(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Juni 2016 (09.06.2016)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2016/087637 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/64 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/078646

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Dezember 2015 (04.12.2015)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2014 117 890.4
4. Dezember 2014 (04.12.2014) DE

(71) Anmelder: **HAHN-SCHICKARD-GESELLSCHAFT FÜR ANGEWANDTE FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Wilhelm-Schickard-Straße 10, 78052 Villingen-Schwenningen (DE).

(72) Erfinder: **SCHULER, Friedrich**; Turnseestr. 9, 79102 Freiburg (DE).

(74) Anwalt: **BUCHANAN, Luke**; HERTIN und Partner PartG mbB, Rechts- und Patentanwälte, Kurfürstendamm 54/55, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

(54) **Title**: METHOD AND SYSTEM FOR DETECTING AND DISTINGUISHING BETWEEN AT LEAST TWO DYES

(54) **Bezeichnung** : VERFAHREN UND SYSTEM ZUR DETEKTION UND UNTERSCHEIDUNG ZWISCHEN MINDESTENS ZWEI FARBSTOFFEN

(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for distinguishing between the emission of light and/or the reflection of light from at least two dyes that are indistinguishable on the basis of their emission and/or reflection wavelength. The method involves at least two measurements being performed. Between the two measurements, the system is subjected to a treatment that alters the fluorescent intensity and/or luminous power of at least one of the dyes. The change of fluorescent intensity or change of luminous power that is characteristic of the dye and is brought about by the treatment between the measurements can be taken as a basis for identifying and/or quantifying the dye and/or the molecule marked thereby. The invention additionally relates to a system for carrying out the method.

(57) **Zusammenfassung**: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zu einer Unterscheidung zwischen der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens zwei Farbstoffen, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind. Im Verfahren werden mindestens zwei Messungen durchgeführt. Zwischen beiden Messungen wirkt eine Behandlung auf das System, welche die Fluoreszenzintensität und/oder Leuchtkraft von mindestens einem der Farbstoffe verändert. Anhand der für den Farbstoff charakteristischen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung, die durch der Behandlung zwischen den Messungen hervorgerufen wird, kann der Farbstoff und/oder das damit markierte Molekül identifiziert und/oder quantifiziert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin ein System zur Durchführung des Verfahrens.

WO 2016/087637 A1

VERFAHREN UND SYSTEM ZUR DETEKTION UND UNTERSCHEIDUNG ZWISCHEN MINDESTENS ZWEI FARBSTOFFEN

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zu einer Unterscheidung zwischen der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens zwei Farbstoffen, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind. Im Verfahren werden mindestens zwei Messungen durchgeführt. Zwischen beiden Messungen wirkt eine Behandlung auf das System, welche die Fluoreszenzintensität und/oder Leuchtkraft von mindestens einem der Farbstoffe verändert. Anhand der für den Farbstoff charakteristischen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung, die durch die Behandlung zwischen den Messungen hervorgerufen wird, kann der Farbstoff und/oder das damit markierte Molekül identifiziert und/oder quantifiziert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin ein System zur Durchführung des Verfahrens.

HINTERGRUND ZUR ERFINDUNG

In vielen biologischen, mikrobiologischen und chemischen Nachweisreaktionen werden Farbstoffe und/oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt um Analyte zu markieren. Die Markierung erfolgt um die Analyte zu detektieren und zu unterscheiden. Die Detektion der Analyte kann dabei qualitativ oder quantitativ erfolgen. Um verschiedene Analyte in einer Reaktion oder einem Test zu unterscheiden werden zum Beispiel verschiedene Farbstoffe eingesetzt. Diese Farbstoffe unterscheiden sich typischerweise in ihrer Emissions- oder Reflektionswellenlänge. Diese Unterschiede werden mit einem Messgerät detektiert und so wird zwischen den verschiedenen Farbstoffen und damit den verschiedenen Analyten unterschieden. Beispielsweise wird in der DE102008025328 B4 ein multiplex PCR-Verfahren zur Identifikation von HIV-1 und HIV-2 Viren offenbart. Dabei werden mehrere Sonden mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoffpaar markiert, wobei die Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Anregungs- und Emissionswelllängen aufweisen und somit über verschiedene Farbkanäle separiert werden können.

Für viele Fragestellungen ist es nötig viele verschiedene Analyte in einem Experiment unterscheiden zu können um zum Beispiel Material oder Arbeit zu sparen oder aber auch um überhaupt aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können. Die Möglichkeiten verschiedene Farbstoffe anhand ihrer charakteristischen Emissions- oder Reflektionswellenlänge zu unterscheiden sind mit den aktuell verfügbaren Standardgeräten begrenzt. Daraus ergibt sich das Problem, dass es wünschenswert wäre mehr Analyte zu untersuchen oder zu unterscheiden als man Detektionskanäle zu Verfügung hat.

Zurzeit existieren mehrere Möglichkeiten mehr Analyte zu detektieren als Farben vorhanden sind. Diese Methoden sind allerdings mit Nachteilen behaftet, zum Teil sind sie nur für spezielle Nachweisreaktionen einsetzbar. Andererseits stellen sie oft Anforderungen an die Randbedingungen unter denen ein Nachweis durchzuführen ist, die sich nicht immer erfüllen lassen. Die folgenden Methoden des Standes der Technik stellen geeignete Hintergrund Informationen zur Erfindung dar.

„Barcoding“

Sogenannte „Barcoding“-Verfahren ermöglichen die Unterscheidung von mehr als einem Analyten (DNA Molekül) pro Farbkanal, falls mehr als ein Farbkanal verwendet wird. Zum Beispiel in Huang et al (2011, PLoS ONE 6 (1), S. e16033) kommen verschiedene Sonden zum Einsatz, die gegen verschiedene Ziele gerichtet sind und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Im Gegensatz zu üblichen Standardverfahren wird pro Zielsequenz nicht nur eine Sonde die mit einem Farbstoff einer Farbe markiert ist verwendet. Stattdessen werden mehrere Sonden verwendet, die gegen die gleiche Zielsequenz gerichtet sind und mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Das Verhältnis dieser Farbstoffe zueinander lässt bei der Detektion später Rückschlüsse auf die An- oder Abwesenheit verschiedener Zielsequenzen zu. Das System wird dabei so ausgelegt, dass keine Kombination doppelt vorkommt oder sich als eine Mischung anderer Kombinationen darstellen lässt. So wird sichergestellt, dass das Vorhandensein von mehreren Zielsequenzen eine Zuverlässige Unterscheidung nicht unmöglich macht. Für dieses Verfahren müssen pro Zielsequenz mehrere Sonden erstellt werden, was die Kosten und die Komplexität des Verfahrens deutlich erhöht. Außerdem ist es nötig die Intensität der einzelnen Farben sehr zuverlässig zu messen und auseinander zu halten. Mit Hilfe des Systems können deutlich mehr Zielsequenzen nachgewiesen werden als Farbkanäle vorhanden sind.

Multiplexing durch Template-Länge

Einige bekannte Verfahren ermöglichen die Unterscheidung von mehr als einem Analyten (DNA Molekül) pro Farbkanal. Zum Beispiel das Verfahren gemäß Miotke et al (2014, Anal. Chem., S. 140212095645005) verwendet interkalierende Farbstoffe, die zum Nachweis von doppelsträngiger DNA verwendet werden, die in einer digitalen droplet PCR vervielfältigt wurde. Dabei wurden mit zwei verschiedenen PCR Systemen zwei verschiedene Zielsequenzen nachgewiesen. Die PCR Systeme sind so entworfen, dass zwei Amplikons unterschiedlicher Länge (gemessen in Basenpaaren) entstehen. Diese unterschiedlich langen Amplikons werden mit einem interkalierenden Farbstoff angefärbt. Je länger das Amplikon ist, desto mehr interkalierender Farbstoff kann sich in die doppelsträngige DNA einlagern. Dadurch erhöht sich für lange Amplikons gegenüber kurzen Amplikons die absolute Fluoreszenzintensität. So können Tropfen unterschieden werden die keine Amplikons enthalten (sehr geringe Fluoreszenzintensität), die kurze Amplikons enthalten (mittlere Fluoreszenzintensität), die lange Amplikons enthalten (hohe Fluoreszenzintensität) und die sowohl lange als auch kurze Amplikons

enthalten (sehr hohe Fluoreszenzintensität). Das System ermöglicht es mehr Zielsequenzen nachzuweisen als Farben verwendet werden. Durch die Verwendung von interkalierenden Farbstoffen können nicht mehrere Farben eingesetzt werden. Außerdem muss der zu amplifizierende Bereich gewissen Kriterien (hier Länge) genügen und die absolute PCR Effizienz ist von Bedeutung um falsch klassifizierte Proben zu verhindern. So könnte zum Beispiel eine geringere PCR Effizienz bei der Verlängerung einer Probe mit langer Zielsequenz dazu führen, dass weniger Amplikons erzeugt werden als bei der kurzen Zielsequenz. Dies könnte dazu führen, dass die Fluoreszenzintensität niedriger oder vergleichbar mit der solcher Proben ist die kurze Amplikons enthalten. Dadurch würde eine Probe mit langen Amplikons fälschlicherweise als Probe mit kurzen Amplikons klassifiziert.

Kombination von Schmelzkurven und Farben zum Multiplexing

Dieses Verfahren ermöglicht die Unterscheidung von mehr als einem Analyten (DNA Molekül) pro Farbkanal. Zum Beispiel das Verfahren gemäß Yiqun et al (2013, Nucleic Acids Res. 41 (7), S. e76) verwendet zwei verschiedene Charakteristika des Systems, zum einen unterschiedliche Farben und zum anderen unterschiedliche Schmelzpunkte. Über eine Kombination der beiden werden so eine deutlich höhere Anzahl an Zielsequenzen nachgewiesen. Dabei verwendet das Verfahren Schmelzkurven, die ausschließlich zur Unterscheidung der Analyten aufgenommen werden müssen. Außerdem wird eine „Linear after the exponential" PCR verwendet, die ein komplexeres Assay als übliche PCRs voraussetzt.

"Lifetime Multiplexing"

US6447724 beschreibt ein Verfahren mit dem verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe durch unterschiedliche lange Lebensdauern des angeregten Zustands unterschieden werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden dabei als Marker eingesetzt. Wird ein Fluoreszenzfarbstoff durch Licht angeregt wird das Molekül in einen energetisch höheren, angeregten Zustand überführt. Dieser Zustand hat eine gewisse Lebensdauer, die für das Molekül charakteristisch ist. Obwohl zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auf der gleichen Wellenlänge emittieren (also die gleiche Farbe haben) können sie sich in Bezug auf die Lebensdauer des angeregten Zustands unterscheiden. Diese Unterschiede können ausgenutzt werden um die Farbstoffe zu unterscheiden. Allerdings ist es dafür nötig die Fluoreszenzintensität auf einer Zeitskala deutlich unter einer Millisekunde zu messen, da die Lebensdauer eines angeregt Zustands sich in diesem Bereich befindet. Messungen mit einer so hohen zeitlichen Auflösung sind nur mit teuren und komplexen Geräten, die nicht zur Standardausstattung von Laboren zum DNA Nachweis gehören, möglich.

„Multiplex digital PCR"

US20130178378 beschreibt eine Methode zum Erhöhen des Multiplexinggrades in digitaler PCR, sodass mehr Zielsequenzen nachgewiesen werden können als Farben verwendet werden. Das Prinzip beruht darauf, dass zwei verschiedene Faktoren variiert werden. Der erste Faktor der

verändert wird ist die Menge an Hydrolyse Sonde. Es wird davon ausgegangen, dass die Hydrolysesonde den limitierenden Faktor beim Signalanstieg während der PCR darstellt. Wird für eine Zielsequenz viel Sonde eingesetzt und für eine andere Zielsequenz weniger eingesetzt so wird davon ausgegangen, dass das Signal der zweiten Zielsequenz unter dem der ersten liegt. Dadurch können verschiedene Targets anhand ihres Endpunkt Fluoreszenzlevels unterschieden werden. Der zweite Faktor der variiert wird, ist der Prozentsatz der Sonde der mit Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Wird weniger Sonde mit Farbstoff markiert steigt die Fluoreszenzintensität erst zu einem späteren Zeitpunkt an. Dieses System setzt die absolute Effizienz der PCR voraus, da sonst die Grundannahme, dass die Sonde das limitierende Element für den Fluoreszenzanstieg ist nicht mehr richtig ist. Außerdem wird mehr als eine Sonde pro Zielmolekül verwendet.

"Multiplex hybridization Analysis" mittels Farbe und Schmelztemperatur

US6472156 beschreibt eine Methode zum Erhöhen des Multiplexinggrades. Dabei hybridisieren zwei Sonden an eine DNA Zielsequenz. Beide Sonden sind mit Fluorophoren markiert, die per Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) fluoreszieren können. Durch Messungen bei verschiedenen Temperaturen kann kontrolliert werden, welche der Sonden noch an die Zielsequenz hybridisiert ist und welche sich schon gelöst hat. Das Verfahren beruht dabei ausschließlich auf der Analyse des Schmelzpunktes den die Sonde mit der Zielsequenz bildet und analysiert nicht das veränderte Fluoreszenzverhalten des Fluorophors bei verschiedenen Temperaturen. Dabei werden mit dem Verfahren verschiedene Loci mit mindestens zwei verschiedenen Allelen nachgewiesen. Für ein Multiplexen mit Standard DNA Nachweisverfahren, die diese Bedingung nicht erfüllen scheint das System nicht geeignet.

Im Lichte des Standes der Technik sind einige Nachteile mit den bisher beschriebenen Verfahren vorhanden.

Verfahren, deren Grundlage eine gegenüber Vergleichsmessungen unveränderte Effizienz der PCR ist, sind anfällig gegenüber Effizienzänderungen der PCR. Diese sind aber bedingt durch verschiedene Cycler und Lesegeräte, die für PCRs verwendet werden, nicht selten. Außerdem lässt sich das System nur mit erhöhten Aufwand auf andere Assays übertragen, da für jeden neuen Assay Verifizierungstests durchgeführt werden müssen, die zeigen, dass die Effizienz der PCR hoch genug liegt um das System nicht signifikant zu beeinflussen.

Verfahren, die auf einer unterschiedlichen Länge der Targets beruhen sind teilweise nachteilhaft, da die Länge des Targets in manchen Fällen nicht frei wählbar ist, zum Beispiel wenn besonders kurze DNA Targets nachgewiesen werden müssen.

Verfahren, die interkalierende Farbstoffe verwenden, sind nicht dafür geeignet verschiedene Farben zu verwenden um den Multiplexing Grad zu erhöhen, da die Reaktion des interkalierenden Farbstoffs sequenzunspezifisch ist. Das senkt den Multiplexinggrad eines Komplettsystems gegenüber anderen Verfahren um den Faktor 4-6.

Verfahren, die die Lebensdauer des angeregten Zustands von Fluoreszenzfarbstoffen zur Unterscheidung der Farbstoffe heranziehen benötigen sehr aufwändige Messaufbauten. Um die Farbstoffe zuverlässig unterscheiden zu können sind zeitliche Auflösungen weit unterhalb von Millisekunden nötig. Derartige Geräte sind teuer und gehören nicht zur Standardausstattung von DNA-Nachweislaboren.

Verfahren, deren Grundlage eine gegenüber Vergleichsmessungen unveränderte Effizienz der PCR ist sind anfällig gegenüber Effizienzänderungen der PCR. Diese sind aber bedingt durch verschiedene Cycler und Lesegeräte die für PCRs verwendet werden nicht selten. Außerdem lässt sich das System nur mit erhöhten Aufwand auf andere Assays übertragen, da für jeden neuen Assay Verifizierungstests durchgeführt werden müssen, die zeigen, dass die Effizienz der PCR hoch genug liegt um das System nicht signifikant zu beeinflussen.

