



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 31 608 T2** 2007.05.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 056 887 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 31 608.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/03175**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 908 154.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/043853**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.02.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.05.2007**

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

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

30156 25.02.1998 US

(73) Patentinhaber:

Nanogen, Inc., San Diego, Calif., US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**SOSNOWSKI, G., Ronald, Coronado, CA 92118,
US; TU, Eugene, San Diego, CA 92103, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON DNA-LÄNGENPOLYMORPHISMEN**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Verfahren und Vorrichtungen dieser Erfindungen betreffen Systeme zur genetischen Identifizierung eines Erkrankungszustandes. Die Verfahren und Vorrichtungen betreffen insbesondere Systeme zum Detektieren von Zuständen von Wiederholungseinheiten, wie z.B. der Anzahl von kurzen Tandemwiederholungseinheiten zum Identifizieren von Individuen, wie z.B. im forensischen Sinne, oder bei der Ermittlung der Vaterschaft oder zum Bestimmen von Erkrankungszuständen, wie z.B. der klonalen Tumordetektion.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Molekularbiologie umfasst eine große Vielfalt von Techniken für die Nukleinsäure- und Proteinanalyse. Viele dieser Techniken und Verfahren bilden die Basis für klinische Diagnoseassays und Tests. Diese Techniken schließen Nukleinsäurehybridisierungsanalysen, Restriktionsenzymanalysen, genetische Sequenzanalysen und das Abtrennen und Reinigen von Nukleinsäuren und Proteinen ein (siehe, z.B., J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0003] Viele dieser Techniken schließen das Durchführen zahlreicher Arbeitsschritte (z. B., Pipettieren, Zentrifugieren, Elektrophorese) bei einer großen Anzahl von Proben ein. Sie sind häufig komplex und zeitaufwendig und erfordern für gewöhnlich ein hohes Maß an Präzision. Viele Techniken sind in ihrer Anwendung durch mangelnde Empfindlichkeit, Spezifität oder Reproduzierbarkeit begrenzt.

[0004] Zum Beispiel haben diese Probleme viele diagnostische Anwendungen von Nukleinsäurehybridisierungsanalysen begrenzt.

[0005] Der vollständige Prozess für die Durchführung einer DNA-Hybridisierungsanalyse für eine genetische oder infektiöse Erkrankung ist sehr kompliziert. Allgemein gesprochen kann der gesamte Prozess in mehrere Schritte und Unterschritte aufgeteilt werden. Im Falle einer genetischen Erkrankungsdiagnose schließt der erste Schritt das Erhalten der Probe (Blut oder Gewebe) ein. Abhängig vom Probentyp würden zahlreiche Vorbehandlungen durchgeführt. Der zweite Schritt schließt das Zerstören oder Lysieren der Zellen ein, die dann das rohe DNA-Material zusammen mit anderen zellulären Bestandteilen freisetzen. Im Allgemeinen sind etliche Unterschritte notwendig, um Zellrückstände zu entfernen und um die Roh-DNA weiter zu reinigen. Zu diesem Zeitpunkt gibt es etliche Möglichkeiten für die weitere Verarbei-

tung und Analyse. Eine Möglichkeit schließt das Denaturieren der gereinigten Proben-DNA und das Durchführen einer direkten Hybridisierungsanalyse in einem von vielen Formaten (Dot Blot, Mikrokügelchen, Mikroplatte, etc.) ein. Eine zweite Möglichkeit, genannt Southern-Blot-Hybridisierung schließt das Spalten der DNA mit Restriktionsenzymen, das Abtrennen der DNA-Fragmente auf einem elektrophoretischen Gel, das Aufbringen auf einem Membranfilter und dann das Hybridisieren des Blots mit spezifischen DNA-Sondensequenzen ein. Dieses Verfahren reduziert wirksam die Komplexität der genomischen DNA-Proben und hilft dabei die Hybridisierungsspezifität und Empfindlichkeit zu verbessern. Leider ist dieses Verfahren langwierig und schwierig. Als dritte Möglichkeit kann man ein Amplifikationsverfahren, wie z.B. die Polymerasekettenreaktion (PCR), eine Strangverdrängungsamplifikation oder ein anderes Verfahren durchzuführen. Diese Verfahren vervielfältigen (Zunahme) die Anzahl der Ziel-DNA-Sequenzen relativ zu den Nicht-Ziel-Sequenzen. Die Amplifikation von Ziel-DNA hilft dabei Probleme zu bewältigen, die mit der Komplexität und Empfindlichkeit in genomischen DNA-Analysen zusammenhängen. Nach dieser Probezubereitung und den DNA-Verarbeitungsschritten wird die eigentliche Hybridisierungsreaktion durchgeführt. Am Ende wandeln die Detektion und die Datenanalyse das Hybridisierungsereignis in ein analytisches Ergebnis um.

[0006] Nukleinsäurehybridisierungsanalysen schließen im Allgemeinen die Detektion einer sehr kleinen Anzahl von spezifischen Ziel-Nukleinsäuren (DNA oder RNA) mit einem Überschuss an Sonden-DNA unter einer relativ großen Anzahl von komplexen Nicht-Ziel-Nukleinsäuren ein. Die Unterschritte bei der Verringerung der DNA-Komplexität bei der Probenvorbereitung sind dafür verwendet worden, um dabei zu helfen, geringere Kopienzahlen (d.h. 10.000 bis 100.000) von Ziel-Nukleinsäuren zu detektieren. Die Komplexität der DNA wurde bis zu einem gewissen Grad durch Amplifikation der Ziel-Nukleinsäuresequenzen mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) und anderer Verfahren überwunden. (Siehe, M. A. Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, 1990, Spargo et al., 1996, *Molecular & Cellular Probes*, in Bezug auf die SDA-Amplifikation). Die Amplifikation ergibt eine große Anzahl von Ziel-Nukleinsäuresequenzen, die den nachfolgenden Schritt der direkten Sondenhybridisierung verbessert.

[0007] Die eigentliche Hybridisierungsreaktion repräsentiert einen der wichtigsten und zentralsten Schritte im ganzen Verfahren. Der Hybridisierungsschritt schließt das Anordnen der vorbereiteten DNA-Sonde in Verbindung mit einer spezifischen Reporter-Sonde bei optimalen Bedingungen für das Stattfinden der Hybridisierung mit der Ziel-DNA-Sequenz ein. Die Hybridisierung kann in irgendeinem ei-

ner Vielzahl von Formaten durchgeführt werden. Zum Beispiel ist die Mehrfachproben-Nukleinsäurehybridisierungsanalyse auf einer Vielfalt von Filter- und Trägerformaten durchgeführt worden (siehe G. A. Beltz et al., in *Methods in Enzymology*, Vol. 100, Part B, R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, Hrsg., Academic Press, New York, Kapitel 19, S. 266–308, 1985). Ein Format, die so genannte "Dot-Blot"-Hybridisierung, schließt das nicht kovalente Anbinden von Ziel-DNA an Filter, die nachfolgend mit einer Radioisotop-markierten Sonde(n) hybridisiert werden, ein. Die "Dot-Blot"-Hybridisierung erlangte weit verbreitete Anwendung und es wurden viele Versionen entwickelt (siehe M. L. M. Anderson und B. D. Young, in *Nucleic Acid Hybridization – A Practical Approach*, B. D. Hames und S. J. Higgins, Hrsg., IRL Press, Washington D. C., Kapitel 4, S. 73–111, 1985). Sie ist für Mehrfachanalysen genomischer Mutationen (D. Nambhushan und D. Rabin, in EPA 0228075, 8. Juli 1987), und für die Detektion von überlappenden Klonen und die Konstruktion von genomischen Karten (G. A. Evans, im US Patent Nummer 5,219,726, 15. Juni 1993) entwickelt worden.

[0008] Neue Techniken werden für das Durchführen von Mehrfachproben-Nukleinsäurehybridisierungsanalysen auf Multiplex oder Matrixvorrichtungen im Mikroformat (z.B., DNA Chips) entwickelt (siehe M. Barinaga, 253 Science, S. 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, S. 757–758, 1992). Bei diesen Verfahren werden für gewöhnlich spezifische DNA-Sequenzen an sehr kleine spezifische Bereiche eines festen Trägers, wie z.B. die Mikrokammern eines DNA-Chips, angebunden. Diese Hybridisierungsformate sind Mikromaßstabsversionen der konventionellen "Dot-Blot" und "Sandwich"-Hybridisierungssysteme.

[0009] Die Hybridisierung im Mikroformat kann verwendet werden, um eine "Sequenzierung durch Hybridisierung" (SBH) durchzuführen (siehe M. Barinaga, 253 Science, S. 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, S. 757–758, 1992). SBH macht Gebrauch von allen möglichen N-Nukleotidoligomeren (n-mers), um n-mers in einer unbekannten DNA-Probe zu identifizieren, die anschließend durch algorithmische Analysen ausgerichtet werden, um die DNA-Sequenz zu erzeugen (R. Drmanac und R. Crkvenjakov, Jugoslawische Patentanmeldung #570/87, 1987; R. Drmanac et al., 4 Genomics, 114, 1989; Strezoska et al., 88 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10089, 1992; und R. Drmanac und R. B. Crkvenjakov, U.S. Patent #5,202,231, 13. April 1993).

[0010] Es gibt zwei Formate zum Durchführen von SBH. Das erste Format schließt das Erzeugen eines Arrays aller möglichen n-mers auf einem Träger ein, der dann mit der Ziel-Sequenz hybridisiert wird. Das zweite Format schließt das Anbinden der Ziel-Sequenz an einen Träger ein, der sequenziell mit allen

möglichen n-mers sondiert wird. Beide Formate weisen das grundlegende Problem der direkten Sondenhybridisierungen und zusätzliche Schwierigkeiten, die mit der Multiplexhybridisierung in Verbindung stehen, auf.

[0011] Southern, WO 89/10977; E. M. Southern et al., 13 Genomics 1008, 1992, schlug vor, das erste Format zu verwenden, um DNA zu analysieren oder zu sequenzieren. Southern identifizierte eine bekannte Einzelpunktmutation mittels PCR amplifizierter genomischer DNA. Southern beschrieb auch ein Verfahren zum Synthetisieren eines Arrays von Oligonukleotiden auf einem festen Träger für SBH. Jedoch beschäftigte sich Southern nicht damit, wie optimale Stringenzbedingungen für jedes Oligonukleotid auf einem Array erzielt werden könnten.

[0012] Gleichzeitig verwendete Drmanac et al., 260 Science 1649–1652, 1993 das zweite Format, um zahlreiche kurze (116 bp) DNA-Sequenzen zu sequenzieren. Die Ziel-DNA wurde an Membranträger ("Dot-Blot"-Format) angebunden. Jeder Filter wurde nachfolgend mit 272 markierten 10-mer und 11-mer Oligonukleotiden hybridisiert. Ein großer Bereich von Stringenzbedingungen wurde verwendet, um eine spezifische Hybridisierung für jede n-mer-Sonde zu erzielen; Wasch-Zeiten variierten von 5 Minuten bis zu Übernacht und Temperaturen von 0°C bis 16°C. Die meisten Sonden erforderten 3 Stunden waschen bei 16°C. Die Filter mussten für 2 bis 18 Stunden ausgesetzt werden, um Hybridisierungssignale zu detektieren. Trotz der einfachen Ziel-Sequenzen, der verringerten Anzahl von Oligomersonden und der Verwendung der stringentesten Bedingungen, die verfügbar waren, lag die allgemeine falsch-positive Hybridisierungsrate bei 5%.

[0013] Es existiert eine Vielfalt von Verfahren zum Detektieren und Analysieren der Hybridisierungsereignisse. Abhängig von der Reporter-Gruppe (Fluorophor, Enzym, Radioisotop, etc.), die zum Markieren der DNA-Sonde verwendet wurde, wird die Detektion und Analyse fluorometrisch, kolorimetrisch oder mittels Autoradiographie durchgeführt. Durch das Beobachten und Messen der emittierten Strahlung, wie z.B. der Fluoreszenzstrahlung oder der Partikelemission, können Informationen über die Hybridisierungsereignisse erhalten werden. Auch wenn die Detektionsverfahren eine sehr hohe intrinsische Empfindlichkeit aufweisen, ist die Detektion von Hybridisierungsereignissen aufgrund der Anwesenheit von nicht spezifisch gebundenen Materialien im Hintergrund schwierig. Eine Anzahl von anderen Faktoren verringert ebenfalls die Empfindlichkeit und Selektivität der DNA-Hybridisierungsassays.

[0014] Eine Form der genetischen Analyse besteht darin, die Natur der relativ kurzen Wiederholungssequenzen innerhalb einer Gensequenz zu bestimmen.

Kurze Tandemwiederholungen (STR's) sind als nützliche Werkzeuge sowohl in der Forensik als auch in anderen Bereichen (Vaterschaftstest, Tumordetektion, D. Sidransky, genetische Erkrankung, Viehhaltung) identifiziert worden. Tatsächlich hat das United States Federal Bureau of Investigation angekündigt, dass es die Verwendung von kurzen Tandemwiederholungssequenzen für forensische Zwecke in Erwägung zieht. (Dr. Bruce Budowle, DNA Forensics, Science, Evidence and Future Prospects, McLean, VA. Nov. 1997).

[0015] Es sind verschiedene Vorschläge zum Identifizieren, Amplifizieren, Detektieren und Verwenden polymorpher Wiederholungssequenzen gemacht worden. Zum Beispiel offenbart Tautz PCT WO 90/04040-PCT/EP98/01203 in einer Anmeldung mit dem Titel "Process for the Analysis of Length Polymorphisms in DNA Regions" (übersetzt aus dem Deutschen), ein Verfahren für die Analyse von Längenpolymorphismen in Bereichen einfacher oder vermeintlich einfacher DNA-Sequenzen. Tautz offenbart ein Verfahren, das die Schritte der Zugabe wenigstens eines Primerpaares zu der zu analysierenden DNA einschließt, wobei eines der Moleküle des Primerpaares im Wesentlichen komplementär zu den komplementären Strängen der 5' bzw. 3' Seite einer einfachen oder vermeintlich einfachen DNA-Sequenz ist, und wobei die Zugabe innerhalb der Orientierung stattfindet, die dergestalt ist, dass zumindest die Syntheseprodukte, die von einer Primer kontrollierten Polymerisationsreaktion mit einem der zwei Primer erhalten werden, im Anschluss an eine Denaturierung, als Matrizes für die Zugabe des anderen Primers verwendet werden können, wobei eine Primer kontrollierte Polymerisationsreaktion und Abtrennung, wie z.B. durch normale Gelelektrophorese der Produkte und Analysieren der Polymerasekettenreaktionsprodukte, durchgeführt wird.

[0016] Caskey et al., am Baylor College für Medizin, detektierte durch das Durchführen eines DNA-Profilings Assays auch Polymorphismen in einer kurzen Tandemwiederholung. Caskey et al., U.S. Patent Nr. 5,364,759, erteilt am 15. November 1994, mit dem Titel "DNA Typing With Short Tandem Repeat Polymorphisms and Identification of Polymorphic Short Tandem Repeats" offenbart ein Verfahren, das die Schritte des Extrahierens von DNA aus einer zu testenden Probe, das Amplifizieren der extrahierten DNA und das Identifizieren der amplifizierten Verlängerungsprodukte für jede unterschiedliche Sequenz einschließt. Bei Caskey war es erforderlich, dass jede unterschiedliche Sequenz unterschiedlich markiert wird. Eine physikalische Abtrennung wurde mittels Elektrophorese durchgeführt.

[0017] C. R. Cantor und andere offenbarten vor kurzem eine Technik zum Auswerten von kurzen Tandem DNA-Wiederholungen. Das Verfahren wird of-

fenbart in Yarr, R. et al., "In Situ Detection of Tandem DNA Repeat Length", Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 13(1996) 113-118, und PCT Anmeldung WO 96/36731, PCT/US96/06527 mit dem Titel "Nucleic Acid Detection Methods". Diese offenbaren die Hybridisierung eines Ziel-Oligonukleotids, das Tandemwiederholungen enthält, die in einer einzigartigen Sequenz eingebettet sind, mit einem Satz von komplementären Sonden, die Tandemwiederholungen bekannter Längen enthalten. Einzelsträngige Schleifenstrukturen ergeben Duplexes, die eine fehlgepaarte (dort definiert als verschieden) Anzahl von Tandemwiederholungen enthalten. Wenn eine entsprechende (dort definiert als identisch) Anzahl von Tandemwiederholungen in dem Duplex existierte, bildete sich keine Schleifenstruktur. Die Schleifenstrukturen wurden mit einer einzelsträngigen Nuklease abgebaut. Unterschiedliche Wellenlängen, wie z.B. durch unterschiedlich gefärbte Fluorophore der verschieden langen Sonden wurden dort identifiziert wo übereinstimmende Stellen existierten. Die schnelle Verwendung der elektrophoretischen Abtrennung war in Übereinstimmung mit diesem Verfahren nicht erforderlich.

[0018] WO 96/31622 offenbart ein Verfahren zum Bestimmen der Anzahl von Wiederholungseinheiten von kurzen Tandem DNA-Wiederholungen durch Anordnen der Ziel-Sequenzen an die zwei Sonden hybridisiert sind, die im Falle einer perfekten Übereinstimmung miteinander ligiert werden.

[0019] Trotz des Wissens über die Existenz von Polymorphismen in Wiederholungseinheiten seid nun etwa 15 Jahre als auch ihrer bekannten Attraktivität für Anwendungen in der Forensik und beim genetischen Testen, müssen kommerziell akzeptierbare Ausführungen noch verwirklicht werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Die Erfindung stellt ein Verfahren bereit, wie es in Anspruch 1 definiert wird. Im Verfahren dieser Erfindung wird die Natur der Wiederholungseinheiten im genetischen Ziel durch die Schritte des Bereitstellens einer Vielzahl von Hybridisierungskomplex-Assays bestimmt, die an einer Vielzahl von Teststellen angeordnet sind, wobei das Hybridisierungskomplex-Assay wenigstens ein Nukleinsäureziel, das eine einfache repetitive DNA-Sequenz enthält, eine Fänger-Sonde mit einer ersten einzigartigen Flankierungssequenz und n Wiederholungseinheiten, wobei $n = 0, 1, 2 \dots$ und komplementär zur Ziel-Sequenz ist, und eine Reporter-Sonde mit einer ausgewählten Sequenz, die zum gleichen Ziel-Sequenzstrang komplementär ist, wobei die ausgewählte Sequenz des Reporters eine zweite einzigartige Flankierungssequenz und m Wiederholungseinheiten einschließt, wobei $m = 0, 1, 2 \dots$, wobei jedoch die Summe der Wiederholungseinheiten in der Fänger-Sonde plus

der Reporter-Sonde größer ist als Null ($n + m > 0$), einschließt. In Übereinstimmung mit diesem Verfahren unterscheidet sich die Sequenz der Fänger-Sonde durch wenigstens zwei Teststellen. Die Hybridisierungskomplex-Assays werden dann überwacht, um die Übereinstimmung und Nicht-Übereinstimmung unter den Hybridisierungskomplex-Assays an den Teststellen zu bestimmen, wie es zumindest zum Teil durch die Hybridisierungsstabilität bestimmt wird. Letztendlich kann die Natur der Wiederholungseinheiten in der Ziel-Sequenz basierend auf der Übereinstimmungs-/Nichtübereinstimmungsbestimmung gekoppelt mit dem Wissen der Sonden, die im Hybridisierungskomplex an der Stelle lokalisiert sind, bestimmt werden.

[0021] Als Beispiel zur Implementierung dieses Verfahrens nimmt man an, dass ein Ziel sechs Wiederholungseinheiten enthält. In einem System, das nur für die Annehmlichkeit der Darlegung vereinfacht wurde, könnte die Vielzahl von Hybridisierungskomplex-Assays drei Assays sein, die auf einem APEX-Typ bioelektronischen System angeordnet sind, wobei ein erstes Assay eine Fänger-Sonde mit vier Wiederholungseinheiten ($n = 4$), das zweite Assay eine Fänger-Sonde mit fünf Wiederholungseinheiten ($n = 5$) und das dritte Assay Fänger-Sonden mit sechs Wiederholungseinheiten ($n = 6$) einschließt. Wenn die Reporter-Sonde so ausgewählt wird, dass sie eine Wiederholungseinheit ($m = 1$) aufweist, dann wird die gesamte Anzahl von Wiederholungseinheiten im ersten Assay fünf sein ($n + m = 4 + 1 = 5$), die gesamte Anzahl von Wiederholungseinheiten im zweiten Assay sechs entsprechen ($n + m = 5 + 1 = 6$) und die gesamte Anzahl von Wiederholungseinheiten im dritten Assay sieben entsprechen ($n + m = 6 + 1 = 7$). Die zweite Teststelle wird die übereinstimmende Teststelle sein, da die Anzahl von Wiederholungseinheiten im Ziel in diesem Fall der Anzahl von Wiederholungseinheiten in den Fänger-plus den Reporter-Sonden entspricht, d.h. es ist die Teststelle mit sechs Wiederholungseinheiten sowohl im Ziel als auch in der Kombination der Fänger-Sonde und der Reporter-Sonde. Unter Verwendung des Wissens betreffend der Sondenanordnung, ist die zweite Test-Stelle dafür bekannt, dass sie eine Fänger-Sonde mit fünf Wiederholungseinheiten ($n = 5$) aufweist, so dass, wenn man es mit dem Wissen über die Reporter-Sonde, die eine Wiederholungseinheit enthält, koppelt, die Gesamtzahl von sechs Wiederholungseinheiten im Ziel bestimmt wird.

[0022] In der bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindungen wird die elektronisch unterstützte Hybridisierung, oder die Bestimmung der Übereinstimmung und Nicht-Übereinstimmung oder beide im Verfahren verwendet. In einem Aspekt können während der Hybridisierung des Nukleinsäureziels mit der Fänger-Sonde und/oder der Reporter-Sonde elektronisch stringente Bedingungen, bevorzugt zusammen

mit anderen die Stringenz beeinflussenden Bedingungen, verwendet werden, um bei der Hybridisierung zu helfen. Diese Technik ist besonders vorteilhaft für das Verringern oder Eliminieren von verrutschten Hybridisierungen bei Wiederholungseinheiten und um eine wirksamere Hybridisierung zu fördern. In einem noch anderen Aspekt können elektronisch stringente Bedingungen während der Bestimmung der Hybridisierungskomplexstabilität variiert werden, um den Status der Übereinstimmung oder Nicht-Übereinstimmung genauer oder schneller zu bestimmen.

[0023] Die Offenbarung stellt auch ein Verfahren zum Bestimmen der Natur der Wiederholungseinheiten in einem genetischen Ziel durch Bereitstellen einer bioelektronischen Vorrichtung, die Sonden, die in Teststellen angeordnet sind, einschließt, wobei die Sonden eine erste einzigartige flankierende Sequenz, eine zweite einzigartige flankierende Sequenz und eine dazwischen liegende Serie von Wiederholungseinheiten mit variabler Anzahl an Wiederholungseinheiten aufweisen, bereit. Das Ziel wird mit den Sonden an den Teststellen unter elektronisch stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisiert und dann wird die Übereinstimmung/Nicht-Übereinstimmung an den Teststellen bestimmt. In der bevorzugten Ausführungsform wird die Übereinstimmung/Nicht-Übereinstimmung wenigstens zum Teil durch die Verwendung von elektronischen Hybridisierungsstabilitätsdeterminanten bestimmt. Die übereinstimmende Teststelle gibt an, welche Sonde die Anzahl von Wiederholungseinheiten einschließt, die mit der im Ziel identisch ist. In einer Abwandlung dieser Ausführungsform wird die elektronische Stringenzkontrolle nur während der Bestimmung der Übereinstimmung/Nicht-Übereinstimmung verwendet.

