

(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  
16. Juni 2011 (16.06.2011)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2011/069501 A1

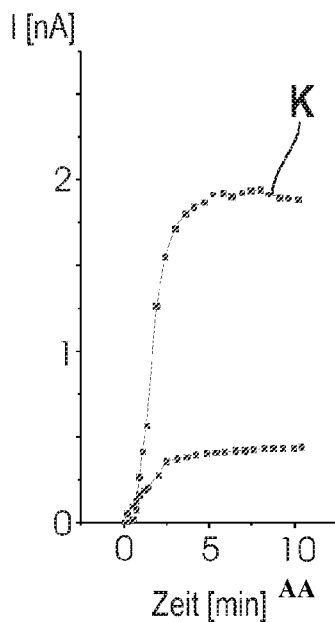
- (51) Internationale Patentklassifikation:  
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2010/075152
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
3. Dezember 2010 (03.12.2010)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2009 044 795.4  
7. Dezember 2009 (07.12.2009) 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
- (75) Erfinder/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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COMPETITION ASSAY FOR DETECTING NUCLEIC ACID OLIGOMER HYBRIDIZATION OCCURRENCES

(54) Bezeichnung : KOMPETITIONSSASSAY ZUR DETEKTION VON NUKLEINSÄUREOLIGOMER-HYBRIDISIERUNGSEREIGNISSEN

Fig. 4C



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting nucleic acid oligomer hybridization occurrences comprising the steps of providing a modified surface, wherein the modification consists of the bonding of at least one type of probe nucleic acid oligomer, providing a sample having target nucleic acid oligomers, providing a solution having at least one type of signal nucleic acid oligomers, wherein signal nucleic acid oligomers have a section that is complementary or substantially complementary to the probe nucleic acid oligomers, and the signal nucleic acid oligomers have a section that is complementary or substantially complementary to the target nucleic acid oligomers, providing a reaction solution for performing a nucleic acid amplification, wherein the reaction solution contains at least nucleotides and at least one type of nucleic acid polymerase, mixing and bringing into contact with the modified surface the solution having signal nucleic acid oligomers, the sample having target nucleic acid oligomers, and the reaction solution for performing a nucleic acid amplification, wherein the signal nucleic acid oligomers are present in the produced mixture in a concentration of  $10^{-17}$  mol/l to  $10^{-3}$  mol/l and the target nucleic acid oligomers are present in the produced mixture in a concentration of up to  $10^{-7}$  mol/l, performing a first detection of the signal nucleic acid oligomers by a surface-sensitive method, amplifying the target nucleic acid oligomers by means of nucleic acid amplification, performing a second detection of the signal nucleic acid oligomers by a surface-sensitive method, and comparing the values obtained in the first detection of the signal nucleic acid oligomers with the values obtained in the second detection of the signal nucleic acid oligomers.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

AA Time [min]

WO 2011/069501 A1



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

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

---

Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen umfassend die Schritte Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren besteht, Bereitstellen einer Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren, Bereitstellen einer Lösung mit wenigstens einer Art von Signal-Nukleinsäureoligomeren, wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere mit zumindest einem Detektionslabel modifiziert sind, die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Sonden-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen und die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen, Bereitstellen einer Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation, wobei die Reaktionslösung zumindest Nukleotide und wenigstens eine Art von Nukleinsäure-Polymerase enthält, Vermischen und Inkontaktbringen mit der modifizierten Oberfläche von der Lösung mit Signal-Nukleinsäureoligomeren, der Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren und der Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation, wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch in einer Konzentration von  $10^{-17}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l vorliegen und die Target-Nukleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch in einer Konzentration von bis zu  $10^{-7}$  mol/l vorliegen, erste Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Methode, Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere mittels Nukleinsäureamplifikation, zweite Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Methode und Vergleich der bei der ersten Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere erhaltenen Werte mit den bei der zweiten Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere erhaltenen Werte.

## Kompetitionsassay zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen

5

### Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion 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 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.

Zur Genanalyse auf einem Chip wird beispielsweise auf einer Oberfläche eine Bibliothek 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 99/51778 A1 ein elektrochemisches Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen. Bei einem solchen elektrochemischen Verfahren werden die Assoziationsereignisse anhand der mit  
5 der Assoziation einhergehenden Änderung der elektrochemischen Eigenschaften der Sonden-Moleküle nachgewiesen.

Die WO 2007/143669 A2 offenbart ein Verfahren zum elektrochemischen Nachweis von Nukleinsäuren mittels Sonden, die an eine Mikroarray-Oberfläche  
10 gebunden sind. In dem Echtzeit-Verfahren der WO 2007/143669 A2 können Kompetitor-Moleküle anwesend sein, die mit den Target-Nukleinsäuren um Bindungsstellen an den immobilisierten Sonden konkurrieren.

Bekannt ist außerdem der Nachweis von Target-Nukleinsäuren mit  
15 hybridisierenden Ferrocen-Signal-Molekülen, wobei die immobilisierten Fänger-Sonden an einen anderen Bereich der Target-Nukleinsäure binden (Lucarelli, F. et al., Anal. Chim. Acta, 2008, 609 (2), 139-159). Daneben werden kompetitive Hybridisierungsassays beschrieben, wobei Fänger-Sonden auf Goldoberflächen und Target-Nukleinsäuren um Nanopartikel-gebundene Signal-Oligonukleotide  
20 konkurrieren.

Daneben sind aus dem Stand der Technik verschiedene Ansätze zur elektrochemischen Detektion einer Echtzeit-PCR bekannt (Yeung, S. W. et al. in Anal. Chem. 2008, 80, 363 – 368; Deféver, T. et al. in J. Am. Chem. Soc. 2009,  
25 131(32), 11433-11441; Henry, O. Y. et al. in Biosens Bioelectron. 2009, 24(7), 2064-2070; Fang, T. H. Deféver, T. et al. in Biosens Bioelectron. 2009, 24(7), 2131-2136).

Eine Verbesserung der Detektionsgrenze solcher Nachweisverfahren stellt für alle  
30 denkbaren Einsatzgebiete einen Fortschritt in der Anwendbarkeit dar.

### Darstellung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Detektion von Nucleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen zu schaffen, welches eine hohe  
5 Detektionssensitivität mit einer einfachen Probenhandhabung kombiniert.

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  
10 Figuren und den Beispielen.

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

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
Base	A, G, T, C oder U
bp	Basenpaar
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat; eine Mischung aus dATP (Desoxyadenosintri-phosphat), dCTP (Desoxycytidin-triphosphat), dGTP (Desoxyguanosin-triphosphat) und dTTP (Desoxythymidin-triphosphat) als Bausteine für die DNA-Synthese; äquivalent zu Nucleotide.
Nucleinsäure-Oligomer	Nucleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z.B. Nucleinsäure-Oktamer: Eine Nucleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei der 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent

	aneinander gebunden sind).
ns-Oligomer	Nukleinsäure-Oligomer
Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z.B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
Basenabfolge	Äquivalent zu Sequenz.
Nukleotide	Äquivalent zu dNTP und äquivalent zu Base.
Sequenz	Genauere Abfolge der einzelnen Basen A, C, G, T (oder U) innerhalb eines Nukleinsäuremoleküls.
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 im Sinne der vorliegenden Erfindung ist es, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.
Matrize	Als „Vorlage“ dienendes Nukleinsäuremolekül; äquivalent zu Probe, Proben-Nukleinsäure, Proben-DNA oder Template.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
Template	Proben-Nukleinsäure, die mittels der PCR amplifiziert wird;

	äquivalent zu Matrize
Primer	Kurzes, einzelsträngiges Oligonukleotid mit einer Basenabfolge komplementär zu einem Abschnitt der Proben-Nukleinsäure, das der Polymerase als Startpunkt für die Synthese dient; der Primer lagert sich in einem sog. Hybridisierungsschritt (auch: Annealing) an komplementäre Abschnitte der in Einzelsträngen vorliegenden Proben-Nukleinsäure an, wodurch ein kurzer, doppelsträngiger DNA-Abschnitt zur Verfügung steht, an dem die Polymerase ansetzt und durch Anfügen weiterer komplementärer Nukleotide den zweiten DNA-Strang synthetisiert.
Polymerase	Enzym, das doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle synthetisiert, indem es einen vorliegenden Einzelstrang als Matrize nutzt und nach dessen Sequenz die Nukleotide für den komplementären Strang aneinanderfügt. In der PCR Methode wird eine thermostabile Polymerase, z.B. <i>Taq</i> -Polymerase (die ursprünglich aus einem thermophilen Organismus <i>Thermus aquaticus</i> isoliert wurde) eingesetzt, deren optimale Arbeitstemperatur in einem Bereich von 70°C bis 74°C liegt und die auch gegenüber Temperaturen von bis zu 100°C und mehr tolerant ist.
Mismatch	Zur Ausbildung der Watson Crick Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide 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 bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.
ss	single strand (Einzelstrang)
ds	double strand (Doppelstrang)
Zyklus	Aufeinanderfolge von Denaturierung, Hybridisierung (auch