Verfahren, die sich auf den Nachweis von mindestens zwei Allelen spezialisieren sind für viele Nachweisreaktionen nicht geeignet und damit nicht ausreichend universell einsetzbar.

Daraus ergibt sich das Bedürfnis für eine Methode Farbstoffe zu unterscheiden, die nicht auf der Emissions- oder Reflektionscharakteristik beruht, möglichst universell einzusetzen ist und mit wenig zusätzlichem Aufwand in bestehende Verfahren und Geräte integriert werden kann.

Weiterhin wird in der WO2003/054548 A1 ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Gehaltes von Aggregaten von Substanzen in Mischungen offenbart. Dabei erfolgt die Anwendung von verschiedenen fluoreszenzmarkierten protein-basierten Sonden, die Ihre Detektionseigenschaften im Aggregatzustand ändern. In der DE102012203964 B3 wird ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren beschrieben. Dabei kommt es zur Anwendung von zwei nanopartikel-basierten Sonden, welche eine messbare Änderung in deren Detektionseigenschaften zeigen, wenn sie in räumlicher Nähe zueinander sind.

In der DE102008019756 B4 wird ein Verfahren zur Messung von Geschwindigkeiten in einer Fluidströmung offenbart, in welchem markierte Partikel mit unterschiedlichen Farbstoffen eingesetzt, welche messbare Änderungen der Detektionseigenschaften in Abhängigkeit des Drucker oder der Temperatur aufweisen. Mit dem Verfahren kann die Temperatur- bzw. Druckverteilung in Strömungen gemessen werden. Ebenso sind aus der EP 09190604 B1, der DE1589382 und der WO2011018355 A1 verschiedene Farbstoffe bekannt welche Ihre Eigenschaften unter verschiedenen Bedingungen ändern. So werden in der EP 09190604 B1 Farbwechselmaterialien beschrieben, deren Farbe sich durch Einwirkung von Wärme oder Wasser verändert. In der DE1589382 wird eine lumineszenzfähige Substanz offenbart, deren Lumineszenz sich mit Hilfe eines Magnetfeldes ändern lässt. In der WO2011018355 A1 werden druckempfindliche Farben offenbart. Solche Verfahren offenbaren Farbstoffe, die unter besondere Bedingungen unterschiedliche Emissions- und somit Detektionseigenschaften zeigen können. Nichtsdestotrotz wurden Farbstoffe dieser Art bisher nicht effektiv und gezielt kombiniert, um eine Detektion von mehreren Targetmolekülen in einem Farbkanal zu ermöglichen.

DETAILLIERTE DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

Im Lichte des Standes der Technik war es daher Aufgabe der Erfindung Mittel bereitzustellen, die die Identifizierung von mehreren Farbstoffen und/oder die Unterscheidung mehrerer Farbstoffe ermöglicht, ohne die Nachteile des Standes der Technik aufzuweisen.

Das erfindungsgemäße Problem wird gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zu einer Unterscheidung zwischen der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens zwei Farbstoffen, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellung der mindestens zwei Farbstoffe, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind und bevorzugt als Gemisch in einer Probe vorliegen;

b) Behandlung der mindestens zwei Farbstoffe, wobei die Behandlung eine Veränderung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens einem der Farbstoffe hervorruft; und

c) Messung der kombinierten Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe, mindestens vor und nach der Behandlung in Schritt b);

dadurch gekennzeichnet, dass

d) die mindestens zwei Farbstoffe durch Schritt b) in Bezug auf ihre Lichtemission und/oder Lichtreflektion unterschiedlich verändert werden, und

e) die Konzentration von mindestens einem der Farbstoffe durch die Änderung der gemessenen Lichtemission und/oder Lichtreflektion zwischen den Behandlungen in Schritt c) berechnet wird.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auf Verfahren zwei oder mehr Farbstoffe voneinander zu unterscheiden. Die beiden Farbstoffe emittieren oder reflektieren Licht einer ähnlichen oder gleichen Wellenlänge (d.h. sie haben im Wesentlichen die gleiche Farbe). Die beiden Farbstoffe können mit einem herkömmlichen Fluoreszenzdetektor oder mittels einer herkömmlichen kolorimetrischen Messung nicht unterschieden werden.

Der Begriff „mindestens zwei Farbstoffe, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind“ bezieht sich auf zwei Farbstoffe, deren Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge so nah beieinander liegt, dass sie mit klassischen Analysegeräten, die beispielsweise auf Bandpassfiltern beruhen, nicht zu unterscheiden sind. Der Begriff „mindestens zwei Farbstoffe, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind“ bezieht sich daher vorzugsweise auf das anzuwendende Analysegerät. Der Begriff umfasst daher auch mindestens zwei Farbstoffe, die

auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge mit dem anzuwendenden Analysegerät (z. B. in einem Detektionskanal) nicht zu unterscheiden sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist daher vorgesehen, dass die mindestens zwei Farbstoffe, „die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind" Farbstoffe sind, deren Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge zwar unterschiedlich sein können, jedoch im Wesentlichen weniger unterschiedlich sind, als die Bandbreite (Detektionskanal), die für die Detektion eingesetzt wird. Dies bedeutet, dass die beiden Farbstoffen Emissions- und/oder Reflektionswellenlängen aufweisen, die so nah beieinander liegen, dass beide durch einen einzelnen im Verfahren eingesetzten Detektionskanal detektiert werden können, z. B. dass beide Farbstoffe in einen einzelnen Farbkanal detektiert werden können. Einen Farbkanal oder Detektionskanal ist durch einen Wellenlängenbereich gekennzeichnet, in dem ein Gerät messen kann ohne ihn (in Bezug auf Wellenlängen) feiner auflösen zu können.

In einer Ausführungsform ist daher vorgesehen, dass die mindestens zwei Farbstoffe, „die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind" Farbstoffe sind, deren Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge weniger als 100 nm Unterschied zueinander aufweisen, bevorzugt 90 nm, 80 nm, 70 nm, 60 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm, 10 nm, 5 nm, 1 nm oder weniger als 1 nm Unterschied zueinander.

Die herkömmlichen Bandbreiten sind von Gerät zu Gerät unterschiedlich und unterscheiden sich auch in Bezug auf die Farbkanäle. Die meisten herkömmlichen Bandbreiten liegen in einem Bereich von beispielsweise 10 nm bis 40 nm.

Das Verfahren ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens zwei Farbstoffe, „die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind" Farbstoffe sind, die unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung nach der Behandlung in Schritt b) aufweisen. Die Berechnung der Konzentration eines Farbstoffes gemäß Schritt e) umfasst sämtliche mögliche Berechnungen, die geeignet sind, um absolute und/oder relative Konzentrationen von einem oder mehreren der Farbstoffe zu bestimmen. Die Berechnung ist nicht darauf beschränkt, dass absolute Konzentrationswerte eines Farbstoffes (oder des assoziierten Zielmoleküls) erstellt werden müssen. Die Berechnung der Konzentration umfasst beispielsweise auch die Erstellung einer Aussage, dass Farbstoff A (oder das assoziierte Zielmolekül A) in größeren Mengen vorhanden ist, und/oder in größerem Ausmaß zur Gesamtfluoreszenz beiträgt, als Farbstoff B (oder das assoziierte Zielmolekül B). Somit ist ein mögliches Ergebnis der Berechnung der relativen Konzentration von Farbstoff A zu Farbstoff B ein binärer Wert, der besagt ob Farbstoff A oder Farbstoff B in größeren Mengen vorliegt, ohne dass der Quotient der Konzentrationsmengen bestimmt werden muss. Die Feststellung der bloßen Anwesenheit eines Targetmoleküls auf Basis der „Berechnung" eines Farbstoffes – ohne spezifische Konzentrationsangaben zu erstellen – ist ebenfalls unter Schritt e) mitumfasst.

Die Berechnung der Konzentration eines Farbstoffes umfasst eine Berechnung der Konzentration eines ungequenchten Farbstoffs, falls Quencher im Verfahren eingesetzt werden. Es kann sein, dass die absoluten Farbstoffkonzentrationen im Verfahren bekannt sind und dass das Ergebnis des Verfahrens vom Signal eines ungequenchten Farbstoffs abhängt. Dabei ist es bevorzugt, dass die Konzentration des ungequenchten Farbstoffes mit einer Konzentration eines biologischen Zielmoleküls korreliert. Ein Zielmolekül ist im Sinne der Erfindung ein Molekül, welches durch das erfindungsgemäße Verfahren detektiert oder quantifiziert werden soll. Das Verfahren kann eingesetzt werden, um mehreren Zielmoleküle zu detektieren und/oder quantifizieren. Die Berechnung der Konzentration eines Farbstoffes gemäß Schritt e) umfasst somit ebenfalls eine Berechnung der (absoluten und/oder relativen) Konzentration des Zielmoleküls. Dabei kann der Farbstoff während der Verfahrensschritte a) – d) an dem Zielmolekül gebunden vorliegen. Beispielsweise kann der Farbstoff zusammen mit einem Quencher an einer Sonde gebunden sein, wobei die Quenchung durch die Bindung der Sonde an das Zielmolekül aufgehoben wird. Es kann aber auch sein, dass der Farbstoff während der Verfahrensschritte a) bis d) nicht an dem Zielmolekül gebunden vorliegt. Insbesondere kann es bevorzugt sein, dass eine Sonde mit einem Farbstoff und einem Quencher verwandt wird, wobei die Aufhebung der Quenchung durch eine Abspaltung des Farbstoffes von der Sonde erfolgt, nachdem diese an ein Zielmolekül bindet. In diesem Fall kann es bevorzugt sein, dass die Bindung der Sonde an das Zielmolekül sowie das Abspalten des Farbstoffes vor den Verfahrensschritten a) bis d) stattfindet. Dies ist beispielweise der Fall bei der Verwendung von TaqMan-Sonden in einem PCR Amplifikationsverfahren. Hierbei erlaubt die Bestimmung der Konzentration in Schritt e) des von der Sonde abgespaltenen Farbstoffes (und dadurch ungequenchten Farbstoffes) eine Bestimmung der Konzentration des Zielmoleküls.

Die Berechnung der Konzentration eines Farbstoffes gemäß Schritt e) umfasst Computer-implementierte Verfahren oder Ansätze, die bei der Durchführung des Schrittes e) verwendet werden können. Die Erfindung betrifft daher in einer weiteren Ausführungsform eine Software, die konfiguriert ist, eine solche Berechnung durchzuführen. Solche Software kann in eine Ausführungsform der Erfindung weitere Komponente oder Module umfassen, die für die Durchführung, Steuerung oder Auswertung eines PCR- oder automatisierten ELISA-Verfahrens geeignet sind. Solche weitere Software-Komponente und -Module können von einem Fachmann auf dem Gebiet der molekularen Analysetechnik identifiziert werden.

Die mindestens zwei Farbstoffe können unterschiedliche Moleküle markieren, indem sie mit diesen Molekülen assoziiert sind oder an diese gebunden sind. Die beiden Farbstoffe können Fluoreszenzfarbstoffe sein. Sie emittieren oder reflektieren Licht einer ähnlichen oder der gleichen Wellenlänge. Deshalb können sie nicht anhand ihrer Fluoreszenzwellenlänge mit herkömmlichen Analysegeräten in einem Detektionskanal unterschieden werden.

Im Verfahren werden mindestens zwei Messungen durchgeführt. Zwischen beiden Messungen wirkt eine Behandlung auf das System, welche die Fluoreszenzintensität bzw. Leuchtkraft

verändert. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst der Begriff „Behandlung, die eine Veränderung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens einem der Farbstoffe hervorruft", sämtliche mögliche Behandlungen, die den gewünschten Effekt hervorruft. Bevorzugt sind Behandlungen, die als externe Behandlungen zu verstehen sind. „Externe Behandlungen" beziehen sich auf Änderungen der physikalischen Bedingungen der zu analysierenden Probe, wobei die externe Behandlung den Inhalt, die Bestandteile und/oder die Komponenten der Probe, oder die Anzahl der Komponenten der Probe, nicht ändert, z. B. wenn von außen keine zusätzlichen neuen Komponenten in dem Gemisch hinzugegeben werden, beispielsweise wenn die Temperatur geändert oder eine Lichtbestrahlung gegeben wird, ohne den Probenbehälter zu öffnen.

Beispiele für Behandlungen unter b) sind eine Bestrahlung mit Licht (der Anregungswellenlänge), Temperaturänderungen, Red/Ox Potentialwechsel, Behandlung mit elektromagnetischen Feldern, pH Änderungen, Oberflächenänderungen oder Druckänderungen. Dabei ist die Änderung der Fluoreszenzintensität oder Leuchtkraft reversibel, irreversibel oder teilweise reversibel. Anhand der für den Farbstoff charakteristischen Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung, die durch die Behandlung zwischen den Messungen hervorgerufen wird, kann der Farbstoff und/oder das damit markierte Molekül identifiziert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher in einer Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung in Schritt 1 b) eine Lichtbestrahlung, bevorzugt mit einer entsprechenden Anregungswellenlänge, eine Temperaturänderung, ein Red/Ox Potentialwechsel, eine Änderung eines elektromagnetischen Felds, eine pH Änderung, eine Oberflächenänderung und/oder eine Druckänderung umfasst.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft daher die Erfindung ein Verfahren wie hierin beschrieben wird, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung in Schritt b) zu einer unterschiedlichen Reduzierung der Intensität der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der jeweiligen Farbstoffe führt. In Fig. 1 und Fig. 2 sind Beispiele der unterschiedlichen Änderungen der Fluoreszenzintensität bzw. Leuchtkraft zu sehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung in Schritt b) eine Lichtbestrahlung ist und diese bei einem ersten der mindestens zwei Farbstoffe zu einer stärkeren Reduzierung der Lichtemission und/oder Lichtreflektion führt, als bei einem zweiten der mindestens zwei Farbstoffe und die Berechnung der Konzentration in Schritt e) durch einen Vergleich des Quotienten aus der in Schritt c) gemessenen kombinierten Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe nach und vor der Lichtbestrahlung (L_{nach}/L_{vor}) mit einem oder mehreren Schwellenwerten erfolgt, wobei

a) im Falle, dass der Quotient L_{nach}/L_{vor} größer als ein erster Schwellenwert ist eine höhere Konzentration des zweiten Farbstoffes im Vergleich zum ersten Farbstoff vorliegt

und

b) im Falle, dass der Quotient L_{nach}/L_{vor} kleiner als ein zweiter Schwellenwert ist eine höhere Konzentration des ersten Farbstoffes im Vergleich zum zweiten Farbstoff vorliegt.

Es kann dabei bevorzugt sein, dass der erste und dem zweiten Schwellenwert identisch sind und das Verfahren genau einen Schwellenwert besitzt. In dem Fall ist das Ergebnis der Berechnung bevorzugt ein binäre Ergebnis, welche eine Aussage darüber trifft, ob ein erster Farbstoff (und bevorzugt ein damit assoziiertes erstes Zielmolekül) oder ein zweiter Farbstoffes (und bevorzugt ein damit assoziiertes zweites Zielmolekül) vorliegt.

