

(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

27. Juni 2013 (27.06.2013)



W I P O | P C T



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2013/091614 AI**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2012/100295

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. September 2012 (21.09.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 201 1 056 606.6  
19. Dezember 2011 (19.12.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRIZ BIOCHEM GESELLSCHAFT FÜR BIOANALYTIK MBH** [DE/DE]; Floriansbogen 2-4, 82061 Neuried (DE).

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder (nur für US): **HARTWICH, Gerhard** [DE/DE]; Nibelungenstraße 10, 80639 München (DE).

(74) **Anwalt: GRAF GLÜCK HABERSACK KRITZENBERGER;** Hermann-Köhl-Straße 2a, 93049 Regensburg (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD FOR THE ELECTROCHEMICAL DETECTION OF NUCLEIC ACID OLIGOMER HYBRIDISATION OCCURRENCES

(54) **Bezeichnung :** VERFAHREN ZUR ELEKTROCHEMISCHEN DETEKTION VON NUKLEINSÄUREOLIGOMER-HYBRIDISIERUNGSEREIGNISSEN

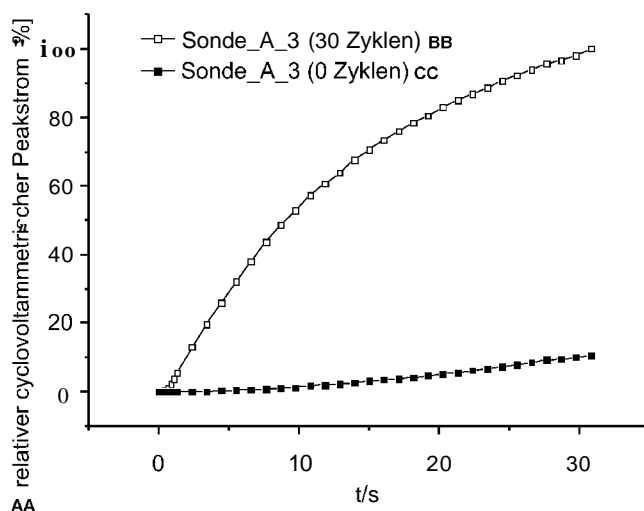


Fig. 3b

AA Relative cyclovoltammetric peak current [%]  
BB Probe\_A\_3 (30 cycles)  
CC Probe\_A\_3 (0 cycles)

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for the electrochemical detection of nucleic acid oligomer hybridisation occurrences, comprising the Steps of: a) preparing a modified surface, wherein the modification consists of the bonding of at least one type of probe nucleic acid oligomers (1), wherein the probe nucleic acid oligomers (1) have a probe pin section (5) complementary to a first signal probe section (5') of signal nucleic acid oligomers (2); b) preparing at least one type of signal nucleic acid oligomers (2), wherein the signal nucleic acid oligomers have a first signal pin section (5') complementary to the probe pin section (5) of the probe nucleic acid oligomers (1), the signal nucleic acid oligomers (2) have a signal recognition section (8) complementary to a target recognition section (8') of target nucleic acid oligomers (10), the signal nucleic acid oligomers (2) have a first and a second signal pin section (5, 5") complementary to each other forming a hairpin-structure, wherein the hairpin structure has a melting temperature (TPIN), the first signal pin section (5') designed to form a hairpin structure is not complementary to the target nucleic acid oligomers (10), and the signal nucleic acid oligomers (2) are modified in the region of the first signal pin section (5') designed for forming the hairpin structure with at least one redox-active detection label (9); c) preparing a sample having target nucleic acid oligomers (10); d) preparing a reaction Solution for performing a nucleic acid amplification, wherein the reaction Solution contains at least nucleotides, at least one

type of primer (11', 12') and at least one type of nucleic acid Polymerase (13) having exonuclease activity; e) mixing the reaction Solution prepared in step d) with the signal nucleic acid oligomers (2) prepared in step b) and mixing the sample prepared in step c) with

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2013/091614 A1



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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

target nucleic acid oligomers (10); f) amplifying the target nucleic acid oligomers (10) by means of nucleic acid amplification to form signal nucleic acid oligomer portions (14); g) bringing the reaction mixture obtained in step f) into contact with the modified surface prepared in step a); h) detecting the signal nucleic acid oligomer portions (14) formed by means of an electrochemical detection method at a temperature  $T_{DET} < T_{PIN}$ ; i) repeating the Steps f) to h) multiple times; and k) comparing the different values obtained in step h).

**(57) Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nucleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen umfassend die Schritte: a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nucleinsäureoligomeren (1) besteht, wobei die Sonden-Nucleinsäureoligomere (1) einen zu einem ersten Signal-Pin-Abschnitt (5') von Signal-Nucleinsäureoligomeren (2) komplementären Sonden-Pin-Abschnitt (5) besitzen, b) Bereitstellen wenigstens einer Art von Signal-Nucleinsäureoligomeren (2), wobei die Signal-Nucleinsäureoligomere (2) einen zu dem Sonden-Pin-Abschnitt (5) der Sonden-Nucleinsäureoligomere (1) komplementären ersten Signal-Pin-Abschnitt (5') besitzen, die Signal-Nucleinsäureoligomere (2) einen zu einem Target-Erkennungs-Abschnitt (8') von Target-Nucleinsäureoligomeren (10) komplementären Signal-Erkennungs-Abschnitt (8) besitzen, die Signal-Nucleinsäureoligomere (2) einen ersten und einen zweiten unter Ausbildung einer Hairpin-Struktur zueinander komplementären Signal-Pin-Abschnitt (5', 5'') besitzen, wobei die Hairpin-Struktur eine Schmelztemperatur ( $T_{PIN}$ ) aufweist, der zur Ausbildung einer Hairpin-Struktur ausgelegte erste Signal-Pin-Abschnitt (5') nicht zu den Target-Nucleinsäureoligomeren (10) komplementär ist, und die Signal-Nucleinsäureoligomere (2) im Bereich des zur Ausbildung einer Hairpin-Struktur ausgelegten erste Signal-Pin-Abschnitts (5') mit zumindest einem redoxaktiven Detektionslabel (9) modifiziert sind, c) Bereitstellen einer Probe mit Target-Nucleinsäureoligomeren (10), d) Bereitstellen einer Reaktionslösung zur Durchführung einer Nucleinsäureamplifikation, wobei die Reaktionslösung zumindest Nucleotide, wenigstens eine Art von Primer (11', 12') und wenigstens eine Art von Nucleinsäure-Polymerase (13) mit Exonuklease-Aktivität enthält, e) Mischen der in Schritt d) bereitgestellten Reaktionslösung mit den in Schritt b) bereitgestellten Signal-Nucleinsäureoligomeren (2) und der in Schritt c) bereitgestellten Probe mit Target-Nucleinsäureoligomeren (10), f) Amplifizierung der Target-Nucleinsäureoligomere (10) mittels Nucleinsäureamplifikation unter Bildung von Signal-Nucleinsäureoligomer-Teilstücken (14), g) Inkontaktbringen des in Schritt f) erhaltenen Reaktionsgemisches mit der in Schritt a) bereitgestellten modifizierten Oberfläche, h) Detektion der gebildeten Signal-Nucleinsäureoligomer-Teilstücke (14) durch eine elektrochemische Detektionsmethode bei einer Temperatur  $T_{DET} \leq T_{PIN}$ , i) mehrfache Wiederholung der Schritte f) bis h), k) Vergleich der verschiedenen in Schritt h) erhaltenen Werte.

## Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen

5

### Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion  
10 von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen.

### Stand der Technik

15

In der Krankheitsdiagnose, der mikrobiologischen Diagnostik, bei toxikologischen  
Testverfahren, in der genetischen Forschung und Entwicklung, sowie auf dem  
Agrar- und pharmazeutischen Sektor ist ein Direktnachweis kleinster Mengen von  
Nukleinsäuren mittlerweile unumgänglich. Zunehmend finden Detektionsverfahren  
20 mittels Array-Technologie unter Verwendung sogenannter DNA-Chips Anwendung,  
die eine oberflächensensitive Detektion von Nukleinsäureoligomer-  
Hybridisierungsereignissen ermöglichen. Mit Hilfe dieser empfindlichen Methode  
können Nukleinsäuren mit einer sehr geringen Nachweisgrenze detektiert werden.

25 Häufig ist jedoch vor der eigentlichen Detektion ein DNA-Amplifizierungsschritt  
notwendig, in dem die nachzuweisenden DNA-Moleküle vervielfältigt werden, damit  
sie letztlich in einer Konzentration vorhanden sind, die über der Nachweisgrenze der  
gewählten Detektionsmethode liegt.

30 Die PCR stellt eine solche für die Molekularbiologie grundlegende Methode dar, die  
im Wesentlichen der Vervielfältigung von DNA-Molekülen dient und den schnellen,  
empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen von DNA oder RNA erlaubt. In den  
vergangenen Jahren hat diese Methode die Labors erobert, da ihre Anwendung  
sehr breit und vielschichtig ist. Die PCR hat in fast allen Bereichen der

Wissenschaft und Medizin, einschließlich der forensischen Medizin, der pränatalen Diagnostik, der Onkologie und nicht zuletzt in der mikrobiologischen Diagnostik Einzug gehalten. Beispielsweise ist die PCR auf dem Sektor der klinischen Diagnostik meist die Methode der Wahl um z. B. Krankheitserreger nachzuweisen.

5 Ebenso wird sie in der Lebensmittelindustrie als Nachweismethode für belastende Keime angewandt.

Bei der PCR handelt es sich um eine enzymatische Reaktion zur Amplifikation von Nucleinsäuremolekülen, die im Wesentlichen in einem wässrigen bzw. flüssigen  
10 Reaktionsgemisch mit sehr kleinen Volumina abläuft. Im Reaktionsgemisch befindet sich eine Nucleinsäure enthaltende Probe und die für die Reaktion außerdem notwendigen Primer, Nucleotide und eine Polymerase. Durch Zugabe von Puffern und vorzugsweise zweiwertigen Ionen wie z. B.  $Mg^{2+}$  wird das Reaktionsgemisch so  
15 eingestellt, dass die für die jeweilige Anwendungsart optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Die Polymerase-Kettenreaktion beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei, bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufenden Schritten, nämlich Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung.

20 Bei der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur größer  $90^{\circ}C$ , vorzugsweise  $94^{\circ}C$  bis  $95^{\circ}C$  erhitzt. Dadurch trennen sich die beiden komplementären Stränge einer doppelsträngigen DNA, die DNA wird „aufgeschmolzen“ bzw. denaturiert und liegt anschließend in Einzelsträngen vor.

25 Bei der Hybridisierung (auch „Annealing“) wird die Temperatur auf eine sogenannte „Annealing-Temperatur“ herabgesetzt. Bei dieser Temperatur verbinden sich die Primer mit der DNA, sie hybridisieren.

30 An den Stellen, an denen der Primer gebunden ist, lagern sich die Polymerasen an und beginnen mit der Verlängerung, indem sie weitere komplementäre Nucleotide am 3'-OH-Ende des Primers anfügen und damit einen Gegenstrang synthetisieren.

Bei jeder Wiederholung obiger drei Schritte verdoppelt sich die Anzahl an kopierten

DNA-Molekülen. Nach 20 Zyklen entstehen auf diese Weise aus einem einzigen DNA-Doppelstrang etwa eine Million Moleküle.

Die Anzahl der Zyklen kann je nach Anwendungsart, Beschaffenheit der Probe und den spezifischen Anforderungen und Reaktionsbedingungen entsprechend gewählt werden. Ebenso kann die Einstellung der Zeitspannen für die einzelnen Schritte an die Erfordernisse bestimmter Anwendungsarten angepasst werden.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang noch eine besondere Art der PCR, die Real-Time-PCR. Diese quantitative PCR Methode erfreut sich in den molekularbiologischen Labors immer größerer Beliebtheit, da sie eine Detektion der Proben-DNA bzw. der Amplifikationsprodukte in Echtzeit und zugleich die Bestimmung der anwesenden Menge einer Proben-DNA erlaubt.

Die Bestimmung der DNA-Menge am Ende einer PCR („Endpunktsbestimmung“) lässt aus vielerlei Gründen nicht direkt Rückschlüsse auf die Zahl der ursprünglich vorliegenden Moleküle zu, da z.B. am Anfang wie auch am Ende der PCR die Bedingungen für die Polymerasen nicht unbedingt optimal sind und daher die Amplifikation nicht über die ganze Reaktionszeit gleichmäßig abläuft. Daher kann die Quantifizierung am Ende einer PCR sehr ungenau sein. Wesentlich genauere Quantifizierungen sind möglich, wenn die Anzahl gebildeter DNA-Moleküle schon während der Reaktion, also nach jedem einzelnen Zyklus, erfasst wird.

Die meisten bekannten Verfahren zur Real-Time-PCR bedienen sich der Fluoreszenzmessung, wobei sequenzunabhängige und sequenzspezifische Detektionsmethoden bekannt sind. Bei den sequenzunabhängigen Detektionsmethoden wird beispielsweise ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet, welcher sich sequenzunabhängig in doppelsträngige DNA einlagert. Durch Amplifizierung einer DNA erhöht sich die Gesamtmenge an DNA, das Fluoreszenzsignal nimmt zu. Bei sequenzspezifischen Nachweismethoden sollen ganz spezifische Targets oder Gen-Abschnitte in einem Testansatz nachgewiesen und quantifiziert werden. Dazu werden Oligonukleotid-Sonden verwendet, die an die amplifizierte Target-DNA binden.

Mehrere Prinzipien zur sequenzspezifischen Detektion eines Fluoreszenzsignals und damit zur Detektion und Quantifizierung der Target-DNA stehen zur Verfügung. Beispielsweise kann der Nachweis über ein so genanntes FRET-Prinzip (Fluorescence Resonance Energy Transfer Prinzip) geführt werden. Dabei werden  
5 zwei spezifische Oligonukleotid-Sonden, welche im Target direkt benachbart binden können, eingesetzt. Jede Oligonukleotid-Sonde ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, wobei einer der Farbstoffe, nach Anregung mit Licht durch seine emittierten Photonen wiederum den zweiten Farbstoff anregt sofern dieser sich in ausreichender Nähe befindet. Das Emissionslicht dieses zweiten  
10 Farbstoffes wird mittels einer geeigneten Vorrichtung detektiert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität spiegelt die Zunahme des Targets wider.

Eine weitere Möglichkeit zur sequenzspezifischen Messung eines Fluoreszenzsignals beruht auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Quenching. Eine  
15 spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde wird zusätzlich mit einem Fluoreszenzquencher ausgestattet, der sich in ausreichender räumlicher Nähe zum Fluorophor befindet, so dass die Sonde wegen des Quench-Vorgangs nicht fluoresziert. Bei geeigneter Konstruktion der Sonde wird aufgrund der Hybridisierung der Sonde an das Target der Quencher räumlich vom Fluorophor  
20 entfernt, das Quenching verhindert und es kommt zur Fluoreszenzemission. Der Quencher kann auch bei an das Target gebundenen Sonden mittels einer geeigneten Exonukleaseaktivität einer Polymerase im PCR-Ansatz abgeschnitten werden. Auch hier spiegelt die Zunahme der Fluoreszenzintensität die Zunahme  
des Targets wider.