	Annealing) und Verlängerung
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).
Perfekter Match	Hybrid aus zwei komplementären Nukleinsäure-Oligomeren, bei dem kein Mismatch auftritt.
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/bekanntem 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 betrifft ein Verfahren zur Detektion von Nucleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen, das die Schritte Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nucleinsäureoligomeren besteht, Bereitstellen einer Probe mit Target-Nucleinsäureoligomeren, Bereitstellen einer Lösung mit wenigstens einer Art von Signal-Nucleinsäureoligomeren, wobei die Signal-Nucleinsäureoligomere mit zumindest einem Detektionslabel modifiziert sind, die Signal-Nucleinsäureoligomere einen zu den Sonden-Nucleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen und die

5 mit Target-Nucleinsäureoligomeren, Bereitstellen einer Lösung mit wenigstens einer Art von Signal-Nucleinsäureoligomeren, wobei die Signal-Nucleinsäureoligomere mit zumindest einem Detektionslabel modifiziert sind, die Signal-Nucleinsäureoligomere einen zu den Sonden-Nucleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen und die

10 Signal-Nucleinsäureoligomere einen zu den Target-Nucleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen, Bereitstellen einer Reaktionslösung zur Durchführung einer Nucleinsäureamplifikation, wobei die Reaktionslösung zumindest Nucleotide und wenigstens eine Art von Nucleinsäure-Polymerase enthält, Vermischen und

15 Inkontaktbringen mit der modifizierten Oberfläche von der Lösung mit Signal-Nucleinsäureoligomeren, der Probe mit Target-Nucleinsäureoligomeren und der Reaktionslösung zur Durchführung einer Nucleinsäureamplifikation, wobei die Signal-Nucleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch in einer Konzentration von  $10^{-17}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l vorliegen und die Target-Nucleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch in einer Konzentration von bis zu  $10^{-7}$  mol/l vorliegen, erste Detektion der Signal-Nucleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Methode, Amplifizierung der Target-Nucleinsäureoligomere mittels Nucleinsäureamplifikation, zweite Detektion der Signal-Nucleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Methode und Vergleich der bei der ersten

20 Detektion der Signal-Nucleinsäureoligomere erhaltenen Werte mit den bei der zweiten Detektion der Signal-Nucleinsäureoligomere erhaltenen Werte umfasst.

Dem erfindungsgemäßen Verfahren liegt die Idee zu Grunde, die hohe Empfindlichkeit einer oberflächensensitiven Detektionsmethode mit einer

30 vorangegangenen Amplifizierung der Target-Oligonucleotide zu kombinieren. Dadurch kann die Grenze für den Nachweis der ursprünglich in der Probe vorhandenen Target-Nucleinsäureoligomeren zu extrem kleinen Konzentrationen verschoben werden. Im Idealfall ist der Nachweis eines einzigen Target-Nucleinsäureoligomers möglich.

Unter einer „weitgehend komplementären Struktur“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Sequenzabschnitte verstanden, bei denen maximal 20% der Basenpaare Mismatches ausbilden. Bevorzugt handelt es sich bei einer „weitgehend komplementären Struktur“ im Rahmen der vorliegenden Erfindung um  
5 Sequenzabschnitte, bei denen maximal 15% der Basenpaare Mismatches ausbilden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei einer „weitgehend komplementären Struktur“ um Sequenzabschnitte, bei denen maximal 10% der Basenpaare Mismatches ausbilden und ganz besonders bevorzugt um Sequenzabschnitte, bei denen maximal 5% der Basenpaare Mismatches  
10 ausbilden. Idealerweise liegen überhaupt keine Mismatches vor, wobei es sich dann um eine komplementäre Struktur handelt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen bei gleichzeitig ablaufender  
15 Amplifikation der Target-Nukleinsäureoligomere, wobei Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomere weitgehend komplementäre Abschnitte aufweisen und zugleich die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementären Abschnitt aufweisen. Das gesamte Verfahren wird dabei in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt und stellt  
20 somit eine „closed tube“ Anwendung dar.

Durch die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere erhöht sich deren Menge und damit ihre im Reaktionsansatz vorhandene Konzentration im Verlauf der Durchführung des Verfahrens. Für eine genaue und zuverlässige Detektion  
25 von Nukleinsäurehybridisierungsereignissen sind die Konzentrationsverhältnisse von Signal-Nukleinsäureoligomeren zu Target-Nukleinsäureoligomeren entscheidend. Ein Verfahren, bei dem eine oberflächensensitive Detektion und gleichzeitig eine Amplifizierung vorgenommen werden, muss daher bestimmte Rahmenbedingungen erfüllen, die eine genaue und fehlerfreie Detektion von  
30 Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen ermöglichen.

Überraschenderweise lassen sich hervorragende Ergebnisse erzielen, wenn die Signal-Nukleinsäureoligomere in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-17}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l vorliegen und gleichzeitig die Target-Nukleinsäureoligomere eine

Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l nicht überschreiten. Durch die Kombination dieser Bedingungen können während des gesamten Verfahrens korrekte, reproduzierbare Meßergebnisse erzielt werden. Die Änderung der Konzentration der Target-Nukleinsäureoligomere durch deren Amplifizierung bleibt dabei für mindestens 30  
5 Amplifizierungszyklen in einem Rahmen, der eine sichere Detektion erlaubt.

Wie bereits erwähnt, kann durch das erfindungsgemäße Verfahren in einem geschlossenen System eine oberflächensensitive Detektion von Nukleinsäurehybridisierungsereignissen bei einer simultan ablaufenden  
10 Nukleinsäureamplifikation durchgeführt werden. Dadurch werden mit der vorliegenden Erfindung unnötige Pipettierschritte, Flüssigkeitstransfers und/oder mehrfaches Öffnen und Schließen von Reaktionsgefäßen obsolet, wodurch vor allem Kontaminationsgefahren aber auch Verwechslungsgefahren der Proben bzw. Reaktionsansätze durch die ausführende Person ausgeschlossen sind. Nicht  
15 zuletzt sinkt die Arbeitsintensität oder die "hands-on-time" bei der Durchführung von Tests, was vor allem in Labors mit hohem Probendurchsatz von besonderer Wichtigkeit ist.

Da in den erfindungsgemäßen Verfahren Signal-Nukleinsäureoligomere verwendet  
20 werden, die einen zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt und gleichzeitig einen zu den Sonden-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen, können die Signal-Nukleinsäureoligomere sowohl mit den Target-Nukleinsäureoligomeren als auch mit den Sonden-Nukleinsäureoligomeren  
25 hybridisieren. Es handelt sich um ein Kompetitionsassay, bei dem Target-Nukleinsäureoligomere und Sonden-Nukleinsäureoligomere um die Signal-Nukleinsäureoligomere konkurrieren.

Hybridisierungsereignisse sind wahrscheinlicher und erfolgen mit höherer  
30 Geschwindigkeit, wenn sich alle Bindungspartner frei in Lösung befinden. Reaktionen an Grenzflächen, nämlich Bindungsereignisse zwischen einem frei in Lösung vorliegenden Bindungspartner und einem zweiten, an einer Oberfläche immobilisierten Bindungspartner, laufen meist langsamer und mit geringerer Wahrscheinlichkeit ab.

Daher ist eine Hybridisierung der frei in Lösung vorliegenden Target- und Signal-Nukleinsäureoligomere sehr viel wahrscheinlicher und erfolgt schneller als eine Hybridisierung der Signal-Nukleinsäureoligomere mit den an der Oberfläche gebundenen Sonden-Nukleinsäureoligomeren. Durch den Konzentrationsanstieg der Target-Nukleinsäureoligomere aufgrund ihrer Amplifizierung wird dieser Effekt  
5 verstärkt, sodass mit jeder Steigerung der Menge an Target-Nukleinsäureoligomeren ein "Abfangen" der Signal-Nukleinsäureoligomere wahrscheinlicher wird. Hybridisierungsereignisse von Signal-Nukleinsäureoligomeren mit den an der Oberfläche immobilisierten Sonden-  
10 Nukleinsäureoligomeren werden dadurch mit zunehmender Target-Nukleinsäureoligomer-Konzentration immer weniger, wodurch das Meßsignal der oberflächensensitiven Detektion abnimmt.

Die Sonden-Nukleinsäureoligomere können eine größere Anzahl an Basen als die  
15 Signal-Nukleinsäureoligomere aufweisen und einen Sequenzabschnitt umfassen, der eine zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementäre oder weitgehend komplementäre Struktur besitzt. Dieser Abschnitt, der keine zu einem Abschnitt der Signal-Nukleinsäureoligomere komplementäre oder weitgehend komplementäre Struktur besitzt, wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Target-  
20 Andockabschnitt bezeichnet. Bei Anwesenheit eines Target-Andockabschnittes hybridisieren die Target-Nukleinsäureoligomere zunächst mit dem Target-Andockabschnitt an die Sonden-Nukleinsäureoligomere und verdrängen auf diese Weise besonders schnell und effizient vorher gebundene Signal-Nukleinsäureoligomere. Bei der Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere stellt  
25 man bei Anwesenheit des gesuchten Targets und vor allem bei Konzentrationsanstieg durch Amplifizierung wiederum eine Abnahme der Signalintensität mit der Zeit fest.