Es kann weiterhin auch bevorzugt sein, dass der erste Schwellenwert größer als der zweite Schwellenwert ist und im Falle, dass der Quotient L_{nach}/L_{vor} größer gleich dem zweiten Schwellenwert und kleiner gleich dem ersten Schwellenwert ist, die Konzentration des ersten Farbstoffes nicht unterscheidbar von der Konzentration des zweiten Farbstoffes ist. Hierbei kann das Ergebnis der Berechnung im Schritt e) eine Aussage sein, ob der erster Farbstoff (und bevorzugt ein damit assoziiertes erstes Zielmolekül), der zweite Farbstoff (und bevorzugt ein damit assoziiertes zweites Zielmolekül) oder aber, dass beide Farbstoffe vorliegen. Durch die Schaffung eines solchen „Zwischenbereiches“, für welchen keine Aussage getroffen wird, welcher Farbstoff in einer höheren Konzentration vorliegt, wird vorteilhafterweise die Sicherheit des Verfahrens zur Detektion von Zielmolekülen erhöht.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher in einer Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass die Änderung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion durch Schritt b) irreversibel ist. Solche Behandlungen können beispielsweise vorgenommen werden, wenn die Farbstoffe nicht zum zweiten oder wiederholten Mal voneinander unterschieden werden müssen. Eine solche Analyse kann beispielsweise vorgenommen werden, wenn die Farbstoffe bereits an ihre Target-Moleküle angebunden sind und die Anwesenheit und/oder Quantität der jeweiligen Targets einmalig festgestellt werden sollen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in einer weiteren Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass die Änderung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion durch Schritt b) reversibel oder teilweise reversibel ist, insbesondere in einem Verfahren zur Bestimmung der Farbstoffe in einem „Real-time“-Assay, z. B. RT- PCR. Solche Behandlungen sind dafür geeignet in einem Detektionsverfahren eingesetzt zu werden, in welchem weitere Detektionsschritte im späteren Verfahren erforderlich sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in einer Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass die Farbstoffe Fluoresenszfarbstoffe sind. Diese Fluoresenszfarbstoffe sind bevorzugt ausgewählt aus folgender Liste: Cyanine, Fluoresceine, Rhodamine, Alexa Fluors, Dylight fluors, ATTO Farbstoffe, BODIPY Farbstoffe, SETA Farbstoffe, SeTau Farbstoffe, insbesondere Alexa Fluor 350, DY-415, ATTO 425, ATTO 465, Bodipy FL, Alexa Fluor 488, FAM, FITC, Fluoresceine,

Fluorescein-dT, ATTO 488, Oregon Green 488, Oregon Green 514, Rhodamine Green, TET, ATTO 520, JOE, Yakima Yellow, Bodipy 530/550, HEX, Alexa Fluor 555, DY-549, Bodipy TMR-X, Cyanine 300, ATTO 550, TAMRA, Rhodamine Red, ATTO 565, ROX, Texas Red, Cyanine 350, LightCycler 610, ATTO 594, DY-480 XL, DY-610, ATTO 610, LightCycler 640, Bodipy 630/650, ATTO 633, Alexa Fluor 647, Bodipy 650/665, ATTO 647, ATTO 647N, Cyanine 500, DY-649, LightCycler 670, Cyanine 550, ATTO 680, LightCycler 705, DY-682, ATTO 700, ATTO 740, DY-782, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 oder Cy7, Pyrene, Dansyl-X, AMCA-X, Eterneon 350/430, Eterneon 350/455, Dy 350, Aterneon 384/480, Atto 390, Eterneon 393/523, Eterneon 394/507, Dy 405, Alexa Fluor 405, Oyster 405, HYCO, Dy 415, DyQ425, D-AMCA, Alexa Fluor 430, Atto425, Abberior STAR440SX, Atto 465, Abberior STAR 470SX, Dabcyl, Eterneon 480/635, Dy 485 XL, Chrmoeo 488, Oyster 488, Dy 490, Fluorsecein-5-EX, BHQ-0, FAM, Dy 495, Chrmoeo 494, Alexa Fluor 488, Atto 495, Ibapy 946/503, Atto 488, Abberior STAR 488, IBApy FL, Alexa Fluor 500, DyQ 505, Dy 480 XL, Rhodamine 110X, Dy 505, Dy 510 XL, Atto 514, Abberior STAR 512, Atto 520, Alexa Fluor 514, Dy 481 XL, JOE 6-isomer, TET, Dy 520 XL. Carbxy-rhodamie 6G 6-isomer, Carboxy-rhodamie 6G 5-isomer, Dy521 XL, IBApy R6G, Alexa Fluor 532, Atto 532, Dy 530, IBApy 530/550, BHQ-1, Atto Rho6G, HEX, Atto 540Q, DyQ 1, IBApy TMR-X, Dy 554, TAMRA 5-isomer, Dy 555, Quasar 570, Dy 556, Chromeo 546, Oyter 555, Oyster 550, Atto 550, Alexa Fluor 555, Cy3, TAMRA 6-isomer, Alexa Fluor 546, Dy 548, Dy 547, Dy 560, Dy 550, Dy 549, Dy 549P1, Atto 565, Atto Rho3B, Oyster 568, Atto Rho11, Atto Rho12, Alexa Fluor 568, BHQ-2, Atto Thio 12, Dy 591, Dy 590, Abberior STAR 580, Sulforhodamine 101, Atto 580Q, Atto Rho101, Alexa Fluor 594, Cy3.5, Dy 594, Oyster 594, Atto 590, BBQ 650, Dy 605, Atto Rho 13, Atto 594, Alexa Fluor 610-X, Dy 610, Alexa Fluor 610, Atto 610, Atto 612Q, Atto 620, Dy 615, Atto Rho14, Atto 633, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 635, Abberior STAR 635, Abberior STAR 635P, EVOblueTM30, Dy 634, Dy 632, Dy 631, Dy 630, Dy 633, Atto 647N, Quasar 670, Atto 647N, Cy5, ChromeoTM 642, Dy 636, Oyster 647, Dy 635, Alexa Fluor 647, Oyster 650, Dy 647, Dy 652, Dy 654, Dy 649P1, Dy 648, Dy 651, Dy 650, Dy 649, Atto MB2, DyQ 660, DyQ 6616, Atto 655, Atto Oxa12, Atto 665, Alexa Fluor 660, Methylene Blue, BHQ-3, Cy5.5, Dy 677, Dy 678, Dy 675, Dy 676, Oyster 680, Dy 679P1, Dy 679, Alexa Fluor 680, Atti 680, DyQ 3, Dy 680, Dy 682, Dy 681, DyQ 700, Atto 700, Alexa Fluor 700, Dy 703, Dy 704, Dy 700, Dy 701, Atto 725, Dy 734, Dy 730, Dy 732, Dy 731, Atto 740, Oyster 750, Dy 754, Alexa Fluor 750, Dy 752, Cy7, Dy 750, Dy 751, Dy749P1, DyQ 4, Dy 778, Dy 777, Dy 776, Dy 780, Dy 781, Dy 782, Alexa Fluor 790, Dy 831.

Ein durchschnittlicher Fachmann ist in der Lage, Kombinationen von Farbstoffen auszuwählen, die als erfindungsgemäße Farbstoffe, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind, verwendet werden können. Diese Auswahl hängt von dem anzuwendenden Gerät ab, insbesondere von den Detektionskanälen und deren Bandbreite, die für die kombinierte Detektion des Signals der jeweiligen Farbstoffe verwendet werden sollen. Ein durchschnittlicher Fachmann ist ebenfalls in der Lage, die Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung eines Farbstoffes, die durch die Behandlung zwischen den Messungen hervorgerufen wird, zu bestimmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in einer Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einer der Farbstoffe in räumlicher Nähe zu einem Quencher vorliegt, sodass sich die gemessene Lichtemission und/oder die Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe aus der Summe der nicht gequenchten Anteile der Farbstoffe ergibt, wobei die Effizienz des Quenchers durch Schritt b) geändert wird, und wenn zwei oder mehrere Quencher in räumlicher Nähe zu den mindestens zwei Farbstoffen vorliegen, die Effizienz der jeweiligen Quencher durch Schritt b) unterschiedlich geändert wird.

Diese Ausführungsform ist deshalb relevant, da auch Quencher durch die erwähnten Behandlungen (Temperatur, Licht etc.) ihre Quenchingeffizienz ändern. So wäre es unter Umständen auch möglich zwei gleiche Farbstoffe mit unterschiedlichen Quenchern zu verwenden und dadurch zwei verschiedene TaqMan Sonden zu unterscheiden. Damit ist auch folgende Ausführungsform von der Erfindung umfasst: wenn zum Beispiel eine Sonde1 mit Quencher1 und Fluorophor1 verwendet wird und eine zweite Sonde2 mit Quencher2 und Fluorophor2 verwendet wird. Nun sinkt die Quenchingeffizienz von Quencher1 durch die Behandlung, die Fluoreszenzintensität von Fluorophor1 steigt. Das führt zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal von Sonde1. Die Quenchingeffizienz von Quencher2 steigt durch die Behandlung die Fluoreszenzintensität von Fluorophor2 sinkt. Das führt zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal von Sonde2. Nun kann man durch die Richtung der Änderung (Steigen oder Sinken) erkennen, um welche Sonde es sich handelt.

Dabei sind insbesondere auch „Dark Quencher“ gemeint, welche Licht und damit Lichtenergie absorbieren, aber nicht oder nur teilweise auf anderen Wellenlängen emittieren. Stattdessen geben diese Dark Quencher die aufgenommene Lichtenergie in anderen Energieformen, z.B. Wärme wieder ab. Die Anwendung von Quencher wird in den unten aufgeführten Beispielteil näher erläutert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der Farbstoffe mit der Konzentration von biologischen Moleküle korreliert. Unter dem Begriff "biologische Moleküle", werden bevorzugt kohlenstoffhaltigen Moleküle, einschließlich Makromoleküle, verstanden, die in einer biologischen Quelle zu finden sind, sowie Derivate, Analoga und Modifikationen solcher Moleküle. Darüber hinaus bezeichnet der Begriff kohlenstoffhaltigen Moleküle wie Arzneimittel, Antibiotika und dergleichen, die in der Medizin verwendet werden. Der Begriff bezieht sich auch auf verschiedene andere biologisch signifikante kohlenstoffhaltige Moleküle, wie Toxine, Pestizide und Herbizide, die in der Medizin oder in Umwelttests untersucht werden können. Beispielsweise werden Nukleinsäure-Analoga wie Morpholino-Oligos, welche modifizierte Basen enthalten, die in der Natur nicht vorkommen, ebenfalls als biologische Moleküle bezeichnet. Entsprechend sind alle Analoge eines Moleküls in der Natur oder jede chemische Modifikation eines solchen Moleküls ebenfalls bevorzugt in der Definition von biologischen Molekülen enthalten. Biologische Moleküle können aus natürlichen Quellen isoliert oder im Labor synthetisiert werden, wie es

beispielsweise der Fall ist für synthetische Peptide oder Oligonukleotide. In dieser bevorzugten Ausführungsform kann das Verfahren genutzt werden, um biologische Zielmoleküle zu detektieren.

Dabei kann es bevorzugt sein, dass die Farbstoffe während der Durchführung an den biologischen Molekülen gebunden vorliegen. Beispielsweise kann es bevorzugt sein, dass die Farbstoffe an einer Sonde gebunden vorliegen und die Lichtemission des Farbstoffes erhöht wird, wenn die Sonde an ein biologisches Zielmolekül bindet. Eine solche Sonde kann beispielsweise ein Molecular Beacon sein. Molecular Beacon sind Hybridisierungssonden zur Detektion von DNA, welche aus einer einzelsträngigen DNA mit einer Haarnadelstruktur bestehen, wobei sich jeweils ein Farbstoff und ein Quencher an einem 3‘ bzw. 5‘ Ende des DNA-Stammes befinden. Durch die Bindung eines Molecular Beacon an ein komplementäres DNA-Zielmolekül, erhöht sich die Distanz zwischen dem Quencher und dem Farbstoff. Die erhöhte Distanz führt zu einer Zunahme der Lichtemission des Farbstoffes. Somit korreliert die Lichtemission des Farbstoffes mit einer Konzentration des DNA-Zielmoleküles, da sich aus der Fluoreszenzemission des Farbstoffes Rückschlüsse auf das Vorhandensein des DNA-Zielmoleküles schließen lassen. In dem Fall liegt während der Durchführung der Verfahrensschritte a) bis d) der Farbstoff an dem zu detektierenden biologischen Molekül gebunden vor.

Es kann jedoch auch bevorzugt sein, dass der Farbstoff während der Durchführung der Verfahrensschritte a) bis d) nicht an dem biologischen Zielmolekül gebunden vorliegt. Das Prinzip der Detektion von TaqManSonden basiert beispielsweise darauf, dass eine Freisetzung des Farbstoffes von der Sonde die Anwesenheit von biologischen Zielmolekülen anzeigt. TaqMan-Sonden sind Hybridisierungssonden, umfassend einen Farbstoff und einen Quencher, zur Detektion von DNA-Zielmolekülen während einer PCR Amplifikationsreaktion. Im ungebundenen Zustand der Sonde oder im gebundenen Zustand der Sonde an das komplementäre DNA-Zielmolekül wird die Lichtemission des Farbstoffes durch den Quencher unterdrückt. Durch die Polymeraseaktivität während der Amplifikation des DNA-Zielmoleküles wird das Fluorophor von dem Teil der Sonde, welche den Quencher umfasst, abgespalten und die Lichtemission des ungebunden, ungequenchten Farbstoffes erhöht. Auch wenn während der Durchführung der Verfahrensschritte a) bis d) der Farbstoff nicht an dem biologischen Zielmolekül gebunden vorliegt, korreliert die Lichtemission des Farbstoffes mit der Konzentration der DNA-Zielmoleküle. Es kann somit auch bevorzugt sein, dass in einer Ausführungsform der Erfindung die Farbstoffe mindestens zeitweise an biologische Moleküle gebunden vorliegen, wobei die zeitweise Bindung vor dem Schritt a) des Verfahrens erfolgt ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in einer bevorzugten Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass die Farbstoffe an biologische Moleküle, bevorzugt Nukleinsäure, Antikörper und/ oder Antigene, gebunden vorliegen. Demgemäß können biologische Zielmoleküle detektiert werden. Die Erfindung stellt Techniken zur Verfügung, mehrere biologische Moleküle in einer Probe zu detektieren, wobei mehr Moleküle als zur Verfügung stehende Farbkanäle oder Detektionskanäle detektiert werden können.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft daher die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von zwei oder mehreren Nukleinsäuren, beispielsweise Nukleinsäureprodukte einer Amplifikationsreaktion, bevorzugt Polymerase Chain Reaction (PCR).

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die Anwendung des Verfahrens zur Bestimmung von zwei oder mehreren Nukleinsäuren, wobei die Farbstoffe an unterschiedliche Oligonukleotide gebunden sind und die Oligonukleotide eine sequenzspezifische Bindung an einem oder mehrere Targetsequenzen ermöglichen, wobei die Farbstoff-Oligonukleotid-Kombinationen bevorzugt aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden: TaqMan Sonden, Molecular Beacons, Hybridisierungssonden, RPA-Sonden, Mediator-Sonden, FRET-Sonden und/oder Q_G-Sonden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von zwei oder mehreren Proteintargets, bevorzugt Antikörpern oder Antigenen, bevorzugt in einem Immun- oder Zellassay. Ein besonders bevorzugter Immunoassay ist dabei der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein System zu einer Unterscheidung zwischen der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens zwei Farbstoffen, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind, umfassend:

a) mindestens zwei Farbstoffe, die (i) auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind, (ii) unterschiedliche Veränderungen ihrer Lichtemission und/oder Lichtreflektion zeigen, die durch die Behandlung gemäß Anspruch 1 b) hervorgerufen werden, und (iii) als Gemisch in einer Probe vorliegen;

b) Mittel zur Behandlung der mindestens zwei Farbstoffe, wobei die Behandlung eine Veränderung der Lichtemission und/oder Lichtreflektion von mindestens einem der Farbstoffe hervorruft,

c) Mittel zur Messung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe, z. B. einen Fluoreszenz- und/oder kolorimetrischen Detektor.