25

Alternativ zu fluoreszenzabhängigen Detektionsmethoden wird zur Genanalyse mittels eines bereits eingangs erwähnten Detektionsverfahrens über Array-Technologien auf einem Chip beispielsweise auf einer Oberfläche eine Bibliothek  
30 bekannter DNA-Sequenzen ("Sonden-Oligonukleotide") in einem geordneten Raster fixiert, so dass die Position jeder individuellen DNA-Sequenz bekannt ist. Existieren in der Untersuchungslösung Fragmente aktiver Gene ("Target-Oligonukleotide"), deren Sequenzen zu bestimmten Sonden-Oligonukleotiden auf dem Chip komplementär sind, so können die Target-Oligonukleotide durch Nachweis der entsprechenden Hybridisierungsereignisse auf dem Chip identifiziert werden.

Verfahren zur oberflächensensitiven Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen sind hinreichend bekannt. So beschreibt beispielsweise die WO 2003/018834 A2 ein Verdrängungsassay zur Detektion von  
5 Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen. Bei einem solchen elektrochemischen Verfahren werden die Assoziationsereignisse anhand der mit der Assoziation einhergehenden Änderung der elektrochemischen Eigenschaften der Sonden-Moleküle nachgewiesen.

10 Die WO 2011/069501 A1 kombiniert die hohe Empfindlichkeit einer oberflächensensitiven Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen mit einer vorangegangenen Amplifizierung der Target-Nukleinsäure-Oligomere durch eine PCR. Dadurch kann die Grenze für den Nachweis der ursprünglich in der Probe vorhandenen Target-  
15 Nukleinsäureoligomere zu sehr kleinen Konzentrationen verschoben werden.

Als nachteilig an diesen Verfahren hat sich herausgestellt, dass die Verdrängung der an die Sonden-Nukleinsäureoligomere hybridisierten Signal-Nukleinsäureoligomere durch die Target-Nukleinsäureoligomere eine Abnahme der  
20 Signalintensität bewirkt. Der Nachweis von Target-Nukleinsäureoligomeren erfolgt also ausgehend von einem maximalen Detektionssignal durch eine nachfolgende Abnahme der Signalintensität.

Es ist allgemein bekannt, dass die Detektion von beliebigen Target-Molekülen mit  
25 deutlich besserer Nachweisgrenze erfolgen kann, wenn der Nachweis von einem Null-Signal ausgeht, d.h. bei Abwesenheit der gesuchten Target-Moleküle wird auch kein Signal detektiert. Wünschenswert wäre es, wenn die Signalintensität direkt mit der Anzahl an anwesenden Target-Molekülen korrelieren würde. Aus der Zunahme der Signalintensität könnte dann die Bildung von Target-Molekülen mitverfolgt  
30 werden.

### Darstellung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen zu schaffen, das den Nachweis von Target-Nukleinsäureoligomeren durch eine Zunahme der Signalintensität ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren gemäß unabhängigem Patentanspruch 1 gelöst. Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den Beispielen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
Base	A, G, T, C oder U
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	Wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z.B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z.B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z.B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z.B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure ist es, dass sie natürlich vorkommende



	cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.
Nukleotid, nt	Monomerbaustein eines Nukleinsäureoligomers
Oligonukleotid, Oligo	Äquivalent zu Nukleinsäureoligomer, also z.B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Sequenz	Nukleotidabfolge in einem Nukleinsäureoligomer
komplementär	Zur Ausbildung der Watson-Crick Struktur doppelsträngiger Nukleinsäureoligomere hybridisieren die beiden Einzelstränge, wobei die Nukleotidabfolge des einen Strangs komplementär zur Nukleotidabfolge des anderen Strangs ist, so dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt).
Mismatch	Zur Ausbildung der Watson-Crick Struktur doppelsträngiger Nukleinsäureoligomere hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung innerhalb des Hybrids bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.
Perfekter Match	Hybrid aus zwei komplementären Nukleinsäure-Oligomeren, bei dem kein Mismatch auftritt.
ss	Single Strand (Einzelstrang)
ds	Double Strand (Doppelstrang)
redoxaktiv	Bezeichnet die Eigenschaft einer Einheit unter bestimmten äußeren Umständen an ein geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen.
Linker, Spacer	Molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen

Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Hetero-Alkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit dem entsprechenden Reaktionspartner eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d.h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Auch unspezifische nt, i.e. nicht zu anderen Basen komplementäre nt, können als Linker/Spacer verwendet werden, insbesondere bei der Anbindung von Sonden-Oligos an eine Oberfläche.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen bereit umfassend die Schritte

- 5 a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren besteht, wobei die Sonden-Nukleinsäureoligomere einen zu einem ersten Signal-Pin-Abschnitt von Signal-Nukleinsäureoligomeren komplementären Sonden-Pin-Abschnitt besitzen,
- 10 b) Bereitstellen wenigstens einer Art von Signal-Nukleinsäureoligomeren, wobei
  - die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu dem Sonden-Pin-Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere komplementären ersten Signal-Pin-Abschnitt besitzen,
  - die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu einem Target-Erkennungs-
  - 15 Abschnitt von Target-Nukleinsäureoligomeren komplementären Signal-Erkennungs-Abschnitt besitzen,
  - die Signal-Nukleinsäureoligomere einen ersten und einen zweiten unter Ausbildung einer Hairpin-Struktur zueinander komplementären Signal-Pin-Abschnitt besitzen, wobei die Hairpin-Struktur eine Schmelztemperatur  $T_{pN}$
  - 20 aufweist,

- der erste Signal-Pin-Abschnitt nicht zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementär ist, und
  - die Signal-Nukleinsäureoligomere im Bereich des ersten Signal-Pin-Abschnitts mit zumindest einem redoxaktiven Detektionslabel modifiziert sind,
- 5
- c) Bereitstellen einer Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren,
  - d) Bereitstellen einer Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation, wobei die Reaktionslösung zumindest Nukleotide, wenigstens eine Art von Primer und wenigstens eine Art von Nukleinsäure-
  - 10 Polymerase mit Exonuklease-Aktivität enthält,
  - e) Mischen der in Schritt d) bereitgestellten Reaktionslösung mit den in Schritt b) bereitgestellten Signal-Nukleinsäureoligomeren und der in Schritt c) bereitgestellten Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren,
  - f) Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere mittels
  - 15 Nukleinsäureamplifikation unter Bildung von Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücken,
  - g) Inkontaktbringen des in Schritt f) erhaltenen Reaktionsgemisches mit der in Schritt a) bereitgestellten modifizierten Oberfläche,
  - h) Detektion der gebildeten Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke durch eine
  - 20 elektrochemische Detektionsmethode bei einer Temperatur  $T_{DE}T \leq T_{PN}$ ,
  - i) mehrfache Wiederholung der Schritte f) bis h),
  - k) Vergleich der verschiedenen in Schritt h) erhaltenen Werte umfasst.

Der Begriff Hairpin wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung für eine DANN-

25 Sekundärstruktur verwendet, bei der durch intramolekulare Basenpaarungen eine Haarnadelstruktur gebildet wird. Ein Hairpin besteht aus einem doppelsträngigen Abschnitt, welcher vorliegend auch als „Doppelhelix-Abschnitt“ oder „Pin“ oder „Stern“ bezeichnet wird und aus einem einzelsträngig vorliegenden Schleifenabschnitt, welcher vorliegend auch als „Loop“ bezeichnet wird.

30

Die zur Ausbildung des Hairpins zueinander komplementären Abschnitte des Signal-Nukleinsäureoligomers, welche den doppelsträngigen Pin des Hairpins bilden, werden in der vorliegenden Erfindung als „erster und zweiter Signal-Pin-Abschnitt“ bezeichnet. Der vorliegend verwendete Ausdruck „Sonden-Pin-Abschnitt“

beschreibt einen zu dem ersten Signal-Pin-Abschnitt komplementären Abschnitt am Sonden-Nukleinsäureoligomer.

5 Unter der Angabe „innerhalb der Hairpin-Struktur angeordnete“ Sequenz-Abschnitte wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass die Sequenzabschnitte im Loop-Bereich des Hairpins und somit - bezogen auf den Einzelstrang - zwischen den zwei zur Ausbildung einer Hairpin-Struktur zueinander komplementären Signal-Pin-Abschnitten des entsprechenden Einzelstranges angeordnet sind.

10

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Ausdruck „Signal-Erkennungs-Abschnitt“ bezieht sich auf einen zu einem Abschnitt des Target-Nukleinsäureoligomers komplementären Abschnitt des Signal-Nukleinsäureoligomers und bezeichnet einen Sequenzabschnitt im Signal-  
15 Nukleinsäureoligomer, welcher aufgrund seiner komplementären Struktur beispielsweise mit einem spezifischen Sequenzabschnitt des Targets einen Doppelstrang ausbilden kann und so zur Erkennung eines nachzuweisenden Targets dient. In Analogie dazu wird vorliegend der entsprechende Abschnitt des Target-Nukleinsäureoligomers, welcher durch den Signal-Erkennungs-Abschnitt  
20 erkannt wird, mit „Target-Erkennungs-Abschnitt“ bezeichnet.

Unter einer „weitgehend komplementären Struktur“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Sequenzabschnitte verstanden, bei denen maximal 10% der Basenpaare Mismatches ausbilden. Bevorzugt handelt es sich bei einer  
25 „weitgehend komplementären Struktur“ im Rahmen der vorliegenden Erfindung um Sequenzabschnitte, bei denen maximal 5% der Basenpaare Mismatches ausbilden.

Von den erfindungsgemäß bereitgestellten Komponenten liegen unter Normalbedingungen die Signaloligonukleotide vorwiegend in einer Hairpin-Struktur  
30 vor, die Target-Nukleinsäureoligomere bilden einen Doppelstrang, die Primer liegen in der Regel einzelsträngig vor und die Nukleinsäure-Polymerase liegt für gewöhnlich ungebunden vor und weist keine Syntheseaktivität auf.

Die Hairpin-Struktur der Signaloligonukleotide besitzt eine Schmelztemperatur  $T_{PN}$ . Unter der Schmelztemperatur einer Hairpin-Struktur wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Temperatur verstanden, bei der 50% der Signaloligonukleotide als Hairpin und 50% der Signaloligonukleotide in offener Form vorliegen.

Zum Start eines Amplifizierungszyklus werden sämtliche potentielle Hybride/Selbsthybride durch eine geeignete, dem Fachmann bekannte Maßnahme wie beispielsweise eine Temperaturerhöhung dissoziiert. Bei einer anschließenden Temperatursenkung hybridisieren die Primer an komplementäre Stellen der noch einzelsträngigen Targets an. Die Polymerase wiederum bindet im Bereich des 3'-OH-Endes der Primer an das Hybrid aus Primer und Target und beginnt mit der Verlängerung des Primers an dessen 3'-OH-Ende. Bei dieser Polymerisierung wird der vorliegende Einzelstrang des Targets als Matrize abgelesen und ein neuer Doppelstrang gebildet.

Der Hairpin des Signaloligonukleotids verbleibt während der Temperaturabsenkung zumindest zum Teil in seiner offenen Form, der Signal-Erkennungs-Abschnitt hybridisiert an den entsprechenden Target-Erkennungs-Abschnitt der einzelsträngig vorliegenden Targets und bildet mit diesem einen Doppelstrang aus.

Da der erste Signal-Pin-Abschnitt des Signaloligonukleotids nicht zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementär ist, hybridisiert dieser nicht mit den Target-Nukleinsäureoligomeren und liegt daher als vom Target abstehender Abschnitt vor. Gelangt nun die Polymerase während der Polymerisierung an eine Stelle des Targets, an der bereits der Signal-Erkennungs-Abschnitt eines Signaloligos gebunden ist, so schneidet das Enzym aufgrund seiner Exonukleaseaktivität den nicht an das Target hybridisierten ersten Signal-Pin-Abschnitt in einem Bereich nahe des hybridisierten Signal-Erkennungs-Abschnittes ab. Dadurch entsteht ein kurzes Signaloligonukleotid-Teilstück, an welches das redoxaktive Detektionslabel gebunden ist und das von einem verbleibenden Signal-Oligonukleotid-Rumpf getrennt ist, welcher wiederum den zweiten Signal-Pin-Abschnitt umfasst. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Signaloligonukleotid-Teilstücke sowohl vom 3' Ende wie auch vom 5' Ende des Signaloligonukleotids geschnitten werden können, da sich

das redoxaktive Detektionslabel vollkommen gleichwertig im Bereich des 3' oder des 5' Endes befinden kann.

Die so entstehenden, mit dem redoxaktiven Detektionslabel modifizierten  
5 Signaloligonukleotid-Teilstücke können aufgrund der Signal-Pin-Abschnitte an die  
dazu komplementären Sonden-Pin-Abschnitte der Sonden-Oligonukleotide und  
damit an die modifizierte Oberfläche binden. Die redoxaktiven Detektionslabel  
werden dabei zum elektrochemischen Nachweis von an die modifizierte Oberfläche  
(Elektroden) durch Hybridisierung mit den Sondenoligonukleotiden gebundenen  
10 Signaloligonukleotid-Teilstücken benutzt. Bei Anlegen einer entsprechenden  
Spannung an die Teststelle wird ein dem Hybridisierungsgrad aus  
Sondenoligonukleotiden und gebundenen Signaloligonukleotid-Teilstücken  
entsprechender Strom gemessen. Dieses elektrisch detektierbare Signal ist bei  
einer Temperatur  $T_{DE}T \leq T_{P,N}$  deutlich höher als das entsprechende Signal der  
15 ursprünglichen Signaloligonukleotide, da letztere in der Hairpin-Form nicht oder nur  
zu einem sehr geringen Teil an die Sondenoligonukleotide gebunden werden.

Mit zunehmendem Fortgang der Nukleinsäure-Amplifikation läuft die Replikation der  
Target-Nukleinsäureoligomere unter Entstehung der Signaloligonukleotid-Teilstücke  
20 wiederholt ab und die Konzentration an freien Signaloligonukleotid-Teilstücken  
nimmt mit zunehmender Amplifizierung zu, was an der Teststelle nachvollzogen  
werden kann. Die Konzentrationszunahme führt an einer mit Sonden-  
Nukleinsäureoligomeren belegten Teststelle zu einer - im Vergleich zur Messung  
bei Zyklus 0 - deutlich beschleunigten Anhybridisierung der Signaloligo-Teilstücke  
25 und damit zu einer Zunahme des detektierten elektrochemischen Signals.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt damit eine Methode zur Verfügung, mit der  
der Fortgang einer Real-Time Nukleinsäure-Amplifikation über eine Zunahme des  
elektrochemisch detektierten Signals ausgehend von einem im Wesentlich bei Null  
30 liegenden Signal verfolgt werden kann. Das elektrochemisch detektierte Signal  
nimmt proportional zur Zahl der Target-Nukleinsäureoligomere zu. Damit ist der  
Nachweis geringster Mengen an Target-Nukleinsäureoligomeren möglich.