[0024] In einem noch anderen Aspekt dieser Erfindung werden Verfahren für die Bestimmung von Ziel-Allelen, die in einer Probe in ihrer Größe variieren, bereitgestellt. Es wird eine Plattform für die Identifikation von Ziel-Allelen bereitgestellt, die Sonden einschließt, die aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus (i) einer Sonde mit einer ersten einzigartigen flankierenden Sequenz, einem dazwischen liegenden Wiederholungsbereich und einer zweiten einzigartigen flankierenden Sequenz, und (ii) ein Sandwich-Assay, das eine Fänger-Sonde mit einer ersten einzigartigen flankierenden Sequenz und 0, 1, 2 ... Wiederholungseinheiten und eine Reporter-Sonde mit 0, 1, 2 ... Wiederholungseinheiten in Sequenz mit einer zweiten einzigartigen flankierenden Sequenz umfasst, besteht. Danach wird das Ziel mit den Sonden, bevorzugt unter elektronisch stringenten Bedingungen hybridisiert, so dass die korrekte Einordnung erleichtert wird, oder alternativ dazu mittels elektronisch stringenter Bedingungen während der darauf folgenden Schritte oder unter Verwendung elektronischer Stringenz sowohl während der Hybridisierung

als auch bei den späteren Schritten, wonach die Übereinstimmung oder Nicht-Übereinstimmung an den Teststellen, wie sie wenigstens in Teilen durch die Hybridisierungsstabilität bestimmt wird, bestimmt wird.

[0025] In einem Aspekt der Erfindungen stellt die Lage der übereinstimmenden Teststelle die Natur der Zielsequenz-Wiederholungseinheiten durch die Anzahl von Wiederholungseinheiten, die im Ziel vorhanden sind, dar, und das wiederum basiert auf der Kenntnis der Sonden, die an dieser Teststelle angeordnet sind. Die einzelnen Sonden, die mit einer vorgegebenen physikalischen Teststelle verbunden sind, werden nämlich üblicherweise in Bezug auf ihre Sequenz, insbesondere einschließlich der Anzahl der Wiederholungseinheiten, bekannt sein, und die physikalische Position dieser Teststellen ergibt ein Wissen über die Art des Ziels der übereinstimmenden Stellen, insbesondere der Anzahl der Wiederholungseinheiten. Für gewöhnlich gleicht an einer übereinstimmenden Teststelle die Anzahl der Wiederholungseinheiten im Ziel der Summe der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Fänger-Sonde und der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Reporter-Sonde.

[0026] Die offenbarten Verfahren sind auch wirksam beim Bestimmen der Anwesenheit von Mikrovarianten in der Ziel-Sequenz. Solche Mikrovarianten können eine oder mehrere Deletionen, Insertionen, Transitionen und/oder Transversionen umfassen. Dies kann für eine einzelne Base oder für mehr als eine einzelne Base gelten. Deletionen oder Insertionen innerhalb von Wiederholungseinheiten können durch Gelabtrennungsverfahren detektiert werden, wenn stark kontrollierte Bedingung verwendet werden. Dies erfordert die Auflösung einzelner Basen und ist für die meisten Gel-Abtrennungstechniken nahe der Detektionsgrenze. Für Transitions- oder Transversionsmutationen ändert sich die Größe des Allels nicht, obwohl sich die Sequenz verändert hat. Konventionelle Gelsiebverfahren haben Schwierigkeiten beim Detektieren dieser Arten von Mutationen und neuere Erkenntnisse durch andere Forscher (Sean Walsh, Dennis Roeder, DNA Forensics: Science, Evidence and Future Prospects, McLean, VA. Nov. 1997) weisen darauf hin, dass Transitions- und Transversionsmutationen geringfügige Anomalien verursachen können, die zu schwierigen Gelanalysen führen, was manchmal zur Verwirrung bei der STR-Analyse führt. Unser Verfahren ist eine Hybridisierungstechnik und ist recht versiert beim zuverlässigen Detektieren einzelner Nukleotidpolymorphismen, wie weiter oben beschrieben. Zusätzlich können durch das Entwerfen spezifischer Fänger- und Reporter-Oligonukleotide diese Assays auf der gleichen Plattform durchgeführt werden, die zur Unterscheidung der Art der STR-Allele durch die Anzahl der Wiederholungseinheiten verwendet wird. Die allgemeine Strategie beim Ent-

werfen von Fänger-Oligos für die Mikrovariantenanalyse ist die gleiche, wie sie es für die integralen Wiederholungseinheiten ist, jedoch können sich die Reporter-Oligos derart unterscheiden, dass sie einzigartige flankierende Sequenzen enthalten oder nicht enthalten. Die Bedingung der wirksamen Bestimmung der Übereinstimmung durch Maximieren der Hybridisierungskomplexstabilität verbleibt, da die Parametern zum Entwerfen von Oligos, die zur Basenstapelung führen (wie weiter oben beschrieben), immer noch berücksichtigt werden.

[0027] Verschiedene zusätzliche Schritte können verwendet werden, um das Unterscheiden von übereinstimmenden und nicht-übereinstimmenden Stellen zu fördern. Es ist die Art der verwendeten Übereinstimmung, dass es eine komplementäre Entsprechung von Basen im Hybridisierungskomplex, der den Fänger, Reporter und das Ziel einschließt im Sandwich-Assay-Format, gibt. Die Verwendung von nebeneinander liegenden terminalen Nukleotiden des Reporters und des Fängers wird ausgenutzt, wobei ihre zusammenhängende Natur eine Wechselwirkung, wie z.B. die Basenstapelung, ermöglicht. Die nebeneinander liegenden terminalen Nukleotididentitäten werden so ausgewählt, wie es von der vorhandenen Wiederholungseinheit oder einer anderen relevanten Sequenz vorgegeben wird, so dass die Energiedifferenz zwischen Übereinstimmung und Nicht-Übereinstimmung erhöht wird. Es ist berichtet worden, dass die Basenstapelung zwischen verschiedenen Basen in ihrer Stabilität über einen etwa 4-fachen Bereich variiert (Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, 1984, Springer-Verlag, New York, NY). Experimentelle Ergebnisse haben eine wenigstens 10-fache und häufig wenigstens mehr als 20-fache Verbesserung bei den Unterscheidungsverhältnissen für die Paarungen 5'G-A3' verglichen mit 5'T-A3' ergeben, wenn sie in unserem System analysiert worden sind. Während dieses Ergebnis im Allgemeinen mit den publizierten Ergebnissen, dass eine 5'G-A3' Basenstapelung eine größere Stabilität aufweist als 5'T-A3'-Paare, übereinstimmt, überschreitet die unterschiedliche Stabilitätssteigerung, die bei unserem Assay beobachtet wird, die berichteten Werte bei weitem. Es ist von großem Vorteil, dass diese Erfindung diese natürliche Bedingung ausschöpft, um einen größeren Vorteil beim Assay zu bieten. In noch anderen Ausführungsformen können die terminalen Nukleotide modifiziert werden, um Basenstapelungseffekte, wie z.B. bei der Zugabe von Propynyl-Gruppen, Methyl-Gruppen oder Cholesterol-Gruppen, zu erhöhen. In einem noch weiteren betreffenden Aspekt der offenbarten Verfahren, können Ligationstechniken, wie z.B. die Enzymigation oder die chemische Ligation, verwendet werden, um die Energiedifferenz zwischen einer übereinstimmenden und einer nicht-übereinstimmenden Stelle zu erhöhen.

[0028] Eine Nicht-Übereinstimmung kann sich auf

verschiedenen Wegen, wie z.B. im Sandwich-Assay-Format, in dem eine Lücke oder eine Überlappung existiert, oder im Ausbuchtungs-Verfahren (loop out method), in dem eine Ausbuchtung existiert, manifestieren. Weiterhin kann eine Nicht-Übereinstimmung im Wiederholungsbereich existieren, wenn es eine Basenvariation gibt, wie z.B. eine Deletion, Insertion, Transition und/oder Transversion.

[0029] Durch das differenzieren zwischen übereinstimmenden und nicht-übereinstimmenden Teststellen wird die Unterscheidung ausgehend von der Hybridisierungsstabilität vorgenommen. Die Hybridisierungsstabilität kann durch zahlreiche Faktoren, die die Thermoregulation, die chemischen Regulation als auch die elektronischen Stringenzkontrolle entweder alleine oder in Kombination mit den anderen aufgelisteten Faktoren einschließen, beeinflusst werden. Durch das Verwenden von elektronischen Stringenzbedingungen in einem oder beiden der Ziel-Hybridisierungsschritte oder der Reporter-Oligonukleotid-stringenzschritte, kann eine rasche Vervollständigung des Verfahrens erzielt werden. Die elektronisch stringente Hybridisierung des Ziels ist ein unverwechselbarer Aspekt dieses Verfahrens, da sie für doppelsträngige DNA zugänglich ist und zu einer schnellen und präzisen Hybridisierung des Ziels mit dem Fänger führt. Es ist wünschenswert eine genau registrierte Hybridisierung der Ziel-DNA zu erzielen, um zur maximalen Anzahl von Molekülen an einer Teststelle mit einem akkuraten Hybridisierungskomplex zu gelangen. Als Beispiel kann bei der Verwendung von elektronischer Stringenz der anfängliche Hybridisierungsschritt in zehn Minuten oder weniger, noch bevorzugter fünf Minuten oder weniger und am meisten bevorzugt einer Minute oder weniger beendet werden. Insgesamt kann das analytische Verfahren in weniger als einer halben Stunde beendet werden.

[0030] Man bevorzugt bezüglich der Detektion des Hybridisierungskomplexes, dass der Komplex markiert wird. Für gewöhnlich gibt es beim Schritt zur Bestimmung der Übereinstimmung oder Nicht-Übereinstimmung eine Detektion der Menge des markierten Hybridisierungskomplexes an der Teststelle oder einem Teil davon. Jede Art oder Modalität der Detektion, die mit dem Zweck und der Funktionsweise der Erfindung konsistent ist, kann verwendet werden, wie zum Beispiel eine optische Bilddarstellung, eine elektronische Bilddarstellung, die Verwendung von ladungsgekoppelten Vorrichtungen und anderen Verfahren zur Quantifizierung. Die Markierung kann die des Ziels, des Fängers oder Reporters sein. Verschiedene Markierungen können eine Fluoreszenzmarkierung, eine kolorimetrische Markierung oder chemilumineszente Markierung sein. In einer anderen Anwendung kann die Detektion mittels einer Energieübertragung zwischen den Molekülen im Hybridisierungskomplex erfolgen. In noch einem anderen

Aspekt kann die Detektion über eine Fluoreszenz-Perturbationsanalyse erfolgen. In einem anderen Aspekt kann die Detektion über Konduktivitätsunterschiede zwischen übereinstimmenden und nicht-übereinstimmenden Stellen erfolgen.

[0031] In noch einer anderen Ausführungsform dieser Erfindungen kann ein redundantes Assay in geeigneter Weise durchgeführt werden. In einer Anwendung kann ein fortlaufendes redundantes Assay, wie zum Beispiel eines, bei dem nach Durchführung eines anfänglichen Hybridisierungskomplexassays die Stringenzbedingungen erhöht werden, um eine Denaturierung zu bewirken, wodurch der Reporter vom ersten Hybridisierungskomplexassay entfernt wird, verwendet werden. Ein zweiter Reporter kann dann mit dem verbleibenden Komplex-Ziel und der Fänger-Sonde hybridisieren, wobei der zweite Reporter eine Anzahl von Wiederholungseinheiten umfasst, die sich von der Anzahl oder dem Typ von Wiederholungseinheiten im ersten Reporter unterscheidet. Auf diese Weise wird sich durch die Praxis der anderen Schritte, wie sie für andere Anwendungen beschrieben worden sind, die physikalische Teststelle, an der eine Übereinstimmung existiert, bewegt haben. Das Ergebnis ist, dass ein redundantes Assay mit der gleichen Vorrichtung und Probenmaterial durchgeführt worden ist.

[0032] Es kann auch noch ein anderes redundantes Assay durchgeführt werden, wobei mehrere, z.B. zwei oder mehr, unabhängige Assays existieren. Ein erster Reporter wird in einem ersten Assay hybridisiert und ein zweiter Reporter hybridisiert in einem zweiten Assay, wobei die Anzahl von Wiederholungseinheiten im ersten Reporter sich von der Anzahl oder Art von Wiederholungseinheiten im zweiten Reporter unterscheidet. Die Bestimmung der Übereinstimmung/Nicht-Übereinstimmung an der ersten Teststelle des Arrays, wenn es mit dem Wissen über die Sonden, die an diesen Teststellen angeordnet sind, gekoppelt wird, stellt zwei Komplexe aus den Hybridisierungsassays zur Bestätigung der Ziel-Wiederholungsanzahl oder Art bereit.

[0033] Die Verfahren dieser Erfindungen sind besonders nützlich für die Bestimmung der Art komplexer Proben, wie zum Beispiel heterozygoter Proben und gemischter Proben, wie zum Beispiel jenen von mehreren Quellen oder Spendern. In der Anwendung können die Verfahren dieser Erfindungen für ein breites Spektrum von Anwendungen verwendet werden. Unter ihnen ist die Identifizierung, wie zum Beispiel für Vaterschaftstests oder für andere forensische Verwendungen, eingeschlossen. Eine noch andere Anwendung liegt in der Erkrankungsdiagnostik, wie zum Beispiel zur Identifikation der Existenz eines klonalen Tumors, wobei der Tumor Wiederholungseinheiten einer Art oder Anzahl einschließt, die sich vom nicht erkrankten genetischen Status des Patienten unter-

scheidet.

[0034] Demgemäß ist es ein Ziel dieser Erfindung, Verfahren für die schnelle Identifikation der Anzahl von Wiederholungseinheiten in einem polymorphen System bereitzustellen.

[0035] Die Offenbarung stellt Verfahren und einen Apparat bereit, der eine wirksame genetische Identifikation bereitstellt.

[0036] Die Offenbarung stellt Systeme und Verfahren für die akkurate Detektion von Erkrankungszuständen, besonders klonale Tumorerkrankungszustände, neurologische Erkrankungen und Veranlagungen für eine genetische Erkrankung, bereit.

[0037] Die Offenbarung stellt ein schnelles und wirksames System und Verfahren zur Identifikation, wie zum Beispiel in forensischen und Anwendungen für Vaterschaftstests bereit.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0038] [Fig. 1A](#) ist eine Querschnittsansicht einer Ausführungsform einer aktiven Matrixvorrichtung, die in Übereinstimmung mit den Verfahren dieser Erfindung verwendbar ist.

[0039] [Fig. 1B](#) ist eine perspektivische Ansicht einer aktiven Arrayvorrichtung, die mit den Verfahren dieser Erfindung verwendet werden kann.

[0040] [Fig. 2](#) ist eine symbolische Zeichnung der Bestandteile eines Multiplex-Assays, das ein Ziel, einen Reporter und eine Fänger-Sequenz einschließt.

[0041] [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) sind schematische Skizzen des Multiplex-Assays, das eine Ziel, einen Reporter und eine Fänger-Sequenz, in denen es eine Lücke, eine Überlappung bzw. eine Entsprechung gibt, einschließt.

[0042] [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#) zeigen eine detaillierte Sequenzliste für ein Multiplex-Assay des THO1-Genlocus, die eine Lücke, eine Überlappung bzw. eine Entsprechung in Übereinstimmung mit der schematischen Darstellung der [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) zeigen.

[0043] [Fig. 5A–Fig. 5G](#) zeigen eine schematische Ansicht einer Sequenz von Multiplex-Assays, die ein Ziel mit acht Wiederholungseinheiten, einen Reporter mit einer einzelnen Wiederholungseinheit bzw. Fänger-Sequenzen, die vier bis zehn Wiederholungseinheiten einschließen, in [Fig. 5A–Fig. 5G](#) zeigen.

[0044] [Fig. 6](#) zeigt die Aufsicht eines Arrays von Teststellen für ein Sandwich-Assay, wobei die übereinstimmende Teststelle schattiert dargestellt wird,

um die Gegenwart eines Hybridisierungskomplexes darzustellen.

[0045] [Fig. 7A–Fig. 7G](#) zeigen eine schematische Ansicht eines Multiplex-Unterscheidungssystems, das ein Ziel mit acht Basenwiederholungseinheiten, einen Reporter mit zwei Basenwiederholungseinheiten bzw. eine Reihe von Fänger-Sequenzen, die von vier bis zehn Wiederholungseinheiten in [Fig. 7A–Fig. 7G](#) einschließen, einschließt.

[0046] [Fig. 8](#) zeigt die Aufsicht eines Arrays von Teststellen für ein redundantes Assay, wobei die übereinstimmende Teststelle schattiert dargestellt wird, um die Gegenwart eines Hybridisierungskomplexes zu verdeutlichen.

[0047] [Fig. 9A](#) zeigt eine schematische Ansicht eines Ziels und eines hybridisierten Reporters in einem übereinstimmenden Zustand.

[0048] [Fig. 9B](#) zeigt ein Ziel und einen Reporter in einem nicht übereinstimmenden Zustand, nämlich in einem Schleifen-Zustand.

[0049] [Fig. 10A–Fig. 10G](#) zeigen eine Multiplexunterscheidung in einem Ausbuchtungssystem, wobei ein Ziel sieben Wiederholungseinheiten einschließt bzw. die Reporter fünf bis elf Wiederholungseinheiten in [Fig. 10A–Fig. 10G](#) einschließen.

[0050] [Fig. 11](#) ist ein Fluoreszenzdiagramm (MFI) als Funktion der Anzahl der Fänger-Oligo-Wiederholungseinheiten bei der Identifizierung von THO1 Ziel-DNA-Allelen durch das Sandwich-Hybridisierungsverfahren.

[0051] [Fig. 12](#) ist ein Diagramm der normalisierten Fluoreszenz als Funktion der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Fänger-Sequenz, wobei der Reporter eine Wiederholungseinheit (linke Seite) einschließt und keine Wiederholungseinheiten (rechte Seite) einschließt, was ein redundantes Reportersystem für den THO1-Genlocus darstellt.

[0052] [Fig. 13](#) ist eine Tabelle, die die spezifischen Oligonukleotide zeigt, die für Fänger-Sequenzen, Reporter-Sequenzen und die Ziel-Allele im THO1-Genlocus verwendet werden.

[0053] [Fig. 14](#) ist ein Diagramm der Unterscheidungsverhältnisse als Funktion der G-A-Stapelung im Vergleich zur T-A-Stapelung in den Paaren links, rechts bzw. in Diagrammen für eine acht x gegen eine sieben x Unterscheidung (linksseitiger Balken) und für eine fünfzehn x gegen eine vierzehn x Unterscheidung (rechts liegender Balken), was die Unterscheidung von Zielen durch G-A und T-A-Stapelung zeigt.

[0054] [Fig. 15](#) ist ein Diagramm des Unterschei-

dungsverhältnisses, das vier Paare an Chips zeigt, Chip eins bis Chip vier, die die maximalen Diskriminierungsverhältnisse bei Verwendung eines zehner-mer-Reporters (der linke Balken in einem Paar) und eines zehner-mer-Reporters mit terminaler Propyryl-Gruppe (rechter Balken in einem Paar) darstellen.

[0055] [Fig. 16](#) ist ein Diagramm der normalisierten Fluoreszenzintensität als Funktion des Fänger-Oligos in einem heterozygoten TPOX-Genlocus.

[0056] [Fig. 17](#) ist eine Tabelle der Nukleotidsequenzen für die TPOX-Fänger-Oligonukleotide, Reporter-Oligonukleotide und das Target-Allel für den TPOX-Genlocus.

[0057] [Fig. 18](#) ist ein Diagramm der Fluoreszenzintensität (MFI/sek.) als Funktion der Anzahl der Fänger-Wiederholungseinheiten für die Hybridisierungsdiskriminierung von CSF1PON-Allelen.

[0058] [Fig. 19](#) ist eine Tabelle der Fänger-Oligonukleotide, Reporter-Oligonukleotide und der Ziel-Allele in den CSF1PON-Allelen.

[0059] [Fig. 20](#) ist ein Diagramm der normalisierten Intensität als Funktion der Wiederholungseinheitennummer in der Fänger-Sequenz in einer THO1/TPOX-Multiplex-Analyse.

[0060] [Fig. 21](#) ist ein Diagramm der relativen Fluoreszenz als Funktion der Anzahl der Wiederholungseinheiten im Fänger-Oligonukleotid in einem System zum Identifizieren von Wiederholungseinheitenallelen in doppelsträngiger, durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizierter DNA, die den Ziel-THO1-Genlocus einschließt.

[0061] [Fig. 22A](#), [Fig. 22B](#) und [Fig. 22C](#) sind Diagramme der Fluoreszenz (MFI) als Funktion des Fänger-Oligonukleotids mit einer Lücke (links liegender Balken in dreifacher Wiederholung), einer Entsprechung (zentraler Balken in dreifacher Wiederholung) oder einer Überlappung (rechter Balken in dreifacher Wiederholung) für das anfängliche Signal, für das Signal nach drei Minuten Denaturierung bzw. für das Signal nach zehn Minuten Denaturierung für [Fig. 22A](#) bis [Fig. 22C](#).

[0062] [Fig. 23](#) ist eine Tabelle, die die Unterscheidung der Entsprechung von der Fehlpaarung/Lücke und der Fehlpaarung/Überlappung verschiedener Kombinationen darstellt.

[0063] [Fig. 24](#) ist ein Diagramm der Fluoreszenz in Prozent als Funktion der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Fänger-Sequenz für eine Bestimmung der Art und Anzahl von Wiederholungseinheiten in allelischer Identität der Ziel-DNA, unter Ver-

wendung der Ausbuchtungs (Loop out)-Analyse.

[0064] [Fig. 25A](#), [25B](#) und [25C](#) zeigen ein detailliertes Sequenzprotokoll für ein Multiplex THO1-Mikrovariantenassay, das eine Lücke, eine Überlappung bzw. eine Entsprechung zeigt.

[0065] [Fig. 26](#) ist ein Diagramm der Fluoreszenzintensität (MFI) als Funktion der Anzahl der Fänger-Oligonukleotide oder Art der Detektion des Mikrovariantenallels THO19.3.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0066] [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) illustrieren eine vereinfachte Version des aktiv programmierbaren, elektronischen Matrixhybridisierungssystems für die Verwendung mit dieser Erfindung. Im Allgemeinen trägt ein Substrat **10** eine Matrix oder ein Array von elektronisch adressierbaren Mikroorten **12**. Zur einfacheren Erklärung sind die verschiedenen Mikroorte in [Fig. 1A](#) mit **12A**, **12B**, **12C** und **12D** bezeichnet worden. Eine Permeationsschicht **14** ist über den einzelnen Elektroden **12** angeordnet. Die Permeationsschicht ermöglicht den Transport von relativ kleinen geladenen Entitäten durch die Schicht, begrenzt jedoch die Mobilität von großen geladenen Entitäten, wie zum Beispiel DNA, um die großen geladenen Entitäten daran zu hindern, die Elektroden **12** während der Dauer des Tests einfach direkt zu berühren. Die Permeationsschicht **14** verringert den elektrochemischen Abbau, der in der DNA durch direkten Kontakt mit der Elektrode **12** auftreten würde, möglicherweise teilweise aufgrund des extremen pH, der sich aus der elektrolytischen Reaktion ergibt. Sie dient weiterhin dazu, die starke, nicht-spezifische Adsorption von DNA an den Elektroden zu minimieren. Anbindungsbereiche **16** sind über der Permeationsschicht **14** angeordnet und stellen spezifische Bindungsstellen für Ziel-Materialien bereit. Die Anbindungsbereiche **16** sind mit **16A**, **16B**, **16C** bzw. **16D** bezeichnet worden, um der Kennzeichnung der Elektroden **12A–D** zu entsprechen.