Das erfindungsgemäße System ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Bestrahlung der mindestens zwei Farbstoffe, z.B. Lichtquellen, bevorzugt eine Leuchtdiode (LED) oder Quecksilberdampflampen oder andere Leuchtkörper, im System vorhanden sind.

Weitere Mittel zur Behandlung der Farbstoffe können Heiz- und/oder Kühlelemente sein, die die Temperatur der die Farbstoffe enthaltenden Probe gerichtet ändern können. Weitere Mittel zur Behandlung der Farbstoffe können pH verändernde Substanzen (z.B. Säuren oder Laugen) sein, die der Probe zugeführt werden oder ihre pH verändernde Wirkung erst verzögert oder durch eine äußere Einwirkung gelenkt freisetzen (z.B. verkapselte Säuren oder Laugen und/oder sogenannte „caged protons“, chemische Verbindungen, die ihre Struktur bei Bestrahlung mit Licht derart ändern, dass ein Proton freigesetzt wird und den pH-Wert der Lösung senkt). Weitere

Mittel zur Behandlung der Farbstoffe können Elektromagnetische Spulen sein, die die Probe gezielt einem elektromagnetischen Feld aussetzen können.

Die Erfindung kann in Diagnostikverfahren eingesetzt werden, in welchen die Identifikation von bestimmten biologischen Molekülen krankheitsrelevante Informationen liefern kann. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch in allen analytischen Anwendungen vorstellbar, wo unterschiedliche Moleküle identifiziert werden müssen. Die Erfindung ermöglicht analytische oder diagnostische Aussagen, die bisher nur mit sehr komplexen Geräten oder kostenintensiven Verfahren möglich waren.

Durch die erfindungsgemäße Methode können Multiplex-Verfahren, im Grunde genommen sämtliche Arten von Detektion von mehreren Analyten in einer Probe, durch eine reduzierte Anzahl von Detektionskanäle vereinfacht durchgeführt werden. Dies reduziert die Erfordernisse an das Gerät, welches für das Verfahren eingesetzt werden soll. Geräte, die vorher nicht für ein ausführliches Multiplex Verfahren geeignet waren, können mit Anwendung der Erfindung nun effektiv eingesetzt werden.

Durch die erfindungsgemäße Methode können mit dem gleichen Gerät mehr Analyte in einer Reaktionslösung nachgewiesen werden als zuvor. Dies reduziert die Material- und Personalkosten wesentlich und erhöht die Effizienz.

Mögliche Anwendungen der Erfindung:

Anwendung zur DNA Detektion:

Mögliche Anwendungen der Erfindung basieren auf der Erkenntnis, dass die Änderung der Fluoreszenzintensität von Fluoreszenzfarbstoffen, die durch äußere Änderungen, wie zum Beispiel Bestrahlung mit Licht der Anregungswellenlänge oder Änderungen der Temperatur, hervorgerufen wird genügend groß ist um mit konventionellen, günstigen Laborgeräten gemessen zu werden. Die Unterschiede sind außerdem genügen groß um zwei verschiedene kommerziell erhältliche Farbstoffe mit hoher Sicherheit auseinander zu halten.

In weiteren Beispielen sind die Farbstoffe, die es zu unterscheiden gilt an Oligos gebunden, die dem Nachweis von DNA dienen. Diese Oligos können z.B. eine der folgenden Sonden sein: TaqMan Sonden, Molecular Beacons, Hybridisierungssonden, RPA-Sonden, Mediator-Sonden, FRET-Sonden oder Q_G-Sonden.

Der Nachweis der DNA kann z.B. mit Hilfe von PCR oder isothermalen Verfahren erfolgen, aber auch über Hybridisierung von Sonden.

Anwendungen, die das Ausbleichverhalten von Farbstoffen ausnützen:

In weiteren Beispielen können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe durch bestrahlen mit Licht unterschieden werden. Das Licht kann z.B. von einer kommerziellen LED stammen, die kostengünstig erhältlich ist. Das Licht kann z.B. von der Anregungslichtquelle der Ausleseeinheit

stammen. Das Licht sollte (mindestens teilweise) im Anregungsspektrum mindestens einer der beiden Farbstoffe liegen. Dabei wird die Fluoreszenzintensität vor und nach der Bestrahlung mit Licht gemessen. Einer der beiden Farbstoffe bleicht durch die Bestrahlung mit Licht stärker aus als der andere. Eine zweite Messung der Fluoreszenzintensität wird nach der Bestrahlung mit Licht durchgeführt. Nun werden die Messwerte verglichen. Anhand der prozentualen Abnahme kann man Rückschlüsse darauf ziehen, welcher der beiden Farbstoffe in der Probe vorhanden ist bzw. stärker zum Fluoreszenzsignal beiträgt. In Figur 3 wird eine schematische Abbildung des Verfahrens dargestellt.

Anwendungen, die die Temperaturabhängigkeit von Farbstoffen ausnützen:

In weiteren Ausführungsbeispielen werden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch Änderung der Temperatur unterschieden. Die Temperatur wird z.B. während einer PCR routinemäßig geändert, sodass eine Temperaturänderung der Probe leicht zu realisieren ist. Es wird die Fluoreszenzintensität vor und nach Änderung der Temperatur gemessen. Einer der beiden Farbstoffe ändert seine Fluoreszenzintensität bei geänderter Temperatur stärker als der andere. Eine zweite Messung der Fluoreszenzintensität wird nach der Änderung der Temperatur durchgeführt. Nun werden die Messwerte verglichen. Anhand der prozentualen Abnahme kann man Rückschlüsse darauf ziehen, welcher der beiden Farbstoffe in der Probe vorhanden ist bzw. stärker zum Fluoreszenzsignal beiträgt. Eine schematische Darstellung des Prinzips wird in Figur 4 abgebildet.

Anwendungen, die Veränderungen der Quenchingeffizienz ausnützen:

In weiteren Beispielen wird die Änderung der Quenchingeffizienz des Quencher ausgenutzt um eine DNA Nachweissonde zu unterscheiden. Viele DNA Nachweissonden bestehen aus einem Fluorophor und einem Quencher, der über ein DNA Oligo räumlich nah an den Fluorophor gebracht wird. Solange Fluorophor und Quencher in räumlicher Nähe sind wird der überwiegende Teil der Fluoreszenzemission vom Quencher gequencht und als Wärme oder Licht anderer Wellenlänge an die Umgebung abgegeben. Während der Nachweisreaktion wird in Anwesenheit von Analyt der Quencher räumlich weiter vom Fluorophor entfernt und die Fluoreszenzintensität des Fluorophors nimmt zu. Ändert sich die Quenchingeffizienz des Quencher so ändert sich auch die Gesamtfluoreszenz des Systems. Über eine geschickte Auswahl von Fluorophor und Quencher ist es so möglich zu zeigen bei welchen Sonden der Quencher räumlich vom Fluorophor getrennt wurde und bei welchen nicht. Die Änderung der Quenchingeffizienz kann z.B. hervorgerufen werden durch, Licht (z.B. der Anregungswellenlänge), Temperaturänderungen, Red/Ox Potentialwechsel, elektromagnetische Felder, pH Änderungen, Oberflächenänderungen oder Druckänderungen. Dabei ist die Änderung der Quenchingeffizienz reversibel, irreversibel oder teilweise reversibel.

Anwendung in digitaler PCR:

In weiteren Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren angewendet, um den Multiplexinggrad von DNA Nachweisreaktionen verschiedener Art zu erhöhen. Dies können z.B. digitale Nachweisreaktionen wie digitale PCR oder digitale isothermale Nachweisverfahren sein.

Anwendung in Immunoassays:

In weiteren Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren angewendet, um den Multiplexinggrad von Immunoassays verschiedener Art zu erhöhen. Dabei kann z.B. der Analyt, das Antigen oder der Antikörper mit Farbstoff markiert sein. Außerdem kann ein Farbstoff z.B. durch eine Enzymreaktion freigesetzt werden.

Anwendung in Zellmarkern:

In weiteren Beispielen wird die Technik zwei Farbstoffe zu unterscheiden angewendet um verschiedene Zellmarker zu unterscheiden. Als Zellmarker sind „Cluster of Differentiation"-Moleküle beispielsweise anwendbar. Der Begriff „Cluster of Differentiation" (CD) bezeichnet Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. Da verschiedene CD-Moleküle, oder andere Zellmarker, spezifisch für eine bestimmte Sorte oder Entwicklungsstufe von Zellen sind, können sie als Marker verwendet werden, die durch Antikörper, die mit Farbstoffe gekoppelt sind, erkannt und auf diese Weise nachgewiesen werden können.

Anwendung in Kombination mit Quantum Dots:

In weiteren Beispielen werden die besonderen Eigenschaften von Quantum Dots (QD) oder verwandten Farbstoffen ausgenutzt. Im Vergleich zu konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen sind QD außergewöhnlich stabil gegenüber Ausbleichen. So können um QD Farbstoffe und konventionelle Fluoreszenzfarbstoffe, die auf der gleichen Wellenlänge emittieren, unterschieden werden. Eine mögliche Anwendung wird in Figur 5 schematisch dargestellt.

Anwendung in Kombination mit Molecular Beacons:

Molecular Beacons (MB), die nach einer erfolgreichen Amplifikation geöffnet an ein DNA Template angelagert sind, erzeugen ein Fluoreszenzsignal, das gegenüber einem Zeitpunkt vor der Amplifikation des Targets erhöht ist. Dieses Fluoreszenzlevel nimmt mit erhöhter Temperatur ab, da der MB abschmilzt und wieder zusammenklappen kann. Erhöht man die Temperatur weiter schmilzt der „Stem" des MB auf und das Fluoreszenzsignal steigt wieder an. Dieses Verhalten kann ausgenutzt werden, indem unterschiedliche MB designt werden, die unterschiedliche Schmelzpunkte haben. Um diese Schmelzpunkte von der zu detektierenden Sequenz unabhängig zu gestalten kann ein System verwendet werden, dass einen Primer enthält, der eine generische zum MB revers-komplementäre Sequenz enthält. Messungen bei verschiedenen Temperaturen ermöglichen nun Rückschlüsse darüber welche Zielsequenz, und mit ihr einhergehen welche generische Primersequenz, amplifiziert wurde. Auch eine Kombination von MB und Hydrolyse Sonden ist denkbar. Durch ein Auslesen bei 3

verschiedenen Temperaturen können so mehr als 2 Zielsequenzen pro Farbe unterschieden werden. Dabei können alle Sonden mit Farbstoffen markiert sein, die auf der gleichen oder einer sehr ähnlichen Wellenlänge emittieren. Mögliche Anwendungen sind in Figur 6 und Figur 7 schematisch dargestellt.

Vorteile der Erfindung gegenüber Stand der Technik:

Ein Vorteil des Systems ist es den Multiplexinggrad auf >1 pro Farbe zu erhöhen ohne dem System zusätzliche Beschränkungen aufzuerlegen. Speziell in Bezug auf DNA Nachweise ist das von großer Bedeutung, da eine Methode umso universeller einsetzbar ist, je weniger Bedingungen sie an die nachzuweisende Zielsequenz stellt.

Im Gegensatz zu anderen Methoden, müssen für die Erhöhung des Multiplexinggrades für die hier gezeigte Methode nicht mehr als eine Sonde pro Zielsequenz entworfen werden.

Im Gegensatz zu anderen Methoden ist man bei der hier vorgestellten Methode frei in der Wahl der Zielsequenz. Dies bezieht sich insbesondere auch auf die Länge der Zielsequenz, die keinen weiteren Bedingungen unterworfen ist.

Im Gegensatz zu anderen Methoden ist die hier vorgestellte Methode nicht abhängig von der absoluten Effizienz einer Nachweisreaktion. Da die Werte vor einer Änderung mit Werten nach Änderungen verglichen werden ist der Verlauf eventuell vorgeschalteter Reaktionen oder Änderungen (wie z.B. einer Amplifikation z.B. mittels PCR) für das Nachweisverfahren nicht relevant.

Im Gegensatz zu anderen Methoden benötigt die hier vorgestellte Methode mindestens zwei Messungen, lässt sich also mit weniger Aufwand umsetzen als andere Methoden.

Im Gegensatz zu anderen Methoden müssen für die hier dargestellte Methode keine aufwändigen Messungen mit einer hohen Auflösung der Zeit oder der Wellenlänge durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu anderen Methoden kann die hier dargestellte Methode mit herkömmlichen Analysegeräten umgesetzt werden und erfordert für einige Ausführungsbeispiele keinen zusätzlichen Handhabungsaufwand. Dabei können „herkömmliche Analysegeräte“ zum Beispiel folgende real-time Cycler sein: RotorGene6000, RotorGeneQ, LightCycler96, Mx3000P QPCR System, qTOWER Real-Time Thermal Cycler, TOptical Real Time Thermal Cyclers, CFX Connect Real-Time PCR Detection System, CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems, CFX96 Touch Deep Well™ Real-Time PCR Detection System, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Systems, QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System, StepOnePlus ™ Real-Time PCR System.

FIGUREN

Im Folgenden soll die Erfindung anhand der folgenden Figuren näher erläutert werden, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1: Links: Die beiden Farbstoffe bleichen unterschiedlich schnell aus. Anhand der verbliebenen Restfluoreszenz lassen sich die beiden Farbstoffe gut unterscheiden. Links für das Paar FAM/Atto488, beide fluoreszieren auf einer ähnlichen Wellenlänge, rechts für das Paar Cy5/Atto647N, beide fluoreszieren auf einer ähnlichen Wellenlänge. Sowohl FAM als auch Cy5 sind in der DNA Analytik übliche Farbstoffe, die von Standardgeräten ausgelesen werden können.

Fig. 2: Falschfarbenfluoreszenzaufname eines Droplets (Durchmesser ca. 100µm). Zwischen den Messungen ist das Droplet dem Licht der Anregungswellenlänge im Gerät ausgesetzt (weiße Zahlen: Minuten nach Beginn der Messung). Deutlich zu erkennen ist das Ausbleichen des Droplets. Dies zeigt, dass das Prinzip auch in der digitalen PCR anwendbar ist.

Fig. 3: Schematische Zeichnung des Ablaufs einer PCR bei der das hier vorgestellte System verwendet wird. Während und nach der PCR können die beiden Targets nicht unterschieden werden, da sie mit zwei Farbstoffen markiert sind, die auf einer ähnlichen Wellenlänge fluoreszieren (der unterschiedlich starke Anstieg und der unterschiedliche „cycle of quantification“ Wert sind rein exemplarisch und können auch gleich sein). Durch Bleichen der Farbstoffe verlieren beide Farbstoffe unterschiedlich schnell ihre Fluoreszenzintensität. Nun lassen sich die Farbstoffe und damit die Targets unterscheiden.

Fig. 4: Schematische Darstellung des hier dargelegten Prinzips. Die Kurven zeigen den Verlauf der Fluoreszenzintensität bei ansteigender Temperatur nach der PCR. Probe 1 (gestrichelte Kurve) verliert ihre Fluoreszenzintensität deutlich schneller als Probe 2 (gepunktete Kurve). Obwohl beide Farbstoffe auf einer ähnlichen Wellenlänge fluoreszieren lassen sie sich nun unterscheiden.

Fig. 5 Schematische Darstellung des hier dargelegten Prinzips. Die Kurven zeigen den Verlauf der Fluoreszenzintensität unter Bestrahlung mit Licht nach der PCR. Probe 1 (gestrichelte Kurve) verliert ihre Fluoreszenzintensität deutlich schneller als Probe 2 (gepunktete Kurve), die ihre Fluoreszenzintensität wiederum schneller verliert als Probe 3 (durchgezogene Linie). Dabei sind Probe 1 und 2 mit herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, Probe 3 hingegen mit QD, die gegenüber einem Ausbleichen äußerst stabil sind. Obwohl alle drei Farbstoffe auf einer ähnlichen Wellenlänge fluoreszieren lassen sie sich nun unterscheiden.