Bevorzugt sind die Signal-Nukleinsäureoligomere mit mehreren Detektionslabel modifiziert, wodurch Signale mit höherer Intensität erhalten werden. Erfindungsgemäß wird als Detektionslabel eine redoxaktive Substanz verwendet.

- 5 Die Signal-Nukleinsäureoligomere weisen bevorzugt 10 bis 200 Basen, insbesondere 20 bis 100 Basen, besonders bevorzugt 25 bis 70 Basen auf. Mit Hilfe von Signal-Nukleinsäureoligomeren dieser Länge können alle gewünschten Targets eindeutig identifiziert werden.
- 10 Erfindungsgemäß wird die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere und die Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke mehrfach wiederholt, wodurch die Bestimmung der Zunahme der Signalintensität mit der Zeit im Laufe der Amplifikation der Target-Nukleinsäureoligomere ermöglicht wird.
- 15 Die Konzentration der Signal-Nukleinsäureoligomere in dem in Schritt e) hergestellten Gemisch beträgt bevorzugt zwischen  $10^{-15}$  mol/l und  $10^{-5}$  mol/l, besonders bevorzugt zwischen  $10^{-13}$  mol/l und  $10^{-7}$  mol/l und insbesondere bevorzugt zwischen  $10^{-11}$  mol/l und  $10^{-7}$  mol/l.
- 20 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besitzen die Signal-Nukleinsäureoligomere zusätzlich zumindest einen Signal-Dock-Abschnitt, und die Sonden-Nukleinsäureoligomere zusätzlich einen zu dem Signal-Dock-Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere komplementären Sonden-Dock-Abschnitt, wobei der Signal-Dock-Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere
- 25 benachbart zu dem ersten Signal-Pin-Abschnitt angeordnet ist. Besonders bevorzugt ist der Sonden-Dock-Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere benachbart zu dem Sonden-Pin-Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere angeordnet. Insbesondere bevorzugt ist der Signal-Dock-Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere nicht zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementär.
- 30 Der Signal-Dock-Abschnitt des Signal-Nukleinsäureoligomers befindet sich benachbart zu dem ersten Signal-Pin-Abschnitt, welcher mit dem redoxaktiven Detektionslabel versehen ist. Der Sonden-Dock-Abschnitt wiederum ist benachbart zu dem Sonden-Pin-Abschnitt des Sonden-Nukleinsäureoligomers.

Im Falle eines nicht zum Target komplementären Signal-Dock-Abschnitts bleibt dieser auch bei einer Anhybridisierung des Signal-Erkennungs-Abschnittes an das Target zusammen mit dem ersten Signal-Pin-Abschnitt ungebunden und liegt im Wesentlichen vom Target „abstehend“ vor. Dadurch wird sichergestellt, dass in  
5 einem mittels der Amplifizierungsreaktion entstehenden Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstück neben dem ersten Signal-Pin-Abschnitt auch der Signal-Dock-Abschnitt enthalten ist. Das Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstück ist somit um den Signal-Dock-Abschnitt verlängert.

10 Da der Signal-Dock-Abschnitt komplementär zu dem Sonden-Dock-Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere ist, ist der potentielle Hybridisierungsbereich zwischen Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstück und Sonden-Nukleinsäureoligomer verlängert. Durch diese zusätzlich vorhandenen Signal-Dock- und Sonden-Dock-Abschnitte wird eine schnellere und beständigere Bindung der nachfolgend  
15 gebildeten Signaloligonukleotid-Teilstücke an die Sonden-Nukleinsäureoligomere bewirkt und somit die Detektionsgenauigkeit erhöht.

Die Tatsache, dass der Signal-Dock-Abschnitt nicht zum Target komplementär ist, erweist sich auch aus einem anderen Grund als vorteilhaft. Zum Target  
20 komplementäre Signal-Dock-Abschnitte könnten an die einsträngig vorliegenden Target-Nukleinsäureoligomere binden. Da die Signaloligonukleotid-Teilstücke aber durch Bindung an die Sonden-Nukleinsäureoligomere elektrochemisch detektiert werden sollen, ist eine Bindung an die Target-Nukleinsäureoligomere unerwünscht und wird vorteilhafterweise vermieden.

25 Besonders vorteilhaft stellt der Signal-Dock-Abschnitt eine Variable dar, die den Signal-Erkennungs-Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere codiert. So können beispielsweise definierte Signal-Dock-Abschnitte in vorgegebener Weise mit einem spezifischen Signal-Erkennungs-Abschnitt gekoppelt werden, so dass eine  
30 bestimmte Sequenz des Signal-Dock-Abschnittes einer ganz bestimmten Target-Sequenz entspricht.

Eine parallele Detektion verschiedener Targets mit Hilfe eines DNA-Chips kann auf diese Weise besonders einfach durchgeführt werden. Es muss dazu lediglich eine



entsprechende Anzahl verschiedener Sequenzen als Signal-Dock-Abschnitte der Signal-Nukleinsäureoligomere eingesetzt werden. Auf einem DNA-Chip, welcher an verschiedenen Bereichen Sonden-Nukleinsäureoligomere mit einer Anzahl entsprechend unterschiedlicher Sonden-Dock-Abschnitte aufweist, können unterschiedliche Targets detektiert werden. Werden verschiedene Targets in getrennten Experimenten detektiert, so kann dieselbe Sequenz des Signal-Dock-Abschnittes der Signal-Nukleinsäureoligomere in den verschiedenen Ansätzen verwendet werden.

10 Bevorzugt sind die Signal-Nukleinsäureoligomere im Bereich des ersten Signal-Pin-Abschnitts und/oder im Bereich des benachbart zu dem Signal-Pin-Abschnitt angeordneten Abschnitts mit zumindest einem redoxaktiven Detektionslabel modifiziert. Falls die Signal-Nukleinsäureoligomere zusätzlich einen Signal-Dock-Abschnitt aufweisen, der benachbart zum ersten Signal-Pin-Abschnitt angeordnet ist, kann das redoxaktive Detektionslabel gleichwertig an einen der beiden 15 genannten Abschnitte gebunden sein. Nach Bildung der kurzen Signaloligonukleotid-Teilstücke durch die Polymerase mit Exonukleaseaktivität sind beide genannten Abschnitte Bestandteil der Signaloligonukleotid-Teilstücke, die nachfolgend an die Sonden-Nukleinsäureoligomere hybridisieren und so detektiert 20 werden.

In Abhängigkeit der Nukleotidsequenz und der Basenlänge der beiden genannten Abschnitte kann beispielsweise aus sterischen Gründen oder aus Gründen der Kopplungschemie einer der beiden genannten Abschnitte besser für die 25 Modifizierung geeignet sein als der andere. Je nach Anwendungsart und je nach Art der Signal-Nukleinsäureoligomere kann die optimale Wahl zur Modifikation getroffen werden.

Zur Sensitivitätserhöhung können einer der beiden genannten Abschnitte oder 30 auch beide Abschnitte mit mehreren Detektionslabel modifiziert sein.

Besonders bevorzugt weisen die zwei Signal-Pin-Abschnitte der Signal-Nukleinsäureoligomere jeweils 4 bis 10 Basen, bevorzugt 5 bis 8 Basen auf. Die genannte Zahl an Basen stellt zum einen sicher, dass unter Normalbedingungen

der weit überwiegende Teil der Signal-Nukleinsäureoligomere als Hairpin vorliegt, und zum anderen, dass die Schmelztemperatur des Hairpins im Bereich der bei der Nukleinsäureamplifikation angewendeten Temperaturen liegt.

5 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Signal-Erkennungs-Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere innerhalb des Loop-Bereichs der Hairpin-Struktur zwischen den Signal-Pin-Abschnitten angeordnet. Besonders vorteilhaft ist der Signal-Erkennungsabschnitt im loop-Bereich des Hairpins angeordnet. Für den Loop-Bereich eines Hairpins bestehen  
10 sowohl bezogen auf die Basenlänge als auch auf die Basenabfolge größere Variationsmöglichkeiten, wodurch ganz unterschiedliche und spezifische Signal-Erkennungs-Abschnitte in unterschiedlichen Längen in den Loop-Bereich integriert werden können.

15 Zwar ist eine Bindung der Signal-Nukleinsäureoligomere an das Target in ihrer offenkettigen Form erwünscht, da besonders in diesem Fall die Polymerase in reproduzierbarem Ausmaß Signaloligonukleotid-Teilstücke bildet, jedoch findet sich ein weiterer Vorteil der genannten Ausführungsform darin, dass der Loop-Bereich immer einzelsträngig ist und daher eine Bindung des Signal-Oligomers an das  
20 Target auch dann möglich ist, wenn das Signal-Oligomer als Hairpin vorliegt. Dies gilt nur bei Vernachlässigung sterischer Hinderungsgründe. Je nach Platzierung der Erkennungssequenz innerhalb des Loops ist ein korrektes Schneiden durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase während der Amplifizierung auch im Fall eines Hybrids aus Hairpin und Target denkbar. Spätestens bei einem darauffolgenden  
25 Denaturierungsschritt zerfällt der Pin-Abschnitt des Hairpins, wodurch das Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstück freigesetzt wird und für eine Detektion an der modifizierten Oberfläche zur Verfügung steht.

Bevorzugt ist der zweite Signal-Pin-Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere  
30 nicht zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementär. Da gemäß der genannten Ausführungsform der zweite Signal-Pin-Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere nicht komplementär zur Targetsequenz ist, kann die Polymerase vorteilhafterweise nicht an das Signaloligo andocken und von da aus den Strang verlängern, was zu unerwünschten Nebenprodukten führen könnte.

Ebenfalls bevorzugt sind Ausführungsformen, gemäß denen das freie Ende des zweiten Signal-Pin-Abschnitts der Signal-Nukleinsäureoligomere durch ein Nukleotid gebildet wird, das ein invertiertes Nukleosid oder ein di-desoxy-Nukleosid aufweist. Besonders vorteilhaft wird gemäß dieser Ausführungsform eine Kettenverlängerung am Signal-Nukleinsäureoligomer verhindert und dadurch die Bildung unerwünschter Nebenprodukte vermieden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen die Sonden-Nukleinsäureoligomere in ihren Sonden-Pin-Abschnitten und/oder in ihren Sonden-Dock-Abschnitten zumindest ein Nukleotid auf, das nicht komplementär zu den entsprechenden Signal-Pin-Abschnitten und Signal-Dock-Abschnitten der Signal-Nukleinsäureoligomere oder der Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke ist.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Bindung der Signaloligonukleotid-Teilstücke an die Sondenoligonukleotide detektiert. Ein störendes Hintergrundsignal kann sich dadurch ergeben, dass Hairpin-Signaloligonukleotide an die Sondenoligonukleotide binden. Eine bessere Unterscheidung zwischen Signaloligonukleotid-Teilstücken und Hairpin-Signaloligonukleotiden kann dadurch erzielt werden, dass die Sondenoligonukleotide in dem/den Sonden-Pin- und Sonden-Dock-Abschnitt/Abschnitten eine, zwei oder mehrere Basen enthalten, die nicht komplementär zu den entsprechenden Signal-Pin- und Signal-Dock-Abschnitten des Signaloligonukleotids sind. Aufgrund dieser so genannten Mismatches entsteht bei Anbindung von Hairpin-Signaloligonukleotiden und Signaloligonukleotid-Teilstücken an diesen Basen ein sogenanntes „Gap“, das sich stark negativ auf die Anhybridisierung von Hairpin-Signaloligonukleotiden auswirkt, aber nur wenig negativ auf die Anhybridisierung von Signaloligonukleotid-Teilstücken. Damit wird die Bindungskonstante der Hairpin-Signaloligonukleotide an die Sondenoligonukleotide deutlich stärker herabgesetzt als die Bindungskonstante der Signaloligonukleotid-Teilstücke an die Sondenoligonukleotide, wodurch sich ein verstärkter Unterschied zwischen den entsprechenden Signalintensitäten ergibt.

Ein entsprechendes Diskriminierungs-erhöhendes Verhalten an der Sonde lässt sich auch erzielen, wenn die Sonde in dem/den zu den Signaloligonukleotiden komplementären Bereich/Bereichen um eine, zwei oder mehrere Basen kürzer ist als der entsprechende Bereich des Hairpin-Signaloligonukleotids oder  
5 Signaloligonukleotid-Teilstücks.

Bevorzugt erfolgt die Detektion der gebildeten Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke in dem erfindungsgemäßen Verfahren durch eine elektrochemische Detektionsmethode bei einer Temperatur  $T_{DET}$  zwischen 20 °C und 60 °C, bevorzugt  
10 zwischen 30 °C und 50 °C. Bei den genannten Temperaturen ist eine besonders genaue und reproduzierbare Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke möglich.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere durch eine PCR oder  
15 durch eine isothermale Amplifikation. Insbesondere die PCR stellt eine etablierte Methode dar, durch die eine weitestgehend fehlerfreie Amplifikation der Target-Nukleinsäureoligomere sichergestellt werden kann.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Signal-Nukleinsäureoligomer zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei das Signal-Nukleinsäureoligomer einen ersten und einen zweiten unter Ausbildung einer Hairpin-Struktur zueinander komplementäre Signal-Pin-Abschnitt aufweist und das Signal-Nukleinsäureoligomer im Bereich der zwei unter Ausbildung einer Hairpin-  
25 Struktur zueinander komplementären Signal-Pin-Abschnitte mit zumindest einem redoxaktiven Detektionslabel modifiziert ist.

Die vorliegende Erfindung umfasst außerdem einen Kit zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens umfassend eine oben beschriebene modifizierte  
30 Oberfläche, eine effektive Menge an Signal-Nukleinsäureoligomeren wie sie oben beschrieben sind und eine Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation, wobei die Reaktionslösung zumindest Nukleotide, Primer und wenigstens eine Art von Nukleinsäure-Polymerase mit Exonuklease-Aktivität enthält.

### Die leitfähige Oberfläche

5 Mit dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird jedes elektrisch leitfähige Trägermaterial bezeichnet, das geeignet ist direkt oder nach entsprechender chemischer Modifizierung derivatisierte oder nicht-derivatisierte Sonden-Nukleinsäureoligomere kovalent oder über andere spezifische Wechselwirkungen zu binden.

10

Es kann jeder Träger mit einer elektrisch leitfähigen Oberfläche beliebiger Dicke eingesetzt werden insbesondere Oberflächen aus Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium und Mangan. Besonders bevorzugt wird im Rahmen der vorliegenden  
15 Erfindung eine mit Gold beschichtete Oberfläche verwendet.