Auch die Signal-Nukleinsäureoligomere können eine größere Anzahl an Basen als  
30 die Sonden-Nukleinsäureoligomere aufweisen und zumindest einen Target-Andockabschnitt umfassen, wobei der Target-Andockabschnitt keine zu einem Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere komplementäre oder weitgehend komplementäre Struktur aufweist und wobei die Target-Nukleinsäureoligomere zusätzlich zu ihrem zu den Signal-Nukleinsäureoligomeren komplementären

- Abschnitt einen weiteren zu dem Target-Andockabschnitt komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen. Die Target-Nukleinsäureoligomere hybridisieren zunächst mit dem Target-Andockabschnitt an die Signal-Nukleinsäureoligomere und verdrängen auf diese Weise besonders
- 5 schnell und effizient vorher gebundene Sonden-Nukleinsäureoligomere. Bei der Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere stellt man bei Anwesenheit des gesuchten Targets und vor allem bei Konzentrationsanstieg durch Amplifizierung wiederum eine Abnahme der Signalintensität mit der Zeit fest.
- 10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere durch eine PCR oder durch eine isothermale Amplifikation. Sofern die Amplifizierung über eine PCR erfolgt, enthält die bereitgestellte Reaktionslösung zusätzlich zumindest eine Art von Primer.
- 15 Eine isothermale Amplifikation erfolgt bei konstanter Temperatur, beispielsweise bei 60°C, wobei in Abhängigkeit der gewählten Bedingungen im wesentlichen sowohl eine lineare als auch eine exponentielle Zunahme der synthetisierten Nukleinsäuremoleküle möglich ist. So stehen beispielsweise eine Rolling Circle Amplification (RCA), eine Linear Rolling Circle Amplification (LRCA) oder eine
- 20 Primer Generation Rolling Circle Amplification (PG-RCA) zur Verfügung. Vor allem in der zuletzt genannten Methode ist die Zugabe externer Primer nicht notwendig, da die Primer hierbei von selbst sukzessive während der Reaktion generiert werden. Die entsprechenden notwendigen Enzyme und Substanzen und die genauen Reaktionsbedingungen für eine isothermale Amplifizierung sind dem
- 25 Fachmann bekannt und werden hier nicht näher erläutert.

- Alternativ zu der isothermalen Amplifikation kann eine Amplifikation der Nukleinsäureoligomere durch eine PCR erfolgen. Bei der PCR handelt es sich um eine für die Molekularbiologie grundlegende Methode, die im wesentlichen der
- 30 Vervielfältigung von DNA-Molekülen dient und ebenfalls einen schnellen und empfindlichen Nachweis von Nukleinsäuren erlaubt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei, bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufenden Schritten, nämlich Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung.

Bei der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur größer 90°C, vorzugsweise 94°C bis 95°C erhitzt. Dadurch trennen sich die beiden komplementären Stränge einer doppelsträngigen DNA, die DNA wird „aufgeschmolzen“ bzw. denaturiert und liegt in Einzelsträngen vor. Die  
5 Denaturierung ist ein sehr schneller Prozess und ist in der Regel innerhalb von Sekunden abgeschlossen.

Bei der Hybridisierung (auch „Annealing“) wird die Temperatur auf eine sogenannte „Annealing-Temperatur“ herabgesetzt. Bei dieser Temperatur verbinden sich die  
10 Primer mit der DNA, sie hybridisieren. Die „Annealing-Temperatur“ richtet sich dabei nach Länge und Sequenz der Primer und kann aus diesen Eigenschaften spezifisch für jeden Primer bestimmt werden. In der Regel liegen die „Annealing-Temperaturen“ in einem Bereich von 55°C bis 65°C, können anwendungsspezifisch jedoch auch niedriger oder höher eingestellt werden.

15 Ebenfalls Einfluss auf die „Annealing-Temperatur“ hat der Anteil der Basen im Primer, die in der vorliegenden Basenabfolge tatsächlich komplementär zum Template-DNA-Abschnitt sind. Die Verbindung von Primer und Template-DNA ist am stabilsten, wenn alle Basen im Primer komplementär sind und wird durch  
20 Vorhandensein eines sogenannten Mismatch destabilisiert. Im Bezug auf die „Annealing-Temperatur“ bedeutet dies, dass sie im Falle vollständig komplementärer Primer höher gewählt werden kann als z.B. bei Primern mit einem Mismatch. Durch die Wahl der „Annealing-Temperatur“ können außerdem mehr oder weniger stringente Bedingungen für die Hybridisierung geschaffen werden.

25 An den Stellen, an denen der Primer gebunden ist, beginnen die Polymerasen weitere komplementäre Nukleotide anzubauen und damit den Gegenstrang zu synthetisieren. Die Verbindung zwischen Primern (bzw. neu synthetisiertem Gegenstrang) und Template wird mit jedem angefügten Nukleotid weiter gestärkt.  
30 Die Hybridisierung hat einen geringen Zeitbedarf und erfolgt innerhalb von Sekunden.

Für die Verlängerung, dem an das „Annealing“ anschließenden Schritt, wird die Temperatur weiter erhöht, vorzugsweise auf 70°C bis 74°C. Das ist die ideale

Arbeits-temperatur für die in der Regel verwendeten Polymerasen, welche weitere Nukleotide an die entstehenden DNA-Stränge anbauen. Im angegebenen Temperaturbereich brechen zudem die losen Verbindungen zwischen Primern und solchen Template-DNA-Abschnitten wieder auf, die nicht vollständig komplementär sind.

Der Verlängerungsschritt ist derjenige Schritt der PCR, der in der Regel den größten Zeitbedarf mit sich bringt. So ist beispielsweise die Arbeits- bzw. Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerase zeitlimitierend, das heißt je kürzer die optimale Temperatur von etwa 70°C bis 74°C herrscht, desto kürzer bleiben auch die neu synthetisierten DNA-Stränge. In der Regel reichen auch im Verlängerungsschritt mehrere Sekunden aus, jedoch wird in Standard-PCR-Verfahren bei sehr langen zu synthetisierenden DNA-Molekülen eine Zeitspanne im Minutenbereich (von einer bis zu mehreren Minuten) zur DNA-Verlängerung gewählt.

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.

Eine besondere PCR-Anwendung, die sogenannte Real-Time-PCR erlaubt die Detektion und Quantifizierung von Target-Nukleinsäuremolekülen in Echtzeit, also während der PCR-Reaktion. Die Real-Time-PCR erfreut sich in den Labors zunehmender Beliebtheit, nicht zuletzt deshalb, weil sie schnell und dabei gleichzeitig präzise ist. Die Bestimmung der DNA-Menge am Ende einer PCR lässt nämlich aus vielerlei Gründen nicht direkt Rückschlüsse auf die Zahl der ursprünglich vorliegenden Moleküle zu, da z. B. am Anfang als auch am Ende der PCR die Bedingungen für die Polymerasen nicht unbedingt optimal sind und daher die Amplifikation nicht über die ganze Reaktionszeit gleichmäßig läuft. 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 beispielsweise nach jedem einzelnen Zyklus erfasst wird. Diese Quantifizierung geschieht in der Regel über

eine Fluoreszenzmarkierung der neu synthetisierten DNA-Moleküle. Insbesondere in der medizinischen Diagnostik aber auch in der Targetsuche und in der Grundlagenforschung ist eine Mengenbestimmung der Proben-DNA unumgänglich, weshalb in diesen Fällen ein besonders ausgeprägter Bedarf an  
5 Quantifizierungsmöglichkeiten in Echtzeit besteht.

Durch ein Zusammenwirken der beiden oben beschriebenen Methoden, nämlich der oberflächensensitiven Detektion und der PCR, können die Nachweisgrenzen für spezielle Anwendungen weiter optimiert werden. Durch eine Voramplifikation  
10 der Probennukleinsäure mittels PCR wird beispielsweise die Zahl der Targets in einem Maße erhöht, dass eine sichere, zuverlässige und genaue Detektion beispielsweise mit DNA-Chips möglich wird. Alternativ kann mit Hilfe von oberflächensensitiven Detektionsmethoden der Verlauf einer PCR in Echtzeit analysiert und die Menge an Targetnukleinsäuremolekülen quantifiziert werden.