Fig. 6: Dargestellt sind zwei Systeme die Zielmoleküle mit einem Molecular Beacon (MB) nachweisen. Dabei ist der revers komplementäre Sequenz des MB als Linker am Primer enthalten. Durch die PCR oder eine ähnliche Amplifikationsreaktion werden die

Zielmoleküle vervielfältigt. Ist mehr Zielmolekül vorhanden klappen die MB auf und erhöhen daher das Fluoreszenzniveau. Dabei ist die zum Primer linker revers komplementäre Sequenz des linken MB kürzer als die des rechten.

Fig. 7: Links: Vier verschiedene Fälle werden aufgeführt die jeweils verschiedene Kombinationen der beiden Zielmoleküle oder keins der beiden enthalten. Zwei Messungen bei 55 °C und 70 °C werden durchgeführt die fiktiven Ergebnisse der Fluoreszenzmessung befinden sich für jeden der vier Fälle rechts der Temperaturen. Die unterschiedliche Länge der Hybridisierungssequenzen der MB bedingt unterschiedliche Schmelztemperaturen. Diese werden herangezogen um alle 4 Fälle zu unterscheiden. Rechts: Zwei Schmelzkurven für verschiedene Zielsequenzen und die Messungen mit ihren Ergebnissen.

Fig. 8: Auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten wiedergegeben. Auf der y-Achse ist die auf t=0 normierte Fluoreszenzintensität in willkürlichen Einheiten dargestellt. Rote Kreuze geben die Fluoreszenzintensität der Probe wieder, die mit *E. coli* DNA versetzt wurde. Schwarze Quadrate geben die Fluoreszenzintensität der Probe wieder, die mit *B. subtilis* DNA versetzt wurde.

Fig. 9: Beispiel für das Temperaturverhalten von FAM&Atto488. Schwarze Quadrate (oben) entsprechen nur Cy5 Zielsequenz anwesend, Kreise (mittel) entsprechen nur Atto647N Zielsequenz anwesend, Dreiecke (unten) entsprechen beiden Zielsequenzen anwesend.

Fig. 10: Unterschiede im Ausbleichen von PCR-Proben nach Beendigung der PCR. In jedem Farbkanal können zwei verschiedene Targets unterschieden werden. Dies sind im roten Farbkanal mecA und mecC und im grünen Farbkanal nuc und PVL. Für jeden der Farbkanäle wurden drei verschiedene Kombinationen der Target-DNA mit einer Konzentration von 10^5 cp. μl^{-1} in die PCR-Probe gebracht. Wie ersichtlich können alle drei Kombinationen mit einem Konfidenzniveau von größer als 99% unterschieden werden. Die Datenpunkte repräsentieren inter- und intraexperimentelle Variabilität. Für jeden Datenpunkt wurden 3 Experimente mit 4 Replikaten durchgeführt.

Fig. 11: Experimentelle Daten für die verbleibende Fluoreszenz von PCR-Proben umfassend fluoreszierenden Proben für welche unterschiedliche Farbstoffe aktiviert wurden. Hierzu wird die Fluoreszenz nach 6 minütigem Ausbleichen unter Bestrahlung von weißem Licht zu der anfänglichen Fluoreszenz vor dem Ausbleichen verglichen. Alle Farbstoffe lagen mit einer Konzentration von 200 nM vor, nur die mit Cy5 markierte Probe wurde mit einer Konzentration von 20 nM verwandt. Die DNA Konzentration betrug in allen Fällen 10^5 cp. μl^{-1}

Fig. 12: Vertrauensniveau mit welchem die gezeigten Kombinationen von Targets unterschieden werden können von Experimenten in denen nur ein Target amplifiziert wurde. In allen Experimenten wurde derselbe 4-plex-PCR Versuch gemäß Beispiel 5 genutzt. Jeder Datenpunkt repräsentiert 4 Replikate.

Fig. 13: Quantifizierung von DNA Zielsequenzen mit Hilfe von monochromen Mulitplexing in droplet digital PCR (ddPCR). A) 4 Proben mit verschiedenen Konzentrationen von *E. coli* DNA (220, 440, 880, 1760 cp. μl^{-1}) und konstanter Konzentration von *B. subitlis* DNA (200 cp. μl^{-1}) wurde zusammen amplifiziert. Durch die Amplifikation der *E. coli* DNA wird die mit dem langsam ausbleichenden Atto488 markierte Probe entquenched. Das „Entquenchen" bezieht sich dabei auf die Fluoreszenzsteigerung der markierten Probe, sobald diese an DNA bindet, da dadurch der Einfluss eines Quenchers vermindert wird. Das Entquenchen führt somit zu einer Erhöhung des Anteiles an ungequenchten oder nicht gequenchten Farbstoffen. Durch die Amplifikation der *B. Subtilis* DNA wird hingegen die mit dem schnell ausbleichenden FAM markierte Probe entquenched. Beide Fluorophore, FAM und Atto488, emittieren Licht mit einer vergleichbaren Wellenlänge und wurden unterschieden durch mit einem monochromen Multiplexing Verfahren. (A) Die Abszisse zeigt Konzentration der eingangs *E. coli* DNA-Kopien und die Ordinate zeigt Konzentration der *E. Coli* DNA, welche in 4 digitalen PCR Experimenten nach dem Ausbleichen gemessen wurden. (B) Die gleiche Prozedur wurde für drei verschiedene Konzentrationen von *B. subitilis* DNA (220, 632, 2000 cp. μl^{-1}) und einer konstanten Konzentration von *E. Coli* DNA (600 cp. μl^{-1}) wiederholt. Für jedes der vorgenannten Experimente wurde 150 Tropfen ausgewertet.

Fig. 14: Abklingen der Fluoreszenzintensität in droplet digital PCR (ddPCR). Es wird die normalisierte Abklingkurve der Fluoreszenzintensität von über 200 positiven Tropfen aus 3 verschiedenen Experimente (für jeden Farbstoff außer für „Atto488 und FAM": ~50 Tropfen aus 3 Experimenten) gezeigt, die FAM und Atto488 markierte Proben enthalten, wobei der in der Legende benannte entquenched wurde. Für das Ausbleichen wurde die Lichtquelle des Scanners genutzt.

Fig. 15: Photobleichen in droplet digital PCR. A) zeigt eine Mikroskopaufnahme der Tropfen vor und nach 10 minütiger Bestrahlung mit weißem LED Licht. Die hellen Tropfen in den „vor dem Ausbleichen" Bildern enthalten FAM entquenchten Farbstoff. Zur besseren Visualisierung sind einige mit Pfeilen markiert. Alle hellen Tropfen in den „nach dem Ausbleichen" Bildern enthalten Atto488 entquenchte Hydrolyse Proben, da die FAM Fluoreszenzintensität auf ein Hintergrundniveau abgesenkt ist, wie an den Tropfen zu sehen ist, welche mit einem Pfeil markiert sind. Die Zahlen in der linken oberen Ecke der „vor dem Bleichen" Bilder entsprechen der erwarteten Anzahl an E. coli targets pro µl). Jedes Bild ziegt die Tropfen nach der digital droplet PCR in dem Auslesechip. Alle Tropfen enthalten den gleichen PCR mastermix, die Zielsequenz der DNA wurde statistisch verteilt. B) zeigt die abklingende Fluoreszenzintensität in einem Tropfen mit einer entquenchten FAM markierten Probe während des Ausbleichens über einem Zeitraum von 10 Minuten (die Zahlen entsprechen den Minuten des Ausbleichens).

BEISPIELE

Im Folgenden soll die Erfindung anhand der folgenden Beispiele näher erläutert werden, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Beispiel 1:

Detaillierte Beschreibung der Untersuchung/Bestimmung von Farbstoffen, die unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung nach einer Behandlung aufweisen:

Eine Reaktionsmischung wird vorbereitet, die folgende Komponenten enthält:

- 2x Finnzymes DyNAmo Flash Probe qPCR Kit master mix (Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany),
- 300 nM Primers (Biomers, Ulm, Germany)
- 200 nM Sonden (Biomers, Ulm, Germany)
- DNA/RNAse freies Wasser (Invitrogen, Carlsbad, Germany)
- 5'-GGCAATTGCGGCATGTTCTTCC-3' (Forward Primer *E. coli*),
- 5'-TGTTGCATTTGCAGACGAGCCT-3' (Reverse Primer *E. coli*),
- 5'-Atto488-ATGCGAACGGCGGCAACGGCAACATGT-BHQ1-3' (Sonde *E. coli*),
- 5'-GCTAGCGAAACAAACGCTCAGCAA-3' (Forward Primer *B. subtilis*),
- 5'-ACTTCCACCCGAAGATGAAGTGCT-3' (Revers Primer *B. subtilis*),
- 5'-FAM-AGCTGGACAACAAGGTCAATTCGGCA-BHQ1-3' (Sonde *B. subtilis*),

Dabei fluoreszieren FAM und Atto488 auf sehr ähnlichen Wellenlängen (518 bzw. 523 nm).

Zwei Reaktionen wurden vorbereitet, eine mit *B. subtilis* DNA versetzt und die andere mit *E. coli* DNA versetzt. Beide Reaktionen wurden PCR Konditionen ausgesetzt und das Fluoreszenzsignal gemessen. Beide Messungen wurden im gleichen Farbkanal (510±5 nm) durchgeführt. Nach der PCR wurden die Proben starkem Licht ausgesetzt und die Fluoreszenz der Proben im Abstand von jeweils einer Minute gemessen. Die Intensität zum Zeitpunkt t=0 (also vor Beginn der Bestrahlung durch starkes Licht) wird als Ausgangswert verwendet um alle folgenden Fluoreszenzmessungen zu normieren.

Folgende Formel kann für die Berechnung verwendet werden:

$$Fluoreszenintensität_{Normiert,t=x} = \frac{Fluoreszenzintensität_{t=x}}{Fluoreszenzintensität_{t=0}}$$

Wie aus Figur 8 hervorgeht sinkt die Fluoreszenzintensität bei Bestrahlung durch weißes Licht für beide Proben. Allerdings sinkt die Fluoreszenzintensität der mit FAM markierten PCR Sonde schneller als die die Fluoreszenzintensität der mit Atto488 markierten PCR Sonde. So lassen sich die beiden Sonden anhand der Farbstoffe unterscheiden, obwohl beide Messungen im gleichen Farbkanal durchgeführt wurden.

Das in diesem Beispiel offenbarte Verfahren zur Untersuchung von Farbstoffen kann eingesetzt werden, um die Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung eines Farbstoffes, die durch die Behandlung zwischen den Messungen hervorgerufen wird, zu bestimmen.

Beispiel 2:

Detaillierte Beschreibung der Untersuchung/Bestimmung von zwei Farbstoffen, die unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung aufweisen, für die Detektion von zwei Zielsequenzen:

1. Eine DNA Probe, die eine unbekannte Zielsequenz (entweder A oder B) enthält wird für die Durchführung einer DNA Nachweisreaktion (PCR) wie folgt vorbereitet.
2. Die notwendigen Reagenzien für die biochemische Nachweisreaktion werden hinzugefügt, darunter:
    a. PCR Mastermix
    b. DNA/RNAse freies Wasser
    c. 2 Primer für Zielsequenz A (300 nM)
    d. 2 Primer für Zielsequenz B (300 nM)
    e. Sonde für Zielsequenz A gelabelt mit FAM als Fluorophor und BHQ1 als Quencher (200 nM)
    f. Sonde für Zielsequenz B gelabelt mit Atto488 als Fluorophor und BHQ1 als Quencher (200 nM)
3. Die Probe wird unter Standard PCR Bedingungen amplifiziert.
4. Die Fluoreszenzintensität der Probe wird im grünen Kanal (Bereich in dem die Fluoreszenzmaxima von FAM *und* Atto488 liegen) gemessen und aufgezeichnet.
5. Durch die exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz und damit einhergehender Spaltung der Sonde wird Fluorophor freigesetzt.

6. Ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz kann beobachtet werden der im weiteren Verlauf in eine Plateauphase übergeht (die Fluoreszenz bleibt konstant). Bis zum Ende der PCR ist unklar, welche Zielsequenz amplifiziert wurde.

7. Der letzte Wert der Fluoreszenzmessung während der PCR wird gespeichert (Fluoreszenzwert=R).

8. Die Probe wird 6 Minuten lang mit intensivem Weißlicht bestrahlt. An dieser Stelle können auch andere Änderungen vorgenommen die oben erwähnt sind z.B. Temperaturänderungen.

9. Die Fluoreszenz der Probe wird gemessen (Fluoreszenzwert=S).

10. Ein Quotient T=S/R wird berechnet.

11. Eine Normwerttabelle wird herangezogen um dem Quotienten T einen Farbstoff zuzuweisen

    a) Ist der Quotient kleiner 0,5 wird der Farbstoff als FAM identifiziert. Bei der nachgewiesenen Sequenz handelt es sich um Zielsequenz A.

    b) Ist der Quotient größer 0,5 wird der Farbstoff als Atto488 identifiziert. Bei der nachgewiesenen Sequenz handelt es sich um Zielsequenz B.

    c) Optional: Ein „Graubereich“ z.B. von T=0,45-0,55 kann eingeführt werden. Erhält man während des Experiments einen Quotienten T in diesem Bereich, so kann keine Zuordnung getroffen werden. Dies erhöht die ohnehin schon hohe Sicherheit noch weiter, z.B. für besonders kritische diagnostische Entscheidungen.

Nach Bedarf können Schritt 8 und 9 wiederholt werden. Hierfür kann ein Algorithmus erstellt oder angewandt werden, der verschiedene Punkte verschieden gewichtet, um so einen möglichst sichere Zuordnung der Messung zu einem Farbstoff vornimmt. Sollte eine Normwerttabelle in Schritt 11 nicht vorhanden sein kann in einem Referenzexperiment eine solche erstellt werden.

Beispiel 3:

Ein Referenzexperiment kann wie folgt ausgestaltet sein:

1. Die notwendigen Reagenzien für die biochemische Nachweisreaktion werden gemischt, darunter:

    a. PCR Mastermix

    b. DNA/RNAse freies Wasser

    c. 2 Primer für Zielsequenz A (300 nM)

d. 2 Primer für Zielsequenz B (300 nM)

e. Sonde für Zielsequenz A gelabelt mit FAM als Fluorophor und BHQ1 als Quencher (200 nM)

f. Sonde für Zielsequenz B gelabelt mit Atto488 als Fluorophor und BHQ1 als Quencher (200 nM)

2. Die Reaktionsmischung wird in mehrere Subvolumina aufgeteilt. Einige dieser Subvolumina (A) werden mit der Zielsequenz A versetzt. Einige dieser Subvolumina (B) werden mit Zielsequenz B versetzt. Einige dieser Subvolumina (C) werden ohne Zielsequenz als no template control (NTC) verwendet.

3. Die Probe wird unter Standard PCR Bedingungen amplifiziert.

4. Die Fluoreszenzintensität der Probe wird im grünen Kanal (Bereich in dem die Fluoreszenzmaxima von FAM *und* Atto488 liegen) gemessen und aufgezeichnet.

5. Durch die exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz und damit einhergehender Spaltung der Sonde wird Fluorophor freigesetzt.

6. Ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz kann beobachtet werden der im weiteren Verlauf in eine Plateauphase übergeht (die Fluoreszenz bleibt konstant). Bis zum Ende der PCR ist unklar, welche Zielsequenz amplifiziert wurde.