[0067] Im Betrieb umfasst das Reservoir **18** den Raum über den Anbindungsbereichen **16**, der die gewünschten als auch die unerwünschten Materialien für die Detektion, Analyse oder Verwendung enthält. Geladene Entitäten **20**, wie z.B. geladene DNA, sind innerhalb des Reservoirs **18** zu finden. In einem Aspekt dieser Erfindung umfasst das aktive, programmierbare Matrixsystem ein Verfahren zum Transportieren des geladenen Materials **20** zu irgendeiner der spezifischen Mikroorte **12**. Wenn einmal aktiviert, erzeugt ein Mikroort **12** den elektrophoretischen Transport im freien Feld jeder geladenen, funktionalisierten, spezifischen Bindungsentität **20** auf die Elektrode **12** zu. Wenn zum Beispiel die Elektrode **12A** positiv ist und die Elektrode **12D** negativ, würden die elektrophoretischen Kraftlinien **22** zwischen den Elektro-

den **12A** und **12D** verlaufen. Die Linien der elektrophoretischen Kraft **22** verursachen den Transport von geladenen Bindungsentitäten **20**, die eine negative Ladung aufweisen, auf die positive Elektrode **12A** zu. Geladene Materialien **20** mit einer nettopositiven Ladung bewegen sich unter der elektrophoretischen Kraft auf die negativ geladene Elektrode **12D** zu. Wenn die Netto negativ geladene Bindungsentität **20**, die funktionalisiert worden ist, die Verbindungsschicht **16A** in Folge ihrer Bewegung unter Einfluss der elektrophoretischen Kraft berührt, wird die Funktionalität der spezifischen Bindungsentität **20** kovalent mit der Verbindungsschicht **16A** verbunden.

[0068] Bevor wir uns einer detaillierten Diskussion der Erfindungen dieses Patentes zuwenden, werden die allgemeinen Fragen der Terminologie diskutiert. Der Begriff "kurze Tandemwiederholung" (STR), wie er hierin verwendet wird, betrifft einen Genlocus, der einfache Sequenzmotive enthält, die zu verschiedenen Zeiten an verschiedenen Allelen dieses Genlocus tandemartig wiederholt werden. Eine Wiederholungseinheit oder Wiederholungseinheiten betreffen für gewöhnlich individuelle einfache Sequenzmotive, die in einer kurzen Tandemwiederholung wiederholt werden. Wiederholungseinheiten können, als Beispiel, vollständige Wiederholungseinheiten sein, die identische, sich wiederholende einfache Sequenzmotive enthalten, oder können teilweise Wiederholungseinheiten sein, wie zum Beispiel, wenn es einige Unterschiede zwischen Wiederholungseinheiten gibt, wie zum Beispiel in der Existenz von Mikrovarianten zwischen Wiederholungseinheiten. Eine übereinstimmende Teststelle wird als eine Teststelle verstanden, die ein relatives oder lokales Maximum an Hybridisierungskomplexstabilität zeigt. Zum Beispiel kann bei einer übereinstimmenden Teststelle die Anzahl der Wiederholungseinheiten im Ziel der Anzahl der Wiederholungseinheiten in einem Fänger plus der Anzahl von Wiederholungseinheiten in einer Reporter-Sonde für ein multiples System entsprechen, oder die Anzahl der Wiederholungseinheiten im Ziel entspricht der Anzahl der Wiederholungseinheiten in einer Sonde. In einem noch anderen Beispiel einer übereinstimmenden Teststelle kann eine übereinstimmende Teststelle, wenn partielle Wiederholungseinheiten vorliegen, sich durch eine Stelle manifestieren, in der die Wiederholungseinheiten im Ziel im Wesentlichen ähnlich sind zu der Art der Wiederholungseinheiten im Fänger plus der Sonde, oder der einzelnen Sonde, falls angebracht. Eine nicht-übereinstimmende Stelle ist auf der anderen Seite eine Stelle, die ein relativ geringes Niveau der Hybridisierungskomplexstabilität relativ zu wenigstens einer anderen Stelle zeigt. Beispiele für Teststellen, die üblicherweise als nicht-übereinstimmend bezeichnet werden würden, wären jene, in denen eine Lücke, eine Überlappung, eine Punktmutation (z.B., einzelne Basenvariation, wie zum Beispiel eine Deletion, Insertion, Transposition und Transversion), Punktmutationen plus Über-

lappung, Punktmutationen plus Lücke, einzelne Nukleotidvarianten oder andere Mikrovarianten existieren.

[0069] Ein Hybridisierungskomplexassay in einem Multiplexsystem, wie zum Beispiel in einem Sandwich-Assay, wird für gewöhnlich ein Ziel, einen Fänger und einen Reporter umfassen. Ein Hybridisierungskomplexassay in einer Ausbuchtungsanwendung schließt wenigstens für gewöhnlich ein Ziel und eine Sonde ein. Ein Array, wie es hierin verwendet wird, betrifft üblicherweise mehrere Teststellen, minimal zwei oder mehr Teststellen. Die typische Anzahl von Teststellen wird eine für jedes Allel des Genlocus sein. Die Anzahl der Loci, die für einen Test erforderliche sind, wird abhängig von der Anwendung variieren, wobei im Allgemeinen einer für eine genetische Erkrankungsanalyse, einer bis fünf für die Tumordektektion, sechs, acht, neun, dreizehn oder mehr für den Vaterschaftstest und die Forensik sind. Die physikalische Positionierung der Teststellen relativ zu einander kann in irgendeiner geeigneten Konfiguration vorliegen, wie linear oder in einer Anordnung von Reihen und Säulen.

[0070] [Fig. 2](#) zeigt eine symbolische Zeichnung der Komponenten eines Multiplex-Assays. Ein Ziel **30** schließt einen ersten einzigartigen flankierenden Bereich **32**, einen zweiten einzigartigen flankierenden Bereich **34** und eine oder mehrere Wiederholungseinheiten **36**, die zwischen dem ersten einzigartigen flankierenden Bereich **32** und dem zweiten einzigartigen flankierenden Bereich **34** angeordnet sind. Das Ziel **30** kann eine einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäure von spezifischen Loci, wie zum Beispiel THO1, sein. Ein Reporter **40** schließt wenigstens einen einzigartigen Sequenzbereich **42** ein und enthält gegebenenfalls eine oder mehrere Wiederholungseinheiten **44**, die am terminalen Ende des einzigartigen Sequenzbereiches **42** angeordnet sind. Der Reporter **40** könnte keine Wiederholungseinheiten **44** aufweisen oder könnte eine oder mehrere Wiederholungseinheiten **44** umfassen. Wenn der Reporter markiert werden soll, ist ein Marker **46** damit verbunden. Üblicherweise ist der einzigartige Sequenzbereich **42** des Reporters **40** komplementär zum zweiten einzigartigen flankierenden Bereich **34** des Ziels **30**. Der Fänger **50** schließt einen einzigartigen Fängersequenzbereich **52** und eine oder mehrere Wiederholungseinheiten **54** ein, die am terminalen Ende des einzigartigen Fängersequenzbereiches **52** angrenzen. Wenn der Fänger **50** an ein Trägermaterial oder ein anderes Verankerungsmedium angebunden werden soll, kann ein Anbindungselement **56**, wie zum Beispiel Biotin, verwendet werden.

[0071] [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) sind schematische Skizzen des Multiplex-Assays, das eine Ziel-, Reporter- und eine Fängersequenz einschließt, in denen eine Lücke, Überlappung bzw. Entsprechung

existiert. Zur Vereinfachung wird die Nummerierung der [Fig. 2](#) hier für die entsprechenden Strukturen übernommen. In [Fig. 3A](#) existiert ein Lückenzustand. Allgemein gesprochen, wird das Ziel **30** mit dem Reporter **40** und dem Fänger **50** hybridisieren. Insbesondere wird der zweite einzigartige flankierende Bereich **34** mit dem komplementären Strang, der den einzigartigen Sequenzbereich **42** des Reporters **40** umfasst, hybridisiert. Auf vergleichbarer Weise wird der erste einzigartige flankierende Bereich **32** des Ziels **30** mit dem komplementären einzigartigen Fänger-Sequenzbereich **52** des Fängers **50** hybridisiert. In diesem Beispiel schließt das Ziel **30** acht Wiederholungseinheiten **36** ein. Die Struktur, wie bestens beschrieben, ist gleichermaßen auf die [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) anwendbar. [Fig. 3A](#) zeigt einen Lücken-Bereich **56**, der sich aus dem Fänger **50** mit sechs Wiederholungseinheiten **54** und dem Reporter **40** mit einer Wiederholungseinheit **44** ergibt. Demnach ist die Gesamtzahl der Wiederholungseinheiten **44**, **54** im Reporter plus Fänger sieben, was eine weniger ist als die Gesamtzahl der Wiederholungseinheiten **36** im Ziel **30**. In [Fig. 3B](#) wird ein Überlappungszustand dargestellt. Hier schließt der Fänger acht Wiederholungseinheiten **34** ein und der Reporter **40** schließt immer noch eine einzelne Wiederholungseinheit **44** ein. Hier liegt die Gesamtzahl von Wiederholungseinheiten **34**, **44** zwischen dem Fänger **50** und dem Reporter **40** bei neun, was die Anzahl der Wiederholungseinheiten **36** im Ziel **30** übersteigt, wobei eine Wiederholungseinheit überlappend ist, die hier dargestellt wird als die Wiederholungseinheit **44**, die mit dem Reporter **40** verbunden ist. [Fig. 3C](#) zeigt eine Entsprechung zwischen dem Ziel **30** und dem Reporter **40** plus Fänger **50**. Es gibt sieben Wiederholungseinheiten **34**, die mit dem Fänger **50** verbunden sind, und eine Wiederholungseinheit **44**, die mit dem Reporter **40** verbunden ist. Dementsprechend entspricht die Anzahl der Wiederholungseinheiten **36** im Ziel **30** der Anzahl der Wiederholungseinheiten **34** im Fänger **50** plus der Anzahl der Wiederholungseinheiten **44** im Reporter **40**.

[0072] [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#) zeigen ein Beispiel für spezifische Nukleotidsequenzen, die den Beispielen der [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) entsprechen. Man beachte, dass die Orientierung von links nach rechts in den [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) in den [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#) umgekehrt von links nach rechts ist. [Fig. 4A](#) zeigt einen Lückenzustand, in dem die Lücke **56** zwischen der Wiederholungseinheit **44** des Reporters **40** und der terminalen Wiederholungseinheit (5'CATT3') neben der Lücke **56** des Fängers **50** angeordnet ist. In [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#) ist die Basenwiederholungseinheit **36** des Ziels **30** 5'AATG3' und dementsprechend ist seine komplementäre Basensequenz 5'CATT3' **44**, **54**. In [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#) sind die Nukleotide der Basenwiederholungseinheit in Großbuchstaben dargestellt. Dies wird getan, um solche Ein-

heiten zur Unterscheidung gegenüber den Nukleotiden, die sowohl den ersten einzigartigen flankierenden Bereich **32** und den zweiten einzigartigen flankierenden Bereich **34** des Ziels **30** als auch den einzigartigen Sequenzbereich **42** des Reporters **40** und den einzigartigen Fänger-Sequenzbereiches **52** des Fängers **50** bilden, zu kennzeichnen. Wie man sehen kann, sind die Nukleotide im hybridisierten Strang gepaart, und zwar sind die A-T und G-C-Paare komplementär. [Fig. 4B](#) zeigt eine Fehlpaarung mit einer Überlappung einer Wiederholungseinheit. Besonders die Basenwiederholungseinheit **44**, die die Serie 5'CATT3' umfasst, wird von einem Hybridisierungszustand mit der Baseneinheit **36** neben dem zweiten einzigartigen flankierenden Bereich **34** des Ziels **30** versetzt. Wie dargestellt, wird das 5' terminale Nukleotid (gekennzeichnet als "c") des einzigartigen Sequenzbereiches **42** des Reporters **40** als leicht verrückt von der vollständigen Hybridisierung mit dem komplementären "g" terminalen Nukleotid des zweiten einzigartigen flankierenden Bereiches **34** des Ziels **30** dargestellt. Diese Darstellung ist optional und kann auch den Zustand einschließen, in dem das terminale Nukleotid des einzigartigen Sequenzbereiches **42** in einem hybridisierten Zustand mit dem terminalen Nukleotid des zweiten einzigartigen flankierenden Bereiches **34** des Ziels **30** vorliegt. [Fig. 4C](#) zeigt einen Entsprechungszustand, wobei in diesem Beispiel die Art des Wiederholungsbereiches, die sowohl die Anzahl der Wiederholungseinheiten partiell als auch ganz ist und die Komplementarität der Sequenz entsprechend sind. Im Entsprechungszustand der [Fig. 4C](#) liegt das 5' terminale Nukleotid "C" der Wiederholungseinheit **44** des Reporters **40** neben und zusammen mit dem 3' terminalen Nukleotid "T" der Basenwiederholungseinheit **54** des Fängers **50**, was eine Basenstapelung zwischen dem 5'"C" der Wiederholungseinheit **44** des Reporters **40** und dem 3'"T" der Basenwiederholungseinheit **54** des Fänger-Oligonukleotids **50** ermöglicht. Die beiden basengestapelten Nukleotide sind in [Fig. 4C](#) unterstrichen. In einer bevorzugten Ausführungsform kann der Hybridisierungskomplex über das Fänger-Oligo **50**, das die geeignete Chemie zur Anbindung enthält, bevorzugt Biotin an seinem 5'-Terminus verankern. Auch in einer bevorzugten Ausführungsform, würde der Hybridisierungskomplex über das Reporter-Oligo **40** mit einem geeigneten Molekül, bevorzugt einem Chromophor an seinem 3'-Ende, markiert sein.

[0073] Die Art einer Wiederholungseinheit ist hier definiert als bestehend aus sowohl der Anzahl der ganzen (oder integralen) Wiederholungseinheiten als auch der teilweisen Wiederholungseinheiten. Teilweise Wiederholungseinheiten, die auch als Mikrovarianten oder kryptisch einfache Sequenzen bekannt sind, können aus einzelnen Nukleotiddivergenzen der gebräuchlichsten Wiederholungseinheitssequenzen bestehen. Diese Divergenzen können aus Insertionen, Deletionen, Transitions- oder Transversions-

polymorphismen der einfachen Wiederholungssequenz bestehen. Da alle vorherigen Verfahren zur Analyse von STR-Loci von der Größe oder der Anzahl der Nukleotide abhingen, ist die Information über die Frequenz der Transitions- und Transitions-wiederholungseinheitspolymorphismen ungenügend. Jedoch haben andere Forscher kürzlich ihre Bedeutung erkannt und es ist wahrscheinlich, dass Verfahren, die sie wirksam detektieren können, wertvoll sein werden (Sean Walsh und Dennis Roeder, DNA Forensics, Science, Evidence and Future Prospects, McLean, VA., Nov. 1997).

[0074] [Fig. 25](#) verdeutlicht, wie diese Erfindung die Anwesenheit einer häufigen Mikrovariante THO1 9.3 detektiert. Zwei neue Entitäten werden hier präsentiert: Eine Mikrovarianten-Ziel-Sequenz **70**, die die teilweise Wiederholungseinheit **71**, ATG und ein Mikrovariantenreporter-Oligonukleotid **80**, das komplementär zu **71** ist, und die sieben 5' nebeneinander liegenden Nukleotide enthält. [Fig. 25](#) zeigt die Beziehung der DNA-Subsequenzen, wenn die Natur des Ziel-Allels neun ganzen Wiederholungseinheiten und einer teilweisen Wiederholung entspricht, was zu einer entsprechenden Übereinstimmung führt. Die Elemente, die bereits zuvor in [Fig. 4A–Fig. 4C](#) diskutiert worden sind, haben ihre numerische Bezeichnung beibehalten und neue Merkmale sind mit neuen Nummer markiert worden. Daher ist die Ziel-Sequenz **70** aus einer ersten einzigartigen Sequenz **34**, einer integralen Wiederholungssequenz **36**, einer zweiten einzigartigen flankierenden Sequenz **32** und der bisherigen teilweisen Wiederholungssequenz **71** zusammengesetzt. Die Fänger-Sequenz **50** ist identisch zu der, die in [Fig. 4A](#) beschrieben wird, mit der Ausnahme, dass sie nur drei Wiederholungseinheiten **54** aufweist. Der Mikrovariantenreporter **80** ist insofern vergleichbar mit dem Reporter **40**, dass er eine Wiederholungssequenz **44** aufweist, sich jedoch durch das Fehlen einer einzigartigen flankierenden Sequenz und durch den Einschluss der Sequenz **81**, die zum Ziel **70** der teilweisen Wiederholungseinheit **71** komplementär ist, unterscheidet. Die Reporter **80**-Stabilität wird durch zwei Merkmale verstärkt. Als erstes ist er nur zum Mikrovariantenbereich komplementär und zweitens wird er eine Basenstapelung ausbilden und daher eine Übereinstimmung oder ein lokales Stabilitätsmaximum nur an der Stelle erzielen, die das 3ru Fänger-Oligo enthält. Ein Fachmann wird erkennen, wie diese Erfindung auf Mikrovariantensequenzen, sich von der THO1 9.3 Sequenz unterscheiden, anzuwenden ist. [Fig. 26](#) demonstriert die Wirksamkeit dieses Verfahrens.

[0075] Die Auswahl der nebeneinander liegenden oder proximalen Nukleotide zum Erhöhen der Energiedifferenz zwischen übereinstimmenden und nicht-übereinstimmenden Teststellen wird auf vorteilhafte Weise angewendet. Eine detaillierte Diskussion solcher Auswahlen oder Modifikationen, wie zum

Beispiel die Verwendung der terminalen Nukleotidbasenstapelung oder die Modifikationen von terminalen Nukleotiden, wie zum Beispiel mit Propynyl-Gruppen, Methyl-Gruppen oder Cholesterol-Gruppen, oder durch die Verwendung von Ligationstechniken, wie zum Beispiel enzymatischer Ligation oder chemischer Ligation, werden weiter unten diskutiert.

[0076] [Fig. 5A–Fig. 5G](#) stellen eine schematische Darstellung eines Multiplexsystemes dar. Der in diesem System verwendete Hybridisierungskomplex wird manchmal als Sandwich-Assay bezeichnet. Wiederum entspricht zur einfacheren Erklärung die bereits vorgenommene Nummerierung derjenigen, die in den [Fig. 2](#), [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) und den [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#) verwendet worden ist. In jeder der Darstellungen weist jedes Ziel **30** einen einzigartigen flankierenden Bereich **32** und einen zweiten einzigartigen flankierenden Bereich **34** mit einem dazwischen liegenden Satz von Wiederholungseinheiten **36** auf. Im Beispiel ist die Anzahl der Wiederholungseinheiten **36** acht. Der Reporter **40** schließt einen einzigartigen Sequenzbereich **42** ein, der zum zweiten einzigartigen flankierenden Bereich **34** komplementär ist, und schließt in diesem Beispiel eine Wiederholungseinheit **44** am terminalen Ende des Reporters ein. Der Fänger **50** schließt einen einzigartigen Fängersequenzbereich **52** und, in diesem Beispiel, mehrere Wiederholungseinheiten **54** am terminalen Ende des Fängers **50** ein. Der einzigartige Fängersequenzbereich **52** ist komplementär zum ersten einzigartigen flankierenden Bereich **32**.

[0077] [Fig. 5A](#) zeigt einen Fänger **50** mit 4 Wiederholungseinheiten **54**. Da die Summe der Anzahl der Wiederholungseinheiten **54** im Fänger **50** plus der Anzahl der Wiederholungseinheiten **44** im Reporter **40** ($4 + 1$) geringer ist als die Anzahl von Wiederholungseinheiten **36** im Ziel **30** (acht) existiert eine Lücke **56**. Die Lücke, wie sie in [Fig. 5A](#) gezeigt wird, hat im Wesentlichen eine Länge von 3 Wiederholungseinheiten **36**, **44**, **54**. Der Terminologie nach wird die Anzahl der Wiederholungseinheiten **54** im Fänger **50** manchmal als "N-Fänger" bezeichnet, wobei N der Anzahl der Basenwiederholungseinheiten **54** im Fänger **50** plus der Anzahl von Basenwiederholungseinheiten **44** im Reporter **40** entspricht. Mit dieser Terminologie existiert eine Entsprechung mit einem N-Fänger, wenn N der Anzahl der Wiederholungseinheiten **36** im Ziel **30** entspricht. Demnach kann im Beispiel der [Fig. 5B](#), in dem ein Entsprechungszustand existiert, ein Fänger **50** mit 7 Wiederholungseinheiten **54** auch als "8-Fänger" bezeichnet werden, da der Fänger **50** mit 7 Wiederholungseinheiten **54**, wenn er mit diesen ausgewählten Reportern **40** mit einer einzelnen Wiederholungseinheiten **44** verwendet wird, eine Entsprechung bereitstellt, da die Gesamtzahl der Wiederholungseinheiten **44**, **54** der Anzahl der Wiederholungseinheiten **36** im Ziel entspricht. Für den Durchschnittsfachmann wird deutlich, dass verschie-

dene Benennungs- oder Nummerierungskonventionen verwendet werden können, um die grundlegenden Anordnungen zu beschreiben, und es sind diese grundlegenden Anordnungen, die die Erfindungen hierin umfassen und nicht die angenommenen Benennungs- oder Nummerierungskonventionen.

[0078] [Fig. 5B](#) zeigt einen Fänger 50 mit 5 Wiederholungseinheiten 54, wobei eine Lücke 56 mit einer Länge von im Wesentlichen 2 Wiederholungseinheiten 36, 44, 54 existiert. [Fig. 5C](#) zeigt einen Fänger 50 mit 6 Wiederholungseinheiten 54, wobei eine Lücke 56 mit im Wesentlichen einer Länge einer einzelnen Wiederholungseinheit 36, 44, 56 existiert. [Fig. 5D](#) zeigt einen Entsprechungszustand mit einem Fänger 50 mit 7 Wiederholungseinheiten 54 und einem Reporter 40 mit einer einzelnen Wiederholungseinheit 44, die der Anzahl der Wiederholungseinheiten 36 im Ziel 30 entspricht.

[0079] [Fig. 5E](#), [Fig. 5F](#) und [Fig. 5G](#) zeigen einen Überlappungszustand. [Fig. 5E](#) zeigt einen Fänger 50 mit 8 Wiederholungseinheiten 54. Wie dargestellt, wird die Reporter 40 -Wiederholungseinheit 44 in einem im Wesentlichen nicht-hybridisierten Zustand mit dem Ziel 30 gezeigt. [Fig. 5F](#) zeigt einen Fänger 50 mit 9 Wiederholungseinheiten 54, wobei eine terminale Wiederholungseinheit 58 des Fängers 50 und die Wiederholungseinheit 44 des Reporters 40 beide in einem im Wesentlichen nicht-hybridisierten Zustand in Bezug auf das Ziel 30 vorliegen. [Fig. 5G](#) zeigt einen Fänger 50 mit 10 Wiederholungseinheiten 54, so dass die zwei terminalen Wiederholungseinheiten 58 des Fängers 50 und die Wiederholungseinheit 44 des Reporters 40 in einer im Wesentlichen nicht-hybridisierten Beziehung mit dem Ziel 30 vorliegen.