15

Im Falle einer Amplifizierung mittels PCR muss das mit der modifizierten Oberfläche in Kontakt stehende Gemisch aus Signal-Nukleinsäureoligomeren, Target-Nukleinsäureoligomeren und Reaktionslösung zur Durchführung einer Amplifikation einer Thermozyklisierung unterzogen werden. Dazu müssen in immer  
20 wiederkehrenden Zyklen drei verschiedenen Temperaturen aufeinanderfolgend angelegt werden, die die drei Schritte einer PCR, nämlich Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung erlauben. Die Denaturierung erfolgt in der Regel bei einer Temperatur von rund 95°C, die Temperatur für die Hybridisierung wird anwendungsspezifisch gewählt, liegt in der Regel jedoch in einem Bereich von  
25 etwa 55°C bis 65°C, während die Verlängerung bei einer Temperatur von rund 72°C bis 74°C durchgeführt wird.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen wenigstens die Signal-Nukleinsäureoligomere an ihrem 3'-Ende eine Modifikation auf, die ein  
30 Anfügen von Nucleotiden durch die Nucleinsäure-Polymerase verhindern. Durch Hybridisierung der Signal-Nukleinsäureoligomere mit den Target-Nukleinsäureoligomeren liegt ein Synthese-Startpunkt für die Polymerase vor, die dann unter Verwendung des Target-Nukleinsäureoligomers als Matrize das Signal-Nukleinsäureoligomer verlängern könnte. Durch eine entsprechende Modifikation

der 3`-Enden der Signal-Nukleinsäureoligomere oder durch Einsatz eines oder mehrerer Didesoxynukleotide als letzte, abschließende Nukleotide am 3`-Ende wird sichergestellt, dass keine unerwünschte Verlängerung der Signal-Nukleinsäureoligomere während des Schrittes der Amplifizierung stattfindet.

5

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen die Sonden-Nukleinsäureoligomere an ihrem 3`-Ende eine Modifikation auf, die ein Anfügen von Nukleotiden durch die Nukleinsäure-Polymerase verhindern. Sofern die Sonden-Nukleinsäureoligomere über ihr 5`-Ende an die Oberfläche gebunden sind, steht das 3`-Ende frei zur Verfügung. Durch Hybridisierung der Signal-Nukleinsäureoligomere mit den Sonden-Nukleinsäureoligomeren liegt ein Synthese-Startpunkt für die Polymerase vor, die dann unter Verwendung des Signal-Nukleinsäureoligomers als Matrize das Sonden-Nukleinsäureoligomer verlängern könnte. Durch eine entsprechende Modifikation der 3`-Enden der Sonden-Nukleinsäureoligomere oder durch Einsatz eines oder mehrerer Didesoxynukleotide als letzte, abschließende Nukleotide am 3`-Ende wird sichergestellt, dass keine unerwünschte Verlängerung der Sonden-Nukleinsäureoligomere während des Schrittes der Amplifizierung stattfindet.

20 Sofern die Sonden-Nukleinsäureoligomere über ihr 3`-Ende an die Oberfläche gebunden sind, und Signal-Nukleinsäureoligomere an die Sonden-Nukleinsäureoligomere hybridisiert vorliegen, steht wiederum das 3`-Ende der Signal-Nukleinsäureoligomere als Anknüpfungspunkt für neue, zusätzliche Nukleotide durch die Polymerase zur Verfügung. Wie bereits erwähnt ist es vorteilhaft, wenn die Signal-Nukleinsäureoligomere an ihrem 3`-Ende eine Modifikation oder Didesoxynukleotide als letzte, abschließende Nukleotide am 3`-Ende aufweisen, um jeweils ein Anfügen von Nukleotiden durch die Nukleinsäure-Polymerase zu verhindern. Besonders bevorzugt weisen die Signal-Nukleinsäureoligomere am 3`-Ende mindestens eine „nicht-matchende“ Base auf, wodurch ebenfalls eine Verlängerung der Signal-Nukleinsäureoligomere durch die Polymerase verhindert wird.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen kann daher in ganz besonders vorteilhafter Weise in

Kombination mit einer Vorrichtung zur Durchführung einer PCR eingesetzt werden. Die Vorrichtung zur Durchführung einer PCR umfasst dabei wenigstens eine Probenzelle mit einem Hohlraum zur Aufnahme einer Probe und mindestens drei unabhängig voneinander regulierbare Temperiereinheiten, die drei räumlich  
5 voneinander getrennte Temperaturzonen definieren. Es ist mindestens ein Mittel zur Durchführung einer Relativbewegung zwischen Probenzelle und den Temperiereinheiten vorgesehen, wobei das Mittel zur Durchführung einer Relativbewegung so ausgelegt und eingerichtet ist, dass die Probe aufgrund der Relativbewegung zwischen Probenzelle und den Temperiereinheiten durch die drei  
10 räumlich voneinander getrennten Temperaturzonen bewegt werden kann.

Die Probenzelle umfasst einen zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten Sensor, der in dem zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraum der Probenzelle ausgebildet ist.  
15 Besonders bevorzugt handelt es sich um einen zur oberflächensensitiven Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten Sensor. Der Sensor besteht dabei im wesentlichen aus einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren besteht. Mit dem Begriff "Oberfläche" wird  
20 jedes 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. Der feste Träger kann aus leitfähigem oder nicht leitfähigem Material bestehen. Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäureoligomeren an einer  
25 Oberfläche sind dem Fachmann bekannt.

Der in der Probenzelle vorhandene Sensor stellt die für das erfindungsgemäße Verfahren erforderliche modifizierte Oberfläche bereit.

30 Weist die Vorrichtung zur Durchführung einer PCR eine vierte Temperiereinheit auf, die eine vierte räumlich von den drei Temperaturzonen getrennte Temperaturzone definiert, so ergeben sich ganz besondere Vorteile. Durch die vierte Temperiereinheit der Vorrichtung wird es möglich, Teilbereiche der Probenzelle, insbesondere den Bereich, in dem sich der Sensor befindet in einer

vierten Temperaturzone, die sich von den zur Durchführung der PCR erforderlichen Temperaturen unterscheidet und gleichzeitig eine für die oberflächensensitive Detektion von Nukleinsäure-Hybridisierungsereignissen optimale Temperatur darstellt, zu positionieren. Beispielsweise wird die vierte Temperaturzone auf eine  
5 für diese Art der Detektion günstige Temperatur von rund 50°C eingestellt.

Bevorzugt erfolgt der Detektionsschritt direkt nach dem Denaturierungsschritt der PCR-Amplifizierung. Durch die während der Denaturierung herrschende Temperatur von rund 95°C werden alle Bindungen bzw. Hybridisierungen von  
10 Nukleinsäuremolekülen gelöst, d.h. alle Nukleinsäureoligomere liegen als Einzelstrang vor und Signal- und Target-Nukleinsäureoligomere befinden sich frei in Lösung. Wie bereits erläutert, wird dadurch die Wahrscheinlichkeit und damit die Geschwindigkeit einer Hybridisierung von Signal- und Target-Nukleinsäureoligomere höher als eine Hybridisierung von Signal- und Sonden-  
15 Nukleinsäureoligomeren. Bei Anwesenheit von Target-Nukleinsäureoligomeren sinkt die Signalintensität der oberflächensensitiven Detektion dabei mit jedem PCR-Zyklus.

Wie bereits erwähnt, enthält die bereitgestellte Reaktionslösung für die  
20 Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere mittels PCR zusätzlich zumindest eine Art von Primer. Die Primer werden dabei bevorzugt so gewählt, dass sie zwar zu den Target-Nukleinsäureoligomeren, nicht aber zu den Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomeren komplementär sind.

25 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nach der ersten Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere und vor der Durchführung der zweiten Detektion der Schritt der Amplifizierung zumindest 5 mal, insbesondere zumindest 10 mal und bevorzugt zumindest 20 mal durchgeführt. Je nach Art der Anwendung ist es sinnvoll und ausreichend, nicht nach jedem  
30 Amplifizierungsschritt, nämlich z.B. nach jedem PCR-Zyklus eine Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durchzuführen und damit die Menge der neu entstandenen Target-Nukleinsäureoligomere zu bestimmen.

Grundsätzlich kann die Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere nach einer beliebigen Anzahl an Amplifizierungszyklen erfolgen. So kann die zweite Detektion beispielsweise nach zwei oder drei oder vier Zyklen erfolgen, die nächste Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere nach einem weiteren, zehn weiteren oder 20  
5 weiteren Zyklen, die darauffolgende Detektion nach vier weiteren Zyklen, acht weiteren Zyklen oder zwölf weiteren Zyklen, usw. Es ist jede denkbare Kombination von Detektionsschritten und Amplifizierungszyklen möglich.

Gemäß bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Konzentration der Signal-  
10 Nukleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch zwischen  $10^{-15}$  mol/l und  $10^{-5}$  mol/l, bevorzugt zwischen  $10^{-13}$  mol/l und  $10^{-7}$  mol/l und besonders bevorzugt zwischen  $10^{-11}$  mol/l und  $10^{-7}$  mol/l. Die Wahl der Konzentrationsbereiche und/oder die exakte Einstellung der Konzentration der Signal-Nukleinsäureoligomere erfolgt so, dass eine stabile und gleichmäßige Messung über den gesamten  
15 Detektionszeitraum möglich ist und hängt unter anderem davon ab, welches Detektionslabel die eingesetzten Signal-Nukleinsäureoligomere tragen. Die optimalen Konzentrationsbereiche können sich für Signal-Nukleinsäureoligomere mit einem redoxaktiven Detektionslabel und solche mit einem Fluoreszenzlabel unterscheiden. Ebenso kann vor allem bei fluoreszenzmarkierten Signal-  
20 Nukleinsäureoligomeren die Anzahl der vorhandenen Fluorophore Einfluss auf die optimale Konzentration nehmen.