20

Daneben können auch beliebige dotierte oder nicht dotierte Halbleiteroberflächen beliebiger Dicke verwendet werden. Sämtliche Halbleiter können als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden. Als Beispiele seien an  
dieser Stelle Kohlenstoff, Silizium, Germanium,  $\alpha$ -Zinn, Cu(I)- und Ag(I)-Halogenide  
beliebiger Kristallstruktur genannt. Geeignet sind ebenfalls sämtliche binären  
Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den  
Elementen der Gruppen 14 und 16, den Elementen der Gruppen 13 und 15, sowie  
den Elementen der Gruppen 15 und 16. Daneben können ternäre Verbindungen  
25 beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den Elementen der  
Gruppen 11, 13 und 16 oder den Elementen der Gruppen 12, 13 und 16 verwendet  
werden. Die Bezeichnungen der Gruppen des Periodensystems der Elemente  
beziehen sich auf die IUPAC-Empfehlung von 1985.

30

### Bindung von Nukleinsäureoligomeren an die Oberfläche

Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäureoligomeren an einer Oberfläche sind dem Fachmann bekannt. Die Sonden-Nukleinsäureoligomere können z.B.

kovalent über Hydroxyl-, Epoxid-, Amino- oder Carboxygruppen des Trägermaterials mit natürlicherweise am Nukleinsäureoligomer vorhandenen oder durch Derivatisierung am Sonden-Nukleinsäureoligomer angebrachten Hydroxy-, Amino- oder Carboxylgruppen an die Oberfläche gebunden werden. Alternativ  
5 können Thiol-modifizierte Sonden-Nukleinsäureoligomere chemisorptiv an z.B. Goldoberflächen gebunden werden. Das Sonden-Nukleinsäureoligomer kann direkt oder über einen Linker/Spacer an die Oberflächenatome oder -moleküle einer Oberfläche gebunden werden. Daneben kann das Sonden-Nukleinsäureoligomer durch die bei Immunoassays üblichen Methoden verankert werden wie z.B. durch  
10 Verwendung von biotinylierten Sonden-Nukleinsäureoligomeren zur nicht-kovalenten Immobilisierung an Avidin oder Streptavidin-modifizierten Oberflächen. Die chemische Modifikation der Sonden-Nukleinsäureoligomere mit einer Oberflächen-Ankergruppe kann bereits im Verlauf der automatisierten Festphasensynthese oder aber in gesonderten Reaktionsschritten eingeführt  
15 werden. Dabei wird auch das Nukleinsäureoligomer direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -moleküle einer Oberfläche der oben beschriebenen Art verknüpft. Diese Bindung kann auf verschiedene dem Fachmann bekannte Arten durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang wird auf die WO 00/42217 A 1 verwiesen.

20

Daneben ist eine Sondenimmobilisierung auf einem DNA-Chip in *P. Liepold, T. Kratzmüller, N. Persike, M. Bandilla, M. Hinz, H. Wieder, H. Hillebrandt, E. Ferrer, G. Hartwich (2008), Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 391, S. 1759-1772, Electrically Detected Displacement Assay (EDDA): A Practica! Approach to Nucleic  
25 Acid Testing in Clinical or Medical Diagnosis* detailliert beschrieben.

### **Sonden-, Target- und Signal-Nukleinsäureoligomere**

30

Die Sonden-Nukleinsäureoligomere der vorliegenden Erfindung bestehen aus Nukleotiden in einer bestimmten Nukleotidabfolge (Sequenz) und liegen an einer Oberfläche immobilisiert vor. Als Target-Nukleinsäureoligomere werden Moleküle bezeichnet, die spezifisch mit den Signal-Nukleinsäureoligomeren unter Ausbildung

eines Doppelstrang-Hybrids wechselwirken. Target-Nukleinsäureoligomere im Sinne der vorliegenden Erfindung sind also Nukleinsäureoligomere, die als Komplexbindungspartner des komplementären Signal-Nukleinsäureoligomers fungieren. Die Target-Nukleinsäureoligomere, deren Vorhandensein anhand der  
5 vorliegenden Erfindung detektiert werden soll, weisen zumindest einen Sequenzbereich auf, dessen Sequenz komplementär oder zumindest weitgehend komplementär zu einem Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere ist.

Als Nukleinsäureoligomer oder ns-Oligomer wird im Rahmen der vorliegenden  
10 Erfindung eine Verbindung aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Nukleotiden oder aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Pyrimidin- (z.B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z.B. Adenin oder Guanin), bevorzugt ein DNA-, RNA- oder PNA-Fragment, verwendet. Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie  
15 z.B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Rückgrat-Strukturen, wie z.B. ein Thio-Phosphat-, ein Dithio-Phosphat- oder ein Phosphoramid-Rückgrat. Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die sequenzspezifische Bindung natürlich vorkommender DNA, oder RNA bzw. daraus  
20 abgeleitete (transkribierte oder amplifizierte) Strukturen wie cDNA oder amplifizierte cDNA oder amplifizierte RNA (aRNA).

Bei den Signal-Nukleinsäureoligomeren im Rahmen der vorliegenden Erfindung handelt es sich um Nukleinsäure-Hairpinstrukturen. Hairpins sind eine spezielle  
25 Form von Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren und entstehen dadurch, dass ein Sequenzabschnitt eines einzelsträngigen DNA- oder RNA-Moleküls mittels einer „Schleifenbildung“ auf einen komplementären Bereich im selben Molekül unter Ausbildung eines kleinen doppelsträngigen Abschnitts zurückfalten kann. Bei Normalbedingungen ist die Bildung von Hairpins in entsprechenden  
30 Nukleinsäuremolekülen thermodynamisch begünstigt. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass Hairpins immer zu einem gewissen Anteil in der geschlossenen Form, also der Hairpin-Form und zu einem gewissen Anteil in der offenen, also einzelsträngigen Form vorliegen, es stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht ein. Das Verhältnis von geschlossener zu offener Form wird

beispielsweise durch die Temperatur beeinflusst, so liegen zum Beispiel bei der Schmelztemperatur  $T_{\text{PIN}}$  jeweils die Hälfte der Moleküle geschlossen bzw. offen vor. Die Schmelztemperatur selbst hängt wiederum von der Sequenz der den Pin bzw. Stern ausbildenden komplementären Abschnitte, von deren GC-Gehalt, deren  
5 Länge und dergleichen ab.

### **Detektions-Label / Markierung (Markermolekül)**

10 Die Signal-Nukleinsäureoligomere sind durch Derivatisierung mit einem oder mehreren detektierbaren redoxaktiven Substanzen als Label ausgestattet. Dieses Label ermöglicht die Detektion der Komplexbildungsereignisse zwischen den in dem erfindungsgemäßen Verfahren gebildeten Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücken und den oberflächengebundenen Sonden-Nukleinsäureoligomeren.

15

Als Redoxlabel können Übergangsmetall-Komplexe, insbesondere solche des Kupfers, Eisens, Rutheniums, Osmiums oder Titans mit Liganden wie Pyridin, 4,7-Dimethylphenanthrolin, 9,10-Phenanthrenquinondiimin, Porphyrine und substituierte Porphyrin-Derivate verwendet werden. Daneben ist der Einsatz von Riboflavin, von  
20 Chinonen wie Pyrrolochinolinochinon, Ubichinon, Anthrachinon, Naphtochinon oder Menachinon bzw. Derivaten davon, von Metallocenen und Metallocenderivaten wie Ferrocenen und Ferrocenderivaten, Cobaltocenen und Cobaltocenderivaten, von Porphyrinen, Methylenblau, Daunomycin, Dopamin-Derivaten, Hydrochinon-Derivaten (para- oder ortho-Dihydroxy-Benzol-Derivaten, para- oder ortho-  
25 Dihydroxy-Anthrachinon-Derivaten, para- oder ortho-Dihydroxy-Naphtochinon-Derivaten) und ähnlichen Verbindungen möglich. Besonders bevorzugt wird Ferrocen oder ein Ferrocen-Derivat als redoxaktives Label eingesetzt.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch indirekte Label verwendet  
30 werden. Unter dem Begriff „indirekte Label“ werden solche verstanden, bei denen die eigentlich detektierbare Form des Labels erst über eine enzymkatalysierte Reaktion entsteht. Die detektierbare Form des Labels kann dann an der Oberfläche detektiert werden. Beispiele für solche indirekten Label sind dem Fachmann aus der Literatur bekannt, exemplarisch sei hier alkalische Phosphatase (AP) in Verbindung



mit dem Substrat p-Aminophenylphosphat genannt. Liegt AP als indirekter Marker an das Signal-Nukleinsäureoligomer gebunden vor, so kann eine elektrochemische Detektion des Signal-Nukleinsäureoligomers dadurch erfolgen, dass zum Zeitpunkt der Detektion p-Aminophenylphosphat zugegeben wird. Das elektrochemisch inaktive p-Aminophenylphosphat dient als Substrat des Enzyms AP und wird in p-Aminophenol umgewandelt. p-Aminophenol kann nun, nach Diffusion zu einer leitfähigen Oberfläche, elektrochemisch detektiert werden, da diese Form des Substrats (also nach Umsetzung am AP) elektrochemisch aktiv ist. Alternativ kann AP auch zur chromogenen Detektion verwendet werden (z.B. mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid).

### **Oberflächensensitive elektrochemische Detektionsmethoden**

Bei elektrochemischen Methoden kann anhand der Kinetik der elektrochemischen Prozesse prinzipiell zwischen an eine Oberfläche adsorbierten und im Überstand gelösten redoxaktiven Detektionslabel unterschieden werden. Oberflächenadsorbierte Detektionslabel werden im allgemeinen schneller elektrochemisch umgesetzt (z.B. oxidiert oder reduziert) als redoxaktive Detektionslabel aus der Volumenphase, da letztere vor der elektrochemischen Umsetzung erst zur (Elektroden-) Oberfläche diffundieren müssen. Als Beispiele für elektrochemische oberflächensensitive Methoden seien die Cyclovoltammetrie, die Amperometrie und die Chronocoulometrie genannt.

Die Methode der Chronocoulometrie z.B. erlaubt es, oberflächennahe redoxaktive Komponenten von (identischen) redoxaktiven Komponenten in der Volumenphase zu unterscheiden und ist z.B. in Steel, A.B., Herne, T.M. und Tarlov M.J.: Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold, Analytical Chemistry, 1998, Vol. 70, 4670 - 4677 und darin zitierten Literaturstellen beschrieben. Der Einsatz der Chronocoulometrie in einem Verdrängungsassay zur Detektion von Nukleinsäureoligomerhybridisierungsereignissen ist detailliert in der WO 03/01 8834 A2 beschrieben, auf die hiermit in diesem Zusammenhang Bezug genommen wird.

Eine elektrochemische Messvariante von Hybridisierungsereignissen unter

Verwendung eines DNA-Chips ist in *P. Liepold, T. Kratzmüller, N. Persike, M. Bandilla, M. Hinz, H. Wieder, H. Hillebrandt, E. Ferrer, G. Hartwich (2008), Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 391, S. 1759-1772, Electrically Detected Displacement Assay (EDDA): A Practical Approach to Nucleic Acid Testing in Clinical or Medical Diagnosis* beschrieben.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden zur elektrochemischen Detektion Cyclovoltammetrie, Amperometrie, Chronocoulometrie, Impedanzmessung oder Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) eingesetzt. Die genannten Methoden erlauben eine genaue und sichere Detektion der Hybridisierungsereignisse.

Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verfahren können unter Verwendung von DNA-Chips durchgeführt werden. In diesem Fall weist die modifizierte Oberfläche zumindest 2 räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche, bevorzugt zumindest 4 und insbesondere zumindest 12 räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche auf.

Unter "räumlich im Wesentlichen abgetrennten Bereichen" werden Bereiche der Oberfläche verstanden, die ganz überwiegend durch Anbindung einer bestimmten Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren modifiziert sind. Lediglich in Gebieten, in denen zwei solche räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche aneinander grenzen, kann es zu einer Vermischung von verschiedenen Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren kommen.

Ganz besonders bevorzugt weist die modifizierte Oberfläche zumindest 32, insbesondere zumindest 64, ganz besonders bevorzugt zumindest 96 räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche auf.

Die in Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellte modifizierte Oberfläche weist bevorzugt eine Fläche von  $1 \mu\text{m}^2$  bis zu  $1 \text{mm}^2$ , besonders bevorzugt eine Fläche von  $10 \mu\text{m}^2$  bis zu  $100 \mu\text{m}^2$  und insbesondere bevorzugt eine Fläche von rund  $50 \mu\text{m}^2$  auf.

Gemäß einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform ist in jeweils einem der räumlich im Wesentlichen abgetrennten Bereiche der Oberfläche jeweils eine Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren an die Oberfläche gebunden, wobei sich die verschiedenen Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren in zumindest  
5 einer Base voneinander unterscheiden. Dies erlaubt die parallele Detektion einer Vielzahl verschiedener Arten von Target-Nukleinsäureoligomeren.

Ein CMOS-basierter DNA-Chip für elektrochemische Detektion der Hybridisierung zwischen Sonde und Signaloligonukleotid ist z.B. in *Augustyniak, M.; Paulus, C.; Brederlow, Fl.; Persike, N.; Hartwich, G.; Schmitt-Landsiedel, D.; Thewes, R. (2006), Solid-State Circuits, 2006 IEEE International Conference Digest of Technical Papers, 59 - 68 A 24x16 CMOS-Based Chronocoulometric DNA Microarray* beschrieben.  
10

15

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im  
20 Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

Fig. 1a ein Sonden-Nukleinsäureoligomer in schematischer Darstellung;

Fig. 1b ein Signal-Nukleinsäureoligomer in schematischer Darstellung;

Fig. 1c ein Target-Nukleinsäureoligomer in schematischer Darstellung;

Fig. 1d Primer und Polymerase in schematischer Darstellung;

Fig. 2a in schematischer Darstellung die wesentlichen Komponenten des erfindungsgemäßen Verfahrens in ihren Hybridisierungszuständen bei Normalbedingungen;

Fig. 2b in schematischer Darstellung die wesentlichen Komponenten des erfindungsgemäßen Verfahrens in ihren Hybridisierungszuständen bei Start eines PCR-Zyklus;

Fig. 2c in schematischer Darstellung die Replikation des Targets und die Bildung von Signaloligonukleotid-Teilstücken;

Fig. 3a eine Auftragung des Peakstroms cyclovoltammetrischer Messungen eines Ferrocen-Labels in Abhängigkeit von der Zeit zu Beginn der PCR;

Fig. 3b eine Auftragung des Peakstroms cyclovoltammetrischer Messungen eines Ferrocen-Labels in Abhängigkeit von der Zeit nach dem 30. PCR-Zyklus;

Fig. 4 eine Auftragung des Peakstroms cyclovoltammetrischer Messungen eines Ferrocen-Labels jeweils 20 Sekunden nach dem entsprechenden PCR-Zyklus in Abhängigkeit von der Zykluszahl.