[0080] [Fig. 6](#) zeigt eine Aufsicht auf ein Array von Teststellen für die Verwendung in einem Multiplex-Assay, wie zum Beispiel in einem Sandwich-Assay. Die übereinstimmende Teststelle wurde als an der Stelle liegend bestimmt, die die 7 Fänger-Wiederholungseinheit enthält. Diese Figur stellt ein Assay dar, das mit 1 Wiederholungseinheit-Reporter durchgeführt wird, daher kann man bestimmen, dass das Ziel 8 Wiederholungseinheiten enthalten muss, da an der übereinstimmenden Stelle die Anzahl der Wiederholungseinheiten im Fänger (7) plus der Anzahl von Wiederholungseinheiten im Reporter (1) 8 entspricht. Die Darstellung betrifft das Diagramm der [Fig. 5](#), in dem die Ergebnisse gezeigt werden, die bei der Analyse einer DNA-Probe, die ein Ziel mit acht Wiederholungseinheiten mit einem Wiederholungseinheiten-Reporter enthält, erzielt wurden.

[0081] [Fig. 7A](#) bis [Fig. 7G](#) sind schematische Darstellungen eines Multiplexsystems, wie zum Beispiel eines Sandwich-Assays, in dem der Reporter zwei Wiederholungseinheiten einschließt. Darin unter-

scheiden sie sich vom Assay der [Fig. 5A–G](#), in denen der Reporter eine einzelne Wiederholungseinheit einschließt. Wiederum wird zur einfacheren Darstellung die Nummerierung der vorherigen Figuren im Umfang der Übereinstimmung angepasst. [Fig. 7A](#) zeigt ein Ziel 30 mit einem ersten einzigartigen flankierenden Bereich 32 und einem zweiten einzigartigen flankierenden Bereich 34. Der Reporter 40 schließt einen einzigartigen Sequenzbereich 42 und, in diesem Beispiel, zwei Wiederholungseinheiten 44 ein. Die Fängersequenz 50 schließt einen einzigartigen Fängersequenzbereich 52 und 4 Wiederholungseinheiten 54 ein. Wiederum kann der Nomenklatur nach der Fänger 50 als ein "5-Fänger" bezeichnet werden, was die Terminologie widerspiegelt, die in Verbindung mit dem Assay der [Fig. 5A–Fig. 5G](#), nämlich denen, in denen ein Reporter 40 mit einer einzelnen Wiederholungseinheit 44 verwendet wird, verwendet wird.

[0082] [Fig. 7B](#) zeigt ein Multiplexsystem, wobei der Fänger 50 5 Baseneinheiten 54 einschließt. Jedes der Beispiele der [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) schließt eine Lücke 56 ein.

[0083] [Fig. 7C](#) zeigt einen Entsprechungszustand in dem die Anzahl der Wiederholungseinheiten 36 im Ziel 30 gleich der Summe der Anzahl von Wiederholungseinheiten 54 im Fänger 50 plus der Wiederholungseinheiten 44 im Reporter 40 ($6 + 2 = 8$) ist. [Fig. 7C](#) stellt die übereinstimmende Teststelle dar, in der ein Entsprechungszustand existiert. Man beachte, dass der aktuelle Genlocus der übereinstimmenden Teststelle sich von [Fig. 5D](#) zu [Fig. 7C](#) verschoben hat. Dies ist eine Widerspiegelung der Veränderung in der Anzahl von Wiederholungseinheiten 44 im Reporter 40. Wenn eine Sequenz oder Windung einer Einheit zunehmend längerer Fänger 50 verwendet wird, wird ein Reporter 40, der eine Baseneinheit 44 kürzer oder länger ist, die physikalische Anordnung der übereinstimmenden Teststelle, wie zum Beispiel in [Fig. 6](#), von der Teststelle 26D zu 26C verschieben, wenn von einem Reporter mit einer Wiederholungseinheit 44 zu einem Reporter 40 mit zwei Wiederholungseinheiten 44 gewechselt wird.

[0084] [Fig. 7B–Fig. 7G](#) zeigen einen Überlappungszustand. In [Fig. 7D](#) ist eine Wiederholungseinheit 44 des Reporters 40 in einer hybridisierten Beziehung mit einer Wiederholungseinheit 36 des Ziels 30. Eine zweite Wiederholungseinheit 44 des Reporters 40 liegt in einem fehlgepaarten, überlappenden Zustand mit dem Komplex vor. [Fig. 7E](#) zeigt einen Überlappungszustand, in dem die Wiederholungseinheiten 60 sich in einem nicht-hybridisierten Zustand mit dem Ziel 30 befinden. [Fig. 7F](#) und [Fig. 7G](#) schließen auch Fehlpaarungsanordnungen ein, die eine Überlappung einschließen, wobei mehrere Wiederholungseinheiten 60 sich in einem nicht-hybridisierten Zustand mit dem Ziel 30 befinden. Die fehlge-

paarten Wiederholungseinheiten können die vom Reporter **30** oder vom Fänger **50** oder einer Kombination von beiden sein.

[0085] [Fig. 8](#) zeigt eine Aufsicht auf ein Array von Teststellen für die Verwendung in einem Multiplex-Assay, wie zum Beispiel in einem Sandwich-Assay. Die übereinstimmende Teststelle wird an der Stelle liegend bestimmt, die einen Fänger mit 6 Wiederholungseinheiten enthält. Dieser Assay stellt ein Assay dar, das mit einem Reporter mit 2 Wiederholungseinheiten durchgeführt wird, wodurch man bestimmen kann, dass das Ziel **8** Wiederholungseinheiten enthalten muss, da an der übereinstimmenden Stelle die Anzahl der Wiederholungseinheiten im Fänger (**6**) plus der Anzahl der Wiederholungseinheiten im Reporter (**2**) **8** entspricht. Die Darstellung betrifft das Diagramm der [Fig. 7A–Fig. 7G](#), in dem es die Ergebnisse zeigt, die bei der Analyse einer DNA-Probe, die ein Ziel mit 8 Wiederholungseinheiten mit einem Reporter mit 2 Wiederholungseinheiten enthält, erzielt werden. Im Vergleich mit [Fig. 6](#) sollte man die Veränderung in der Anordnung der übereinstimmenden Teststelle und der Bestätigung der Ziel-Allel Bestimmung beachten, wenn die Ziel-DNA mit einem zweiten Reporter-Oligonukleotid redundant untersucht wird.

[0086] [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) zeigen schematische Ansichten einer Ausbuchtungs (Loopout)-Ausführungsform der Erfindung. In den Figuren schließt ein Fänger **60** eine erste einzigartige flankierende Sequenz **62**, eine zweite einzigartige flankierende Sequenz **64** und eine dazwischen liegende Sequenz von Wiederholungseinheiten **66**, die eine oder mehrere Wiederholungseinheiten umfasst, ein. Ein Reporter **70** schließt eine erste einzigartige flankierende Sequenz **72** eines Reporters, eine zweite einzigartige flankierende Sequenz **74** eines Reporters und eine dazwischen liegende Sequenz von Wiederholungseinheiten **76** ein. Die Anzahl der Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **76** des Reporters **70** kann die gleiche sein oder unterschiedlich sein zur Anzahl der Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **66** des Fängers **60**. Ein Reporter-Marker **78** kann enthalten sein.

[0087] [Fig. 10A](#) bis [Fig. 10G](#) sind Darstellungen von Multiplexsystemen mit einer variablen Länge der Wiederholungseinheiten. Die Nummerierung der [Fig. 7–10](#) wird die von den [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) im praktikablen Umfang übernehmen. In [Fig. 10A](#) schließt ein Fänger **60** eine erste einzigartige flankierende Sequenz **62**, eine zweite einzigartige flankierende Sequenz **64** und eine dazwischen liegende Sequenz von Wiederholungseinheiten **66** mit **5** Wiederholungseinheiten ein. Der Reporter **70** schließt eine erste einzigartige flankierende Sequenz **72** eines Re-

porters, eine zweite einzigartige flankierende Sequenz **74** eines Reporters und eine dazwischen liegende Sequenz von Wiederholungseinheiten, besonders **7** Wiederholungseinheiten, ein. Ein Fehlpaarungs- oder Loopout-Zustand existiert bei gegebener unterschiedlicher Anzahl von Wiederholungseinheiten in den dazwischen liegenden Sequenzen **66**, **76**. Auf die gleiche Weise existiert in [Fig. 10B](#) und [10D–Fig. 10G](#) ein Fehlpaarungs- oder Loopout-Zustand. Jede der Komponenten der Figuren schließt **7** Basenwiederholungseinheiten im Reporter **70** ein. Eine Windung oder Sequenz mit gleich bleibender ansteigender Anzahl von Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **66** des Fängers **60** wird dargestellt. [Fig. 10B](#) schließt **6** Wiederholungseinheiten ein, wobei dies immer noch einen Fehlpaarungs- oder Loopout-Zustand in [Fig. 10B](#) ergibt, wo die überschüssigen Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz **66** des Reporters **70** hervorsteht. In jeder der [Fig. 10D–Fig. 10G](#) überschreitet die Anzahl der Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz **66** im Fänger **60** die Anzahl der Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz **76** des Reporters. Es existiert dann ein Loopout- oder Fehlpaarungszustand. In [Fig. 10D](#) existieren **8** Wiederholungseinheiten innerhalb der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **64**, die sich durch eine Wiederholungseinheit von der Anzahl innerhalb der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **76** eines Reporters unterscheiden. In [Fig. 10E](#) gibt es **9** Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **64** im Fänger **60**. In [Fig. 10F](#) gibt es **10** Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **64** des Fängers **60**. In [Fig. 10G](#) gibt es **11** Wiederholungseinheiten in der dazwischen liegenden Sequenz von Wiederholungseinheiten **64** des Fängers **60**.

[0088] In einem Modus wird der Hybridisierungskomplex markiert, und der Schritt des Bestimmens der Übereinstimmung und Nicht-Übereinstimmung schließt das Detektieren der Mengen an markiertem Hybridisierungskomplex an den Teststellen ein. Die Detektionsvorrichtung und das Verfahren können einschließen, sind jedoch nicht begrenzt auf: optische Bildgebung, elektronische Bildgebung, Bildgebung mit einer CCD Kamera und integrierte optische Bildgebung. Weiterhin wird die Detektion, entweder markiert oder unmarkiert, quantifiziert, was statistische Analysen einschließen kann. Der markierte Abschnitt des Komplexes kann sein: das Ziel, der Fänger, der Reporter oder der Hybridisierungskomplex in toto. Die Markierung kann eine Fluoreszenzmarkierung sein, die aus der Gruppe ausgewählt wird, jedoch nicht begrenzt ist auf: Bodipy Texas Red, Bodipy Far Red, Lucifer Yellow, Bodipy 630/650-X, Bodipy R6G-X und 5-CR 6G. Die Markierung kann weiterhin

mittels kolorimetrische Markierung, Biolumineszenzmarkierung und/oder Chemilumineszenzmarkierung durchgeführt werden. Die Markierung kann weiterhin den Energietransfer zwischen Molekülen im Hybridisierungskomplex einschließen, mittels: Perturbationsanalyse, Löschung, Elektronentransport zwischen Donor- und Akzeptormolekülen, wobei das letztere durch doppelsträngige, übereinstimmende Hybridisierungskomplexe erleichtert werden kann (siehe, z.B., Tom Meade und Faiz Kayyem, Elektronentransport durch DNA). Wenn der Hybridisierungskomplex unmarkiert ist, kann die Detektion gegebenenfalls durch die Messung der Leitfähigkeitsdifferenzials zwischen doppelsträngiger und nicht-doppelsträngiger DNA durchgeführt werden (siehe, z.B., Tom Meade und Faiz Kayyem, Elektronentransport durch DNA). Weiterhin kann die direkte Detektion durch auf porösem Silikon basierender optischer Interferometrie erzielt werden.

[0089] Der Marker kann amplifiziert sein und kann zum Beispiel verzweigte oder dendritische DNA einschließen. Wenn die Ziel-DNA gereinigt wird, kann sie unamplifiziert oder amplifiziert sein. Wenn ferner das gereinigte Ziel amplifiziert ist und die Amplifikation ein exponentielles Verfahren ist, kann es zum Beispiel PCR amplifizierte DNA oder SDA amplifizierte DNA sein. Lineare Verfahren der DNA Amplifikation, wie zum Beispiel rollender Kreis oder run-off-Transkription, können verwendet werden. Wenn die Ziel-DNA ungereinigt und unamplifiziert oder amplifiziert ist, bestehen die Amplifikationsverfahren weiterhin aus PCR und SDA zur exponentiellen Amplifikation und rollender Kreis oder run-off-Transkription für die lineare Amplifikation.

[0090] Die Ziel-DNA kann aus einer Gewebequelle stammen, die einschließt, jedoch nicht begrenzt ist auf: Haar, Blut, Haut, Sputum, fäkale Masse, Samen, Epithelzellen, Endothelzellen, Lymphozyten, rote Blutzellen, Beweisen von Kriminaldelikten. Die Quelle der Ziel-DNA kann einschließen: normales Gewebe, erkranktes Gewebe, Tumorgewebe, Pflanzenmaterial, tierisches Material, Säugetiere, Menschen, Vögel, Fisch, mikrobielles Material, xenobiotisches Material, virales Material, bakterielles Material und Protozoenmaterial.

[0091] Wobei das Ziel-Material von klonierten Organismen stammt (Ian Wilmut, Roslyn Institute, Edingborough), um den Identitätsgrad und das Niveau des genetischen Drifts zu bestimmen.

[0092] Weiterhin kann die Quelle des Ziel-Materials RNA einschließen. Noch weiter kann die Quelle des Ziel-Materials Mitochondrien-DNA einschließen.

BEISPIELE

Beispiel 1 – Identifikation von THO1 Ziel-DNA-Allelen durch das Sandwich-Hybridisierungsverfahren

[0093] Der THO1-Genlocus enthält die Tetranukleotidwiederholung (AATG), die in fünf bis elf Kopienzahlen in einem nicht kodierenden Bereich des menschlichen Tyrosin-Hydroxylasegens (ref) vorliegt. Dieser Genlocus ist einer von vielen gebräuchlich verwendeten und durch die Gemeinschaft der Forensiker für DNA Fingerabdrücke akzeptierten. **Fig. 1** stellt Daten von einem Experiment dar, das entworfen wurde, um die Identität der Allele zu bestimmen, die in einer unbekannten Ziel-DNA-Probe nach der Analyse durch das hierin beschriebene Verfahren vorhanden sind.

[0094] Ein Silikonchip wurde durch das Rotationsbeschichten der Oberseite der Elektroden mit einer organischen Schicht an Agarose, die mit Streptavidin vermischt ist, hergestellt, wodurch die Permeationsschicht, die als das darunter liegende Fundament für die DNA-Anbindung dient, gebildet wird (siehe z.B., Sosnowski et al., 1997, Proceedings of the National Academy of Science USA). Diese Permeationsschicht grenzt auf einer Seite an die Elektrode und grenzt auf der anderen Seite an den Puffer, der den Analyten enthält. Die Fänger-DNA, die für jedes THO1-Allel spezifisch ist, wurde dann elektronisch individuellen Stellen auf dem rotationsbeschichteten Chip zugewiesen, so dass jede Teststelle ein anderes THO1-Allel detektieren kann. Sequenzen für die Fänger-Oligos sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Fänger-Oligos wurden elektronisch in einem 50 mM Histidinpuffer bei seinem natürlichen pH ~5,4, bei einer Konzentration von 500 nM zugewiesen. Die Felder waren einseitig positiv, jeweils 5, und eine Stromquelle von + 4,0 MikroAmp (A) wurde für 38 Millisekunden (ms) angelegt. Die Polarität des Feldes wurde dann umgekehrt und - 4,0 A wurden für 25 ms an die 5 Felder angelegt. Dieser Zyklus wurde 500 mal für eine elektronische Zuweisungszeit von insgesamt ~30 Sekunden wiederholt. Unter diesen Bedingungen reagiert der Biotin-Rest des Fänger-Oligos mit dem Streptavidin in der Permeationsschicht über der aktivierten Teststelle, um das Fänger-Oligo der Stelle zu immobilisieren.

[0095] Eine Mischung komplementärer Ziel-DNA, die aus den THO1-Allelen 5 und 9 (Tabelle 1) zusammengesetzt ist, wurde dann elektronisch mit jeder der Stellen, die zugewiesene Fänger-DNA enthält, hybridisiert. Die elektronische Hybridisierung wurde in einem zwitterionischen Puffer niedriger Konduktivität bei einer Temperatur, die empirisch bestimmt worden ist, um eine nicht verrutschende Hybridisierung zu fördern, durchgeführt. Aufgrund der Natur der elektronischen Hybridisierung kann besonders der niedrig konduktive Puffer (Edman et al., Nucleic Acids Research, 1997) eine hoch stringente Hybridisierung

bei niedrigeren Temperaturen erreichen, als eine konventionelle, nicht elektronische Hybridisierung. Experimente für die THO1 Analyse wurden für gewöhnlich bei 34–42°C durchgeführt. Die Ziel-DNA wurde in einem 50 mM Histidin-Puffer bei seinem natürlichen pH ~5,4, bei einer Konzentration von 5–125 nM elektronisch hybridisiert. Das programmierte elektronische Protokoll schließt die folgenden Schritte ein. Die Felder wurden einseitig positiv, jeweils 5 und eine Stromquelle von +4,0 MikroAmp (A) wurde für 19 Millisekunden (ms) angelegt. Die Polarität des Feldes wurde dann umgekehrt und –4,0 A wurden an den gleichen 5 Feldern für 12 ms angelegt. Dieser einseitige AC-Zyklus wurde 500 mal wiederholt, für eine elektronische Adressierungszeit von insgesamt ~30 Sekunden.

[0096] Dieses Experiment wurde ebenfalls durch passive, nicht elektronische Hybridisierung bei stark stringenten Bedingungen, jedoch mit viel längeren Inkubationszeiten (50 mM NaPO₄-Puffer, pH 7,0, 60°C, 30–60 Minuten, Ergebnisse nicht dargestellt) durchgeführt.

[0097] Die Stringenz dieses Hybridisierungsschrittes ist aufgrund der anpassungsfähigen Natur der komplementären Ausrichtung der Tetranukleotidwiederholung kritisch. Es ist recht einfach stabile Hybride zu erhalten, ohne die flankierenden einzigartigen Sequenzen auszurichten, da die Länge der Wiederholungseinheit **20–44** Basen ist. Die Hybride, die außerhalb des Registers liegen, die durch unzureichende Stringenz gebildet wurden, werden durch kein Hybridisierungsassay akkurat unterschieden werden können. Die hoch stringente Hybridisierung kann bei relativ niedrigen Temperaturen mittels elektronischer Hybridisierung aufgrund der geringen Konduktivität des Puffers und der sich daraus ergebenden niedrigen Abschirmung der repulsiven negativen Ladung auf dem DNA-Rückgrat erreicht werden. Die elektronische Konzentrierung der DNA überwindet diese repulsiven Effekte, während hoch stringente Hybridisierungsbedingungen beibehalten werden.

[0098] Reporter-DNA, 1 Wiederholungseinheit (**Fig. 13**, 500 nM in 50 mM NaPO₄, 500 mM NaCl, pH 7,0) wurde dann mit den Fänger-Ziel-Komplexen, die durch die obigen Schritte gebildet wurden, hybridisiert. Die Reporter-Hybridisierung war am stabilsten an solchen Teststellen, an denen das Ziel (Target) die Hybridisierung regelt, um eine Nebeneinanderstellung der terminalen Nukleotide des Fängers und des Reporter-Oligos zu ermöglichen. Diese zusätzliche Stabilität ergibt sich aufgrund der Basenstapelung der terminalen Nukleotide. Diese Nebeneinanderstellung wird sein 5'-3' oder 3'-5', abhängig von der Position der angebundenen Chemie auf dem Fänger-Oligo. Unstabile Konfigurationen wären eine Vierbasen (oder größer)-Lücke zwischen dem Fänger und dem Reporter oder eine Vierbasen (oder größer)-Überlap-

pung des Fängers und des Reporters (siehe, z.B., **Fig. 3A–Fig. 3C** und **Fig. 5A–Fig. 5G**).

[0099] Nach der Reporter-Hybridisierung wird der mit DNA beladene Chip mehrmals mit 50 mM NaPO₄, pH 7,0 bei Umgebungstemperatur gewaschen. Die Temperatur des hybridisierten Organo-Chips wird dann auf 30°C erhöht und die Fluoreszenzniveaus an jeder Teststelle werden in 1-minütigen Zeitintervallen aufgenommen. Die Fluoreszenzwerte werden durch ein Computerprogramm (IP Lab) als durchschnittliche Pixelintensität digitalisiert. Ein spezifischer Bereich über jedem Feld wird ausgewählt und die Pixelintensität für jede Stelle wird für die Analyse gespeichert. Dieses Histogramm in **Fig. 11** zeigt die durchschnittliche Pixelintensität an jeder Teststelle unmittelbar nachdem der Denaturierungsschritt beendet ist.

[0100] **Fig. 11** zeigt einen Graphen der Fluoreszenz als Funktion der Anzahl von Wiederholungseinheiten. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine heterozygote Mischung von THO1-DNA in entsprechende (übereinstimmende) und fehlgepaarte (nicht-übereinstimmende) Hybride aufgelöst werden können, wobei die entsprechenden Hybride die Identität der Allele repräsentieren, die in der DNA-Probe vorhanden sind. Alle möglichen homozygoten und heterozygoten THO1-STR Allel-Kombinationen (5 + 6, 5 + 7, 5 + 8 etc.) sind mittels des Chipformats analysierte worden, wie zum Beispiel in **Fig. 1A** und **Fig. 1B** gezeigt, mit ähnlich hervorragenden Diskriminierungsniveaus unter den Allelen.

Beispiel 2 – Wiederholungsanalyse der Ziel-DNA mit redundanten Reportern

[0101] Ein Reporter mit einer Wiederholungseinheit wurde von den entsprechenden Stellen auf dem Chip, die im vorherigen Beispiel beschrieben wurden, durch Erhöhen der Temperatur ~50°C denaturiert, Zustände, die das Ziel nicht vom Fänger ab denaturieren. Dieser Chip wurde dann mit dem Reporter ohne Wiederholungseinheit (siehe, z.B., **Fig. 5**) rehybridisiert. Dies verschiebt die Position der stabilen Sandwich-Komplexe von den 4 und 5 Stellen (siehe, **Fig. 12**, linke Seite, Reporter mit einer Wiederholungseinheit) auf die 5 und 6 Stellen (**Fig. 12**, rechte Seite, Reporter ohne Wiederholungseinheit). Unter Verwendung der Formel, dass die Anzahl der Wiederholungseinheiten im Fänger plus der Anzahl der Wiederholungseinheiten im Reporter der Anzahl der Wiederholungseinheiten im Ziel entspricht, fanden wir heraus, dass die Ziel-DNA in diesem Fall eine heterozygote Mischung der 5 und 6 Allele von THO1 aufwies. Die Wiederholungsanalyse bestätigt die Identität der Allele, die in der Ziel-DNA mit einer zweiten Oligo-Sequenz vorhanden sind. Diese redundante Analyse erhöht die Bedeutung des Assayergebnisses, da es im Wesentlichen eine neue Abfrage der

Ziel-DNA mit einem Oligo ist, das eine andere Sequenz aufweist. Die Verwendung einer anderen Sequenz verringert die Möglichkeit von Artefakten aufgrund von sekundären Strukturen der Oligos oder anderen sequenzbezogenen Anomalien. Daher verringert die Verwendung von zusätzlichen Oligos zur Ziel-Analyse die Möglichkeit von falsch-positiven und/oder negativen Ergebnissen.