7. Der letzte Wert der Fluoreszenzmessung während der PCR wird gespeichert (Fluoreszenzwert=V).

8. Die Probe wird 6 Minuten lang mit intensivem Weißlicht bestrahlt. An dieser Stelle können auch andere Änderungen vorgenommen die oben erwähnt sind z.B. Temperaturänderungen.

9. Die Fluoreszenz der Probe wird gemessen (Fluoreszenzwert=W).

10. Ein Quotient (X=W/V) wird berechnet. Für alle Subvolumina A (XA) werden die Quotienten gemittelt und eine Standardabweichung berechnet. Für alle Subvolumina B werden die Quotienten (XB) gemittelt und eine Standardabweichung berechnet. Für alle Subvolumina C werden die PCR Daten überprüft ob ein signifikanter Signalanstieg vorhanden ist. Falls dies der Fall ist wird das Experiment wiederholt.

11. Die Schritte 1.-10. werden (mehrmals) wiederholt um eine Interexperimentvariabilität bestimmen zu können.

12. Sämtliche Quotienten XA und XB werden gemittelt und in eine Normwerttabelle übernommen. Die Standardabweichungen für XA und XB dienen dazu bei der Zuordnung

der unbekannten Messwerte in Kategorien A und B entsprechende Konfidenzintervalle anzugeben.

Beispiel 4:

Beispiel für das Temperaturverhalten von FAM&Atto488:

Die Probe wird wie in Beispiel 2 verarbeitet. Statt Atto488 und FAM werden Atto647N und Cy5 verwendet (Maxima bei 669 bzw. 670 nm). In Schritt 7 wird die Probe bei 25 °C vermessen. In Schritt 8 wird die Probe auf 80 °C aufgeheizt. In Schritt 9 wird die Probe bei 80 °C vermessen.

Aus dem Kurvenverlauf in Figur 9 kann abgelesen werden welche Quotienten (T aus Schritt 10) zur Anwesenheit bestimmter Zielsequenzen passen. Diese Grafik kann in Schritt 11 anstelle einer Normwerttabelle verwendet werden oder zur leichteren Handhabung vorher in eine solche überführt werden.

Beispiel 5:

Detaillierte Beschreibung der Untersuchung/Bestimmung von vier Farbstoffen, die unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensitätsänderung bzw. Leuchtkraftänderung aufweisen, für die Detektion von vier Zielsequenzen:

1. Eine DNA Probe, welche eine oder mehrere unbekannter Zielsequenzen (mecA, mecC, nuc, oder PVL) enthält wird für die Durchführung einer DNA Nachweisreaktion (PCR) wie folgt vorbereitet.
2. Die notwendigen Reagenzien für die biochemische Nachweisreaktion werden hinzugefügt, darunter:
    a. PCR Mastermix
    b. DNA/RNAse freies Wasser
    c. 2 Primer für Zielsequenz mecA (700 nM)
    d. 2 Primer für Zielsequenz mecC (500 nM)
    e. 2 Primer für Zielsequenz nuc (500 nM)
    f. 2 Primer für Zielsequenz Panton-Valentine leucocidin (PVL) (500 nM)
    g. Sonde für Zielsequenz mecA gelabelt mit Atto647N als Fluorophor (200 nM) und ZEN/IABkFQ als Quencher
    h. Sonde für Zielsequenz mecC gelabelt mit Cy5 als Fluorophor (20 nM) und BHQ1 als Quencher

i. Sonde für Zielsequenz nuc gelabelt mit Atto488 als Fluorophor (200 nM) und BHQ2 als Quencher

j. Sonde für Zielsequenz PVL gelabelt mit FAM als Fluorophor (200 nM) und BHQ2 als Quencher

3. Die Probe wird unter Standard PCR Bedingungen amplifiziert.

4. Die Fluoreszenzintensität der Probe wird im grünen Kanal (Bereich in dem die Fluoreszenzmaxima von FAM *und* Atto488 liegen) gemessen und aufgezeichnet.

5. Die Fluoreszenzintensität der Probe wird im roten Farbkanal (Bereich in dem die Fluoreszenzmaxima von Atto647N *und* Cy5 liegen) gemessen und aufgezeichnet.

6. Durch die exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz und damit einhergehender Spaltung der Sonde wird Fluorophor freigesetzt.

7. Ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz kann beobachtet werden der im weiteren Verlauf in eine Plateauphase übergeht (die Fluoreszenz bleibt konstant).

8. Der letzte Wert der Fluoreszenzmessung während der PCR wird gespeichert.

9. Die Probe wird 1 Minute lang mit intensivem Weißlicht einer LED (20 W 230 V) bestrahlt

10. Die Fluoreszenzintensität der Probe wird im grünen und im roten Kanal gemessen

11. Die Schritte 8 – 10 werden 6 mal wiederholt, so dass eine Abklingkurve der Fluoreszenzintensität, wie in Figur 10 gezeigt, für die Probe bestimmt wird.

12. Anhand der charakteristischen Abklingkurve wird bestimmt, welche Zielsequenz die Probe enthält

Beispiel 6:

<u>Referenzexperimente zur Bestimmung Vertrauensniveau in Abhängigkeit der Konzentrationen der Zielsequenzen</u>

Für das Referenzexperiment werden die Proben wie in Beispiel 5 ausgeführt vorbereitet, eine PCR durchgeführt und die Fluoreszenz in dem roten und grünen Farbkanal gemessen. Um zu evaluieren mit welchem Vertrauensniveau der 4-plex-PCR Versuch Zielsequenzen in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmen kann, wurden Experimente für beide Farbkanäle durchgeführt mit keiner, geringer, mittlerer und hoher Konzentration von jeder Targetsequenz und jeder Kombination. In Fig. 12 sind die Kombination der Konzentrationen sowie die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vertrauensniveau für das mecA/mecC System höher sind als für das nuc/PVL System.

Beispiel 7:

Monochrome Multiplexing in digital PCR (dPCR)

Die digitale PCR ist eine biochemische Methode zur Bestimmung der Konzentration einzelner DNA-Sequenzen und verwendet im Gegensatz zur PCR eine Vereinzelung der DNA-Moleküle durch Grenzverdünnung und Mikrofluidik in einer großen Anzahl getrennter. In der droplet digital PCR (ddPCR) werden die Reaktionsräume durch Tropfen gebildet.

Für ein monochromes multiplexing in ddPCR wurden Tropfen mit Hilfe eines Bio-Rad QX100 System generiert. Diese Tropfen enthalten den PCR Reaktionsmix, Primer (200 nM) und Sonden (300 nM) sowie DNA/RNAse freies Wasser analog zu dem Beispiel 2. Als DNA Zielsequenz wurden *B. subtilis* DNA und *E. coli* DNA verwandt. Die Sonden für die Zielsequenzen enthielten als Fluorophore Atto488 und FAM. In den Tropfen wurden die Proben unter Standard PCR Bedingungen amplifiziert. Anschließend wurden die Tropfen auf einen Auslesechip transferiert um mit Hilfe eines LaVision Bioanalyzer die Fluoreszenz zu bestimmen. Für die Fluoreszenzmessung kam eine Quecksilberdampflampe mit einem Anregungsfilter von 482 nm und einem Emissionsfilter von 536 zum Einsatz. Zwischen den Fluoreszenzmessungen wurden die Proben mit dem Scannerlicht des LaVision Bioanalyzer für 1 Minute gebleicht. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurden einmal pro Minute gemessen um eine Abklingkurve zu bestimmen. Fig. 14 zeigt charakteristischen Abklingkurven von Tropfen enthaltend Proben mit Atto488, FAM oder Atto488 und FAM. Fig. 5 zeigt Fluoreszenzbilder von Tropfen enthaltend FAM entquenchte Hydrolyseproben und Atto488 entquenchte Hydrolyseproben.

Beispiel 8:

Verifikationsexperiment mit verschiedene Konzentrationen von *E. Coli* DNA und einer konstanten *B. subtilis* DNA Konzentration

Für ein Verifikationsexperiment wurden verschiedene Konzentrationen von *E. coli* DNA (220, 440, 880, 1760 cp. μl^{-1}) mit einer konstanter Konzentration von *B. subitlis* DNA (200 cp. μl^{-1}) gemischt. Dabei wurden die Zielsequenz DNA mit einem Mastermix gemischt, der Primer und Sonden für beide Zielsequenzen umfasst und mit diesen einen droplet digital PCR (ddPCR) durchgeführt. Für jede Konzentration wurde die Fluoreszenzintensität von 150 Tropfen vor und nach dem Ausbleichen bestimmt. Dabei erfolgte die Fluoreszenzmessung jede Minute während einer Gesamtbleichdauer von 10 Minuten. Die Intensitätswerte zum Zeitpunkt 0 min dienten der Unterscheidung von positiven und negativen Tropfen in Abhängigkeit eines Grenzwertes. Anschließend wurden die Intensitätswerte von jedem Tropfen zu dem Wert zum Zeitpunkt 0 min normalisiert und 1 gesetzt. Danach wurde die normalisierte Fluoreszenz zum Zeitpunkt 10 min genutzt um zu bestimmen, in welchen Tropfen die Atto488 Sonde entquencht wurde (>75% der anfänglichen Intensität) und in welchen Tropfen die FAM Sonde entquencht wurde (<75% der anfänglichen Intensität). Mit Hilfe der Poisson-Verteilung wurde die Anzahl der anfänglichen target DNA Kopien von der Anzahl der positiv amplifizierten Tropfen bestimmt. Mit Hilfe

bionomialer Statistik wurde das 95% Vertrauensintervall bestimmt. Die Ergebnisse der Experimente sind in Fig. 13A dargestellt.

Beispiel 9:

Verifikationsexperiment mit verschiedene Konzentrationen von B. subtilis DNA und einer konstanten *E. Coli* DNA Konzentration

Das Verifikationsexperiment gemäß Beispiel 8 wurde wiederholt, mit dem Unterschied, dass verschiedene Konzentrationen von *B. subtilis* DNA (200, 632, 2000 cp. μl^{-1}) in einer konstanten Konzentration von *E. Coli* DNA (600 cp. μl^{-1}) bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Fig. 13B dargestellt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zu einer Unterscheidung zwischen der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens zwei Farbstoffen, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind, umfassend die Schritte:

    a) Bereitstellung der mindestens zwei Farbstoffe, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind und bevorzugt als Gemisch in einer Probe vorliegen;

    b) Behandlung der mindestens zwei Farbstoffen, wobei die Behandlung eine Veränderung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens einem der Farbstoffe hervorruft; und

    c) Messung der kombinierten Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe, mindestens vor und nach der Behandlung in Schritt b);

    dadurch gekennzeichnet, dass

    d) die mindestens zwei Farbstoffe durch Schritt b) in Bezug auf ihre Lichtemission und/oder Lichtreflektion unterschiedlich verändert werden, und

    e) die Konzentration von mindestens einem der Farbstoffe durch die Änderung der gemessenen Lichtemission und/oder Lichtreflektion zwischen den Behandlungen in Schritt c) berechnet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Farbstoffe Fluoreszenzfarbstoffe sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung in Schritt b) zu einer unterschiedlichen Reduzierung der Intensität der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der jeweiligen Farbstoffe führt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung in Schritt 1 b) eine Lichtbestrahlung eine Temperaturänderung, ein Red/Ox Potentialwechsel, eine Änderung eines elektromagnetischen Felds, eine pH Änderung, eine Oberflächenänderung und/oder eine Druckänderung umfasst.

5. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtbestrahlung mit einer entsprechenden Anregungswellenlänge erfolgt.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der Farbstoffe mit der Konzentration von biologischen Molekülen korreliert.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Farbstoffe an biologische Molekülen gebunden vorliegen.

8. Verfahren nach Anspruch 6 und/oder 7 dadurch gekennzeichnet, dass die biologischen Moleküle Nukleinsäuren, Antikörper und/ oder Antigene sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einer der Farbstoffe in räumlicher Nähe zu einem Quencher vorliegt, sodass sich die gemessene Lichtemission und/oder die Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe aus der Summe der nicht gequenchten Anteile der Farbstoffe ergibt, wobei die Effizienz des Quenchers durch Schritt b) geändert wird, und wenn zwei oder mehrere Quencher in räumlicher Nähe zu den mindestens zwei Farbstoffen vorliegen, die Effizienz der jeweiligen Quencher durch Schritt b) unterschiedlich geändert wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Änderung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion durch Schritt b) irreversibel ist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Änderung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion durch Schritt b) reversibel oder teilweise reversibel ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung in Schritt b) eine Lichtbestrahlung ist und diese bei einem ersten der mindestens zwei Farbstoffe zu einer stärkeren Reduzierung der Lichtemission und/oder Lichtreflektion führt, als bei einem zweiten der mindestens zwei Farbstoffe und die Berechnung der Konzentration in Schritt e) durch einen Vergleich des Quotienten aus der in Schritt c) gemessenen kombinierten Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe nach und vor der Lichtbestrahlung (L_{nach}/L_{vor}) mit einem oder mehreren Schwellenwerten erfolgt, wobei

a) im Falle, dass der Quotient L_{nach}/L_{vor} größer als ein erster Schwellenwert ist eine höhere Konzentration des zweiten Farbstoffes im Vergleich zum ersten Farbstoff vorliegt

und

b) im Falle, dass der Quotient L_{nach}/L_{vor} kleiner als ein zweiter Schwellenwert ist eine höhere Konzentration des ersten Farbstoffes im Vergleich zum zweiten Farbstoff vorliegt.

13. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass der erste und der zweite Schwellenwert identisch sind und das Verfahren einen Schwellenwert umfasst.

14. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass der erste Schwellenwert größer als der zweite Schwellenwert ist und im Falle, dass der Quotient L_{nach}/L_{vor} größer gleich dem zweiten Schwellenwert und kleiner gleich dem ersten Schwellenwert ist, die Konzentration des ersten Farbstoffes nicht unterscheidbar von der Konzentration des zweiten Farbstoffes ist.

15. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass der Schwellenwert zwischen 0,2 und 0,8 liegt.

16. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen 12-15 dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtbestrahlung über einen Zeitraum von 30 sec bis 30 min erfolgt.

17. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtbestrahlung über einen Zeitraum von 3 min bis 12 min erfolgt.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12-17 dadurch gekennzeichnet, dass der erste Farbstoff ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend FAM, Cy5, TET, JOE.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12-18 dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Farbstoff ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend Atto488, Atto647, Atto532, Atto647N

20. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Farbstoffe in einem „Real-time“-Assay erfolgt.

21. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass der „Real-time“ Assay eine quantitative PCR (qPCR) oder eine quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) ist.

22. Verfahren nach dem vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Berechnung der Konzentration von mindestens einem der Farbstoffe in Schritt e) mit Hilfe eines computer-implementierten Verfahren erfolgt.

23. Anwendung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bestimmung von zwei oder mehreren Nukleinsäuren.

24. Anwendung des Verfahrens nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die zwei oder mehrere Nukleinsäuren Nukleinsäureprodukte einer Amplifikationsreaktion sind.

25. Anwendung des Verfahrens nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationsreaktion eine Polymerase Chain Reaction (PCR) ist.

26. Anwendung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bestimmung von zwei oder mehreren Proteintargets.

27. Anwendung des Verfahrens nach dem vorhergehenden Anspruche dadurch gekennzeichnet, dass die zwei oder mehrere Proteintargets Antikörpern oder Antigenen sind.

28. Anwendung des Verfahrens nach dem vorhergehenden Anspruche dadurch gekennzeichnet, dass die Anwendung in einem Immun- oder Zellassay erfolgt.

29. Anwendung des Verfahrens nach dem vorhergehenden Anspruch zur Bestimmung von zwei oder mehreren Nukleinsäuren, wobei die Farbstoffe an unterschiedliche Oligonukleotide gebunden sind und die Oligonukleotide eine sequenzspezifische Bindung an einem oder mehrere Targetsequenzen ermöglichen.