### **Wege zur Ausführung der Erfindung**

#### **5 Elektrisch detektierte Real-Time PCR (eRT-PCR)**

Zu einem PCR-Ansatz werden Signaloligonukleotide gegeben, die zum einen zu Sondenoligonukleotiden, die auf einer Teststelle eines DNA-Chips immobilisiert sind, und zum anderen zu den Target-Oligonukleotiden (einem Sequenzbereich des  
10 Templates bzw. des über PCR zu amplifizierenden DNA-Abschnitts) komplementär sind.

In den Figuren 1a bis 1d sind ein Sonden-Nukleinsäuroligomer 1, ein Signal-Nukleinsäuroligomer 2 und die wesentlichen restlichen Komponenten einer  
15 elektrisch detektierbaren real-time PCR schematisch dargestellt. Fig. 1a zeigt schematisch eine Teststelle eines Mikroarrays mit einem der darauf immobilisierten Sondenoligonukleotide 1. Die Oberfläche 3 der Teststelle besteht aus Gold. Auf der

Teststelle ist über Thiolbindungen (-S-) eine Art von Sondenoligonukleotiden 1 immobilisiert. Die Sondenoligonukleotide 1 umfassen die Abschnitte Spacer 4, Sonden-Pin-Abschnitt 5 und Sonden-Dock-Abschnitt 6. Der Sonden-Dock-Abschnitt 6 kann auch zwischen Sonden-Pin-Abschnitt 5 und Spacer 4 angeordnet sein.  
5 Daneben ist es möglich, dass Sonden-Pin-Abschnitt 5 und Sonden-Dock-Abschnitt 6 überlappen, also gemeinsame Basen aufweisen.

Die Signaloligonukleotide 2 weisen bei Normalbedingungen (25<sup>°</sup>, 1 bar) eine sogenannte Hairpinstruktur auf, die aus einem aus einem ersten und einem zweiten  
10 Signal-Pin-Abschnitt 5', 5" aufgebauten Pin-Bereich und einem Loop-Bereich besteht. Benachbart zu dem ersten Signal-Pin-Abschnitt 5' weist das Signaloligonukleotid 2 des vorliegenden Beispiels zusätzlich einen Signal-Dock-Abschnitt 6' auf, welcher komplementär zu dem Sonden-Dock-Abschnitt 6 der Sondenoligonukleotide 1 ist. Der Hairpin trägt ein kovalent angebundenes elektrisch  
15 detektierbares Label 9, wobei im vorliegenden Beispiel der erste Signal-Pin-Abschnitt 5' mit dem Label markiert ist. Der erste Signal-Pin-Abschnitt 5' ist komplementär zu dem Sonden-Pin-Abschnitt 5 des Sondenoligonukleotids 1. Ebenso ist es möglich, dass der Signal-Dock-Abschnitt 6' nicht zwischen Signal-Pin-Abschnitt 5' und Signal-Erkennungs-Abschnitt 8, sondern endständig am freien  
20 Ende des Signal-Pin-Abschnitt 5' angeordnet ist. Auch können der Signal-Pin-Abschnitt 5' und der Signal-Dock-Abschnitt 6' überlappen, also gemeinsame Basen aufweisen.

Der Loop-Bereich der Signaloligonukleotide 2 weist einen Signal-  
25 Erkennungsabschnitt 8 auf, welcher komplementär zu einem Target-Erkennungs-Abschnitt 8' des Target-Nukleinsäureoligomers 10 (Fig 1c) ist. Das Target-Nukleinsäureoligomer liegt in der Regel als Doppelstrang vor und weist Primerbindungsstellen 11, 12 auf, die wiederum komplementär zu den Primern 11' und 12' (Fig. 1d) sind. In Fig. 1d ist schematisch eine Polymerase 13 mit geeigneter  
30 Exonukleaseaktivität dargestellt.

Die Figuren 2a bis 2c zeigen schematisch die Grundzüge des Ablaufs einer elektrisch detektierbaren real-time PCR in der Volumenphase. Die wesentlichen Komponenten in ihren Hybridisierungszuständen bei Normalbedingungen (25<sup>°</sup>C, 1

bar) sind in Fig. 2a dargestellt. In der Regel liegen die Signaloligonucleotide 2 in einer Hairpin-Struktur vor, das Target 10 als Doppelstrang, die Primer 11', 12' einzelsträngig und die Polymerase 13 in einem nicht an die DNA gebundenen Zustand. Ein PCR-Zyklus wird gestartet, indem die PCR-Lösung kurzzeitig auf ca. 5 95°C erhitzt wird, um potentielle Hybride/Selbsthymide zu dissoziieren (vgl. Fig. 2b). Kühlt man die PCR-Lösung auf eine geeignete Temperatur ab (ca. 70°C), können zum einen die Primer 11', 12' mit den einzelsträngigen Targets 10 hybridisieren und die Polymerase 13 kann andocken, zum anderen bleibt der Hairpin des Signaloligonucleotids zumindest zum Teil dissoziiert, und der Signal-Erkennungs- 10 Abschnitt 8 des Signaloligos 2 kann mit dem Target-Erkennungs-Abschnitt 8' hybridisieren. Da der zweite Signal-Pin-Abschnitt 5" des Signaloligos 2 nicht komplementär zur Targetsequenz ist, liegt dieser Abschnitt immer einzelsträngig vor, weshalb die Polymerase 13 nicht an das Signaloligo 2 andocken und von da aus den Strang verlängern kann, was zu unerwünschten Nebenprodukten führen würde. Alternativ oder additiv zu einer nichtkomplementären Ausführung des 15 zweiten Signal-Pin-Abschnittes 5" könnte das Signaloligo 2 auch am Ende des zweiten Signal-Pin-Abschnittes 5" ein invertiertes Nucleosid oder ein di-desoxy-Nucleosid aufweisen. Auch andere dem Fachmann bekannte Maßnahmen können getroffen werden, um eine Kettenverlängerung des Signal-Oligonucleotids 2 zu vermeiden. 20

Die für den in Fig. 2c skizzierten Zustand geeignete Temperatur ist im Wesentlichen von der Primerhybridisierungstemperatur  $T_P$ , der Signaloligohybridisierungstemperatur des Signaloligos 2 mit dem Target 10 im Bereich  $8/8'$   $T_{SO}$  und der Hairpinschmelztemperatur  $T_{Pin}$  unter den 25 Pufferbedingungen der PCR abhängig und wird beim Primer-/ Sondendesign in silico durch entsprechende Software oder empirische Werte ermittelt. Als grobe Faustregel sollte die für den in Fig. 2c skizzierten Vorgang geeignete Temperatur T gelten:  $T \sim T_P \sim T_{SO} \sim (>) T_{PN}$ , wobei die Temperatur T zusätzlich in einem Bereich 30 liegen sollte, bei der die Polymerase hohe Raten der Targetreplikation aufweist (in der Regel um 70 °C); T kann in Vorversuchen entsprechend optimiert werden.

Bei geeigneter Konstruktion des Hairpin-Signaloligonucleotids kann T auch kleiner als  $T_{Pin}$  sein, wenn gewährleistet ist, dass zumindest ein Bruchteil der Signaloligos 2

und/oder auch bei (teilweise) geschlossener Hairpinstruktur an das zumindest im Target-Erkennungs-Abschnitt 8' einzelsträngige Target 10 anbinden kann. Sind die in Fig. 2c skizzierten Voraussetzungen gegeben und weist die Polymerase 13 eine entsprechend geeignete Exonukleaseaktivität aus, wird diese bei der Replikation das an das zu replizierende Target 10 gebundene Signaloligonukleotid 2 in einem Bereich in der Nähe des Übergangs vom Signal-Dock-Abschnitt 6' zum Signal-Erkennungsabschnitt 8 des Signaloligonukleotids 2 schneiden. Dadurch entsteht ein kurzes Signaloligonukleotid-Teilstück 14, welches vom Signal-Oligonukleotid-Rumpf 15 abgetrennt ist (Fig. 2c).

10

Das kovalent gebundene redoxaktive Label, insbesondere Ferrocen 9 der Signaloligonukleotide 2 kann zum elektrochemischen Nachweis von an der modifizierten Oberfläche 3, nämlich den Teststellen (Elektroden) gebundenen/hybridisierten Signaloligonukleotiden 2 benutzt werden. Ferrocen ist reversibel oxidier- und reduzierbar. Bei Anlegen einer entsprechenden Spannung an die Teststelle wird ein dem Hybridisierungsgrad aus Sonden 1 und gebundenen Signaloligos 2 entsprechender Strom gemessen. Entsprechend können die Signaloligo-Teilstücke 14 bei geeigneter Temperatur ( $T_{DE}T \leq T_{P,N}$ ) an der Teststelle mit Sondenoligo 1 gebunden werden und erzeugen ein elektrisch detektierbares Signal, das bei  $T_{DE}T \leq T_{P,N}$  deutlich höher ist als das entsprechende Signal des ursprünglichen Signaloligos 2, da letzteres in der Hairpin-Form nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil an die Sonde 1 gebunden wird. Zur Unterstützung der Diskriminierung zwischen Hairpin-Signaloligonukleotid 2 und Signaloligonukleotid-Teilstück 14 kann die Sonde 1 zwischen dem ersten Signal-Pin-Abschnitt 5 und dem Signal-Dock-Abschnitt 6 zusätzlich eine, zwei oder mehrere Basen besitzen, die nicht zum Signaloligonukleotid 2 komplementär sind und bei Anbindung von Hairpin-Signaloligonukleotid 2 und Signaloligonukleotid-Teilstücken 14 Mismatches und / oder ein sogenanntes „Gap“ ausbilden, das sich stark negativ auf die Anhybridisierung von Hairpin-Signaloligonukleotiden 2 auswirkt, aber nur wenig negativ auf die Anhybridisierung von Signaloligonukleotid-Teilstück 14. Ein entsprechendes Diskriminierungs-erhöhendes Verhalten an der Sonde 1 lässt sich auch erzielen, wenn die Sonde 1 im Bereich des ersten Signal-Pin- und/oder des Signal-Dock-Abschnitts 5', 6' um eine, zwei oder mehrere Basen kürzer ist als der

30

entsprechende Bereich des Hairpin-Signaloligonukleotids 2 oder Signaloligonukleotid-Teilstücks 14.

In Tabelle 1 sind die für die folgenden eRT-PCR Experimente verwendeten Primer, Sonden-, Signal- und Target-Oligonukleotide zusammengestellt.

Tabelle 1: 5'-3' Sequenzen der in Fig. 1 und 2 skizzierten Oligonukleotide.

Bezeichnung	
Target (liegt als cDNA doppelsträngig vor, Basen der Primerbindungsstellen sind kursiv gedruckt)	GGG CGC ATG CCA GCC TTG CCC CAT CAA CTG CAC CCA CTC CTG TGT GGA CCT GGA TGA CAA GGG CTG CCC CGC CGA GCA GAG AGC CAG CCC TCT GAC GTC CAT CAT CTC TGC GGT <i>GTT GGC</i> <i>ATT CTG CTG GTC</i> GTG GTC TTG
Fw-Primer	CAG CCT TGC CCC ATC AAC
Rev-Primer	ACC AGC AGA ATG CCA ACC A
Signaloligo (das Subscript "inv" der Base am 3'-Ende bedeutet, dass diese Base invertiert ist; Pin kursiv)	CGC GCG CGA CCA GAA CCG AGC AGA GAG CCA GCC CAC TGA CCG CGC GCG T <sub>inv</sub>
Signaloligo-Schnipsel	CGC GCG CGA CCA GAA
Sonde_A_1 *	ttc tgg tgc cgc gc ATTTTTTTTT
Sonde_A_2 *	ttc tgg taa cgc gcg c ATTTTTTTTT
Sonde_A_3 *	ttc tgg acg cgc gc ATTTTTTTTT
Sonde_B_1 *	tgg tgc cgc gc ATTTTTTTTT
Sonde_B_2 *	tgg taa cgc gcg c ATTTTTTTTT
Sonde_B_3 *	tgg acg cgc gc ATTTTTTTTT

\* (hybridisierbare Sondensequenz in Kleinbuchstaben, Spacer in Großbuchstaben, Gap klein und kursiv sowie Mismatches klein und fett gedruckt )

10

Mit zunehmendem Fortgang der PCR-Reaktion laufen die mit Fig. 2 dargestellten Grundzüge der Amplifikation wiederholt ab und die Konzentration der freien Signaloligonukleotid-Teilstücke 14 nimmt mit zunehmender Zyklenzahl der PCR deutlich zu, was an der Teststelle nachvollzogen werden kann. Die

15

Konzentrationszunahme führt an einer mit Sonden 1 belegten Teststelle (siehe



Figur 1a) zu einer - im Vergleich zur Messung bei Zyklus 0 (Figur 3a) - deutlich beschleunigten Anhybridisierung der Signaloligonukleotid-Teilstücke 14 (Figur 3b).

Die Figuren 3a und 3b zeigen Messergebnisse einer elektrisch detektierten  
5 Signaländerung zur „real time“ Verfolgung des Fortgangs einer PCR-Reaktion. In  
Fig. 3a ist der Peakstrom cyclovoltammetrischer Messungen des Ferrocen-Labels 9  
in Abhängigkeit von der Zeit zu Beginn der PCR (Zyklus 0) für zwei Sonden  
(Sonde\_A\_1 und Sonde\_A\_3, vgl. Tabelle 1) gezeigt. Diese Darstellung entspricht  
dem Anhybridisierungsverhalten des Signaloligos 2 bzw. Signaloligo-Teilstücks 14,  
10 das u.a. von der Konzentration an Signaloligos 2 bzw. Signaloligo-Teilstücken 14  
abhängig ist. In Fig. 3a ist somit das Anhybridisierungsverhalten des  
Signaloligonukleotids 2 bei 40<sup>°</sup> dargestellt, einer Temperatur bei der das  
Signaloligonukleotid 2 als Hairpin vorliegt, womit Fig. 3a letztendlich auch das  
Background-Signal der Messung darstellt. In Fig. 3b ist eine entsprechende  
15 Messung nach dem 30. PCR-Zyklus (der Her-2 PCR, siehe Text) im Vergleich zum  
Background-Signal (Sonde\_A\_3 bei 0 Zyklen) dargestellt. Während der PCR  
wurden über die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase eine dem Fortgang der  
Amplifikation entsprechende Menge an Signaloligo-Teilstücken 14 hergestellt. Das  
Anhybridisierungsverhalten bei Zyklus 30 entspricht im Wesentlichen dem  
20 Background-Signal (aus Fig. 3a) und dem Signal der gebildeten Signaloligo-  
Teilstücke 14.