[0102] Das obige Protokoll wurde mit dem Reporter mit zwei Wiederholungseinheiten (siehe, z.B., [Fig. 7A–Fig. 7G](#)) wiederholt, um den Genlocus der stabilen, entsprechenden Hybride an eine dritte Teststelle zu verschieben. Diese zusätzliche Wiederholung der STR-Analyse stärkt weiter die Robustheit des Assays.

Beispiel 3 – Auswahl und/oder Modifikationen von terminalen Nukleotiden zum Erhöhen von Basenstapelungseffekten

[0103] Die Basenstapelung hängt von der Wechselwirkung der Ringstruktur einer Base mit dem Basenring seines nächsten Nachbarn ab. Gemäß empirischen Bestimmungen hängt die Stärke dieser Wechselwirkung vom Typ der involvierten Ringe ab. Die Anmelder wünschen nicht durch irgendeine Theorie gebunden zu sein, zu den möglichen theoretischen Erklärungen für dieses Phänomen gehören die Anzahl der verfügbaren Elektronen zwischen den zwei Basen, die an Pi-Bindungs-Wechselwirkungen partizipieren, und die Wirksamkeit der verschiedenen Basenkombinationen, um Wasser aus dem Inneren der Helix auszuschließen, wodurch die Entropie erhöht wird. Obwohl die obigen Modelle mit den derzeitigen Daten konsistent sind, sind die möglichen Mechanismen der Stapelungswechselwirkungen nicht auf diese Konzepte begrenzt.

[0104] Es ist ebenfalls beobachtet worden, dass die Modifikation von Basen, die an Basenstapelungswechselwirkungen beteiligt sind, die Pi-Bindung oder Stapelung zwischen ihnen stärken kann. Wie man anhand der oben beschriebenen Modelle vorhersagen kann, stellen diese Modifikationen mehr Elektronen für die Verwendung in einer Pi-Bindung bereit und/oder um die Oberfläche der Ringe zu erhöhen, wodurch die Fläche der Hydrophobie zwischen den gestapelten Basen erhöht wird.

[0105] [Fig. 14](#) stellt ein Beispiel dieser Modelle dar, wie sie in dieser Erfindung angewendet werden. Anfängliche Experimente mit dem CSF1PO Genlocus verwendeten ein A und T als terminale Nukleotide, um das Unterscheiden der Basenstapelung bereitzustellen. Die Referenzen zeigen an, dass die A-T Basenstapelungswechselwirkungen die am wenigsten stabilen von allen Nukleotidkombinationen sind. Daher veränderten wir das Design der Fänger- und Reporter-Oligos, um G und A zu den terminalen Nukle-

otiden zu machen, da von diesen berichtet wird, dass sie eine viel stabilere Konformation bilden. Das Experiment wurde mittels des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens durchgeführt, mit der Ausnahme, dass der untersuchte Genlocus CSF1PO war. Um die Basenstapelungsbeiträge von verschiedenen nebeneinander liegenden, angrenzenden, terminalen Nukleotiden zu vergleichen, wurde ein zusätzlicher CSF1PO-Fänger und Reporter entworfen, um die terminalen Nukleotide von T-A auf G-A zu wechseln. [Fig. 15](#) vergleicht die Unterscheidung von entsprechenden zu fehlgepaarten Hybriden, die entweder A-T oder G-A terminale Nukleotide enthalten. Die Ergebnisse werden als Unterscheidungsverhältnisse gezeigt, d.h. die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der übereinstimmenden Stelle geteilt durch die durchschnittliche MFI der nicht-übereinstimmenden Stellen. Man sieht, dass die Diskriminierungsverhältnisse sich von etwa 2,5 auf etwa 25 erhöhen, wenn G-A terminale Nukleotide anstelle von T-A terminalen Nukleotiden verwendet werden. Diese Daten zeigen, dass dieses System auf eine Art und Weise moduliert werden kann, die durch die Basenstapelungstheorie als auch aufgrund früherer Beobachtungen vorhergesagt werden kann, wodurch unterstrichen wird, dass der Mechanismus der Erfindung von einer Pi-Bindung zwischen angrenzenden Basen abhängt.

[0106] Zusätzlich dazu, dass man die natürlich ausgewählten Basenstapelungswechselwirkungen ausnutzt, könnte man vorhersagen, dass Basenmodifikationen, die die Anzahl der Elektronen im Ring erhöhen oder die hydrophoben Bereiche vergrößern, auch die Unterscheidung entsprechender von fehlgepaarten Hybride(n) erhöhen würden. Dies wurde durch Synthetisieren von THO1-Reporter-Oligos getestet, dessen 5' terminales Nukleotid eine Propynyl-Gruppe enthielt, die an den Ring der Base angebunden war. Man würde vorhersagen, dass diese Modifikation die Basenstapelung entweder durch das Erhöhte-Elektronen- oder das Hydrophobiemodell, die weiter oben beschrieben wurden, verstärken würde. [Fig. 15](#) zeigt die Entsprechungs-/Fehlpaarungsergebnisse in einem direkten Vergleich eines THO1-Reporters mit oder ohne eine mit Propynyl modifizierte terminale Base. Dieses Experiment wurde wie in Beispiel 1 beschrieben mit dem THO1-Genlocus durchgeführt. Die Daten werden wiederum als Diskriminierungsverhältnisse dargestellt. In 4 separaten Experimenten wird eine erhöhte Stabilität in Komplexen beobachtet, die Reporter mit Propynylmodifizierten Reportern enthalten. Die durchschnittliche Erhöhung der Unterscheidungsverhältnisse lag bei 95%. Die Ergebnisse zeigen wiederum, dieses System kann auf vorhersagbare Weise manipuliert werden. Dieses Konzept könnte durch Zugabe anderer Analoga, wie zum Beispiel Methyl oder Cholesterol-Gruppen weiter vorangetrieben werden. Techniken zum Hinzufügen dieser Modifikationstypen sind

bekannt (z.B. Gryaznov).

[0107] Diese Modifikationen könnten verwendet werden, um durch Verknüpfen der modifizierten Moleküle miteinander die Bindung des Reporters an die übereinstimmende Stelle weiter zu stabilisieren. Ein Beispiel dafür lehrt Gryaznov durch die Verwendung von Cholesterol an beiden terminalen Nukleinsäuren und der Zugabe eines Cholesterol bindenden Moleküls, wie z.B. eines Lipoproteins niedriger Dichte (LDL). Dies würde einen Komplex an der übereinstimmenden Stelle ergeben, der aus dem Ziel, dem Cholesterol modifizierten Fänger, dem Cholesterol modifizierten Reporter und LDL besteht.

Beispiel 4 – Hybridisierungsdetektion von TPOX-Allelen

[0108] Der TPOX-Genlocus enthält die Tetranukleotidwiederholung (AATG), die in sechs bis dreizehn Kopienzahlen in einem nicht-kodierenden Bereich des menschlichen Thyroidperoxidasegens vorkommt (siehe, z.B., Anbach et al., 1996, Advanced in Forensic Haemogenetics). Dieser Genlocus ist auch einer von vielen gebräuchlich verwendeten und durch die Gemeinschaft der Forensiker für DNA Fingerabdrücke akzeptierten. Die Sequenzen werden in [Fig. 17](#) dargestellt.

[0109] [Fig. 16](#) stellt Daten von einem Experiment dar, in dem Ziel-DNA, die die TPOX 8 und 11 Allele enthält, durch ein Verfahren, das mit dem in Beispiel 1 beschriebenen fast identisch ist, analysiert wurde. Oligo-Fänger-DNA, die alle allelen Möglichkeiten enthält, wurde individuelle Stellen auf dem Chip elektronisch zugewiesen. Eine Mischung komplementärer Ziel-DNA, die aus TPOX-Allelen mit 8 und 11 STR's zusammengesetzt ist, wurde dann mit jedem der Felder, die zugewiesene Fänger-DNA enthalten, elektronisch hybridisiert. Die Bedingungen für die elektronische Hybridisierung waren die gleichen, wie die in Beispiel 1 beschriebenen. Ein Reporteroligo mit einer Wiederholungseinheit wurde dann passiv mit dem Array hybridisiert und in der Art und Weise des THO1 Beispiels behandelt. [Fig. 16](#) zeigt einen stabilen Hybridisierungskomplex an den Teststellen, die Fänger-Oligos mit 7 und 10 Wiederholungseinheiten enthalten. Da der Reporteroligo eine Wiederholungseinheit aufweist, kann identifiziert werden, dass die Ziel-DNA 8 und 11 Wiederholungseinheiten aufweist.

[0110] Die Ergebnisse zeigen, dass eine Mischung aus TPOX 8 und 11 STR DNA eindeutig von allen Fehlpaarungen unterschieden werden kann. Weiterhin erzielten alle anderen analysierten homozygoten und heterologen TPOX Kombinationen vergleichbare Unterscheidungen.

Beispiel 5 – Hybridisierungsunterscheidung von CSF1PO-Allelen

[0111] Fänger-Oligos, die CSF1PO-Allele 7 bis 15 ([Fig. 19](#)) inklusive enthalten, wurden elektronisch repräsentativen Stellen, wie zuvor bereits beschrieben, zugewiesen. Ziel-DNA, die CSF1PO 11 und 12 Allele ([Fig. 19](#)) enthält, wurde dann elektronisch mit jeder Stelle hybridisiert. Die Denaturierung des Reporters wurde bei 30°C durchgeführt. [Fig. 18](#) zeigt die durchschnittliche Pixelintensität an verschiedenen Fänger-Stellen nach dem Assay, was die Fähigkeit des Assays, die in der Ziel-Probe vorhandenen Allele korrekt zu unterscheiden, deutlich macht. Das Experiment wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Beispiel 6 – THO1/TPOX Multiplexanalyse

[0112] Genlocus-Allele spezifische Fänger-Oligos wurden individuell verschiedenen Stellen auf einem einzelnen Chip zugewiesen. Der DNA-Chip, der Fänger-Oligos enthält, wurde dann mit einer Mischung von THO1 und TPOX Ziel-DNA, die heterozygote Allele enthält, hybridisiert. Der Chip wurde dann gewaschen und durch das Hybridisierungsassay in der bereits zuvor beschriebenen Form analysiert. Die obigen Schritte wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Die relativen Fluoreszenzniveaus wurden verwendet, um zu bestimmen, ob Stellen übereinstimmende oder nicht-übereinstimmende DNA-Hybridkomplexe enthalten. Beide verwendeten Reporter enthielten eine Wiederholungseinheit.

[0113] Die Ergebnisse aus [Fig. 20](#) zeigten, dass unter den Assaybedingungen 7 und 9 STR Allele von THO1 sehr gut mit ihren Erkennungsfängerstellen hybridisierten. Die Hybridisierung mit anderen Fänger-Allelen war nicht detektierbar (5x, 7x, 9x und 10x), was eine hervorragende Diskriminierung der THO1 7/9 Heterozygote anzeigt. Für den TPOX Genlocus erhielten wir auch eine gut entsprechende Fänger/Ziel-Wechselwirkung (Stellen 9x und 11x). Weiterhin war die Stabilität der nicht-übereinstimmenden Hybridisierungskomplexe, die sich mit den 10 und 12 STR-Zielen gebildet haben, so niedrig, dass die Komplexe entweder undetektierbar waren (7xc und 12xc) oder sie waren niedrig genug, um ein Unterscheidungsverhältnis von 15-fach oder höher zu erzielen (10xc bzw. 8xc), was eine einfache Unterscheidung des TPOX 10/12 heterozygoten Ziels ergibt.

Beispiel 7 – Identifikation von STR-Allelen in doppelsträngiger, PCR amplifizierter DNA

[0114] Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die Verwendbarkeit der vorliegenden Erfindung zu bestimmen, so wie sie auf die Frage der doppelsträngigen DNA, die durch PCR Amplifikation generiert wurde, angewendet wurde. [Fig. 6](#) stellt ein Beispiel

der Fähigkeit unseres Systems zur akkuraten Identifizierung von PCR generierten Zielen dar.

[0115] Der TPOX1-Genlocus wurde unter Verwendung einer genomischen Matrize der K562 Zelllinie unter Einhaltung von Standardbedingungen, wie sie in der Promega STR Gebrauchsanweisung (3) dargestellt werden, PCR amplifiziert. Der Genotyp von K562 ist heterozygot für die 8 und 9 Wiederholungsallele. Nach der Amplifikation wurde das Amplicon bei 95°C denaturiert und mit einem Nanogen APEX-Chip hybridisiert. Wie zuvor bereits diskutiert, wies der Chip Fänger-Sonden auf, die für PCR Produkte, die jede Anzahl von Wiederholungslängen enthalten, einzigartig waren.

[0116] Die technischen Aspekte dieses Experiments waren, mit Ausnahme der Verwendung von doppelsträngiger, PCR amplifizierter DNA als Ziel, identisch mit den in Beispiel 1 und 4 beschriebenen.

[0117] [Fig. 21](#) zeigt die relative Menge des Signals, das als positiv (8C, 9C Entsprechung) und negativ (7C, 10C Fehlpaarung) vorhanden war, nachdem das Experiment durchgeführt worden ist. Wie in Beispiel 4 zu sehen, variiert das zu erreichende Diskriminierungsniveau von 20-fach bis unendlich. Vergleichbare Ergebnisse wurden unter Verwendung von CSF1 und THO1, sowohl mit K562 Kontroll-DNA als auch genomischer DNA, die von anonymen Spendern isoliert wurde, erhalten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die vorliegende Erfindung im Allgemeinen auf alle doppelsträngige DNA anwendbar ist, ob sie nun durch PCR oder eine andere Technologie amplifiziert wurde, einschließlich der Möglichkeit zur Analyse von unamplifizierter DNA.

Beispiel 8 – Multivariantendetektion

[0118] In den vorher aufgelisteten Beispielen wurde die Detektion durch direkte Fluoreszenzmarkierung des Reporters oder der Reporter/Ziel-DNA durchgeführt. Eine Ausführungsform wäre die Fluoreszenzstörung bei der Quencher und Reporter-Chromophor proximal zueinander positioniert werden, so dass die Fluoreszenz gelöscht wird. Siehe, z.B., (Verfahren zur Hybridisierungsanalyse mittels elektronisch kontrollierter Hybridisierung und Verfahren zur elektronischen Fluoreszenzstörung zur Analyse, und elektronische Störungskatalyse zur Synthese).

[0119] Oligosynthese, und Konjugationsverfahren und Materialien werden wie üblich genutzt. Kurz dargestellt, würde die Fänger-Sonde einen Bindungsrest, wie zum Beispiel Biotin, an einem Ende und ein Chromophor am distalen Terminus oder dem Terminus, der sich in den STR-Bereich erstreckt, aufweisen. Während der DNA-Synthese würden Arme zur Verknüpfung oder Platzhalter an geeigneter Stelle intern oder am Terminus eingebaut. Diese Arme zur

Verknüpfung würden eine funktionelle Gruppe aufweisen, an die Chromophore später konjugiert werden können, wie zum Beispiel eine Amino-Verknüpfung und Succinimidylesterchromophor. Die Reporter-Sonde würde ein anderes Chromophor, das auf gleiche Art und Weise eingebaut würde, am Ende, das sich in den STR-Bereich erstreckt, aufweisen. Daher würden in Gegenwart des Ziels der Fänger und die Reporter-Sonden hybridisieren und das Chromophor nahe zueinander positionieren. Die Distanz zwischen den Chromophoren würde durch die Länge des Platzhalters bestimmt und wo das Chromophor an die DNA gebunden war, über die Base, das Rückgrat oder den Zucker.

Beispiel 9 – Zielabhängige Stapelung von Fänger und Reporter

[0120] Eine zusätzliche Ausführungsform dieser Erfindung wäre es, die Anbindung des Reporters an die übereinstimmende Teststelle durch Ligation des Reporters an den vorgebundenen Fänger weiter zu stabilisieren. Dies würde zu einer kovalenten Bindung zwischen dem Fänger und dem Reporter führen, wobei der Fänger an der Stelle durch Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung gehalten wird. Der kritische Teil dieser Ausführungsform wäre der, die Ligation auf selektive Art und Weise durchzuführen, so dass die Fähigkeit der Unterscheidung zwischen Entsprechung und Fehlpaarungs-Hybriden beibehalten wird. Dies könnte durch vorsichtiges Einhalten der Hybridisierungsstringenz durch elektronische oder konventionelle Verfahren erreicht werden.

[0121] Die Ligation könnte durch enzymatische (Maniatis et al., Molecular Cloning, Laborhandbuch, 1982) oder chemische Verfahren (Gryaznov, Nucleic Acids Research, 1994) erzielt werden. Die Auswahl des Verfahrens könnte durch die Kinetiken, die mit dem spezifischen Reaktionstyp einhergehen, als auch durch die allgemeine Wirksamkeit der Aufnahme eines bestimmten Verfahrens in ein Produkt, bestimmt werden.

Beispiel 10 – Unterscheidung einer Entsprechung von einer Fehlpaarung/Lücke und Fehlpaarung/Überlappung

[0122] Die Fähigkeit des Systems nicht nur entsprechende von fehlgepaarten Hybriden zu unterscheiden sondern auch zwischen den zwei Typen von Fehlpaarungen, Lücke und Überlappung zu unterscheiden, erhöht die Verwendbarkeit des Verfahrens. [Fig. 22A](#), [Fig. 22B](#) und [Fig. 22C](#) zeigen Graphiken der Fluoreszenzintensität für einen Lücken, Entsprechungs- und Überlappungszustand (Balkendiagramme von links nach rechts), für das anfängliche Signal ([Fig. 22A](#)) nach drei Minuten der Denaturierung ([Fig. 22B](#)) und nach zehn Minuten der Denaturierung ([Fig. 22C](#)). Dieses Merkmal der Technologie stellt zu-

sätzliche Informationen über die Ziel-DNA bereit, d.h. Informationen bezüglich aller drei Typen von möglichen Hybriden. Diese zusätzliche Information kann auf verschiedene Art und Weis verwendet werden.

[0123] Als erstes könnte es möglich sein die Anzahl der Felder, die für die genaue Identifikation von Ziel-DNA erforderlich sind, durch Ausnutzen dieses Merkmals zu verringern. **Fig. 23** zeigt das Potenzial für dieses Merkmal in Verwendung mit dem THO1 Genlocus. Es sagt voraus, dass die korrekte Identifizierung aller THO1 Allele mit einem Satz von Fänger-Oligonukleotiden erzielt werden kann, die fünf, sieben und neun Wiederholungseinheiten in Kombination mit dem THO1-Genlocus Reporter mit einer Wiederholungseinheit aufweisen. Dies verringert die erforderliche Anzahl von analytischen Teststellen von sieben auf drei. Dieses Merkmal, wenn man es mit der Fähigkeit redundante Reporter zu machen kombiniert, könnte die Anzahl der Felder, die für die Analyse von Genloci für statistisch signifikantes genotypisieren erforderlich ist, stark verringern. Derzeit liegt dieses Niveau bei etwa 10 Genloci. Die vorteilhafte Wirkung davon wäre, dass mehr Genloci auf einen einzelnen Chip ermöglicht würden, und daher mit größeren Arrays, die Fähigkeit mehrere Individuen auf dem gleichen Chip zu untersuchen, gegeben wäre, wodurch die Kosten des Assays verringert würden. Dies wäre besonders nützlich für Hochdurchsatzverfahren, wie es für Erstellung von STR Datenbanken für Verbrecher, die derzeit erzeugt werden, erforderlich ist.

[0124] Auch ohne eine Verringerung der Anzahl der Teststellen, die für das Untersuchen von STR Allelen gebraucht werden, werden die zusätzlichen Informationen, die durch das Unterscheiden von Lücken/Fehlpaarungen von Überlappungen/Fehlpaarungen erhalten werden, bei der Genauigkeit des Assays helfen. Jede zusätzliche Information könnte in die endgültigen statistischen Analysen der Daten eingebaut werden, um eine Antwort darauf zu geben, was eine höhere Genauigkeitswahrscheinlichkeit hat.

Beispiel 11 – Bestimmung der STR-Allelidentität von Ziel-DNA durch Loopout-Analyse

[0125] In einer anderen Ausführungsform der STR-Allelunterscheidung durch Hybridisierung haben wir verdeutlicht, dass ein anderes Oligonukleotidsystem verwendet werden kann. Dieses Verfahren, das als Loopout-System bezeichnet wird, wird in den **Fig. 9A** und **Fig. 9B** und **Fig. 10A–Fig. 10G** dargestellt. Ausgehend von der Zeichnung wird offenkundig, dass dies eine Alternative zum Sandwich-Verfahren zur Identifizierung von Allelen in einer Matrix ist. Das Loopout-System verwendet ein Array von Fänger-Oligos, die auf vergleichbare Weise wie im Sandwichformat verteilt werden. Die Struktur der Fänger-Oligos unterscheidet sich von der im Sand-

wich-Format durch die Anwesenheit von Genlocus spezifischen einzigartigen Sequenzen, die beide Ende der Wiederholungsbereichs flankieren. Die Ziel-DNA ist ebenfalls markiert und dient als Reporter-Molekül. Das Ziel kann während der Amplifikation und durch Verwendung eines PCR-Primers, der fluoreszierend ist (oder enthält irgendein anderes geeignetes Molekül, das für die Detektion angepasst wurde) markiert werden.

[0126] In der Praxis werden Loopout-Fänger-Oligos, die für verschiedene Allele eines Genlocus spezifisch sind, in einer Matrix angeordnet, so dass individuelle Teststellen unterschiedliche Allele repräsentieren (siehe, z.B., **Fig. 6**). Aktuelle Testergebnisse werden in **Fig. 24** gezeigt. Das markierte Ziel-Oligo wird dann stringent unter elektronischen Zuständen mit dem gesamten Array hybridisiert. Die Teststelle mit den stabilsten Hybriden wird mit der Allel-Identität der Ziel-DNA übereinstimmen. Durch das Bestimmen der Position der stabilen Hybride (und dadurch des Allel-spezifischen Fänger-Oligos, das daran gebunden ist) werden die Allele, die in der Ziel-DNA vorhanden sind, identifiziert. Die Hybride, die zwischen den Fänger- und Reporter-Oligos, die die gleiche Anzahl von Wiederholungseinheiten aufweisen, gebildet werden, werden abgeglichen. Man kann auch sagen, dass diese Teststelle mit der Identität des Ziel-Allels übereinstimmt. Teststellen, die nicht übereinstimmen oder die gleiche Anzahl von Wiederholungseinheiten zwischen dem Fänger und dem Ziel enthalten, werden ein Hybrid mit einer Schleife (Loop) sowohl in der Ziel- als auch in der Fänger-DNA ausbilden (siehe, z.B. **Fig. 10A**, **Fig. 10B** und 10D–**Fig. 10G**). Diese Hybride werden inhärent weniger stabil sein als die sich entsprechenden Hybride. Daher wird die Denaturierung durch elektronische Stringenzkontrolle stabile von weniger stabilen Hybriden unterscheiden, was auf die übereinstimmenden Stellen hindeutet, und basierend auf der Kenntnis der Sonden, die an solchen Stellen vorhanden sind, den Anwender in die Lage versetzen, die Anzahl der Wiederholungseinheiten in der Ziel-DNA zu bestimmen.

Beispiel 12 – Detektion des Mikrovariantenallels THO1 9.3

[0127] Da STR's immer weitere Verwendung finden, werden Abweichungen innerhalb der Wiederholungsbereiche mit größerer Frequenz entdeckt. Dies kann für gewöhnlich dimensionierte Fraktionierungsverfahren problematisch sein, da der Spielraum für eine Unterscheidung von vier Basen bis hinunter zu einer Base reicht. Dies ist der Fall bei Insertions- oder Deletionsmutationen. Für transitionale oder transversionale Mutationen verändert sich die Größe des Allels nicht, auch wenn sich die Sequenz verändert hat.