30. Anwendung des Verfahrens nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die Farbstoff-Oligonukleotid-Kombinationen bevorzugt aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden: TaqMan Sonden, Molecular Beacons, Hybridisierungssonden, RPA-Sonden, Mediator-Sonden, FRET-Sonden und/oder Q_G-Sonden.

31. System zu einer Unterscheidung zwischen der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion von mindestens zwei Farbstoffen, die auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind, umfassend:

    a) mindestens zwei Farbstoffe, die (i) auf Basis ihrer Emissions- und/oder Reflektionswellenlänge nicht zu unterscheiden sind, (ii) unterschiedliche Veränderungen ihrer Lichtemission und/oder Lichtreflektion zeigen, die durch die Behandlung gemäß Anspruch 1 b) hervorgerufen werden, und (iii) als Gemisch in einer Probe vorliegen;

    b) Mittel zur Behandlung der mindestens zwei Farbstoffe, wobei die Behandlung eine Veränderung der Lichtemission und/oder Lichtreflektion von mindestens einem der Farbstoffe hervorruft,

c) Mittel zur Messung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe

32. System nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Messung der Lichtemission und/oder der Lichtreflektion der mindestens zwei Farbstoffe ein Fluoreszenz und/oder ein kolorimetrischer Detektor sind.

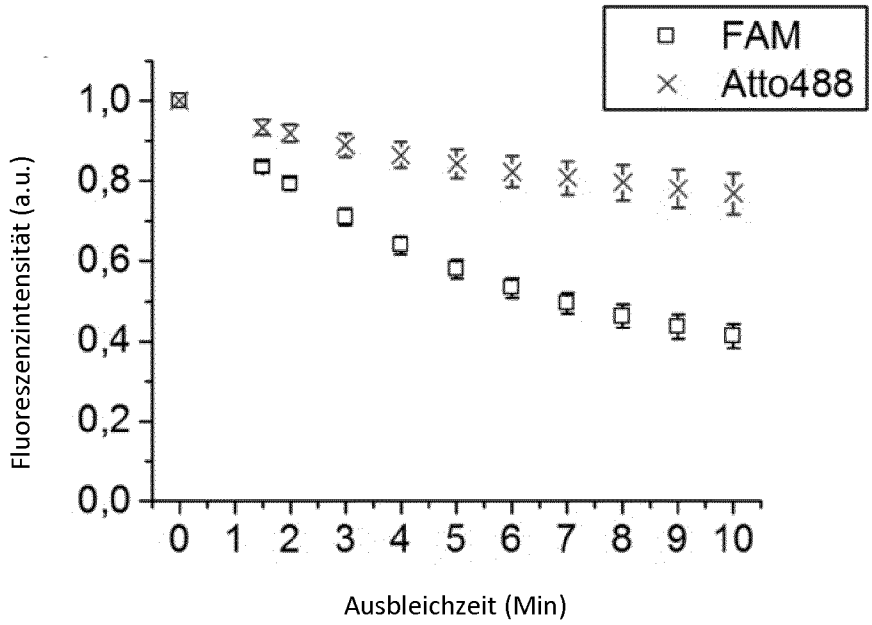
33. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Bestrahlung der mindestens zwei Farbstoffe im System vorhanden sind.

34. System nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zur Bestrahlung der mindestens zwei Farbstoffe eine Leuchtdiode (LED) ist.

35. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass das System Mittel zur Durchführung eines computer-implementierten Verfahren zur Berechnung der Konzentration mindestens eines der Farbstoffe umfasst.

36. System nach dem vorhergehenden Anspruch dadurch gekennzeichnet, dass die Berechnung der Konzentration des mindestens einen Farbstoffes gemäß der Berechnung der Konzentration des mindestens einen Farbstoffes in einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1-30 erfolgt.

Fig. 1


FAM
Atto488
Fluoreszenzintensität (a.u.)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Ausbleichzeit (Min)

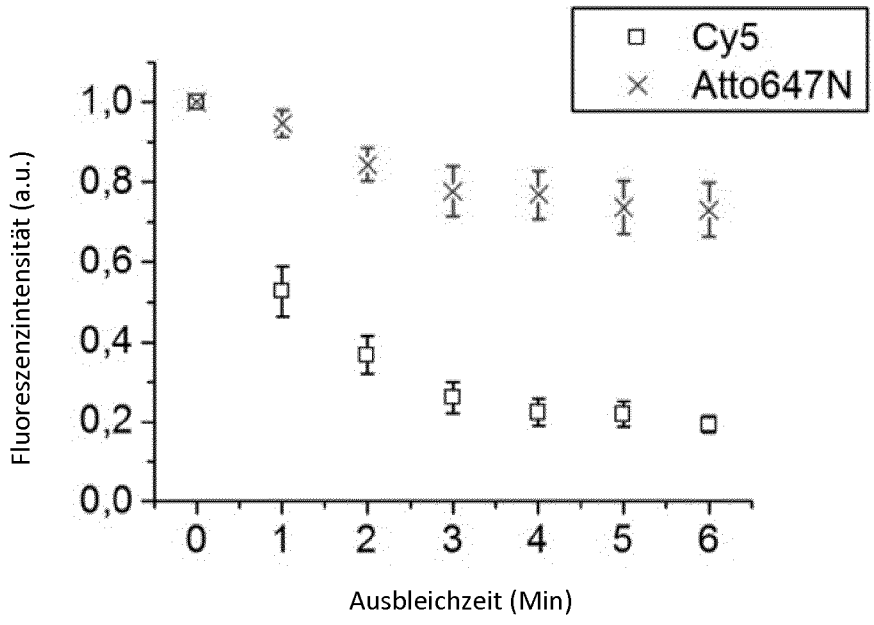

Cy5
Atto647N
Fluoreszenzintensität (a.u.)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0 1 2 3 4 5 6
Ausbleichzeit (Min)

Fig. 2

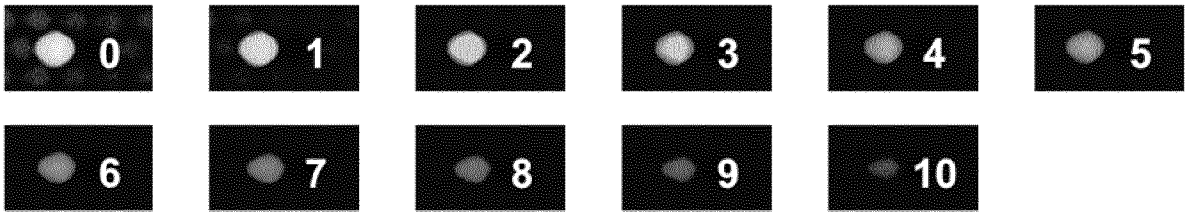

0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Fig. 3

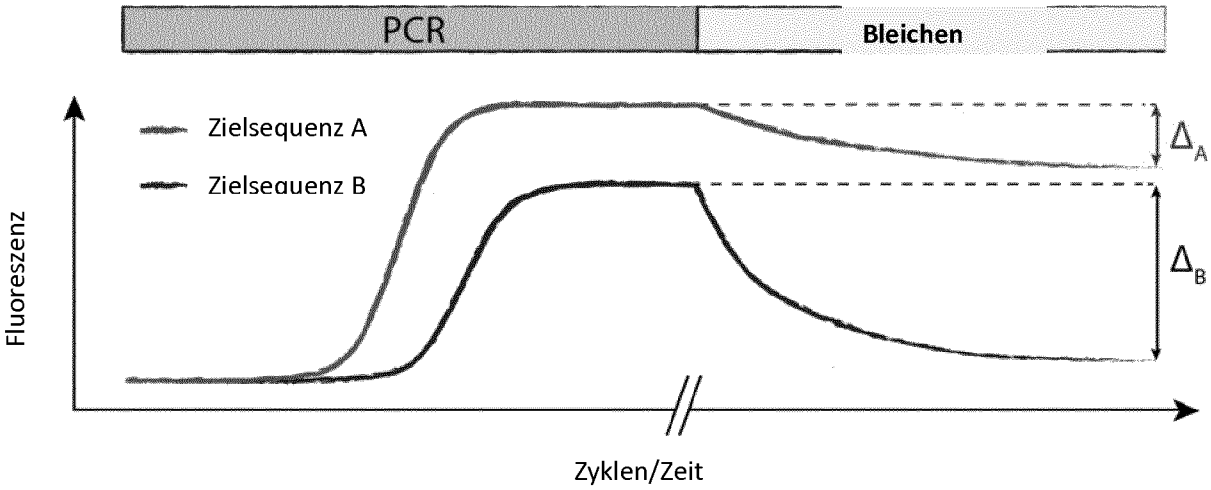

PCR
Bleichen
Zielsequenz A
Zielsequenz B
Δ_A
Δ_B
Fluoreszenz
Zyklen/Zeit

Fig. 4

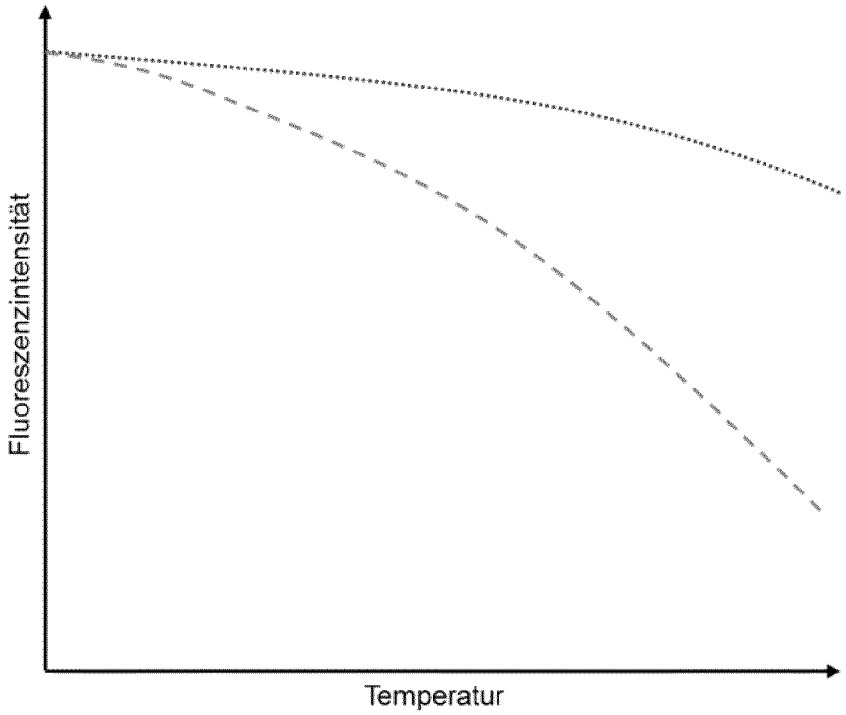

Fluoreszenzintensität
Temperatur

Fig. 5

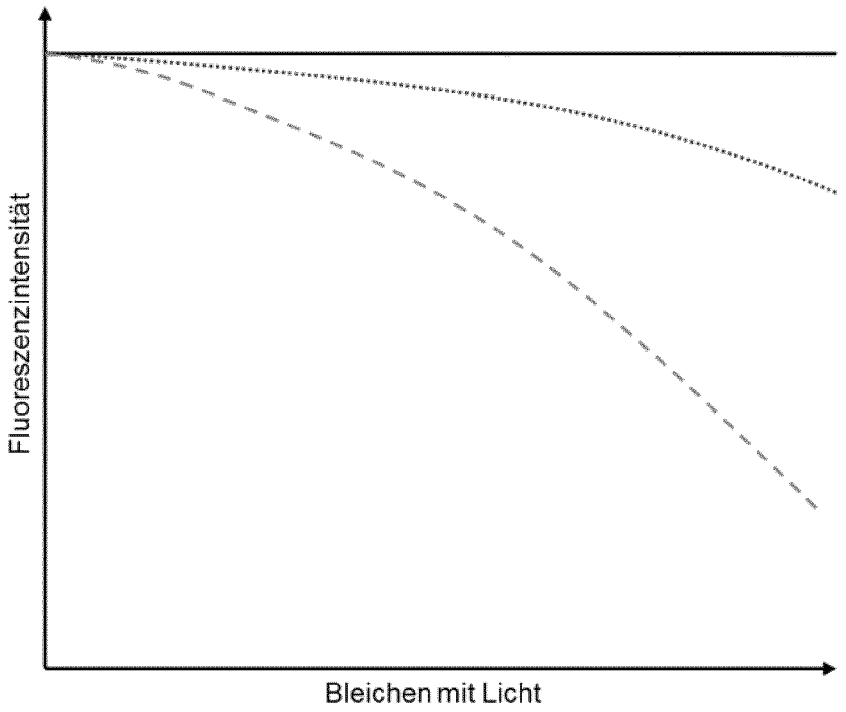

Fluoreszenzintensität
Bleichen mit Licht

Fig. 6

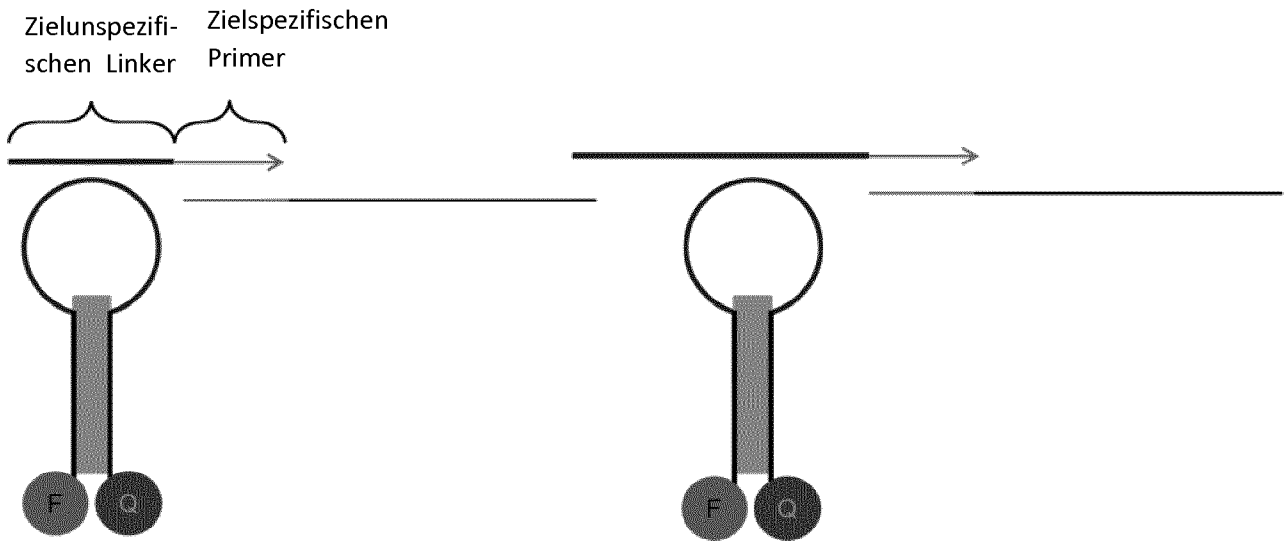


Fig. 7

	Fall I	Fall II	Fall III	Fall IV
Target A	✗	✓	✗	✓
Target B	✗	✗	✓	✓
55°	1	0.4	0.8	0.6
70°	1	0.3	0.3	0.3