Bei Verwendung eines DNA-Chips hängt die bevorzugte Konzentration der Signal-Nukleinsäureoligomere zudem von der Größe der Test-Sites und von der  
25 Belegungsdichte, mit der die Sonden-Nukleinsäureoligomere an die Chip-Oberfläche gebunden sind, ab.

Vorzugsweise beträgt die Konzentration der Target-Nukleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch bis zu  $10^{-9}$  mol/l, bevorzugt bis zu  $10^{-11}$  mol/l, besonders  
30 bevorzugt bis zu  $10^{-13}$  mol/l. Durch die während des erfindungsgemäßen Verfahrens stattfindende Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere findet eine kontinuierliche Veränderung der Konzentration der Target-Nukleinsäureoligomere statt. Dabei kann zusätzlich je nach Anwendungsart die Anzahl der gewünschten Amplifizierungszyklen unterschiedlich sein.

Sinnvollerweise werden dabei die Zyklenzahl und die Konzentration der Target-Nukleinsäureoligomere aneinander angepasst. Durch die angegebenen Grenzen wird eine zuverlässige Messung während des gesamten Ablaufs des Verfahrens gewährleistet.

5

Bei Verwendung eines DNA-Chips hängt die bevorzugte Konzentration der Target-Nukleinsäureoligomere zudem von der Größe der Test-Sites und von der Belegungsdichte, mit der die Sonden-Nukleinsäureoligomere an die Chip-Oberfläche gebunden sind, ab.

10

Die Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere erfolgt durch eine oberflächensensitive Detektionsmethode, da in diesem Fall ausschließlich die an die Oberfläche gebundenen Signal-Nukleinsäureoligomere detektiert werden. Bevorzugt sind in diesem Zusammenhang spektroskopische, elektrochemische und elektrochemolumineszente Methoden.

15

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden nach der ersten Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Detektionsmethode und vor einer zweiten Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Detektionsmethode Bedingungen eingestellt oder Maßnahmen ergriffen, die zur zumindest überwiegenden Dissoziation von Sonden-Nukleinsäureoligomeren und Signal-Nukleinsäureoligomeren führen. Eine solche Dehybridisierung der an die Oberfläche gebundenen Doppelstranghybride führt die modifizierte Oberfläche im wesentlichen in ihren ursprünglichen Zustand zurück. Erfolgt die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere durch eine PCR und liegen die zur Durchführung der einzelnen PCR-Schritte erforderlichen Temperaturen auch an der modifizierten Oberfläche an, so ist kein separater Dehybridisierungsschritt erforderlich, da die Dehybridisierung automatisch während eines PCR-Zyklus erfolgt.

20  
25  
30

Unter einer „zumindest überwiegenden Dissoziation von Sonden-Nukleinsäureoligomeren und Signal-Nukleinsäureoligomeren“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass zumindest 50% der an die Oberfläche

gebundenen Doppelstranghybride dissoziieren, bevorzugt zumindest 75%, besonders bevorzugt zumindest 90% und insbesondere bevorzugt zumindest 98%.

Zur elektrochemischen Detektion werden bevorzugt Amperometrie, Chronocoulometrie, Impedanzmessung oder Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) eingesetzt. Als spektroskopisches Verfahren wird besonders eine Detektion der Fluoreszenz, insbesondere der Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) oder eine Detektion über Surface Plasmon Resonance (SPR) bevorzugt.

10

Gemäß bevorzugten Ausführungsformen besteht die Modifikation der bereitgestellten modifizierten Oberfläche in der Anbindung von mehreren Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren. Die verschiedenen Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren sind dabei in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die modifizierte Oberfläche gebunden. Die modifizierte Oberfläche besitzt bevorzugt zumindest 2 räumlich im wesentlichen abgetrennte Bereiche, besonders bevorzugt zumindest 4 und insbesondere zumindest 12 solche räumlich im wesentlichen abgetrennte Bereiche. Ganz besonders bevorzugt weist die modifizierte Oberfläche zumindest 32, insbesondere zumindest 64, ganz besonders bevorzugt zumindest 96 räumlich im wesentlichen abgetrennte Bereiche auf.

20

Besondere Vorteile ergeben sich durch bevorzugte Ausführungsformen, in denen die bereitgestellte modifizierte Oberfläche eine Fläche von  $1 \mu\text{m}^2$  bis zu  $1 \text{mm}^2$ , bevorzugt eine Fläche von  $10 \mu\text{m}^2$  bis zu  $100 \mu\text{m}^2$ , besonders bevorzugt eine Fläche von rund  $50 \mu\text{m}^2$  aufweist.

25

Die Fläche der modifizierten Oberfläche richtet sich zum einen nach der Anzahl der verschiedenen Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren, die in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die modifizierte Oberfläche gebunden sind. Je mehr räumlich im wesentlichen abgetrennte Bereiche die modifizierte Oberfläche zur Verfügung stellen soll, desto größer muss ihre Fläche gewählt werden.

30

Andererseits kann jedoch beispielsweise durch Veränderung der Belegungsdichte mit Sonden-Nukleinsäureoligomeren die Fläche der modifizierten Oberfläche innerhalb eines angemessenen Rahmens angepasst werden. In der Regel wird mit einer Belegungsdichte von rund  $6 \times 10^{12}$  Sonden-Nukleinsäureoligomeren pro  $\text{cm}^2$  Oberfläche gearbeitet. Durch Abweichungen von diesem Richtwert können größere oder kleinere Flächen sinnvoll sein.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Der Kit enthält dabei zumindest eine modifizierte Oberfläche, wie sie in der vorliegenden Erfindung spezifiziert ist und eine effektive Menge an Signal-Nukleinsäureoligomeren wie sie in der vorliegenden Erfindung definiert sind.

## 15 **Die Oberfläche**

Mit dem Begriff "Oberfläche" wird jedes 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. Der feste Träger kann aus leitfähigem oder nicht leitfähigem Material bestehen.

### *(i) leitfähige Oberflächen*

25 Unter dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird jeder Träger mit einer elektrisch leitfähigen Oberfläche beliebiger Dicke verstanden, insbesondere Oberflächen aus Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium und Mangan.

30 Daneben können auch beliebige dotierte oder nicht dotierte Halbleiteroberflächen beliebiger Dicke verwendet werden. Sämtliche Halbleiter können als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden. Als nicht einschränkend gemeinte 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 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.

10

*(ii) nichtleitende Oberflächen*

Bei den nichtleitenden Oberflächen wird als Material Glas, modifiziertes Glas oder Silizium bevorzugt. Die Modifizierung kann z.B. durch Silanisierung erfolgen und führt in allen Fällen zu funktionellen Gruppen, die geeignet sind, in Kopplungsreaktionen entsprechend funktionalisierte Sonden-Nukleinsäureoligomere zu binden. Diese Modifizierung schließt Schichtaufbauten auf der Oberfläche unter Verwendung von Polymeren wie z.B. Dextranpolymeren, die eine Variation der Schichtdicke und Oberflächenbeschaffenheit erlauben, mit ein. Weitere Derivatisierungsmöglichkeiten zur letztendlichen Anbindung der Sonden-Nukleinsäureoligomeren bestehen z.B. im Aufbringen einer dünnen (ca. 10 - 200 nm) Metallisierungsschicht, insbesondere einer Gold-Metallisierungsschicht, die zusätzlich mit (Thiol-funktionalisierten) Polymeren, insbesondere Dextranen, belegt sein kann. Daneben kann das Glas nach der Silanisierung auch mit Biotin funktionalisiert werden (z.B. aminofunktionalisierte Glasoberfläche nach der Silanisierung und Kopplung der Carbonsäure Biotin über einen Biotinaktivester wie Biotin-N-succinimidylester) oder alternativ mit an Dextran-Lysin oder Dextran immobilisierten Biotin überzogen werden. Die so erzeugten biotinylierten Glasoberflächen werden anschließend mit Avidin oder Streptavidin behandelt und können dann zur Anbindung von biotinylierten Sonden-Nukleinsäureoligomeren verwendet werden.

### **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 Thiol-, Hydroxy-, Amino- oder Carboxylgruppen an die Oberfläche gebunden werden. Das Sonden-Nukleinsäureoligomer kann direkt oder über einen Linker/Spacer an die Oberflächenatome oder -molekülen einer Oberfläche gebunden werden. Daneben kann das Sonden-Nukleinsäureoligomer durch die bei Immunoassays üblichen Methoden verankert werden wie z.B. durch 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 werden. Dabei wird auch das Nukleinsäureoligomer direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen 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 A1 verwiesen.