[0128] Diese beiden Klassen von Mutationen, Insertion/Deletion und transitionale/transversionale können

einfach durch unsere Technologie detektiert werden. Dies ist primär die Folge der Tatsache, dass der Ansatz von Nanogen ein auf Hybridisierung basierendes Assay ist anstelle eines Verfahrens zur Bestimmung der Größe. Daher stellt das Kombinieren der terminalen Nukleotidbasenstapelung mit Einzelnukleotidpolymorphismen ein kraftvolles Unterscheidungs-werkzeug bereit.

[0129] Eine gut bekannte STR Mikrovariante ist das THO1 9.3-Allel. Es ist wichtig, da es in einem wesentlichen Teil der Kaukasischen Population vorhanden ist. Das Assay für die 9.3 Mikrovariante war im Wesentlichen das Gleiche wie für die normalen STR-Allele, erforderte jedoch ein spezielles Design der Fänger und Reporter-Oligos. Das Fänger-Oligo enthält nur drei Wiederholungseinheiten (3ru, [Fig. 13](#)). Dies deswegen, da die einzelne Basendeletion zwischen den Wiederholungseinheiten 6 und 3 des Zielstrangs liegt. THO1 9.3 Ziel-DNA, die an den Fänger bindet, wird an Fänger-Stellen, die mehr als drei Wiederholungseinheiten enthalten, weniger stabil sein, da es eine Leserahmenverschiebung im Wiederholungs-bereich von 9.3 geben wird. Das Reporter-Oligo (Micro-var 9.3, [Fig. 13](#)) ist entworfen worden, damit es sehr stabil an den Bereich der Wiederholungseinheit, der die Deletion enthält, bindet. Zusätzlich ist das Fänger-Oligo entworfen worden, so dass eine Ziel-gerichtete Basenstapelung der Fänger- und Reporter-DNA nur an der 3ru Test-Stelle auftritt. [Fig. 25](#) zeigt eine detaillierte Sequenzausrichtung der Fänger- und Reporteroligonukleotide, die verwendet wurden, um die THO1 9.3 Mikrovariante zu detektieren. Die Nummerierung in der Zeichnung ist konsistent mit der, die in [Fig. 4C](#) gefunden werden kann, unter Zusatz der Sequenz **45**, die mit der partiellen Wiederholungseinheit komplementär ist, die die Mikrovariante ausmacht. Dieser bestimmte Mikrovarianten-reporter hat keine zweite einzigartige flankierende Sequenz **42**. Für die Analyse des THO1 9.3-Allels ist es notwendig nicht ein Merkmal anderer Mikrovarianten spezifischer Reporter zu sein. Ausgehend von dieser Zeichnung ist offenkundig, dass im Hybridisierungskomplex, der mit dem THO1 9.3-Allel übereinstimmt, eine Sequenzkomplementarität sowohl zwischen der Ziel und der Reporter-DNA als auch eine Basenstapelung zwischen den Fänger- und Reporter-Oligonukleotiden existiert. [Fig. 26](#) zeigt die Ergebnisse eines Assays mit PCR amplifizierter DNA von einem Individuum, das für das THO1 Allel homozygot ist.

[0130] Obwohl die vorhergehende Erfindung im Detail durch Illustrationen und Beispiele zum Zwecke der Klarheit und des Verständnisses beschrieben worden ist, mag es für den Fachmann im Lichte der Lehren dieser Erfindung offensichtlich sein, dass bestimmte Veränderungen und Modifikationen durchgeführt werden können, ohne vom Schutzzumfang der beigefügten Ansprüche abzuweichen.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Bestimmung der Anzahl von Wiederholungseinheiten in einem genetischen Ziel, umfassend die Schritte:

Bereitstellen einer Vielzahl von Hybridisierungskomplex-Assays angeordnet auf einer Vielzahl von Teststellen, wobei der Hybridisierungskomplex-Assay einschließt:

ein Nukleinsäureziel, das repetitive DNA-Sequenzen enthält,

eine Fänger-Sonde, die eine erste einzigartige Flankierungssequenz und n Wiederholungseinheiten, die komplementär zu der Zielsequenz sind, besitzt, wobei $n \geq 0$, und

eine Reporter-Sonde, die eine ausgewählte Sequenz besitzt, die komplementär zu dem Nukleinsäureziel ist, wobei die ausgewählte Sequenz eine zweite einzigartige Flankierungssequenz und m Wiederholungseinheiten einschließt, wobei $m \geq 0$,

wobei die Summe der Anzahl von Wiederholungseinheiten in Fänger-Sonde plus Reporter-Sonde ($n + m$) größer ist als null,

wobei die Reporter-Sonde und Fänger-Sonde an einer übereinstimmenden Stelle einen Hybridisierungskomplex mit dem Ziel bilden, so dass die Enden der Fänger-Sonde und Reporter-Sonde nebeneinander liegen, und wobei die nebeneinanderliegenden Enden durch Basenstapelung stabilisiert werden, und wobei die nebeneinander liegenden terminalen Nukleotide so ausgewählt sind, dass sie die Energiedifferenz zwischen Übereinstimmung und Nicht-Übereinstimmung zu erhöhen, wobei die Anzahl von Wiederholungseinheiten in dem Ziel an einer übereinstimmenden Stelle gleich der Summe der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Fänger-Sonde und der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Reporter-Sonde ist, wobei die Anzahl von Wiederholungseinheiten in dem Ziel an einer nicht übereinstimmenden Stelle nicht gleich der Summe der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Fänger-Sonde und der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Reporter-Sonde ist und die Sequenz der Fänger-Sonde sich an mindestens zwei Teststellen des Arrays unterscheidet,

Bestimmung der Übereinstimmung und Nicht-Übereinstimmung unter den Hybridisierungskomplex-Assays an den Teststellen mittels der Bestimmung der Stabilität der Hybridisierung und Bestimmung der Anzahl von Wiederholungseinheiten in den Zielsequenzen basierend auf der Festlegung der übereinstimmenden Stelle und ferner basierend auf der Kenntnis der vorher festgelegten Sequenzen der Sonden, die in dem Hybridisierungskomplex an dieser Stelle lokalisiert sind.

2. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Stabilität der Hybridisierung des Ziels durch ein oder mehrere Kontrollverfahren, bestehend aus: Temperaturkontrolle der Stringenz, chemische Kontrolle der

Stringenz und elektronische Kontrolle der Stringenz, bestimmt wird.

3. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, das ferner während der Hybridisierung der Fänger-Sonde mit dem Nukleinsäureziel stringente Bedingungen einschließt.

4. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, das ferner während der Hybridisierung der Reporter-Sonde mit dem Hybridisierungskomplex aus Fänger-Sonde und Nukleinsäureziel elektronische Stringenzbedingungen einschließt.

5. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der Hybridisierungskomplex markiert ist.

6. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, das ferner den Schritt einer statistischen Analyse einschließt.

7. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, das ferner die Analyse von Störungen der Fluoreszenz einschließt.

8. Das Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei der Marker amplifiziert wird.

9. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, das ferner einen seriellen redundanten Assay einschließt, der, nach mindestens dem Schritt der Bestimmung der Übereinstimmung und Nicht-Übereinstimmung, die folgenden Schritte einschließt, Erhöhen der Denaturierungsstringenz, um besagte Reporter-Sonde von allen Stellen, ob übereinstimmend oder nicht-übereinstimmend, zu entfernen, Hybridisierung einer zweiten Reporter-Sonde, wobei die Anzahl von Wiederholungseinheiten in besagter zweiter Reporter-Sonde sich von der Anzahl von Wiederholungseinheiten in besagter Reporter-Sonde unterscheidet, wobei der Ort der übereinstimmenden Teststelle die Anzahl von Wiederholungseinheiten, die in dem Ziel vorhanden sind, basierend auf der Kenntnis der vorher festgelegten Sequenzen der Sonden, die an dieser Teststelle lokalisiert sind, anzeigt, wobei an der übereinstimmenden Teststelle die Anzahl von Wiederholungseinheiten in dem Ziel gleich der Summe der Anzahl von Wiederholungsanzahlen in der Fänger-Sonde und der Anzahl von Wiederholungseinheiten in der Reporter-Sonde ist, Bestimmung der übereinstimmenden und nicht-übereinstimmenden Teststellen unter den Hybridisierungskomplex-Assays an den Teststellen über die Bestimmung der Stabilität der Hybridisierung und Vergleich dieser Ergebnisse mit dem anfänglichen Hybridisierungskomplex-Assay zur Bestätigung der Anzahl von Wiederholungseinheiten in dem Ziel.

10. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei jede übereinstimmende Teststelle die Anzahl von

Wiederholungseinheiten des Ziels anzeigt.

11. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Gruppe von nicht-übereinstimmenden Teststellen die Anzahl von Wiederholungseinheiten des Ziels anzeigt.

12. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Auflösung aus dem Verlauf der Anwendung einer Auswahl von elektronischen, chemischen und/oder thermalen Stringenzbedingungen und der resultierenden Änderung der Signalintensität des Hybridisierungskomplex-Assays bestimmt wird.

13. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Zielmaterial mehr als ein Allel pro Locus bildet.

14. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Verfahren für die Diagnose von Krankheiten verwendet wird.

15. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Verfahren für die Züchtung, mit Ausnahme von Menschen, verwendet wird.

16. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Quelle des Nukleinsäureziels monoklonale und polyclonale Zellen sind.

17. Das Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei der Marker durch enzymatische Amplifizierung des Marker amplifiziert wird.

18. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, das ferner einschließt: Transport eines oder mehrerer Elemente aus der Gruppe bestehend aus dem Ziel und der Fänger-Sonde durch Freifeld-Elektrophorese.

19. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Übereinstimmung/Nicht-Übereinstimmung durch elektronische Stringenz, chemische Stringenz und thermale Stringenz bestimmt wird.

20. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Übereinstimmung/Nicht-Übereinstimmung durch thermale Stringenz bestimmt wird.

21. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Übereinstimmung/Nicht-Übereinstimmung durch elektrische Stringenz bestimmt wird.

Es folgen 21 Blatt Zeichnungen

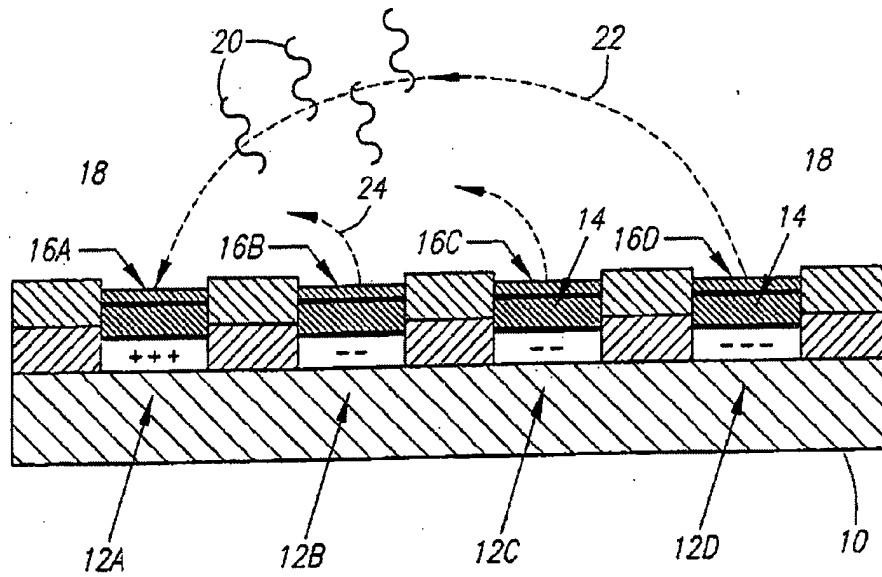


FIG. 1A

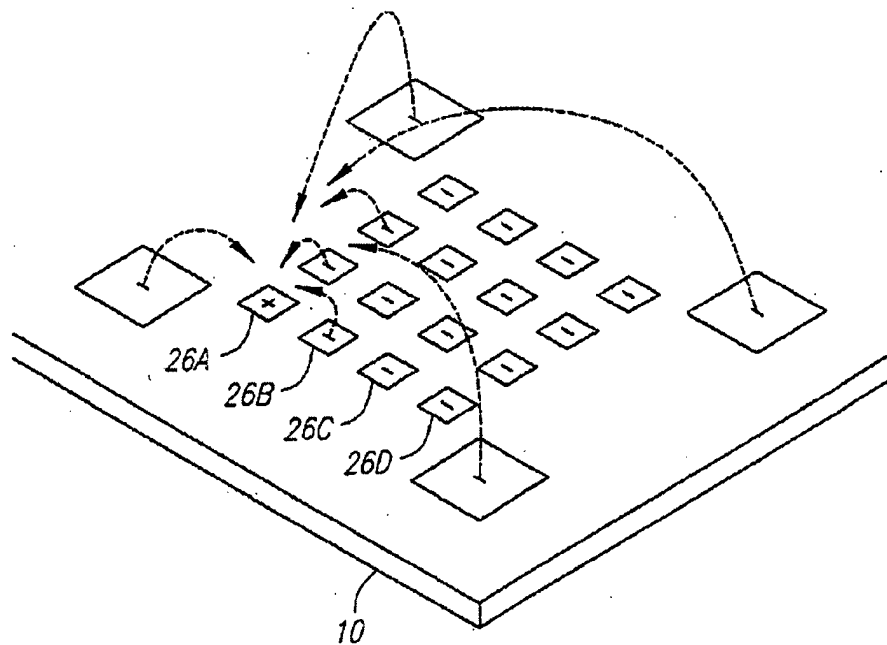
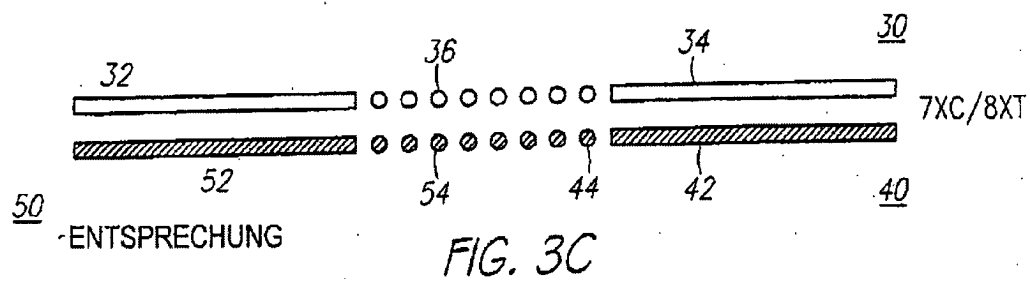
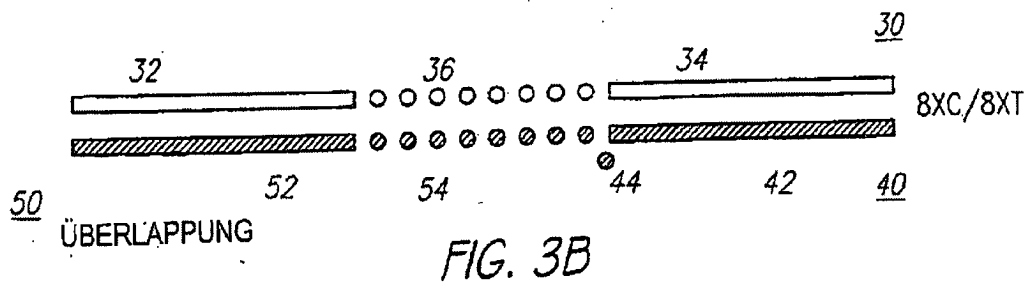
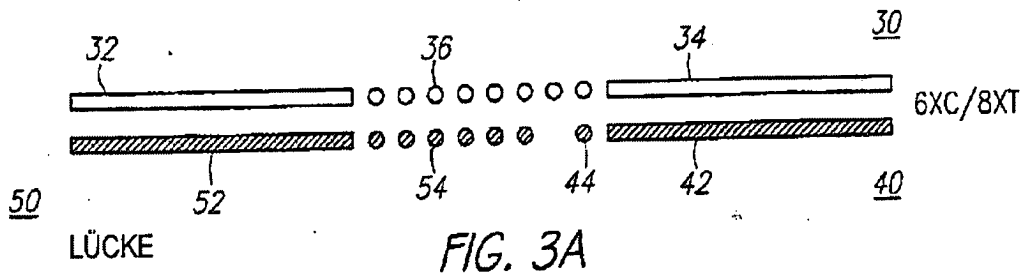
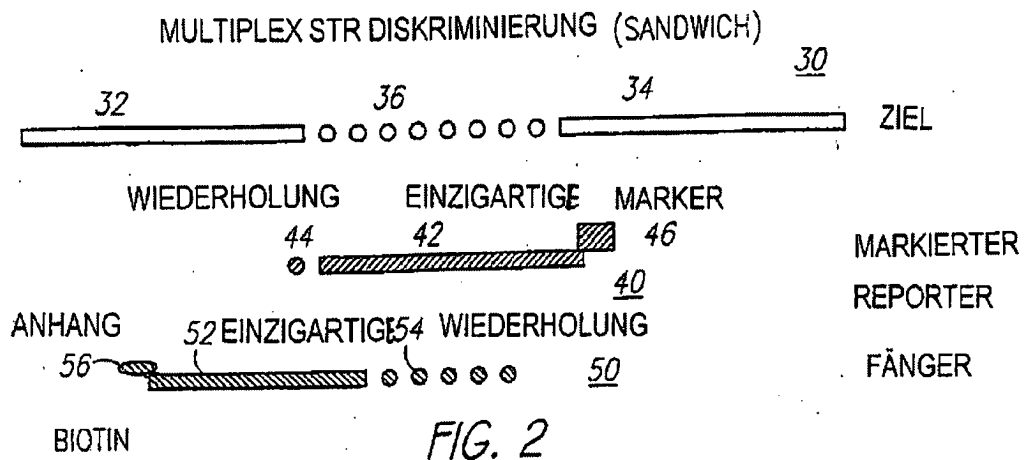