### **Durchführung einer Real-Time PCR am Beispiel Her-2 PCR (Her-2 = cDNA des 25 human epidermal growth factor receptor 2)**

Die Sequenzen der wesentlichen PCR-Komponenten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Der Mastermix für die PCR Reaktion zur Amplifikation einer Zielsequenz von Her-2  
30 (Template-Menge ca. 10<sup>3</sup> Kopien) enthält entsprechende Primer (10 μM), den  
dNTP-Mix (je dNTP 25 μM) und MgAc (3 mM) in einem Standard PCR-Puffer (5 x  
Bicin Puffer, 250 mM Bicin/KOH, pH 8.2; 575 mM K-Acetat, 40% Glycerol (v/v),  
Bicine = N,N-Bis(2-hydroxyethyl) Glycin). Zu diesem Mastermix werden das  
Template und Signaloligonukleotide (50nM), sowie Kontroll-Signaloligonukleotide

(50 nM), die vollständig nicht-komplementär zu DNA-Sequenzen der Template-Lösung sind, gegeben. Unmittelbar vor Start der PCR-Reaktion wird PCR-Polymerase mit Exonuklease-Aktivität zugefügt und die Lösung in eine PCR-Kartusche gefüllt.

5

Funktion und Aufbau der PCR-Kartusche und eines PCR-Cyclers sind in der DE 10 2009 044 431 A 1 beschrieben. Bei der PCR-Kartusche handelt es sich um eine Zelle mit einem ungefähren Durchmesser von 20 mm und einer Dicke von 1 mm, in die ein ungefähr 0.5 mm tiefer Hohlzylinder zur Aufnahme der Lösung für die PCR-  
10 Reaktion eingebracht ist. Im Inneren der Kartusche befindet sich ein DNA-Chip, dessen Sensorfeld über einen Brückenkanal mit der Reaktionslösung in Flüssigkeitskontakt steht. Der Chip verfügt über eine Durchkontaktierung, so dass die für die Messwerterfassung notwendige elektrische Kontaktierung des DNA-Chips von außen über Federkontakte bewerkstelligt werden kann.

15

Zur Durchführung der PCR wird die PCR-Kartusche in einem PCR-Cycler angeordnet. Der PCR-Cycler besteht aus 3 Heizblöcken aus einem gut wärmeleitfähigen Material (z.B. Aluminium). Mittels Peltierelementen bzw. Heizmatten, Platinwiderstand zur Temperaturmessung und einer geeigneten  
20 Regelelektronik (PID-Regler) werden die Heizblöcke auf die für die PCR-Reaktion nötige Temperatur gebracht. Jeder Block enthält einen Spalt, in den die PCR-Kartusche eingeführt wird. Ober- und unterhalb der Kartusche befindet sich im Bereich des DNA-Chips ein weiterer Heizblock, um die Chiptemperatur unabhängig von der Temperatur für die PCR-Reaktion im Reaktionskanal einzustellen. Dieser  
25 zentrische Heizblock dient gleichzeitig zur Vermittlung der Rotationsbewegung der PCR-Kartusche und der Kontaktierung des DNA-Chips in der Kartusche. Durch eine geeignete Wahl der Blockgeometrie kann der Bereich, in der die Zelle eine bestimmte Temperatur aufweist, festgelegt werden. Im vorliegenden Beispiel wurde ein Verhältnis von 2:1 :1 des Bereiches mit 95<sup>°</sup> zu den Bereichen mit 72°C  
30 (Annealing) und 72°C (Elongation) gewählt. Zwischen den Blöcken ist jeweils ein Luftspalt, um die Wärmeübertragung zwischen den Blöcken zu verhindern. Durch Variation der Rotationsfrequenz kann die Zeit, in der die kritischen Temperaturen für die PCR-Reaktion an der Kartusche anliegen, variiert werden.

Vor Start der PCR wird die Reaktionsmischung in dem PCR-Cycler 3 min auf 95°C erhitzt und anschließend abgekühlt und nach leichtem Durchmischen der PCR-Lösung durch geeignete Maßnahmen, die gewährleisten, dass frische Lösung aus dem PCR-Kanal den Chip benetzt, eine erste Messung am integrierten DNA-Chip durchgeführt. Der DNA-Chip trägt an einer der bereitgestellten Teststellen Sonden des Typs Sonde\_A\_3, die zumindest teilweise komplementär zum Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstück 14 sind und an einer weiteren Teststelle Sonden, die komplementär zum Kontroll-Signaloligonukleotid sind. Die Messung findet bei 40°C statt, also deutlich unter der  $T_{\text{Pin}}$  des Signaloligonukleotids und entspricht den in Fig. 3a dargestellten Messwerten.

Nach dieser ersten Normierungsmessung wird die PCR-Reaktion gestartet, die Heizblöcke des PCR-Cyclers werden dazu auf 96°C (Aufschmelzen), 72°C (Annealing) und 72°C (Elongation) eingestellt und die PCR-Kartusche mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 2 Umdrehungen pro Minute (i.e. 2 Zyklen pro Minute) in den Heizblöcken gedreht. Das nahezu zentrisch ausgerichtete Sensorfeld des DNA-Chips wird über einen weiteren Heizblock bei ca. 40°C gehalten, Während einer Messung des Hybridisierungsvorgangs am Chip wird die PCR-Kartusche in der Regel weiter gedreht.

In Fig. 4 sind zur Darstellung des Amplifikationsverlaufs während der PCR die Peakströme des Anhybridisierungsverhaltens (vgl. Fig. 3a, 3b) jeweils 20 Sekunden nach dem entsprechenden PCR-Zyklus in Abhängigkeit von der Zyklenzahl dargestellt. Ab ca. 20 Zyklen steigt dieser Peakstrom deutlich an. Dieser Anstieg ist auf die vermehrte Bildung von Signaloligo-Teilstücken und damit auf vermehrte Amplifikation der Ziel-DNA Her-2 zurückzuführen. Durch geeignete Normierung und Vergleich mit der Kontroll-Teststelle ist es zudem möglich, nicht nur das Vorhandensein der entsprechenden Ziel-Sequenz nachzuweisen, sondern auch auf die ursprünglich vorhanden Menge rückzurechnen (quantitative bzw. semiquantitative real-time PCR).

**Bezugszeichenliste**

	1	Sonden-Nukleinsäureoligomer
	2	Signal-Nukleinsäureoligomer
5	3	Oberfläche der Teststelle
	4	Spacer
	5	Sonden-Pin-Abschnitt
	5'	erster Signal-Pin-Abschnitt
	5"	zweiter Signal-Pin-Abschnitt
10	6	Sonden-Dock-Abschnitt
	6'	Signal-Dock-Abschnitt
	8	Signal-Erkennungs-Abschnitt
	8'	Target-Erkennungs-Abschnitt
	9	redoxaktives Detektionslabel
15	10	Target-Nukleinsäureoligomer
	11, 12	Primerbindungsstellen
	11', 12'	Primer
	13	Nukleinsäure-Polymerase
	14	Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstück
20	15	Signal-Nukleinsäureoligomer-Rumpf

### Patentansprüche

1. Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen umfassend die Schritte
- 5 a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren (1) besteht, wobei die Sonden-Nukleinsäureoligomere (1) einen zu einem ersten Signal-Pin-Abschnitt (5') von Signal-Nukleinsäureoligomeren (2) komplementären Sonden-Pin-Abschnitt (5) besitzen,
- 10 b) Bereitstellen wenigstens einer Art von Signal-Nukleinsäureoligomeren (2), wobei
- die Signal-Nukleinsäureoligomere (2) einen zu dem Sonden-Pin-Abschnitt (5) der Sonden-Nukleinsäureoligomere (1) komplementären ersten Signal-Pin-Abschnitt (5') besitzen,
  - 15 - die Signal-Nukleinsäureoligomere (2) einen zu einem Target-Erkennungs-Abschnitt (8') von Target-Nukleinsäureoligomeren (10) komplementären Signal-Erkennungs-Abschnitt (8) besitzen,
  - die Signal-Nukleinsäureoligomere (2) einen ersten und einen zweiten unter Ausbildung einer Hairpin-Struktur zueinander komplementären Signal-Pin-Abschnitt (5', 5'') besitzen, wobei die Hairpin-Struktur eine Schmelztemperatur  $T_{PN}$  aufweist,
  - 20 - der zur Ausbildung einer Hairpin-Struktur ausgelegte erste Signal-Pin-Abschnitt (5') nicht zu den Target-Nukleinsäureoligomeren (10) komplementär ist, und
  - 25 - die Signal-Nukleinsäureoligomere (2) im Bereich des zur Ausbildung einer Hairpin-Struktur ausgelegten erste Signal-Pin-Abschnitts (5') mit zumindest einem redoxaktiven Detektionslabel (9) modifiziert sind,
- 30 c) Bereitstellen einer Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren (10),
- d) Bereitstellen einer Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation, wobei die Reaktionslösung zumindest Nukleotide, wenigstens eine Art von Primer (11', 12') und wenigstens

- eine Art von Nukleinsäure-Polymerase (13) mit Exonuklease-Aktivität enthält,
- 5 e) Mischen der in Schritt d) bereitgestellten Reaktionslösung mit den in Schritt b) bereitgestellten Signal-Nukleinsäureoligomeren (2) und der in Schritt c) bereitgestellten Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren (10),
- f) Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere (10) mittels Nukleinsäureamplifikation unter Bildung von Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücken (14),
- 10 g) Inkontaktbringen des in Schritt f) erhaltenen Reaktionsgemisches mit der in Schritt a) bereitgestellten modifizierten Oberfläche,
- h) Detektion der gebildeten Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke (14) durch eine elektrochemische Detektionsmethode bei einer Temperatur  $T_{\text{DET}} \leq T_{\text{PIN}}$ ,
- 15 i) mehrfache Wiederholung der Schritte f) bis h),
- k) Vergleich der verschiedenen in Schritt h) erhaltenen Werte.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere (2) zusätzlich zumindest einen Signal-Dock-Abschnitt (6'), und die Sonden-Nukleinsäureoligomere (1) zusätzlich einen zu dem Signal-Dock-Abschnitt (6') der Signal-Nukleinsäureoligomere (2) komplementären Sonden-Dock-Abschnitt (6) besitzen, wobei der Signal-Dock-Abschnitt (6') der Signal-Nukleinsäureoligomere (2) benachbart zu dem ersten Signal-Pin-Abschnitt (5') angeordnet ist.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Signal-Dock-Abschnitt (6') der Signal-Nukleinsäureoligomere (2) nicht zu den Target-Nukleinsäureoligomeren (10) komplementär ist.
- 30 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere (2) im Bereich des ersten Signal-Pin-Abschnitts (5') und/oder im Bereich des benachbart zu dem Signal-Pin-Abschnitt (5') angeordneten Signal-Dock-Abschnitts (6') mit zumindest einem redoxaktiven Detektionslabel (9) modifiziert sind.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die zwei Signal-Pin-Abschnitte (5', 5'') der Signal-Nukleinsäureoligomere jeweils 4 bis 10 Basen, bevorzugt 5 bis 8 Basen aufweisen.
- 5
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Signal-Erkennungs-Abschnitt (8) der Signal-Nukleinsäureoligomere (2) innerhalb des Loop-Bereichs der Hairpin-Struktur zwischen den Signal-Pin-Abschnitten (5', 5'') angeordnet ist.
- 10
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der zweite Signal-Pin-Abschnitt (5'') der Signal-Nukleinsäureoligomere (2) nicht zu den Target-Nukleinsäureoligomeren (10) komplementär ist.
- 15
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das freie Ende des zweiten Signal-Pin-Abschnitts (5'') der Signal-Nukleinsäureoligomere (2) durch ein Nukleotid gebildet wird, das ein invertiertes Nukleosid oder ein di-desoxy-Nukleosid aufweist.
- 20
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Sonden-Nukleinsäureoligomere (1) in ihren Sonden-Pin-Abschnitten (5) und/oder in ihren Sonden-Dock-Abschnitten (6) zumindest ein Nukleotid aufweisen, das nicht komplementär zu den entsprechenden Signal-Pin-Abschnitten (5') und Signal-Dock-Abschnitten (6') der Signal-Nukleinsäureoligomere (2) oder der
- 25
- Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke (14) ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Detektion der gebildeten Signal-Nukleinsäureoligomer-Teilstücke (14) in Schritt h) durch eine elektrochemische Detektionsmethode bei einer Temperatur  $T_{DET}$  zwischen 20
- 30
- °C und 60 °C, bevorzugt zwischen 30 °C und 50 °C erfolgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die elektrochemische Detektion durch Amperometrie, Chronocoulometrie, Impedanzmessung oder Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) erfolgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere (10) in Schritt f) durch eine PCR oder durch eine isothermale Amplifikation erfolgt.
- 5
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Modifikation der in Schritt a) bereitgestellten modifizierten Oberfläche in der Anbindung von mehreren Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren (1) besteht und die verschiedenen Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren (1) in räumlich
- 10 abgetrennten Bereichen an die modifizierte Oberfläche gebunden sind.
14. Signal-Nukleinsäureoligomer (1) zur Verwendung in einem Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 13, wobei das Signal-Nukleinsäureoligomer (1) einen ersten und einen zweiten unter Ausbildung einer Hairpin-Struktur zueinander
- 15 komplementären Signal-Pin-Abschnitt (5', 5") aufweist und das Signal-Nukleinsäureoligomer (1) in zumindest einem der Bereiche der zwei Signal-Pin-Abschnitte (5', 5") mit zumindest einem redoxaktiven Detektionslabel (9) modifiziert ist.
- 20 15. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 umfassend eine modifizierte Oberfläche wie in den Ansprüchen 1 bis 13 definiert, eine effektive Menge an Signal-Nukleinsäureoligomeren wie in Anspruch 14 definiert und eine Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation wie in Anspruch 1 definiert.