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

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 Sonden-Nukleinsäureoligomeren oder 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 Sonden-Nukleinsäureoligomers bzw. Signal-Nukleinsäureoligomers fungieren. Die Target-Nukleinsäureoligomere, deren

Vorhandensein anhand der vorliegenden Erfindung detektiert werden soll, weisen zumindest einen Sequenzbereich auf, dessen Sequenz komplementär oder zumindest weitgehend komplementär zu einem Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere bzw. der Signal-Nukleinsäureoligomere ist.

5

Die Target-Nukleinsäureoligomere liegen in der Probe entweder als Einzelstrang (ss) oder als Doppelstrang (ds) vor. In einer bevorzugten Ausführungsform liegen die Target-Nukleinsäureoligomere zumindest teilweise als Einzelstrang vor. Dies kann z.B. dadurch erreicht werden, dass ds-Target-Nukleinsäureoligomere  
10 (thermisch oder durch sonstige, dem Fachmann bekannte Maßnahmen) dehybridisiert werden oder dass bei der Aufbereitung der Target-Nukleinsäureoligomere darauf geachtet wird, dass die Target-Nukleinsäureoligomere z.T. als Einzelstränge vorliegen. Dies wird beispielsweise durch eine asymmetrische PCR erreicht.

15

Als Nukleinsäureoligomer oder ns-Oligomer wird im Rahmen der vorliegenden 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),  
20 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 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  
25 Phosphoramid-Rückgrat. Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die sequenzspezifische Bindung natürlich vorkommender DNA, oder RNA bzw. daraus abgeleitete (transkribierte oder amplifizierte) Strukturen wie cDNA oder amplifizierte cDNA oder amplifizierte RNA (aRNA).

30

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

Die Signal-Nukleinsäureoligomere sind durch Derivatisierung mit einem oder mehreren detektierbaren Label ausgestattet. Dieses Label ermöglicht die Detektion  
5 der Komplexierungsereignisse zwischen dem Signal-Nukleinsäureoligomeren und den oberflächengebundenen Sonden-Nukleinsäureoligomeren. Das Label kann direkt oder wie im Falle enzym-katalysierter Reaktionen indirekt ein Detektionssignal liefern. Bevorzugte Detektionslabel (Markermoleküle) sind Fluorophore und redoxaktive Substanzen.

10

Bei den Fluorophoren können kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Texas Rot, Rhodamin-Farbstoffe, Fluorescein etc. verwendet werden (vgl. Molecular Probes Katalog). Im Falle der Detektion durch elektrochemische Methoden werden Redoxmoleküle als Label eingesetzt.

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  
20 Riboflavin, von Chinonen wie Pyrrollochinolinchinon, Ubichinon, Anthrachinon, Naphthochinon 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,  
25 para- oder ortho-Dihydroxy-Anthrachinon-Derivaten, para- oder ortho-Dihydroxy-Naphthochinon-Derivaten) und ähnlichen Verbindungen möglich.

In den erfindungsgemäßen Verfahren können auch indirekte Label verwendet werden. Unter dem Begriff „indirekte Label“ werden solche verstanden, bei denen  
30 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  
5 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  
10 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid).

### **Oberflächensensitive Detektionsmethoden**

15 Oberflächensensitive Detektionsmethoden erlauben die Unterscheidung zwischen an eine Oberfläche assoziierten und im Überstand gelösten Markermolekülen. Als Detektionsmethode eignen sich elektrochemische, spektroskopische und elektrochemolumineszente Verfahren.

#### 20 *(i) Oberflächensensitive elektrochemische Detektion*

Bei elektrochemischen Methoden kann anhand der Kinetik der elektrochemischen Prozesse prinzipiell zwischen an eine Oberfläche adsorbierten und im Überstand gelösten redoxaktiven Detektionslabel unterschieden werden.  
25 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,  
30 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 03/018834  
5 A2 beschrieben, auf die hiermit in diesem Zusammenhang Bezug genommen wird.

*(ii) Oberflächensensitive Fluoreszenz-Detektion*

Als optische Messmethode zur Detektion von fluoreszenzmarkierten Signal-  
10 Nukleinsäureoligomeren kann die Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF, vgl. Sutherland und Dahne, 1987, J. Immunol. Meth., 74, 253 - 265) dienen. Dabei können Fluoreszenzmoleküle, die sich in der Nähe der Grenzfläche zwischen einem festen Wellenleitermedium, typischerweise Glas, und einem flüssigen Medium befinden bzw. auf der der Flüssigkeit zugewandten Oberfläche des  
15 Wellenleitermediums immobilisiert sind, durch das evaneszente Feld, das aus dem Wellenleiter herausragt, angeregt werden und detektierbares Fluoreszenzlicht emittieren. Verdrängte bzw. im Überstand gelöste fluoreszenzgelabelte Komplexbildner werden vom evaneszenten Feld nicht erfasst (bzw. nur insofern als sie sich im Bereich der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befinden) und  
20 liefern somit (nahezu) keinen Beitrag zum gemessenen Signal. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes beträgt typischerweise 100 bis 200 nm, kann aber durch eine dünne Metallisierungsschicht (ca. 10 bis 200 nm), insbesondere eine Goldmetallisierungsschicht, auf mehrere 100 nm erhöht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Fluoreszenzdetektion der verdrängten,  
25 Fluorophor-markierten Signal-Nukleinsäureoligomere wird die Schichtdicke der Sonden-modifizierten Trägeroberfläche an die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes angepasst z.B.

- durch entsprechend lange Sonden-Nukleinsäureoligomere,  
30
- durch Immobilisierung der Sonden-Nukleinsäureoligomere über entsprechend lange Linker zwischen Oberfläche und Sonden-Oligonukleotid,

- durch Kopplung der Carbonsäure Biotin (über einen Biotinaktivester wie Biotin-N-succinimidylester) an aminoderivatisierte Oberflächen und Kopplung von Avidin oder Streptavidin an die so erzeugten biotinylierten Oberflächen mit anschließender Anbindung von biotinylierten Sonden-  
5 Nukleinsäureoligomeren oder
  
- durch Immobilisierung einer entsprechend dicken Schicht an funktionalisiertem Polymer und Anbindung des Sonden-  
10 Nukleinsäureoligomeren an das Polymer, z.B. (a) durch Aufbringen einer dünnen (ca. 10 - 200 nm) Metallisierungsschicht, insbesondere einer Gold-Metallisierungsschicht, die mit einem (Thiol-funktionalisierten) Polymer, insbesondere Dextranen oder Polylysin, belegt sein kann, welches wiederum zur Anbindung der Sonden-Nukleinsäureoligomere verwendet wird oder (b) durch Aufbringen einer Polymerschicht aus Polylysin-,  
15 Dextran-Lysin- oder von Dextran-immobilisiertem Biotin und Kopplung von Avidin oder Streptavidin an die so erzeugten biotinylierten Oberflächen mit anschließender Anbindung von biotinylierten Sonden-Nukleinsäureoligomeren.

20

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammen-  
25 hang mit den Figuren näher erläutert werden. Es wird aber ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Erfindung nicht auf die angegebenen Beispiele beschränkt sein soll. Es zeigen

Fig. 1A, eine schematische Darstellung des Messprinzips der Detektion von  
1B Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren,

Fig. 2 eine schematische Darstellung einer Probenzelle mit integriertem Sensor,

Fig. 3 eine perspektivische Darstellung einer Vorrichtung zur Durchführung einer PCR-Reaktion bei gleichzeitiger Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen,

Fig. 4A, eine Auftragung der Messergebnisse der Detektion von  
4B, 4C Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen während einer PCR (Real-Time PCR),

Fig. 5A, eine Auftragung der Messergebnisse der Detektion von  
5B, 5C, Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen an 24 Teststellen  
5D während einer PCR (Multiplex-Real-Time PCR).

*Beispiel 1: Messprinzip der Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen*

5

Die Figuren 1A, 1B zeigen schematisch das Messprinzip der Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen während einer PCR, nämlich einer elektrisch detektierten Real-Time PCR, wobei in Fig. 1A der Zustand zu Beginn bzw. vor dem Start der PCR und in Fig. 1B der Zustand bei einer  
10 fortgeschrittenen PCR-Reaktion skizziert ist.