FIG. 1B



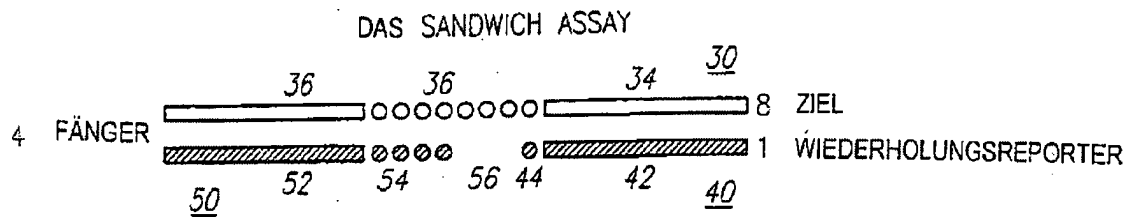


FIG. 5A

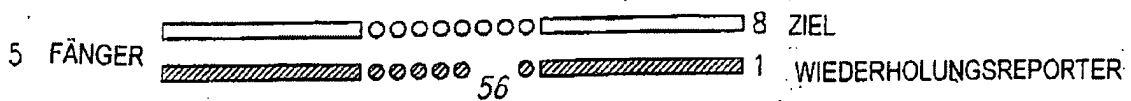


FIG. 5B

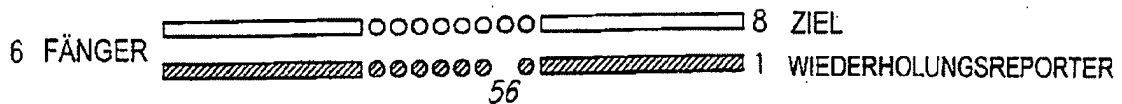


FIG. 5C

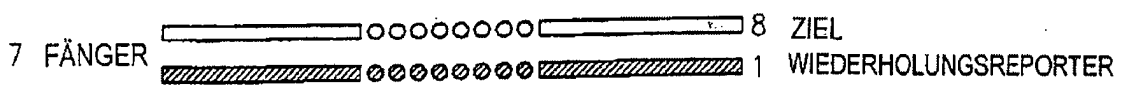


FIG. 5D

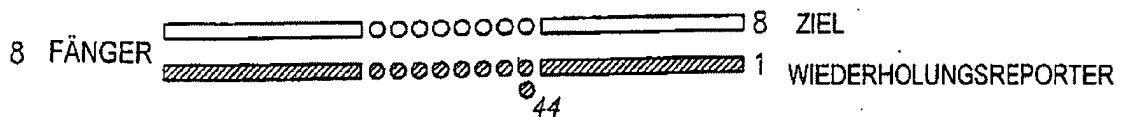


FIG. 5E

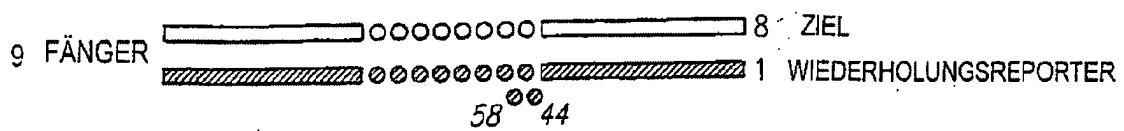


FIG. 5F

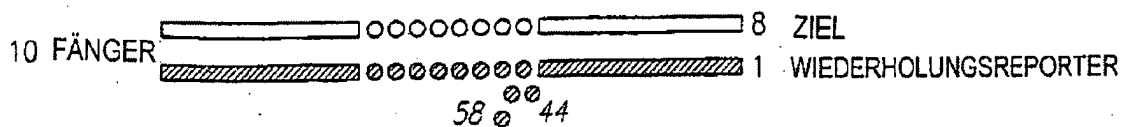


FIG. 5G

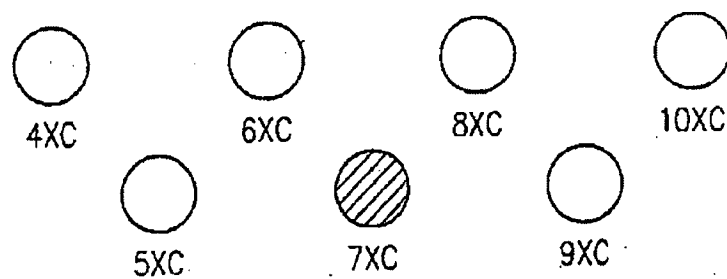


FIG. 6

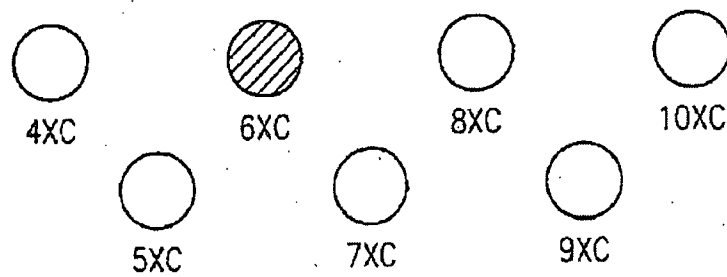
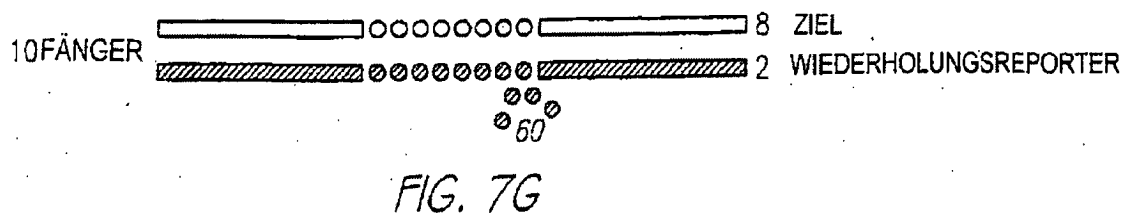
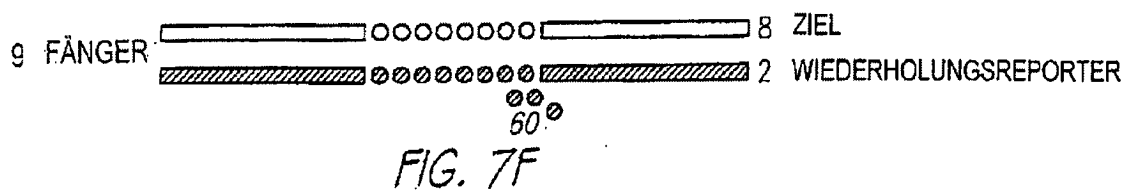
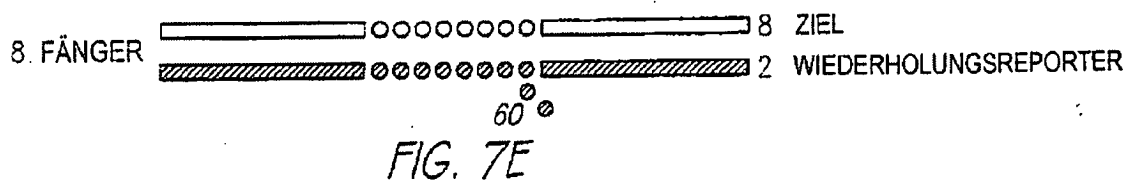
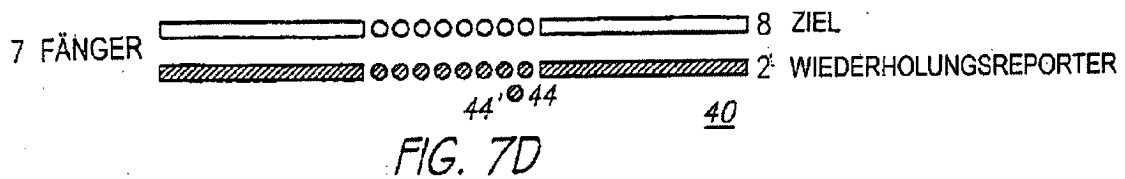
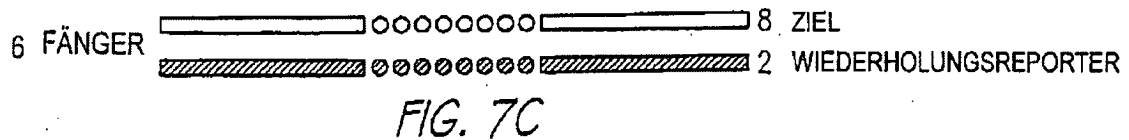
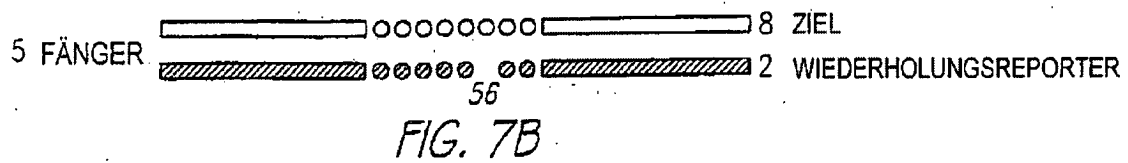
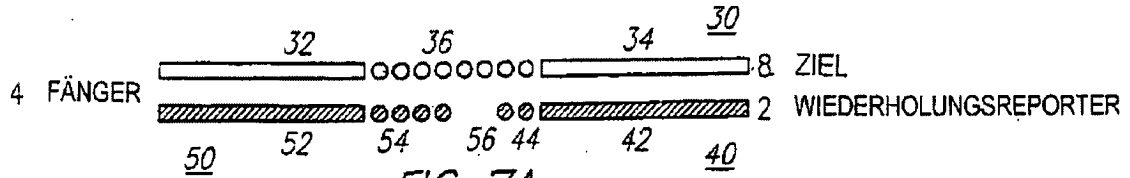


FIG. 8

DAS SANDWICH ASSAY
(MIT DEM 2 WIEDERHOLUNGSEINHEITEN REPORTER)



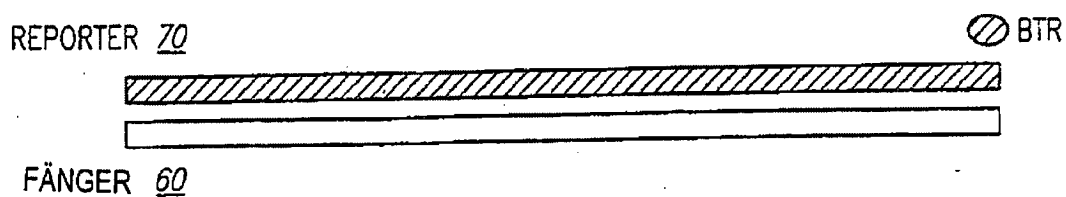


FIG. 9A

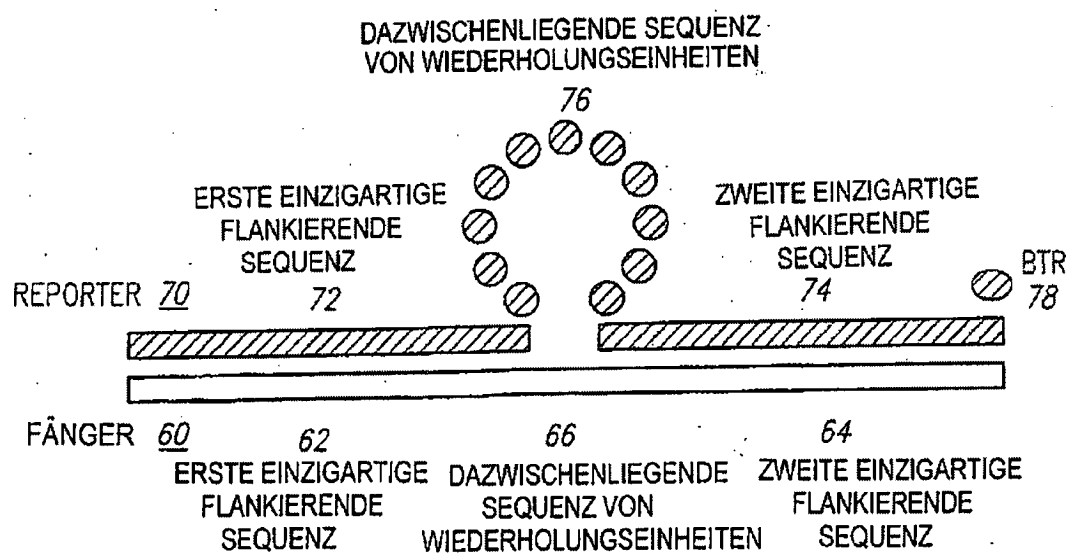
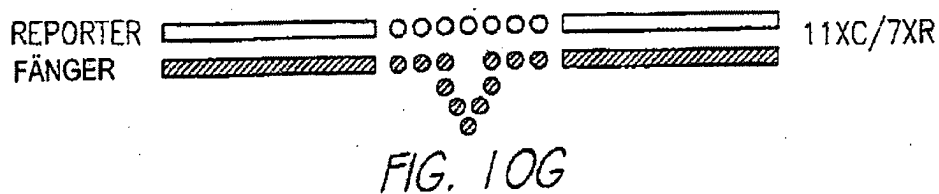
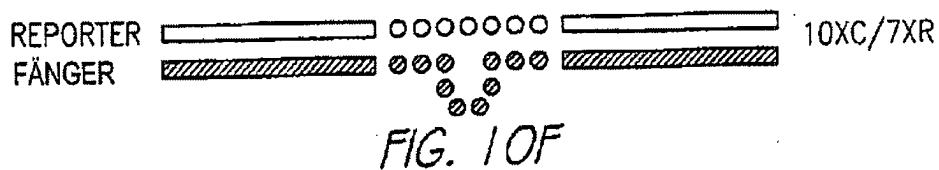
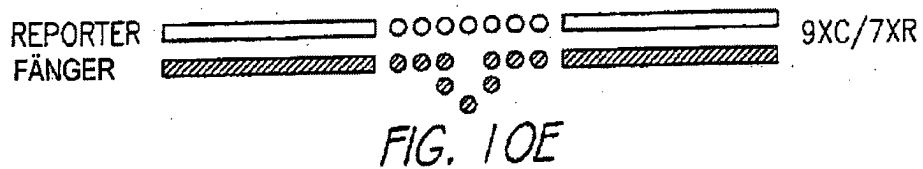
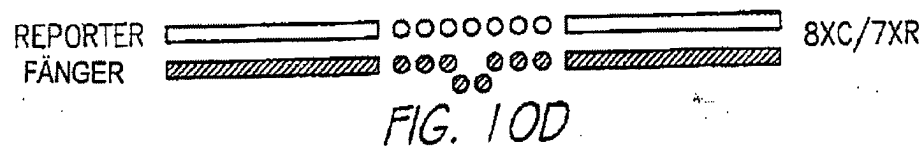
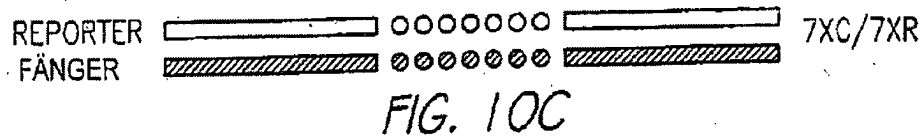
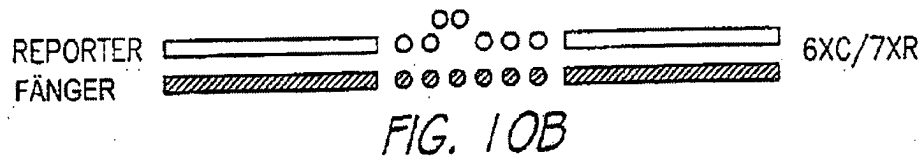
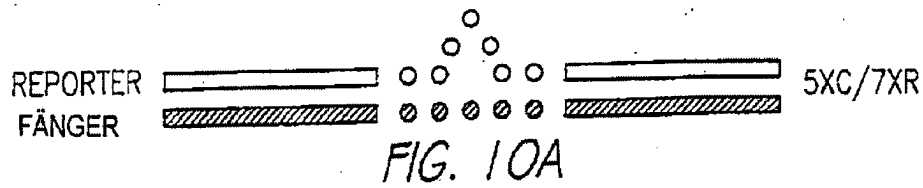


FIG. 9B



- GIBT REPORTER-WIEDERHOLUNGSEINHEITEN AN
- ◐ GIBT FÄNGER-WIEDERHOLUNGSEINHEITEN AN

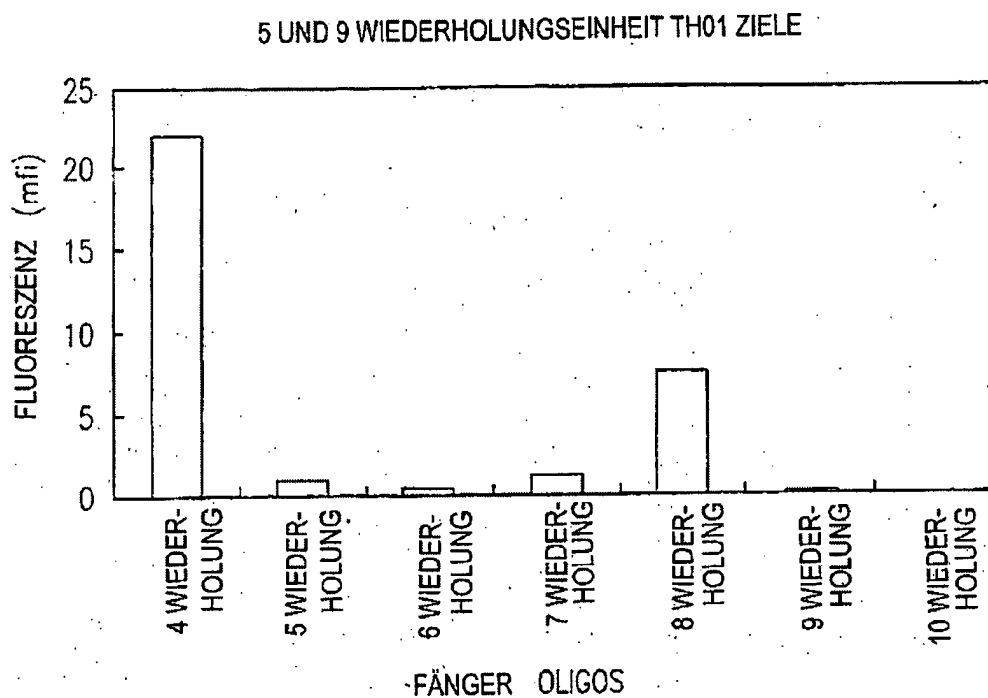
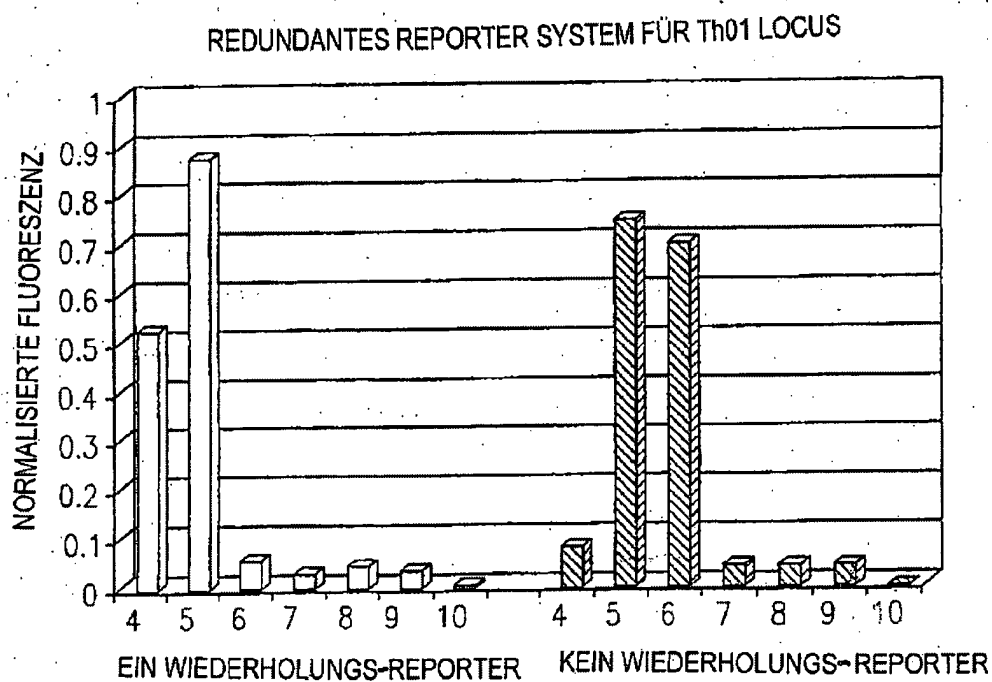


FIG. 11



ZIEL: PCR PRODUKT

ELEKTRONISCHE HYBRIDISIERUNG: 32hz, 35°C

FIG. 12

OLIGO-TABELLE -- TH01

FÄNGER-OLIGOS	
3ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
4ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
5ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
6ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
7ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
8ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
9ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
10ru	5' BIOTIN - TCCTCCCTTATTTCCTCATTCATTCATT 3'
REPORTER-OLIGOS	
1 WIEDERHOLUNGSEINHEITEN	5' CATTCACCAT - BODIPY TEXAS RED 3'
2 WIEDERHOLUNGSEINHEITEN	5' CATTCATTCAC - BODIPY TEXAS RED 3'
0 WIEDERHOLUNGSEINHEITEN	5' CACCATGGAG - BODIPY TEXAS RED 3'
MICROVAR 9.3	5' CATCATTCAT - BODIPY TEXAS RED 3'
ZIELALLEL	
5X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'
6X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'
7X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'
8X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'
9X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'
9.3X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'
10X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'
11X	5' ACACAGACTCCATGGTGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATGAATG AGGGAATAAGGGAGGA 3'

