international search report

11/08/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Werner, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/002759

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2009/013492 A1 (UNIV HONG KONG CHINESE [CN]; LO YUK-MING DENNIS [CN]; CHIU ROSSA WAI K) 29 January 2009 (2009-01-29) paragraph [0220] - paragraph [0223] abstract	1-20, 23-25
X,P	WO 2009/033178 A1 (FLUIDIGM CORP [US]; RAMAKRISHNAN RAMESH [US]) 12 March 2009 (2009-03-12) paragraph [0010] - paragraph [0021]	1,20
A	WO 2007/068305 A1 (ADVALYTIX AG [DE]; GAUER CHRISTOPH [DE]; MANN WOLFGANG [DE]) 21 June 2007 (2007-06-21) page 7 - page 10 examples 1-5	1-25
A	WO 2007/048469 A1 (ADVALYTIX AG [DE]; GAUER CHRISTOPH [DE]; MANN WOLFGANG [DE]) 3 May 2007 (2007-05-03) page 9 - page 10	1-25
A	DE 101 02 687 A1 (ADNAGEN AG [DE]) 1 August 2002 (2002-08-01) cited in the application paragraph [0007] - paragraph [0008] paragraph [0028] - paragraph [0034]	1-25
A	TABERLET P ET AL: "RELIABLE GENOTYPING OF SAMPLES WITH VERY LOW DNA QUANTITIES USING PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 24, no. 16, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 3189-3194, XP007900312 ISSN: 0305-1048 abstract page 3189, column 1, paragraph 1; figure 4	1-25
A	IE-MING SHIH ET AL: "Evidence That Genetic Instability Occurs at an Early Stage of Colorectal Tumorigenesis" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD., US, vol. 61, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 818-822, XP007905911 ISSN: 0008-5472 page 818, column 2, paragraph 4; figure 2 abstract	1-25
----- -/--		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/002759

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DENNIS LO Y M ET AL: "Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 104, no. 32, 7 August 2007 (2007-08-07), pages 13116-13121, XP007905909 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/002759

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006010610	A2	02-02-2006	CA 2574832 A1	02-02-2006
			CN 1997757 A	11-07-2007
			DE 102004036285 A1	16-02-2006
			EP 1771577 A2	11-04-2007
			JP 2008507963 T	21-03-2008
			US 2008193927 A1	14-08-2008
DE 102006014000	A1	25-10-2007	EP 2004848 A1	24-12-2008
			WO 2007110124 A1	04-10-2007
WO 2009013492	A1	29-01-2009	WO 2009013496 A1	29-01-2009
			US 2009087847 A1	02-04-2009
			US 2009029377 A1	29-01-2009
WO 2009033178	A1	12-03-2009	US 2009069194 A1	12-03-2009
WO 2007068305	A1	21-06-2007	DE 102005059227 A1	14-06-2007
			EP 1960537 A1	27-08-2008
			JP 2009518051 T	07-05-2009
WO 2007048469	A1	03-05-2007	DE 102005051816 A1	10-05-2007
DE 10102687	A1	01-08-2002	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/002759

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12Q1/68		
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 2006/010610 A2 (ALOPEX GMBH [DE]; ADVALYTIX AG [DE]; MANN WOLFGANG [DE]; GAUER CHRISTO) 2. Februar 2006 (2006-02-02)	1-15, 19-20, 23-25
Y	Seite 25 - Seite 34; Beispiele 1-3	16-18
A	Seite 7, Zeile 14 - Seite 8, Zeile 30 Seite 9, Absatz 3 - Absatz 4 Seite 12, Zeile 23 - Seite 14, Zeile 17 Seite 17, Absatz 3 - Absatz 4 Ansprüche 2-3, 6, 9	21-22
Y	DE 10 2006 014000 A1 (ADVALYTIX AG [DE]) 25. Oktober 2007 (2007-10-25) Anspruch 9	16-18
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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* älteres Dokument, 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 anderen 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 30. Juli 2009		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 11/08/2009
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Werner, Andreas

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/002759

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	WO 2009/013492 A1 (UNIV HONG KONG CHINESE [CN]; LO YUK-MING DENNIS [CN]; CHIU ROSSA WAI K) 29. Januar 2009 (2009-01-29) Absatz [0220] - Absatz [0223] Zusammenfassung	1-20, 23-25
X,P	WO 2009/033178 A1 (FLUIDIGM CORP [US]; RAMAKRISHNAN RAMESH [US]) 12. März 2009 (2009-03-12) Absatz [0010] - Absatz [0021]	1,20
A	WO 2007/068305 A1 (ADVALYTIX AG [DE]; GAUER CHRISTOPH [DE]; MANN WOLFGANG [DE]) 21. Juni 2007 (2007-06-21) Seite 7 - Seite 10 Beispiele 1-5	1-25
A	WO 2007/048469 A1 (ADVALYTIX AG [DE]; GAUER CHRISTOPH [DE]; MANN WOLFGANG [DE]) 3. Mai 2007 (2007-05-03) Seite 9 - Seite 10	1-25
A	DE 101 02 687 A1 (ADNAGEN AG [DE]) 1. August 2002 (2002-08-01) in der Anmeldung erwähnt Absatz [0007] - Absatz [0008] Absatz [0028] - Absatz [0034]	1-25
A	TABERLET P ET AL: "RELIABLE GENOTYPING OF SAMPLES WITH VERY LOW DNA QUANTITIES USING PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 24, Nr. 16, 1. Januar 1996 (1996-01-01), Seiten 3189-3194, XP007900312 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3189, Spalte 1, Absatz 1; Abbildung 4	1-25
A	IE-MING SHIH ET AL: "Evidence That Genetic Instability Occurs at an Early Stage of Colorectal Tumorigenesis" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD., US, Bd. 61, 1. Februar 2001 (2001-02-01), Seiten 818-822, XP007905911 ISSN: 0008-5472 Seite 818, Spalte 2, Absatz 4; Abbildung 2 Zusammenfassung	1-25

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/002759

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr:
A	DENNIS LO Y M ET AL: "Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, Bd. 104, Nr. 32, 7. August 2007 (2007-08-07), Seiten 13116-13121, XP007905909 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/002759

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2006010610 A2	02-02-2006	CA 2574832 A1	02-02-2006
		CN 1997757 A	11-07-2007
		DE 102004036285 A1	16-02-2006
		EP 1771577 A2	11-04-2007
		JP 2008507963 T	21-03-2008
		US 2008193927 A1	14-08-2008
DE 102006014000 A1	25-10-2007	EP 2004848 A1	24-12-2008
		WO 2007110124 A1	04-10-2007
WO 2009013492 A1	29-01-2009	WO 2009013496 A1	29-01-2009
		US 2009087847 A1	02-04-2009
		US 2009029377 A1	29-01-2009
WO 2009033178 A1	12-03-2009	US 2009069194 A1	12-03-2009
WO 2007068305 A1	21-06-2007	DE 102005059227 A1	14-06-2007
		EP 1960537 A1	27-08-2008
		JP 2009518051 T	07-05-2009
WO 2007048469 A1	03-05-2007	DE 102005051816 A1	10-05-2007
DE 10102687 A1	01-08-2002	KEINE	