Zu einem PCR-Reaktionsansatz, der Target-Nukleinsäureoligomere 1 enthält, werden Signal-Nukleinsäureoligomere 2 mit kovalent gebundenen Ferrocenen 3 gegeben. Die Signal-Nukleinsäureoligomere 2 sind zum einen zu den Sonden-  
15 Nukleinsäureoligomeren 5, die auf einer Teststelle 4 eines DNA-Chips immobilisiert sind, und zum anderen zu den Target-Nukleinsäureoligomeren 1 komplementär. Zu Beginn der PCR-Reaktion, wie in Fig. 1A dargestellt, befinden sich nur wenige Target-Nukleinsäureoligomere 1 im Reaktionsansatz, die Signal-Nukleinsäureoligomere 2 sind in deutlichem Überschuss vorhanden und können in  
20 hohem Maße an die an der DNA-Chip-Teststelle 4 immobilisierten Sonden-

Nukleinsäureoligomere 5 unter Ausbildung von Sonden-/Signal-Nukleinsäureoligomer-Hybriden 25 gebunden werden. In der Regel ist - bei geeigneter Konzentration der Signal-Nukleinsäureoligomere 2 in Lösung - eine Sättigung der Hybridisierung von Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomeren 25 innerhalb weniger Minuten erreicht.

Die kovalent gebundenen Ferrocene 3 der Signal-Nukleinsäureoligomere 2 können zur elektrochemischen Detektion der an den Teststellen 4 (Elektroden) gebundenen/hybridisierten Signal-Nukleinsäureoligomere 2 benutzt werden, da Ferrocen reversibel oxidier- und reduzierbar ist. Bei Anlegen einer entsprechenden Spannung an die Teststelle 4 wird ein dem Anteil an hybridisierten Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomeren 25 entsprechender Strom gemessen. Die frei in Lösung befindlichen Signal-Nukleinsäureoligomere 2 sind in einer Konzentration vorhanden, die kein messbares Zusatzsignal an der Teststelle 4 erzeugt bzw. sie können anhand ihrer Zeitcharakteristik – freie Signal-Nukleinsäureoligomere 2 müssen zunächst an die Teststelle 4 diffundieren und können erst dann oxidiert bzw. reduziert werden – von an der Teststelle 4 gebundenen, mit Sonden-Nukleinsäureoligomeren hybridisierten Signal-Nukleinsäureoligomeren diskriminiert werden. Eine thermische Dehybridisierung (Aufheizen des DNA-Chips und der angrenzenden Lösung auf 95°C) führt zum Abdiffundieren aller an der Teststelle gebundenen Signal-Nukleinsäureoligomere 2. Die Teststelle 4 ist in ihrer ursprünglichen Form mit freien Sonden- Nukleinsäureoligomeren 5 wiederhergestellt. Dieser Zustand liegt zumindest für den Zeitraum vor, in dem die Temperatur nach der thermischen Dehybridisierung über der Schmelztemperatur des Hybrids aus Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomeren 25 liegt. Ein Absenken der Temperatur an der Teststelle 4 des DNA-Chips auf bzw. unter die Schmelztemperatur des Hybrids 25 ermöglicht eine erneute Messung.

Mit zunehmendem Fortgang der PCR-Reaktion, wie in Fig. 1B dargestellt, nimmt die Zahl der Target-Nukleinsäureoligomere 1 exponentiell zu. Bei geeigneter Temperaturführung (Aufschmelzen der PCR-Produkte, Absenken der Temperatur auf einen Bereich unter der Schmelztemperatur eines Hybrids aus Signal- und Target-Nukleinsäureoligomeren 12, danach gegebenenfalls weiteres Absenken der Temperatur auf einen Bereich unterhalb der Schmelztemperatur des Hybrids aus

Signal- und Sonden-Nukleinsäureoligomeren 25) kommt es in der Volumenphase zu einer schnellen Hybridisierung aus Target- und Signal-Nukleinsäureoligomeren 12 (wenige Sekunden). Die Konzentration der freien Signal-Nukleinsäureoligomere 2 nimmt deutlich ab, was an der Teststelle 4 zu einer im Vergleich zu einer  
5 Messung bei Reaktionsstart verlangsamten Anhybridisierung der Signal-Nukleinsäureoligomere 2 und zu einem reduzierten Hybridisierungsgrad zwischen Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomeren 25 führt.

Daneben kann durch geschicktes Ausnutzen der geeigneten Exonukleaseaktivität  
10 der Polymerase und Anbindung der Markierung am geeigneten Ende des Signal-Nukleinsäureoligomers 2 pro Amplikon und Zyklus ein Signal-Nukleinsäureoligomer 2 zerstört werden (Trennung von Markierung und Oligosequenz), was, neben dem Verbrauch freier Signal-Nukleinsäureoligomere 2 durch die Hybridisierung an die Target-Nukleinsäureoligomere 12, zu einem permanenten Verbrauch der Signal-  
15 Nukleinsäureoligomere 2 durch den (korrekten) Amplifikationsvorgang führt und so das Signal an der Teststelle 4 des DNA-Chips noch stärker beeinflusst.

*Beispiel 2:*

20 *Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen in Kombination mit einer Vorrichtung zur Durchführung von PCR-Reaktionen*

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen kann in Kombination mit einer Vorrichtung 30 zur  
25 Durchführung einer PCR anzuwenden. Eine spezielle Ausführungsform der Vorrichtung 30 ist in der Figur 2 gezeigt. Die Vorrichtung 30 zur Durchführung der PCR umfasst eine Probenzelle 10 mit einem Hohlraum zur Aufnahme der Probe und drei unabhängig voneinander regulierbare Temperatureinheiten, die drei räumlich voneinander getrennte Temperaturzonen definieren. In der Figur 2 sind  
30 aus Übersichtsgründen nur die Temperatureinheiten 7a und 7c dargestellt. Ebenso ist in der Vorrichtung 30 ein Mittel R zur Durchführung einer Relativbewegung zwischen Probenzelle und den Temperatureinheiten vorgesehen, wobei das Mittel R zur Durchführung einer Relativbewegung so ausgelegt und eingerichtet ist, dass die Probe aufgrund der Relativbewegung zwischen Probenzelle 10 und den

Temperiereinheiten durch die drei räumlich voneinander getrennten Temperaturzonen bewegt wird. Im speziellen Beispiel handelt es sich um ein Mittel zur Durchführung von Drehbewegungen, nämlich um eine rotierbare Achse R.

- 5 Eine spezielle Ausführungsform der Probenzelle 10 ist in der Figur 3 dargestellt. Die Probenzelle 10 weist einen ungefähren Durchmesser von 20 mm und eine Dicke von 1 mm auf. Der in der Probenzelle 10 vorhandene Hohlraum 8 weist eine Tiefe von ca. 0,5 mm und zwei Einfüllöffnungen 11 zum Beschicken mit dem PCR-Reaktionsgemisch auf. Ebenso umfasst die Probenzelle 10 einen zur Detektion  
10 von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten Sensor 20, nämlich einen DNA-Chip, der in dem Hohlraum 8 der Probenzelle 10 ausgebildet ist.

- Der in der Probenzelle 10 vorhandene DNA-Chip 20 stellt die für das  
15 erfindungsgemäße Verfahren erforderliche modifizierte Oberfläche bereit und weist ein Sensorfeld 20a auf, welches über einen Brückenkanal 8.1 mit der Reaktionslösung in Kontakt steht. Der DNA-Chip 20 verfügt über eine Durchkontaktierung, so dass die für die Messwerterfassung notwendige elektrische Kontaktierung des DNA-Chips von außen über Federkontakte 9 (siehe Fig. 2), die  
20 in der rotierbaren Achse R ausgebildet sind, bewerkstelligt werden kann.

- Die drei unabhängigen Temperiereinheiten der Vorrichtung 30 weisen jeweils einen temperierbaren Block 6 aus einem gut wärmeleitfähigen Material, im speziellen Beispiel aus Aluminium auf. Mittels Peltierelementen bzw. Heizmatten,  
25 Platinwiderstand zur Temperaturmessung und einer geeigneten Regelelektronik (PID-Regler) werden die temperierbaren Blöcke 6 auf die für die PCR-Reaktion nötige Temperatur gebracht. Im vorliegenden Beispiel wird mit der ersten Temperiereinheit 7a eine erste Temperaturzone von 95°C, mit der zweiten Temperiereinheit 7c eine zweite Temperaturzone von 55°C und mit der dritten  
30 Temperiereinheit (nicht gezeigt) eine dritte Temperaturzone von 72°C definiert. Jeder temperierbare Block 6 enthält einen Spalt 13, in den die Probenzelle 10 eingeführt wird.

Im vorliegenden Beispiel weist die Vorrichtung 30 eine vierte Temperiereinheit 7d auf, die eine vierte, räumlich von den anderen Temperaturzonen getrennte Temperaturzone definiert. Im speziellen Fall stellt die rotierbare Achse R zugleich die vierte Temperiereinheit 7d dar, wobei zwei zylinderförmige, temperierbare  
5 Blöcke 6 ober- und unterhalb der Probenzelle 10 im Bereich des DNA-Chips angeordnet sind. Durch die vierte Temperiereinheit 7d der Vorrichtung wird es möglich, Teilbereiche der Probenzelle, insbesondere den Bereich, in dem sich der Sensor befindet in einer vierten Temperaturzone, die eine für die oberflächensensitive Detektion von Nukleinsäure-Hybridisierungsereignissen  
10 optimale Temperatur bereitstellt, zu positionieren.