FIG. 13

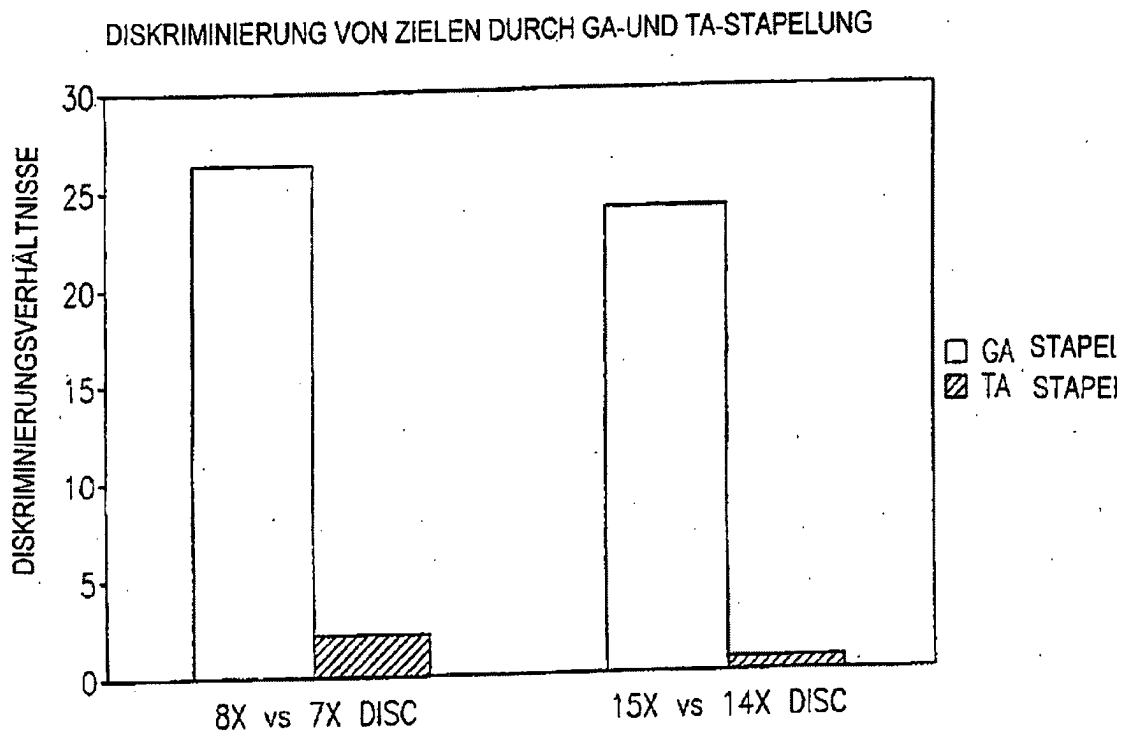


FIG. 14

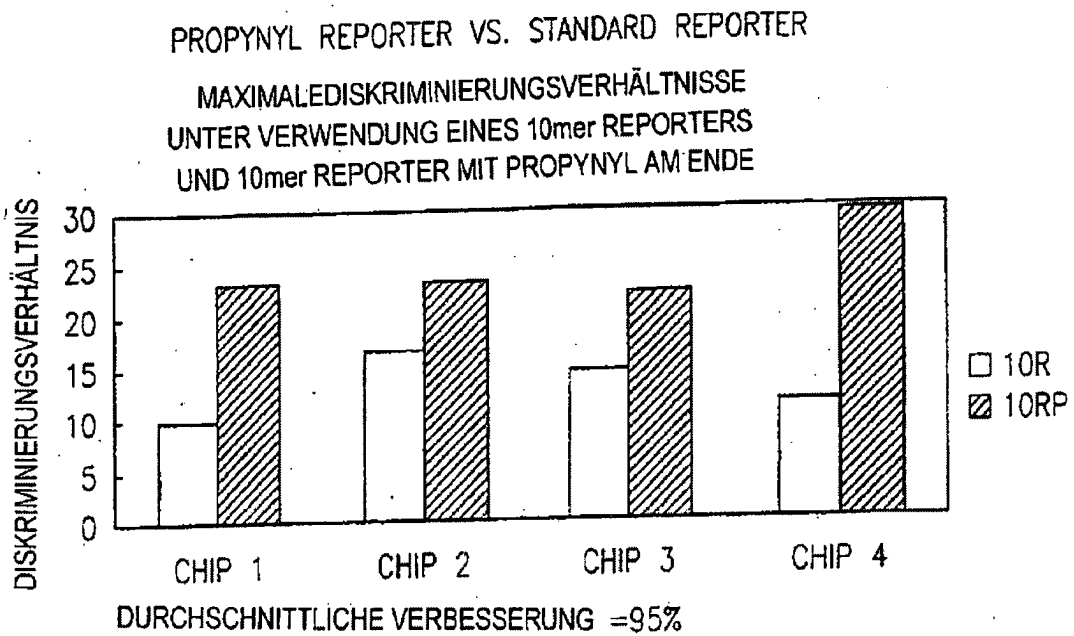


FIG. 15

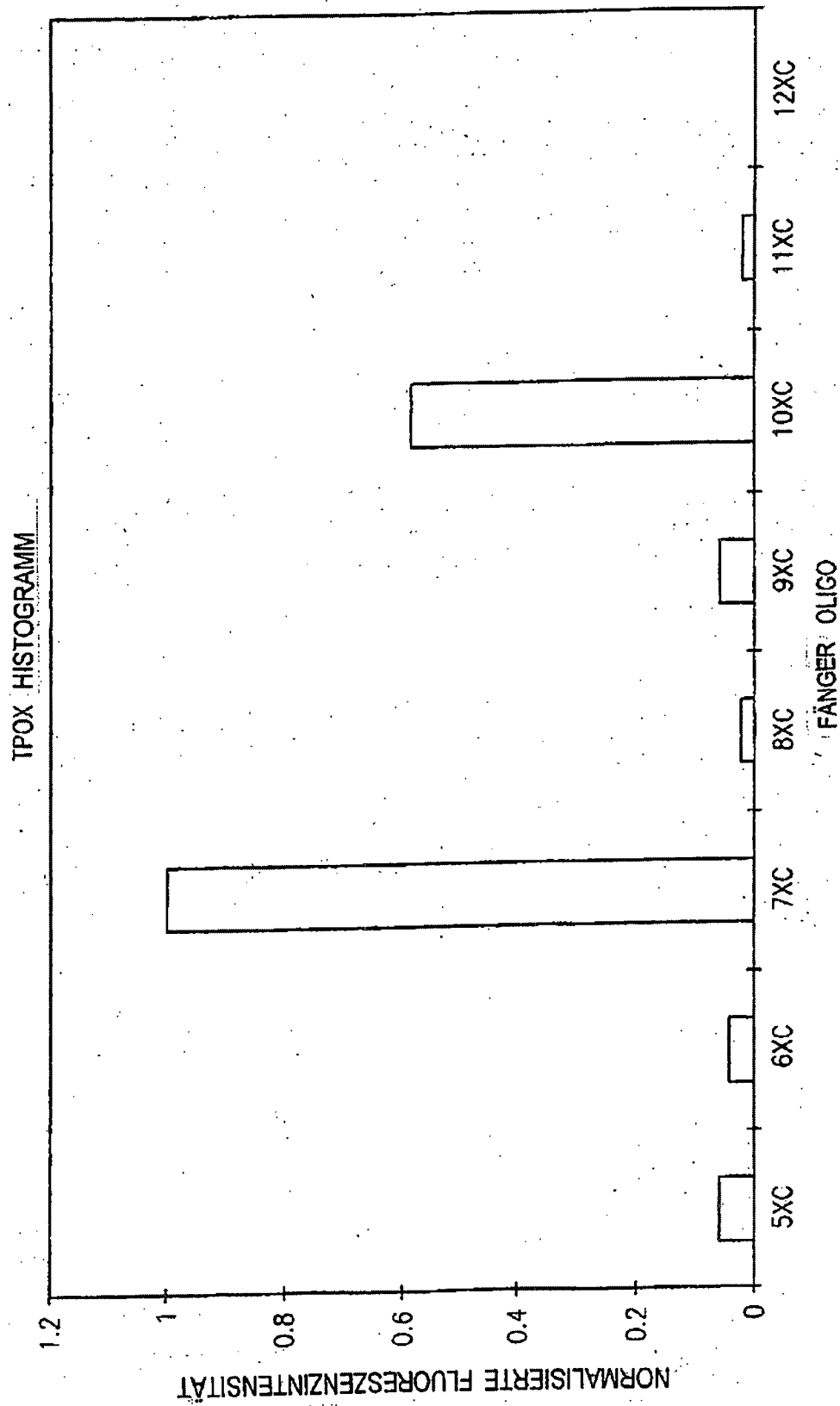
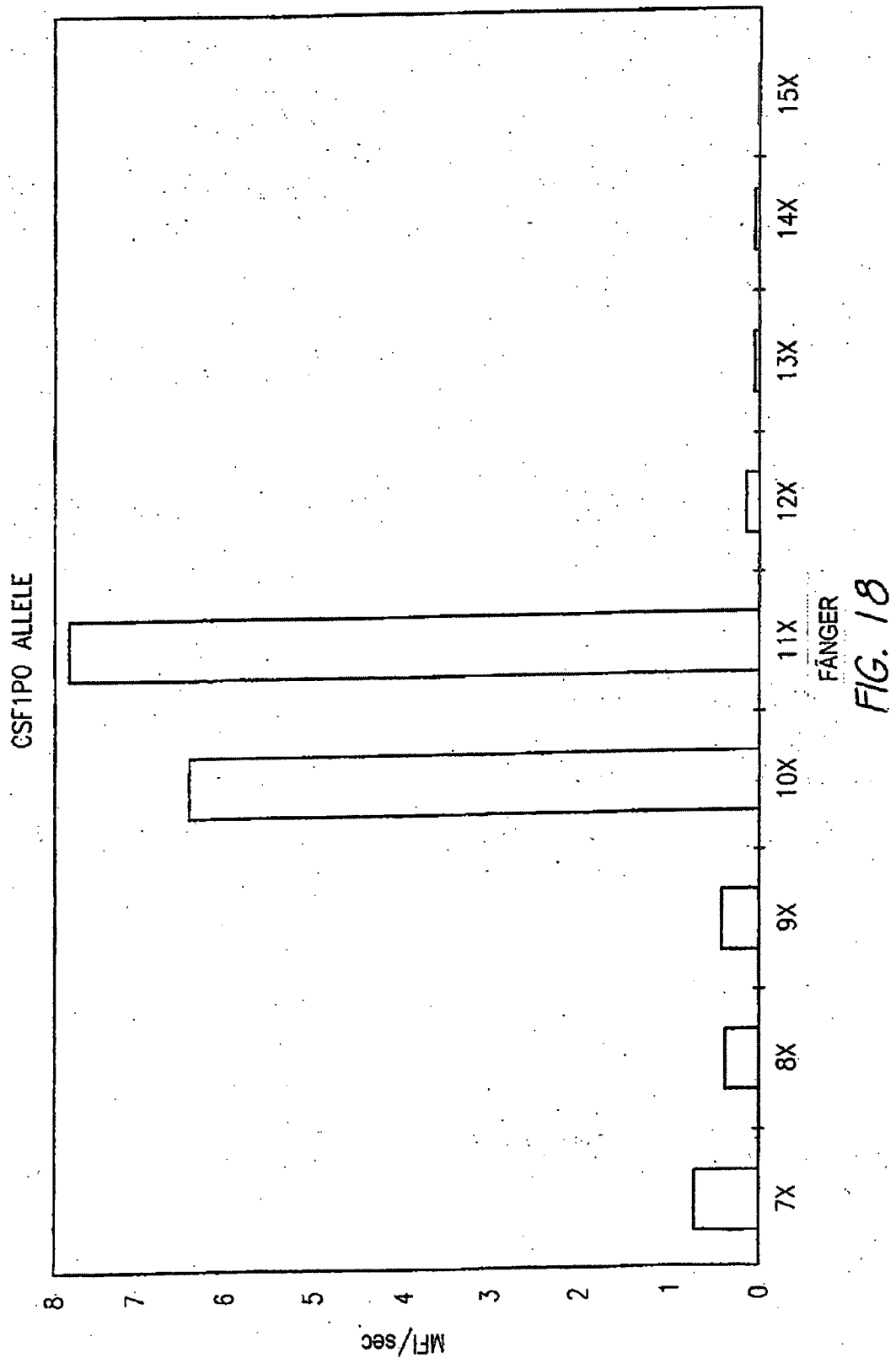


FIG. 16



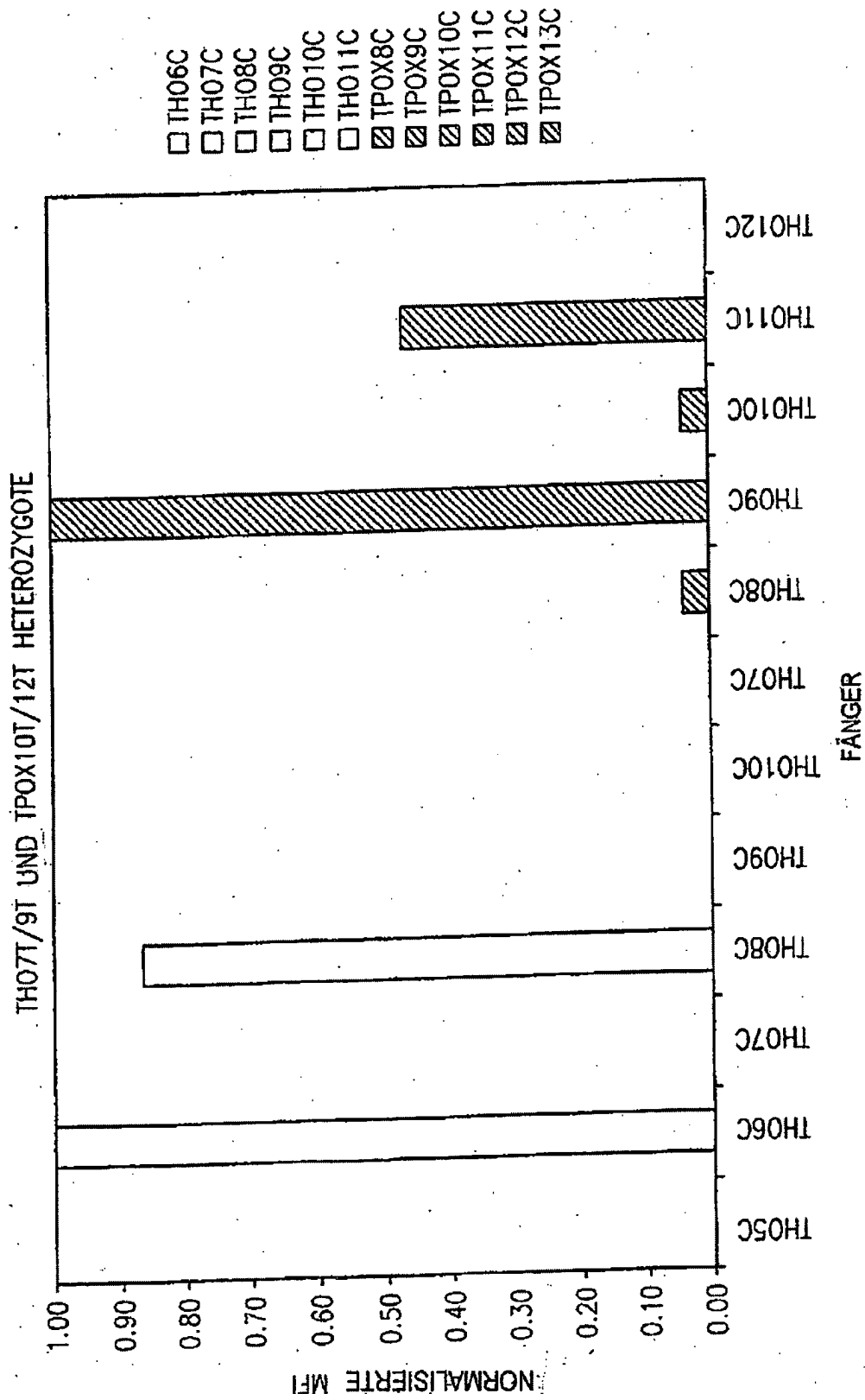


FIG. 20

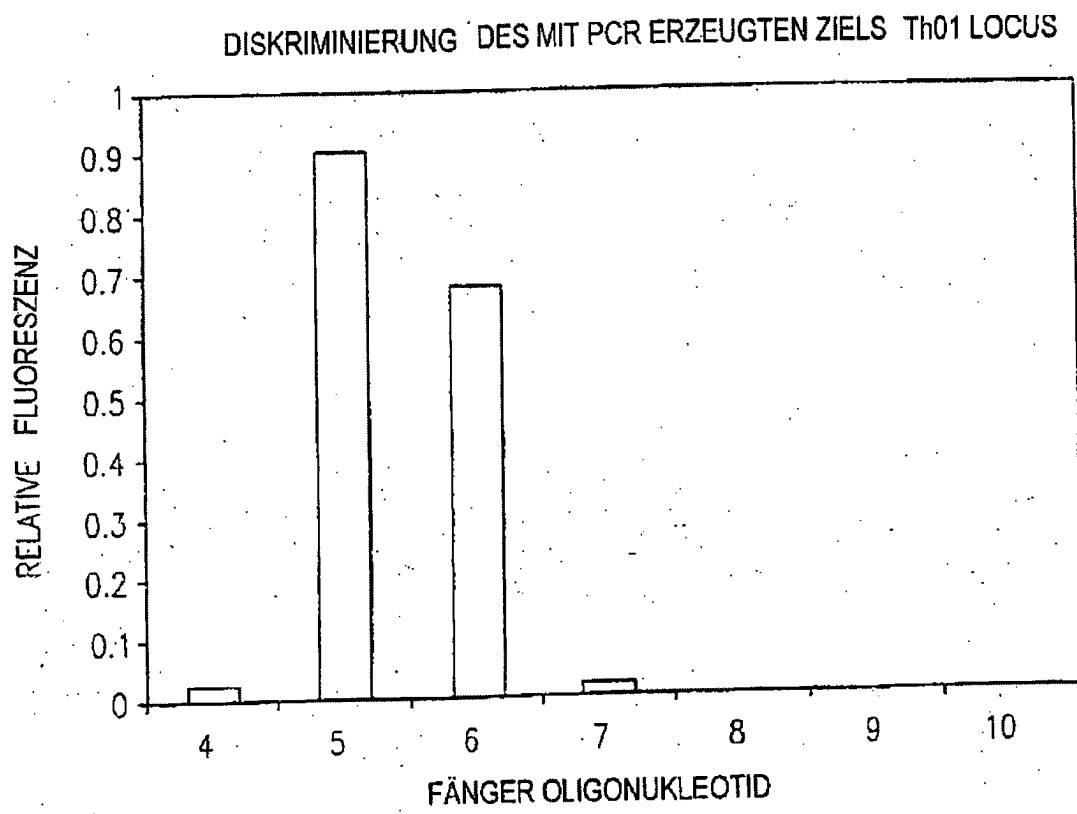


FIG. 21

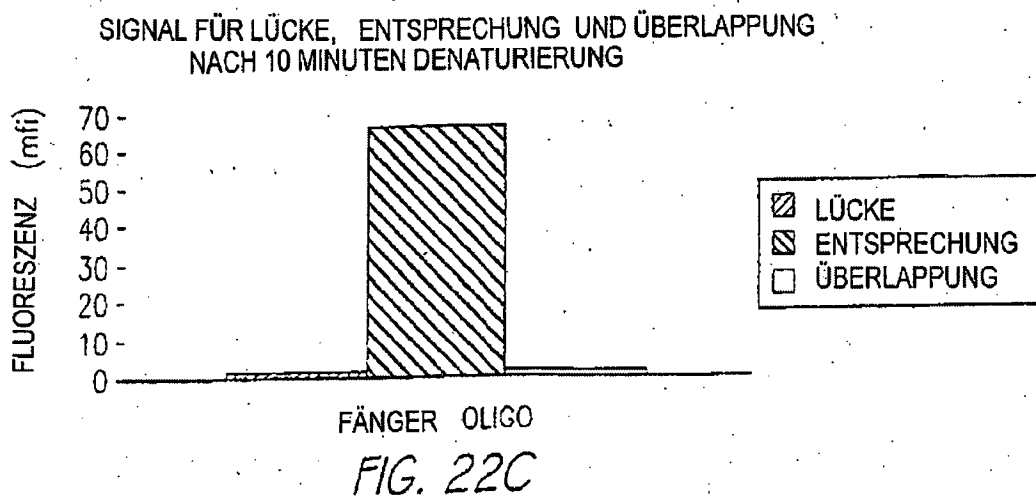
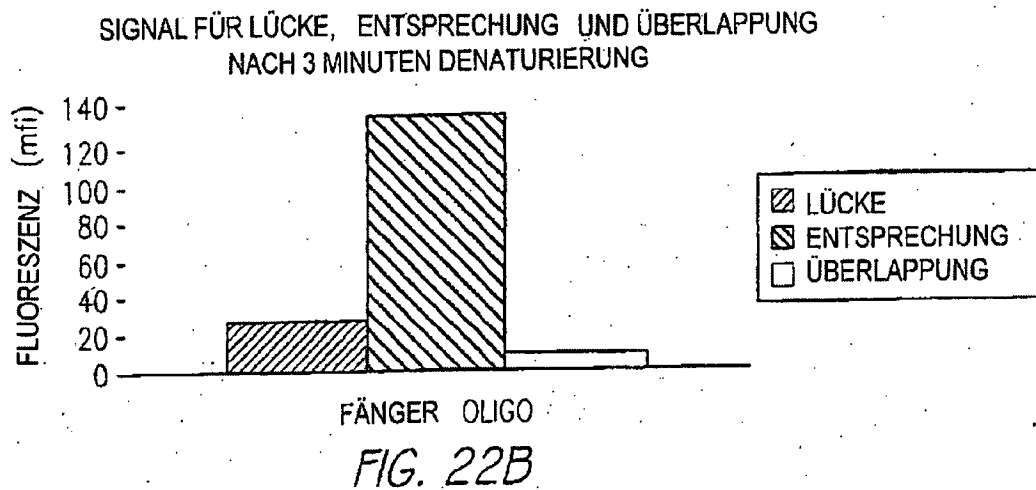
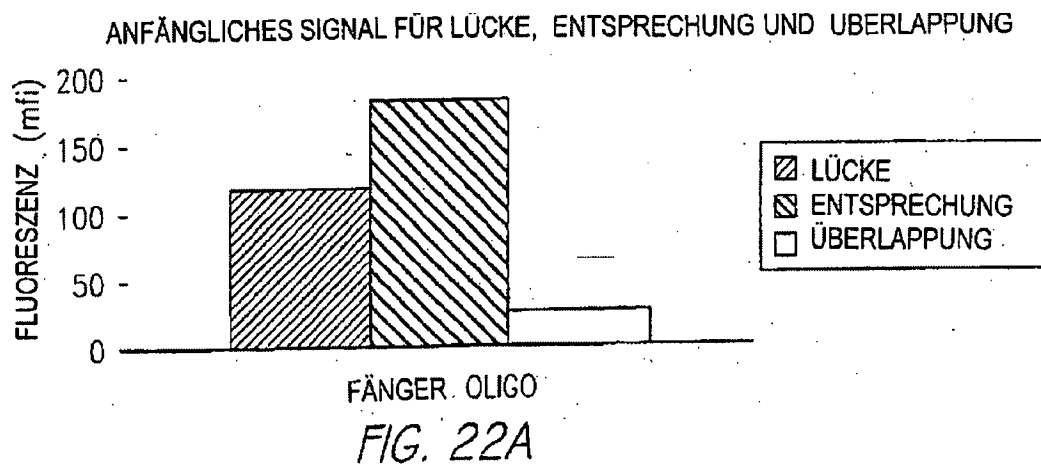


TABELLE 3 – DISKRIMINIEREN DER ÜBEREINSTIMMUNG VON : FEHLPAARUNGEN/LÜCKE UND FEHLPAARUNG/ÜBERLAPPUNG (EINE REPORTERWIEDERHOLUNGSEINHEIT)

	ZIEL- GENOTYP							
	11+11	10+11	9+11	8+11	7+11	6+11	5+11	
FÄNGER-TYP	HYBRID-TYP							
5	a	a	a	a	a	e	d	
7	a	a	a	e	d	d	d	
9	a	e	d	d	d	d	d	
GENOTYP CODE	aaa	aae	aad	aed	add	edd	ddd	

ZIEL- GENOTYP							
	10+10	9+10	8+10	7+10	6+10	5+10	
FÄNGER-TYP	HYBRID TYP						
5	a	a	a	a	e	d	
7	a	a	e	d	d	d	
9	c	f	f	f	f	f	
GENOTYP CODE	acc	aaf	aef	adf	edf	ddf	

FIG. 23A

CODE	
LÜCKE	a
ÜBERLAPPUNG	b
ENTSPRECHUNG	c
LÜCKE + ÜBERLAPPUNG	d
LÜCKE + ENTSPRECHUNG	e
ÜBERLAPPUNG + ENTSPRECHUNG	f
WAHRSCHEINLICHKEIT, DASS 3 FELDER DIE GLEICHEN BUCHSTABEN AUFWEISEN (AUS MÖGLICHEN 6) = 6² = 216	

TABELLE 3 – DISKRIMINIEREN DER ÜBEREINSTIMMUNG VON FEHLPAARUNGEN/LÜCKE UND FEHLPAARUNG/ÜBERLAPPUNG (EINE REPORTERWIEDERHOLUNGSEINHEIT)

ZIEL- GENOTYP					
FÄNGER-TYP	9+9	8+9	7+9	6+9	5+9
5	a	a	a	e	d
7	a	e	d	d	d
9	b	b	b	b	b
GENOTYP CODE	acb	aeb	adb	edb	ddb

ZIEL- GENOTYP					
FÄNGER-TYP	8+8	7+8	6+8	5+8	
5	a	a	e	d	
7	c	f	f	e	
9	b	b	b	b	
GENOTYP CODE	acb	afb	efb	deb	

ZIEL- GENOTYP					
FÄNGER-TYP	7+7	6+7	5+7	6+6	5+5
5	a	e	d	c	f
7	b	b	b	b	b
9	b	b	b	b	b
GENOTYP CODE	abb	ebb	ddb	cbb	bbb

FIG. 23B

CODE	
LÜCKE	a
ÜBERLAPPUNG	b
ENTSPRECHUNG	c
LÜCKE + ÜBERLAPPUNG	d
LÜCKE + ENTSPRECHUNG	e
ÜBERLAPPUNG + ENTSPRECHUNG	f
WAHRSCHEINLICHKEIT, DASS 3 FELDER DIE GLEICHEN BUCHSTABEN AUFWEISEN (AUS MÖGLICHEN 6) = 6³ = 216	

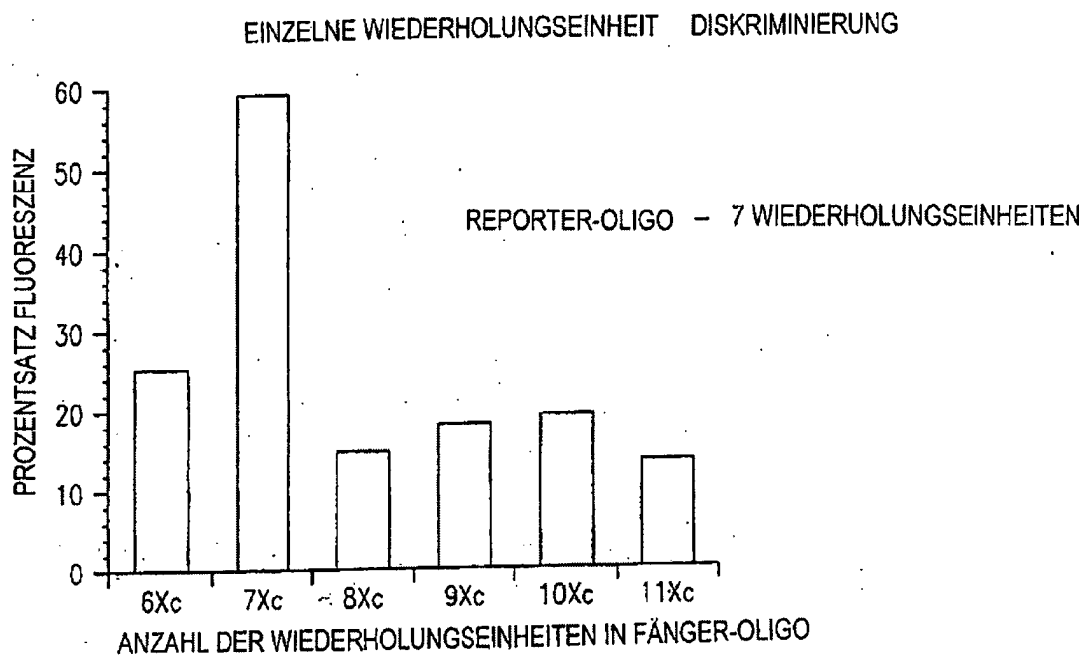
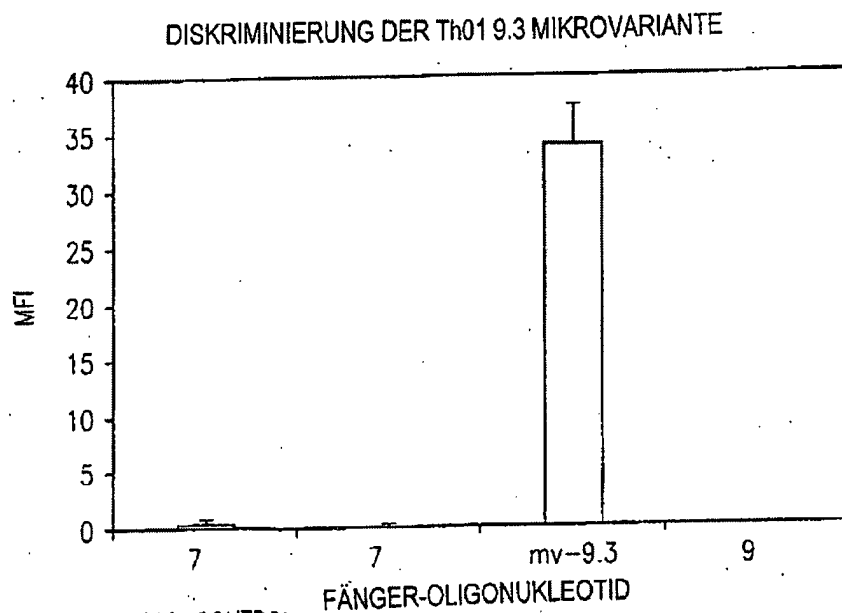


FIG. 24



PROBE: K562 CONTROL
ELEKTRONISCHE HYBRIDISIERUNG: 32hz, 41°C
2 CHIPS, 20 FÄLDER GESAMT/ ALLEL

FIG. 26