Fig. 1a

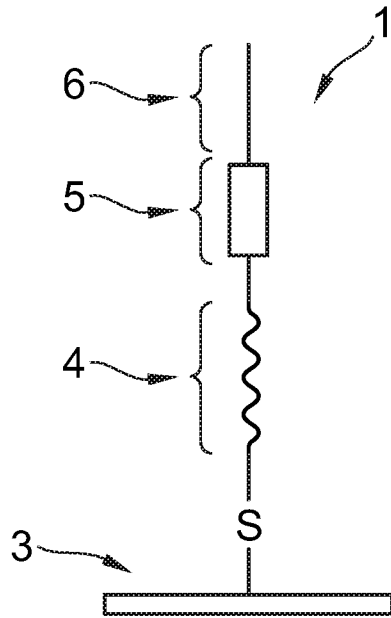


Fig. 1b

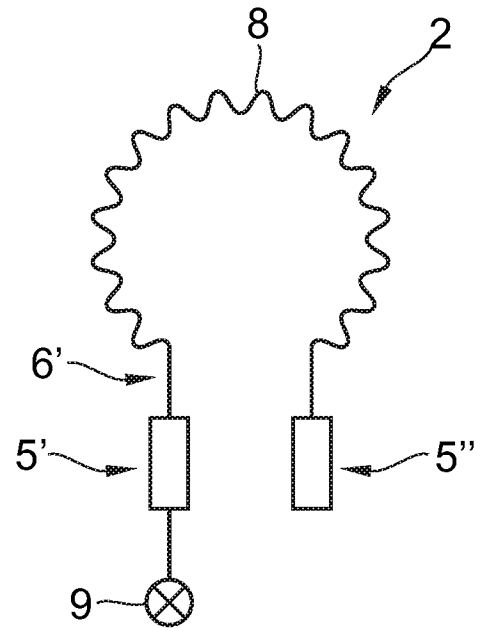


Fig. 1c

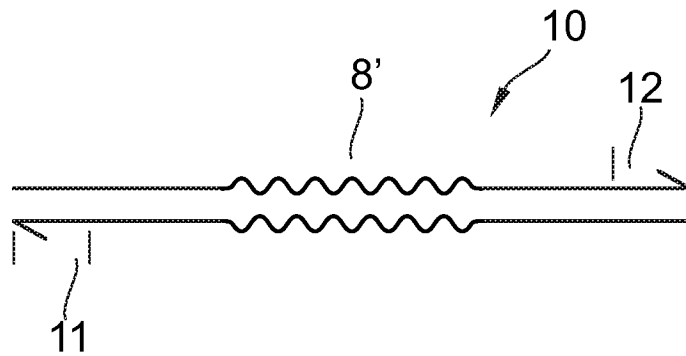


Fig. 1d

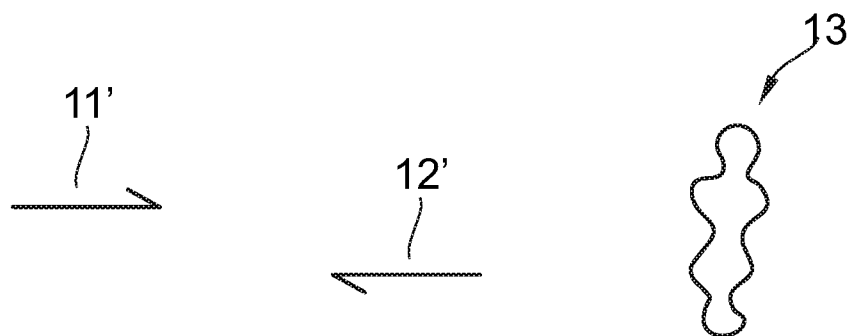


Fig. 2c

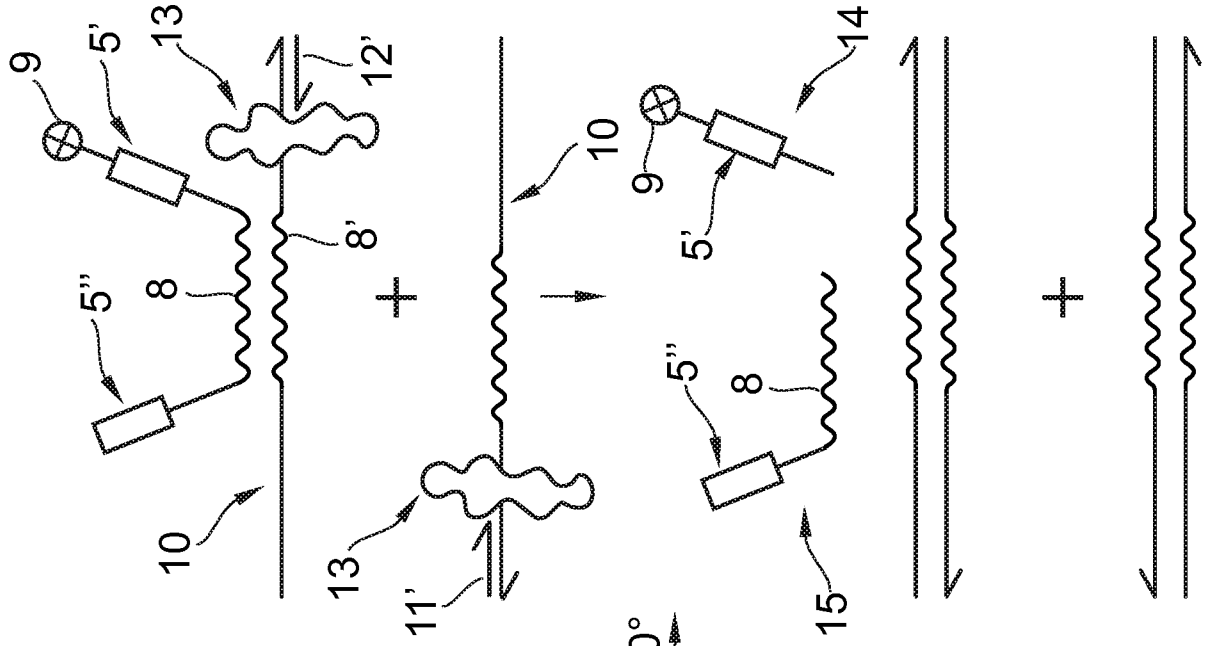


Fig. 2b

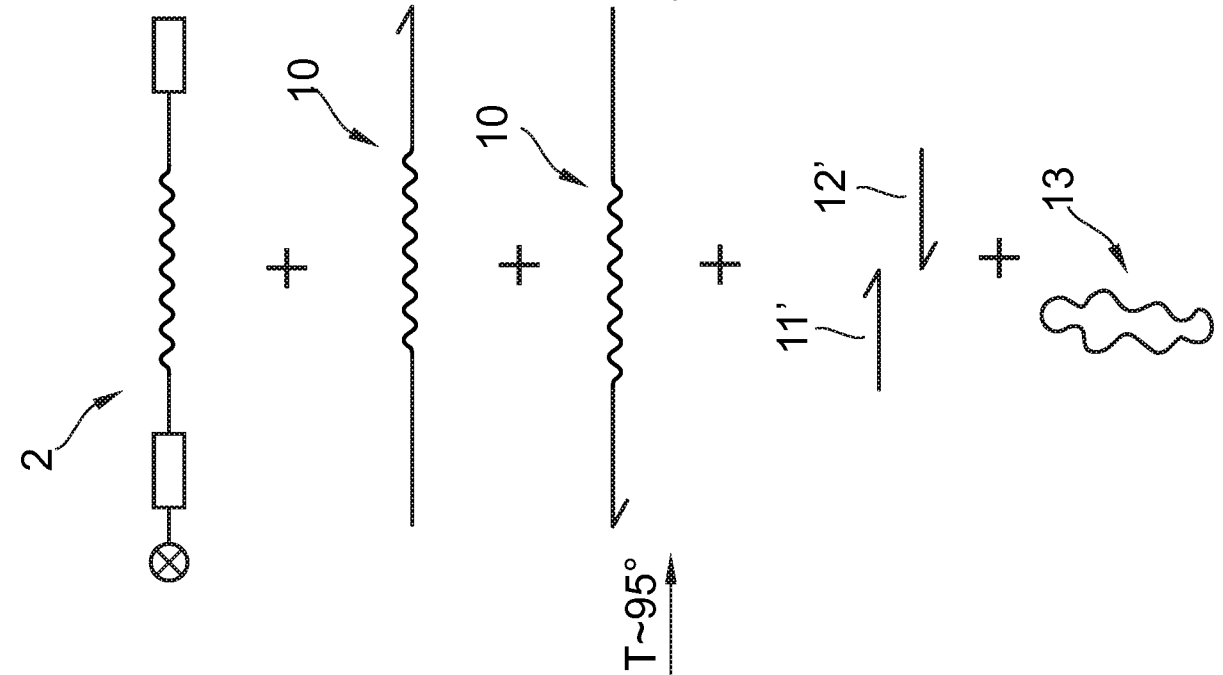
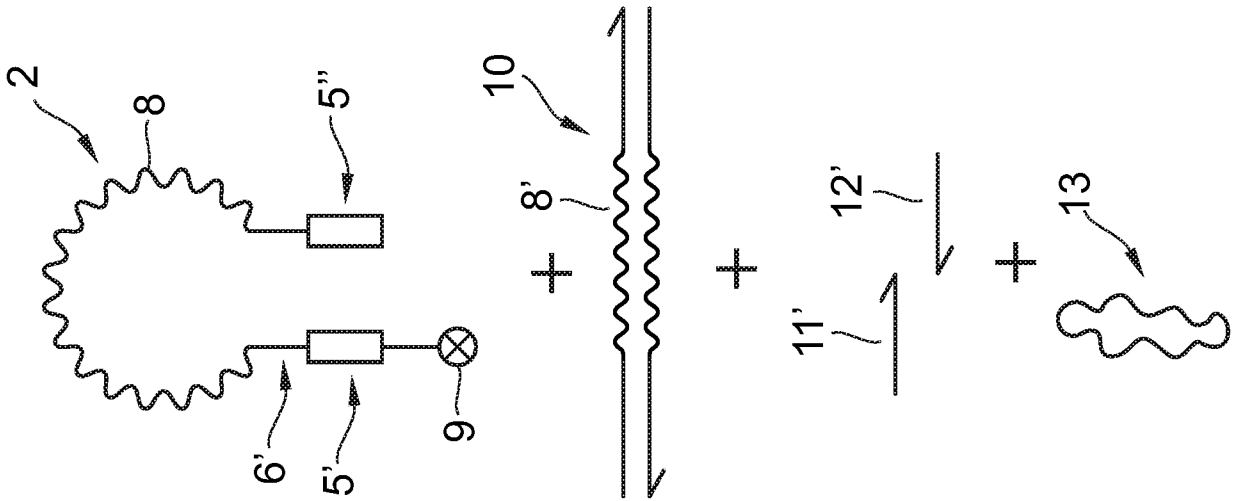