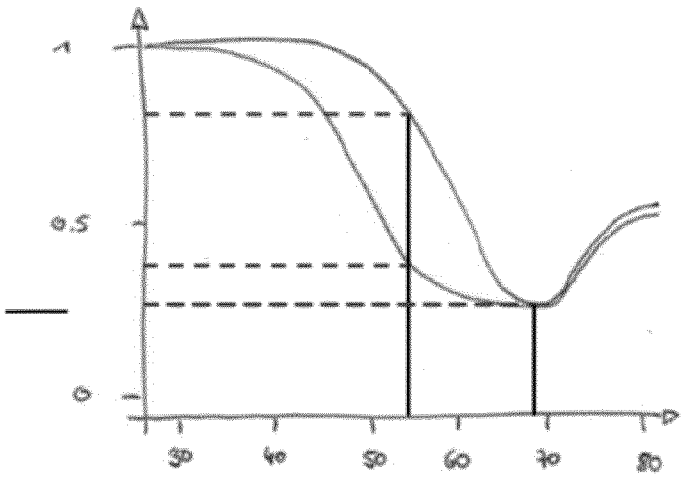


Fig. 8

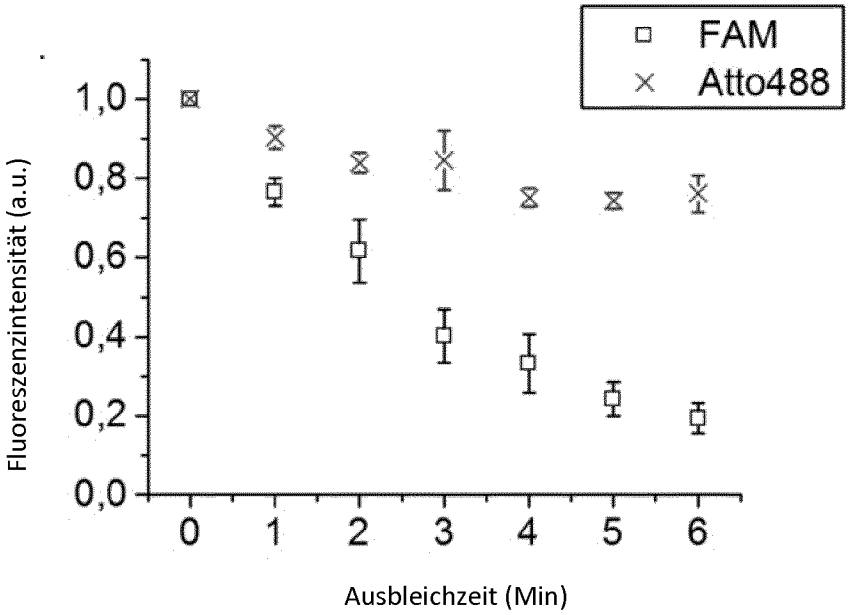

FAM
Atto488
Fluoreszenzintensität (a.u.)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
1
2
3
4
5
6
Ausbleichzeit (Min)

Fig. 9

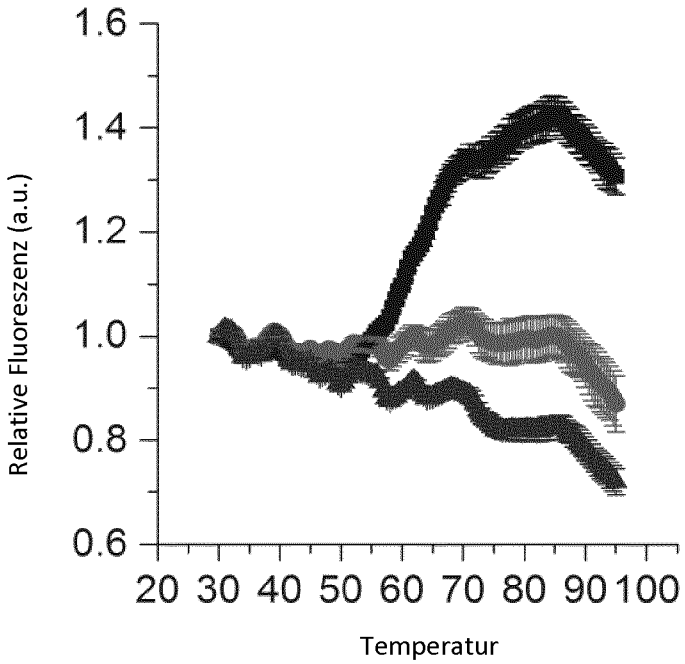

Relative Fluoreszenz (a.u.)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
20 30 40 50 60 70 80 90 100
Temperatur

Fig. 10

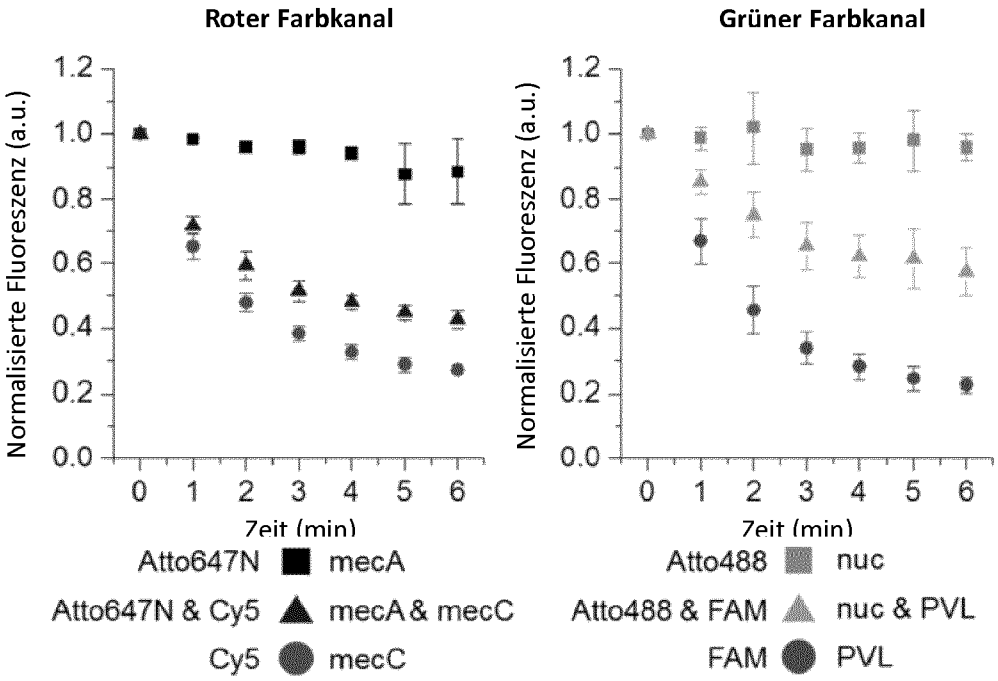


Fig. 11

Farbstoff	*Relative Fluoreszenz nach Ausbleichen*
Atto488	88%
Atto488&FAM	40%
FAM	25%
Atto647N	95%
Atto647N&Cy5	53%
Cy5	21%

Fig. 12

nuc Konzentration (aktiviert Atto488)

PVL Konzentration (aktiviert FAM)	cp. µl^{-1}	10^5	10^4	10^3
	10^5	>99.9%	>68%	>68%
	10^4	>99.7%	>99.7%	>95%
	10^3	>68%	>68%	>95%

mecA Konzentration (aktiviert Atto647N)

mecC Konzentration (aktiviert Cy5)	cp. µl^{-1}	10^5	10^4	10^3
	10^5	>99.9%	*>99.7%**	*>99.7%**
	medium	>99.7%	>99.7%	*>99.7%**
	low	>99.7%	>99.7%	*>99.7%**

* Only mecC amplified

Fig. 13

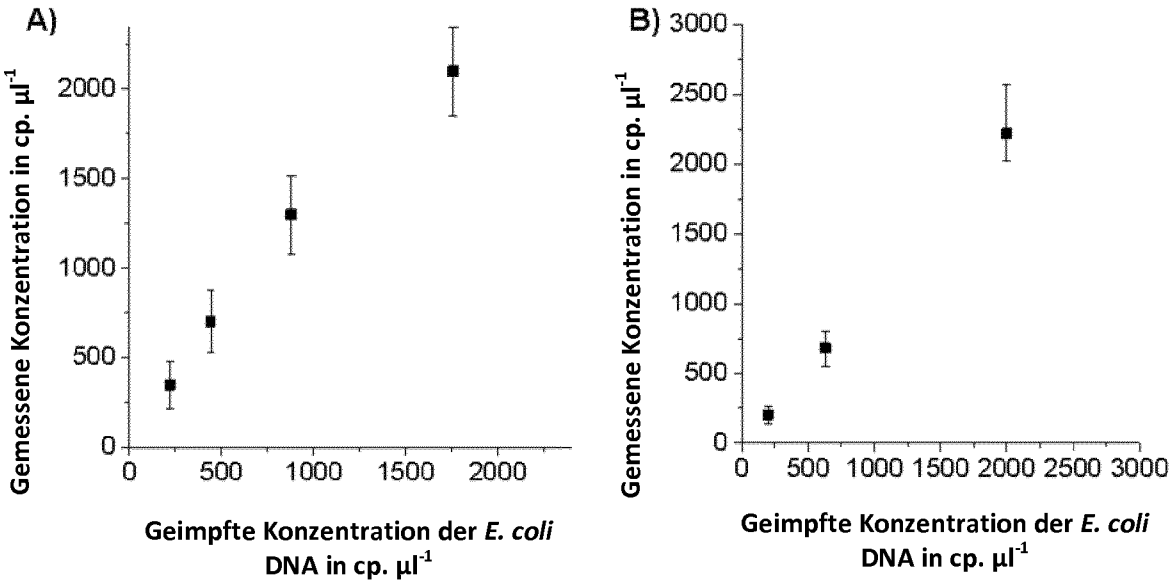


Fig. 14

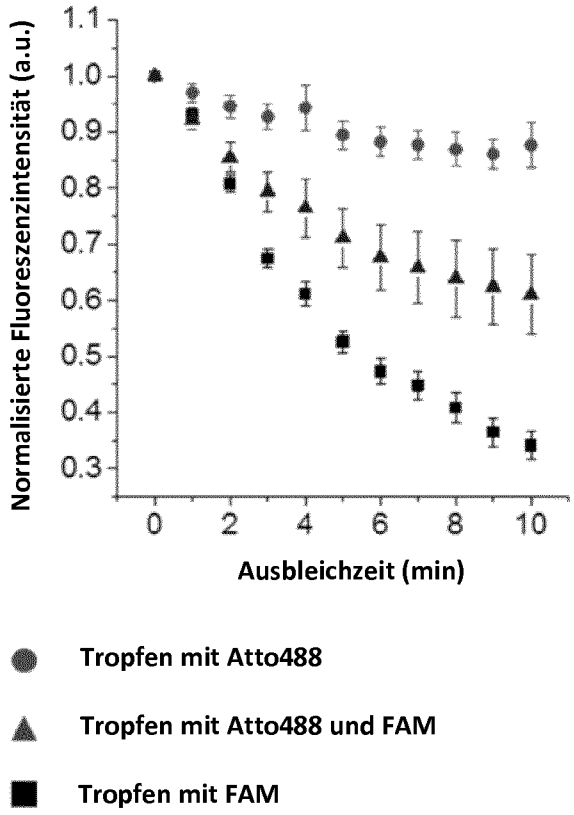
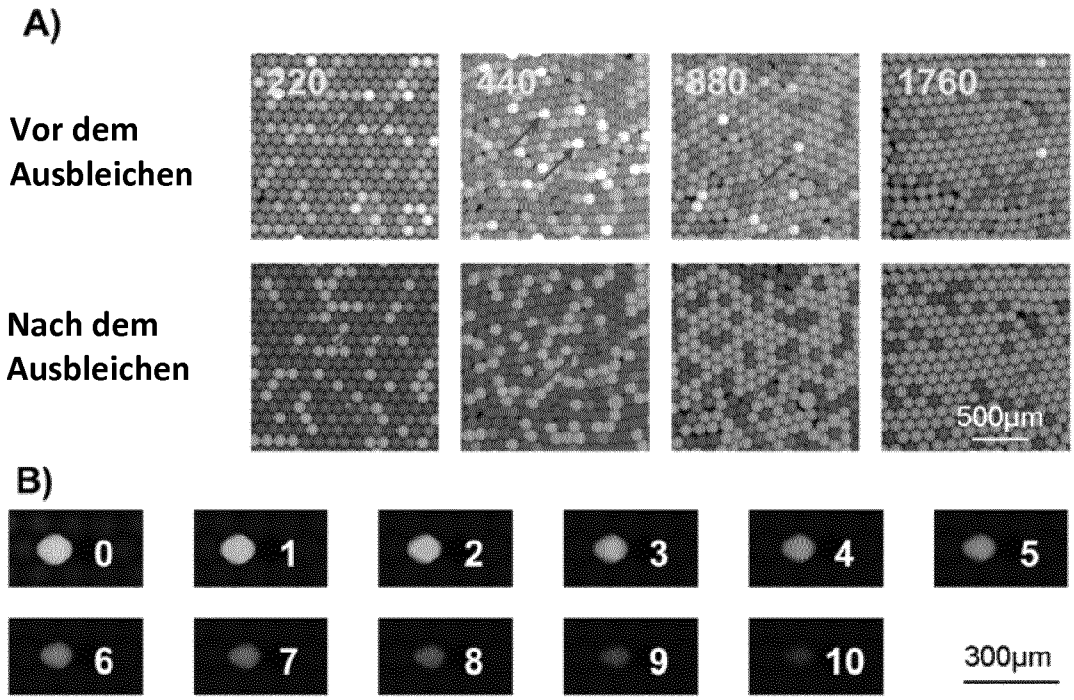

Normalisierte Fluoreszenzintensität (a.u.)
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0
2
4
6
8
10
Ausbleichzeit (min)
Tropfen mit Atto488
Tropfen mit Atto488 und FAM
Tropfen mit FAM

Fig. 15


A)
Vor dem Ausbleichen
Nach dem Ausbleichen
220
440
880
1760
500µm
B)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
300µm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/078646

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/64
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/008924 A1 (ANKER JEFFREY [US] ET AL) 12 January 2006 (2006-01-12) paragraphs [0057] - [0292]; figures -----	1-36
A	FROMHERZ P ET AL: "Voltage-sensitive fluorescence of amphiphilic hemicyanine dyes in neuron membrane", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - BIOMEMBRANES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1150, no. 2, 15 August 1993 (1993-08-15), pages 111-122, XP023352250, ISSN: 0005-2736, DOI: 10.1016/0005-2736(93)90079-F [retrieved on 1993-08-15] the whole document ----- -/--	1-36

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 January 2016	09/02/2016

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

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 2008 019756 B4 (LAVISION GMBH [DE]) 17 March 2011 (2011-03-17) cited in the application the whole document -----	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/078646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006008924 A1	12-01-2006	NONE	
DE 102008019756 B4	17-03-2011	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2015/078646

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N21/64
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2006/008924 A1 (ANKER JEFFREY [US] ET AL) 12. Januar 2006 (2006-01-12) Absätze [0057] - [0292]; Abbildungen -----	1-36
A	FROMHERZ P ET AL: "Voltage-sensitive fluorescence of amphiphilic hemicyanine dyes in neuron membrane", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - BIOMEMBRANES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 1150, Nr. 2, 15. August 1993 (1993-08-15), Seiten 111-122, XP023352250, ISSN: 0005-2736, DOI: 10.1016/0005-2736(93)90079-F [gefunden am 1993-08-15] das ganze Dokument ----- -/--	1-36

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
29. Januar 2016	09/02/2016

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Politsch, Erich

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2015/078646

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 10 2008 019756 B4 (LAVISION GMBH [DE]) 17. März 2011 (2011-03-17) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-36

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2015/078646

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2006008924 A1	12-01-2006	KEINE	
DE 102008019756 B4	17-03-2011	KEINE	