Fig. 2a



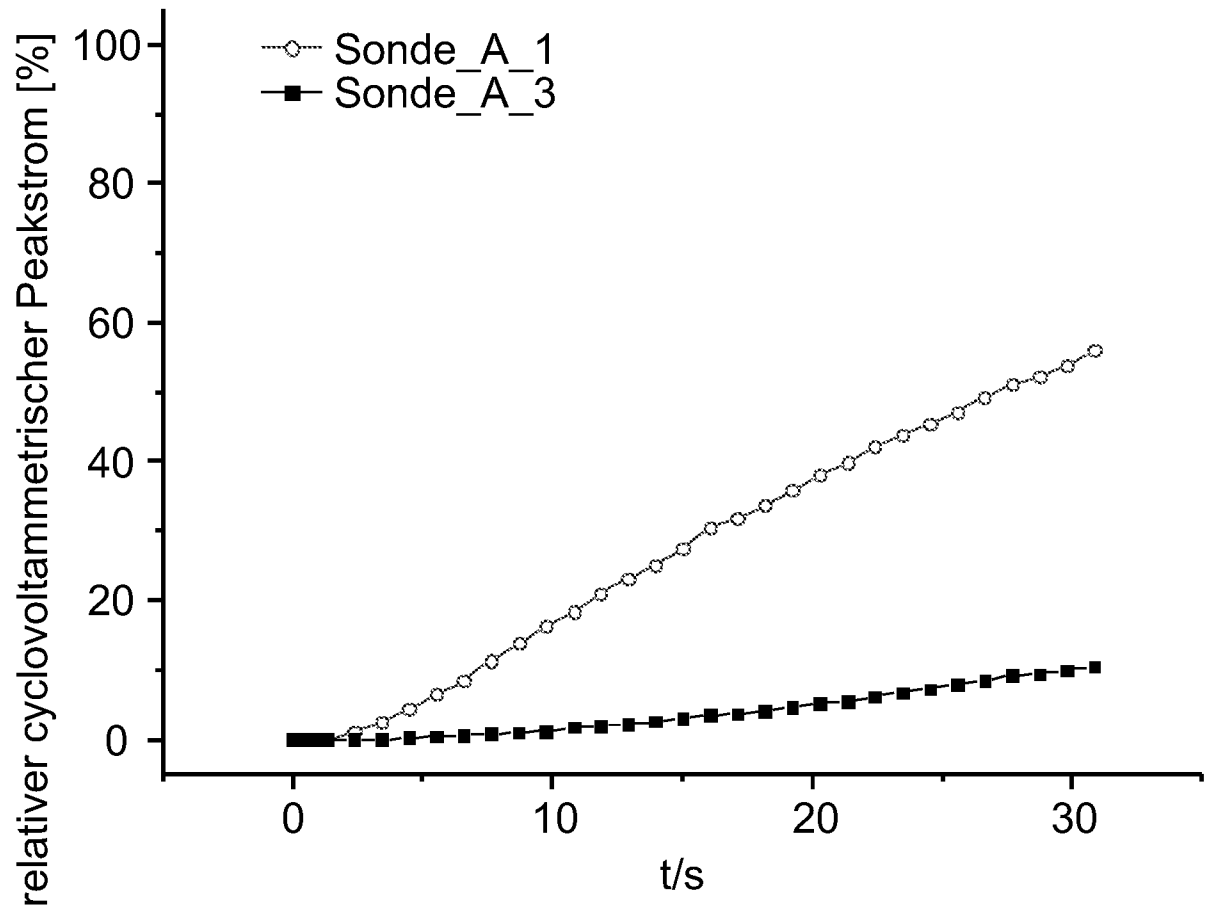


Fig. 3a

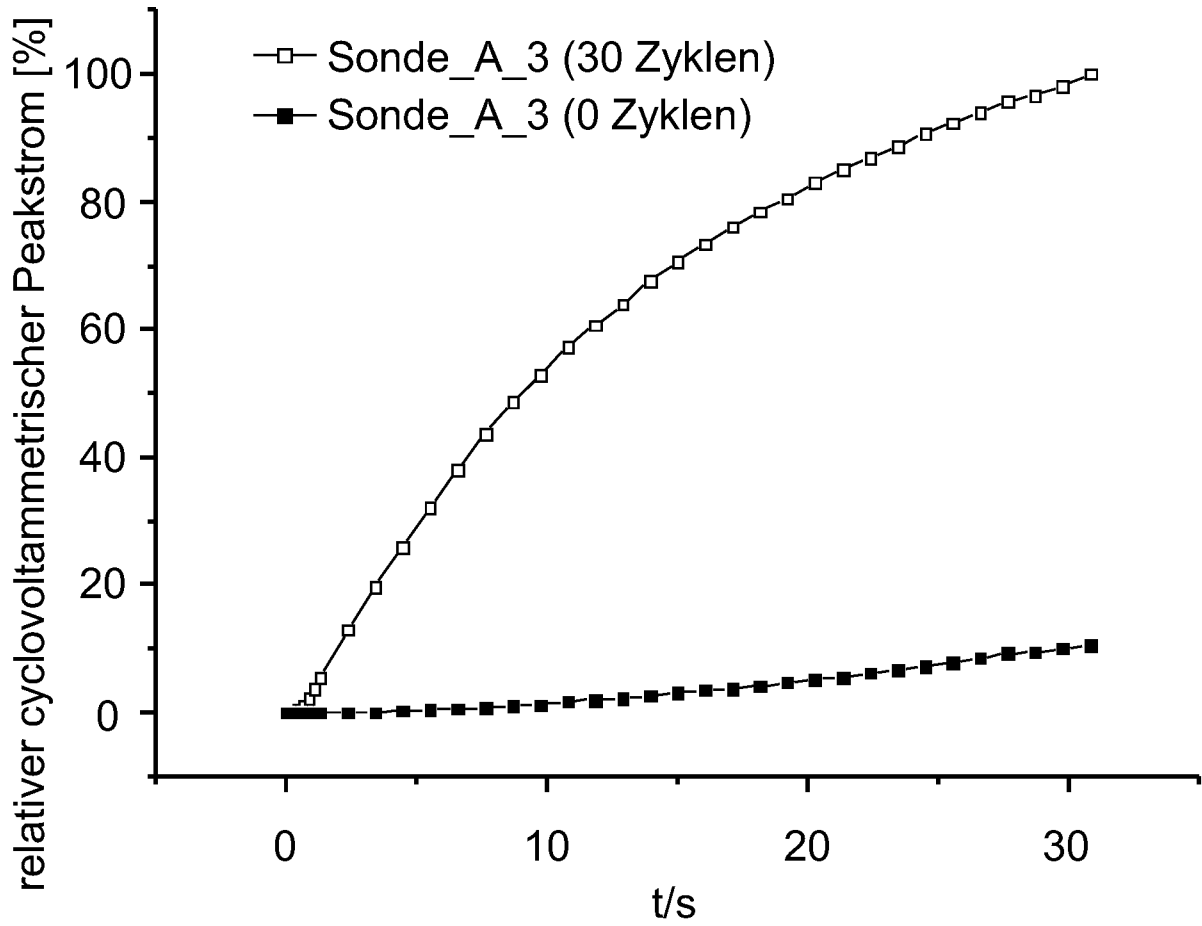


Fig. 3b

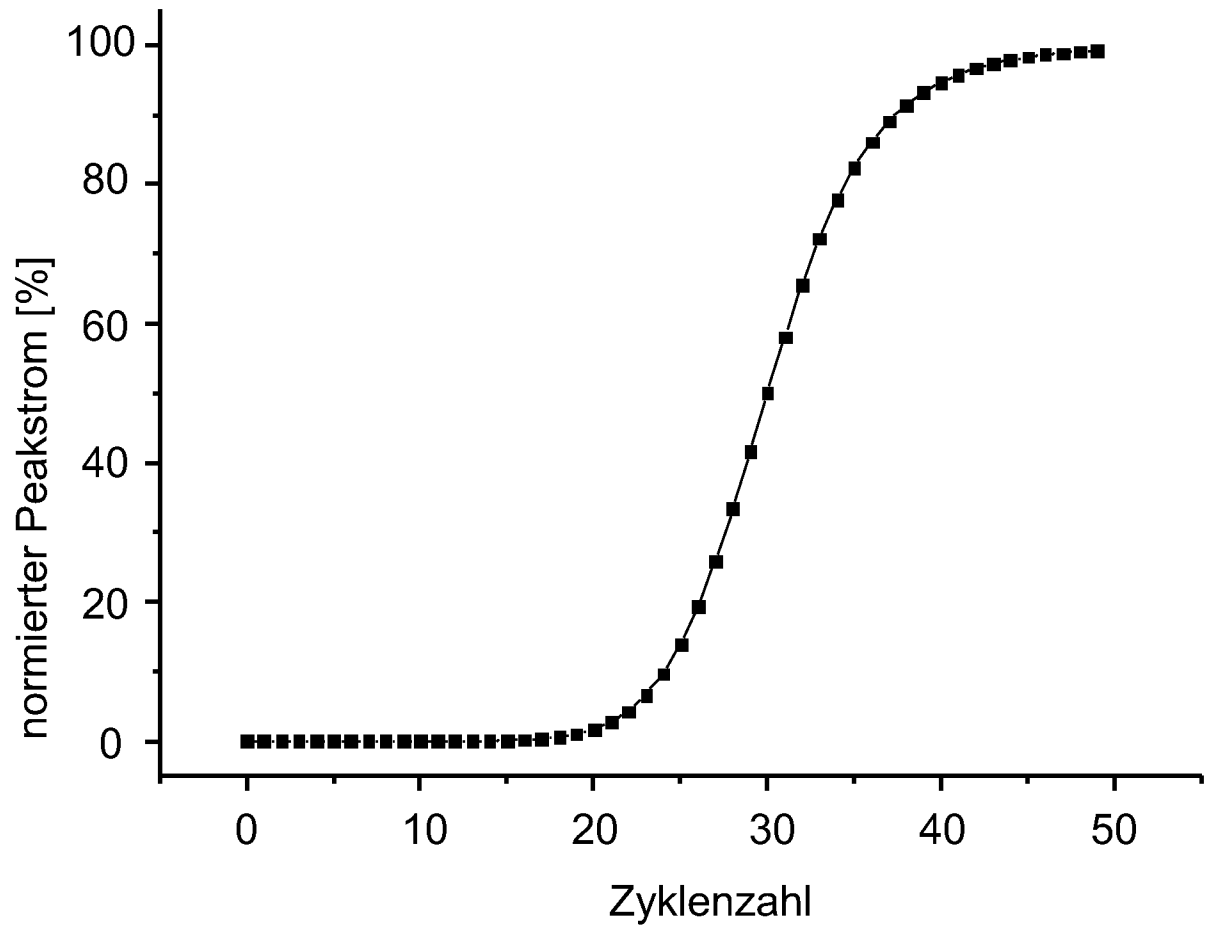


Fig. 4

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)



on paper



in electronic form

b. (time)



in the international application as filed



together with the international application in electronic form



subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required. Statements that the Information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DE2012/100295
---

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. C12Q1/68  
 ADD.

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (Classification System followed by Classification Symbols)  
 C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal , MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	wo 2008/083259 AI (APPLERA CORP [US] ; AIVAZACHVILI VISSARION [US] ; SCAB00 KRISTIAN [US] ; ) 10 July 2008 (2008-07-10) page 1 - page 23; Claims 1-30; figure 1A -----	1-10
Y	LAI REBECCA Y ET AL: "Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 103, no. 11, March 2006 (2006-03), pages 4017-4021, XP002471588, ISSN: 0027-8424 figure 1 ----- -/- .	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general State of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2013

Date of mailing of the international search report

27/05/2013

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

Authorized officer  
  
 Botz , Jürgen

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2012/100295

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
Y	wo 2011/069501 AI (FRIZ BIOCHEM GES FUER BIOANALYTI K MBH [DE] ; HARTWICH GERHARD [DE]) 16 June 2011 (2011-06-16) figures 1A, 1B; example 2 -----	1-15
Y	LUO XIAOTENG ET AL: "Electrochemical techniques on sequence-specific PCR amplicon detection for point-of-care applications.", THE ANALYST OCT 2009, vol. 134, no. 10, October 2009 (2009-10), pages 1957-1964, XP002696746, ISSN: 1364-5528 page 1959, paragraph 2.2 - page 1960, Paragraph 2.3; figures 1,3; table 2 -----	1-15
Y	PAVLOVIC ELIZABETH ET AL: "Microfluidic device architecture for electrochemical patterning and detection of multiple DNA sequences.", LANGMUIR : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS 5 FEB 2008, vol. 24, no. 3, 5 February 2008 (2008-02-05), pages 1102-1107, XP002696747, ISSN: 0743-7463 page 1103; figure 1 -----	1-15
Y	wo 2009/061783 A2 (UNIV ROCHESTER [US]) 14 May 2009 (2009-05-14) Paragraph [0029] - paragraph [0086]; figures 1-16 -----	1-15
Y	wo 00/42222 A2 (GENE LOGIC INC [US]; CASS ANTHONY [GB]; VALAT CHRISTOPHE [GB]; STEEL A) 20 July 2000 (2000-07-20) the whole document -----	1-15
Y	wo 2008/022538 AI (UNIV HONG KONG SCIENCE & TECHN [CN]; HSING I-MING [CN]; YEUNG SIU WAI) 28 February 2008 (2008-02-28) paragraph [0019] - paragraph [0089]; examples 7-11 -----	1-15
Y	YEUNG STEPHEN S W ET AL: "Electrochemistry-based real-time PCR on a microchip.", ANALYTICAL CHEMISTRY 15 JAN 2008, vol. 80, no. 2, 15 January 2008 (2008-01-15), pages 363-368, XP002696748, ISSN: 0003-2700 the whole document -----	1-15
	-/-	



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2012/100295

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
Y	<p>ELSHOLZ B ET AL: "Electrical microarrays for highly sensitive detection of multiplex PCR products from biological agents" , BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol . 24, no. 6, 15 February 2009 (2009-02-15) , pages 1737-1743 , XP025922751 , ISSN: 0956-5663 , DOI : 10.1016/J.BIOS.2008.09.003 [retrieved on 2008-09-12] the whole document -----</p>	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2012/100295

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008083259    AI	10-07-2008	AU 2007339793 AI	10-07-2008
		CA 2674012 AI	10-07-2008
		CN 101978070 A	16-02-2011
		EP 2069525 AI	17-06-2009
		JP 2010514450 A	06-05-2010
		US 2008193940 AI	14-08-2008
		WO 2008083259 AI	10-07-2008
-----			
WO 2011069501    AI	16-06-2011	DE 102009044795 B3	07-04-2011
		EP 2510120 AI	17-10-2012
		WO 2011069501 AI	16-06-2011
-----			
WO 2009061783    A2	14-05-2009	US 2009137418 AI	28-05-2009
		WO 2009061783 A2	14-05-2009
-----			
WO 0042222        A2	20-07-2000	AU 2965500 A	01-08-2000
		US 6312906 B1	06-11-2001
		WO 0042222 A2	20-07-2000
-----			
WO 2008022538    AI	28-02-2008	CN 101506380 A	12-08-2009
		US 2010184028 AI	22-07-2010
		WO 2008022538 AI	28-02-2008
-----			

## Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- a. (Form)
- in Papierform
- in elektronischer Form
- b. (Zeitpunkt)
- in der eingereichten internationalen Anmeldung
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
- bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2.  Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 INV. C12Q1/68  
 ADD.  
 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**  
 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
 C12Q  
 Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

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

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	wo 2008/083259 AI (APPLERA CORP [US] ; AIVAZACHVILI VISSARION [US] ; SCAB00 KRISTIAN [US] ; ) 10. Jul i 2008 (2008-07-10) Seite 1 - Seite 23; Ansprüche 1-30; Abbi ldung 1A	1-10
Y	LAI REBECCA Y ET AL: "Rapi d, sequence-speci fic detecti on of unpuri fied PCR ampli cons vi a a reusabl e, electrochemi cal sensor" , PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCI ENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Bd. 103, Nr. 11, März 2006 (2006-03) , Seiten 4017-4021 , XP002471588, ISSN : 0027-8424 Abbi ldung 1	1-15

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

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen 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	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
16. Mai 2013	27/05/2013
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Botz , Jürgen

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	wo 2011/069501 AI (FRIZ BIOCHEM GES FUER BIOANALYTI K MBH [DE] ; HARTWICH GERHARD [DE] ) 16. Juni 2011 (2011-06-16) Abbi l dungen 1A, 1B; Bei spi el 2 -----	1-15
Y	LUO XIAOTENG ET AL: "El ectrochemi cal techni ques on sequence-speci fic PCR amplicon detecti on for poi nt-of-care appl i cati ons .", THE ANALYST OCT 2009 , Bd. 134, Nr. 10, Oktober 2009 (2009-10) , Sei ten 1957-1964, XP002696746, ISSN: 1364-5528 Sei te 1959 , Absatz 2.2 - Sei te 1960, Absatz 2.3; Abbi l dungen 1,3; Tabel le 2 -----	1-15
Y	PAVLOVIC ELIZABETH ET AL: "Mi crof luidi c devi ce archi tecture for el ectrochemi cal patterni ng and detecti on of mul ti ple DNA sequences .", LANGMUI R : THE ACS JOURNAL OF SURFACES AND COLLOIDS 5 FEB 2008, Bd. 24, Nr. 3, 5. Februar 2008 (2008-02-05) , Sei ten 1102-1107 , XP002696747 , ISSN: 0743-7463 Sei te 1103; Abbi l dung 1 -----	1-15
Y	wo 2009/061783 A2 (UNIV ROCHESTER [US] ) 14. Mai 2009 (2009-05-14) Absatz [0029] - Absatz [0086] ; Abbi l dungen 1-16 -----	1-15
Y	wo 00/42222 A2 (GENE LOGIC INC [US] ; CASS ANTHONY [GB] ; VALAT CHRISTOPHE [GB] ; STEEL A) 20. Jul i 2000 (2000-07-20) das ganze Dokument -----	1-15
Y	wo 2008/022538 AI (UNIV HONG KONG SCI ENCE & TECHN [CN] ; HSING I-MING [CN] ; YEUNG SIU WAI) 28. Februar 2008 (2008-02-28) Absatz [0019] - Absatz [0089] ; Bei spi ele 7-11 -----	1-15
Y	YEUNG STEPHEN S W ET AL: "El ectrochemi stry-based real -time PCR on a mi crochi p. ", ANALYTICAL CHEMISTRY 15 JAN 2008, Bd. 80, Nr. 2, 15. Januar 2008 (2008-01-15) , Sei ten 363-368, XP002696748, ISSN: 0003-2700 das ganze Dokument -----	1-15
	-/-	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>ELSHOLZ B ET AL: "Electri cal mi croarrays for highly sensi tive detecti on of multiplex PCR products from biologi cal agents" ,            BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVI ER            BV, NL,            Bd. 24, Nr. 6,            15. Februar 2009 (2009-02-15) , Sei ten            1737-1743 , XP025922751 ,            ISSN: 0956-5663 , DOI :            10.1016/J .BIOS.2008.09 .003            [gefunden am 2008-09-12]            das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-15

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2012/100295

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008083259 AI	10-07-2008	AU 2007339793 AI	10-07-2008
		CA 2674012 AI	10-07-2008
		CN 101978070 A	16-02-2011
		EP 2069525 AI	17-06-2009
		JP 2010514450 A	06-05-2010
		US 2008193940 AI	14-08-2008
		WO 2008083259 AI	10-07-2008
-----			
WO 2011069501 AI	16-06-2011	DE 102009044795 B3	07-04-2011
		EP 2510120 AI	17-10-2012
		WO 2011069501 AI	16-06-2011
-----			
WO 2009061783 A2	14-05-2009	US 2009137418 AI	28-05-2009
		WO 2009061783 A2	14-05-2009
-----			
WO 0042222 A2	20-07-2000	AU 2965500 A	01-08-2000
		US 6312906 B1	06-11-2001
		WO 0042222 A2	20-07-2000
-----			
WO 2008022538 AI	28-02-2008	CN 101506380 A	12-08-2009
		US 2010184028 AI	22-07-2010
		WO 2008022538 AI	28-02-2008
-----			