Durch eine geeignete Wahl der Blockgeometrie kann der Bereich, in dem die Probenzelle auf eine bestimmte Temperatur erwärmt wird, festgelegt werden. Im vorliegenden Beispiel wurde ein Verhältnis von 2:1:1 des Bereiches mit 72°C zu  
15 den Bereichen mit 95°C und 55°C gewählt. Zwischen den Blöcken ist jeweils ein Luftspalt, um einen Wärmeübertrag zwischen den Blöcken zu verhindern. Durch Variation der Rotationsfrequenz kann die Zeit, in der die kritischen Temperaturen für die PCR-Reaktion an der Probenzelle 10 anliegen, variiert werden.

20

### *Beispiel 3:*

#### *DNA-Chip und Sondenimmobilisierung*

Eine elektrochemische Messvariante von Hybridisierungsereignissen und die  
25 Sondenimmobilisierung auf dem DNA-Chip 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. Ein CMOS-basierter DNA-  
30 Chip für die elektrochemische Detektion der Hybridisierung zwischen Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomeren ist z.B. in Augustyniak, M.; Paulus, C.; Brederlow, R.; 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.

5 *Beispiel 4:*

*Durchführung einer Real-Time PCR*

Der Mastermix für die PCR Reaktion zur Amplifikation einer Zielsequenz, nämlich  
Target-Nukleinsäureoligomere von *Campylobacter jejuni* (Template-Menge ca.  $10^3$   
10 Kopien, isoliert aus *Campylobacter jejuni* Reinkultur) enthält entsprechende Primer  
(10  $\mu$ M), den dNTP-Mix (je dNTP 25  $\mu$ M) und MgAc (3 mM) in einem Standard  
PCR-Puffer (5 x Bicine Puffer, 250 mM Bicine/KOH, pH 8.2; 575 mM K-Acetat,  
40% Glycerol (v/v), Bicine = N,N-Bis(2-hydroxyethyl)Glycin). Zu diesem Mastermix  
wird das Template und Signal-Nukleinsäureoligomere (50nM), die komplementär zu  
15 einem Teilbereich der Target-Nukleinsäureoligomere sind, sowie Kontroll-Signal-  
Nukleinsäureoligomere (50 nM), die vollständig nicht-komplementär zu DNA-  
Sequenzen der Template-Lösung sind, gegeben. Unmittelbar vor Start der PCR-  
Reaktion wird PCR-Polymerase zugefügt und die Lösung in die Probenzelle 10,  
wie in der Figur 3 gezeigt, gefüllt.

20 Vor Start der PCR wird das in der Probenzelle 10 vorliegende Reaktionsgemisch in  
der Vorrichtung 30, wie in der Figur 2 gezeigt, 3 min auf 95°C erhitzt, anschließend  
abgekühlt und eine erste Messung am integrierten DNA-Chip 20 durchgeführt. Der  
DNA-Chip 20 trägt an einer der bereitgestellten Teststellen Sonden-  
25 Nukleinsäureoligomere, die komplementär zu den Signal-Nukleinsäureoligomeren  
sind und an einer weiteren Teststelle Sonden, die komplementär zu den Kontroll-  
Signal-Nukleinsäureoligomeren sind. Diese erste Messung findet bei 62°C statt, ca.  
4°C unter der Schmelztemperatur des Hybrids aus Sonden- und Signal-  
Nukleinsäureoligomeren unter den Bedingungen in der Reaktionslösung und  
30 deutlich unter der Schmelztemperatur des Hybrids aus Target- und Signal-  
Nukleinsäureoligomeren (das Signal-Nukleinsäureoligomer hat mehr matchende  
Basen zum Target-Nukleinsäureoligomer als zum Sonden-Nukleinsäureoligomer).  
Die Schmelztemperatur des Hybrids aus Kontroll-Sonden-Nukleinsäureoligomer  
und Kontroll-Signal-Nukleinsäureoligomer unter den Bedingungen in der

Reaktionslösung ist identisch zur Schmelztemperatur des Hybrids aus Sonden- und Signal-Nukleinsäureoligomeren. Das Ergebnis dieser Normierungsmessung ist in der Figur 4A gezeigt. Die Messung an der Kontrollteststelle ist mit K gekennzeichnet.

5

Die in den Figuren 4A, 4B, 4C dargestellten Kurven stellen den integralen Oxidationsstrom der Ferrocenmarkierungen von den an die Sonden-Nukleinsäureoligomere hybridisierten Signal-Nukleinsäureoligomere in Abhängigkeit von der Zeit dar und spiegeln somit den Hybridisierungsgrad bzw. die Hybridisierungseffizienz wider. Die Hybridisierungseffizienz ist wiederum abhängig von der Konzentration freier Signal-Nukleinsäureoligomere und somit indirekt von der Konzentration bzw. der Menge an Target-Nukleinsäureoligomeren.

Nach der Normierungsmessung wird die PCR-Reaktion gestartet, die temperierbaren Blöcke der Vorrichtung 30 werden dazu auf 96°C (Aufschmelzen), 55°C (Annealing) und 72°C (Elongation) eingestellt und die Probenzelle 10 wird mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 2 Umdrehungen pro Minute (i.e. 2 Zyklen pro Minute) in den temperierbaren Blöcken gedreht. Das nahezu zentrisch ausgerichtete Sensorfeld 20a des DNA-Chips 20 wird über einen weiteren temperierbaren Block bei ca. 50°C gehalten, um dann – vor einer erneuten Messung - zunächst auf 95°C aufgeheizt zu werden, um die Signal-Nukleinsäureoligomere, die während einer vorausgegangenen Messung an die Sonden-Nukleinsäureoligomere hybridisiert sind, von diesen wieder zu dehybridisieren. Die Temperatur wird schließlich erneut auf 62°C eingestellt, um eine weitere Messung der Hybridisierung von Signal-Nukleinsäureoligomeren an die freien Sonden-Nukleinsäureoligomere zu ermöglichen. Während einer Messung des Hybridisierungsvorgangs am DNA-Chip 20 wird die Probenzelle 10 in der Regel nicht gedreht.

30 In den Figuren 4B und 4C sind Ergebnisse weiterer Messungen nach 10 bzw. 20 Zyklen der PCR dargestellt. Man beobachtet eine leichte, etwa 20%ige Abnahme der Hybridisierungseffizienz (des Maximalsignals der elektrochemischen Messung) an der Kontrollteststelle (in den Graphen mit K gekennzeichnet), wohingegen die Hybridisierungseffizienz an der eigentlichen Detektionsteststelle mit zunehmender

Amplifikationsrate der Target-Nukleinsäureoligomere, wie erwartet, signifikant abnimmt (etwa um den Faktor 6).

5 *Beispiel 5:*

*Durchführung einer Multiplex Real-Time PCR*

Die Versuchsführung erfolgt wie im Beispiel 3 beschrieben, jedoch ohne Zugabe von Target-Nukleinsäureoligomeren von *Campylobacter jejuni*. Verwendet wurde  
10 ein DNA Chip 20 mit 24 Teststellen zur Erfassung von Target-Nukleinsäureoligomeren verschiedener Subtypen des Humanen Papilloma Virus in einer Probe. Die Figur 5 zeigt das Ergebnis einer solchen closed tube Multiplex Real-Time PCR mit elektrischer Detektion an 24 Teststellen eines DNA-Chips.

15 In der Figur 5 sind für jede Teststelle zwei Messkurven, nämlich die der ersten Messung vor Start der PCR (5.1) und die der Messung nach 25 Zyklen der PCR (5.2) gezeigt. Die Kurven geben dabei den Stromfluss (angegeben in nA) an der jeweiligen Teststelle wieder. Die beiden Messungen sind für nahezu alle  
20 Teststellen im wesentlichen identisch, d.h. die entsprechenden Subtypen (in den jeweiligen Graphen mit dem Zusatz „low“ bzw. „high“ indiziert) waren nicht vorhanden. Die Subtypen HPV\_6low (siehe Fig. 5C), HPV\_16high und HPV\_18high (siehe Fig. 5D) konnten nachgewiesen werden, bei der Teststelle für HPV\_11low (siehe Fig. 5C) ist die leichte Abnahme nach 25 Zyklen auf eine suboptimale Teststelle mit per se geringer Signalstärke zurückzuführen.

**Bezugszeichenliste**

	1	Target-Nukleinsäureoligomer
	2	Signal-Nukleinsäureoligomer
5	3	Ferrocen
	4	Teststelle
	5	Sonden-Nukleinsäureoligomer
	6	temperierbarer Block
	7a	Temperiereinheit
10	7c	Temperiereinheit
	7d	Temperiereinheit
	8	Hohlraum
	8.1	Brückenkanal
	9	Federkontakte
15	10	Probenzelle
	11	Einfüllöffnungen
	12	Hybrid aus Target- und Signal-Nukleinsäureoligomer
	13	Spalt
	20	Sensor
20	20a	Sensorfeld
	25	Hybrid aus Signal- und Sonden-Nukleinsäureoligomer
	30	Vorrichtung zur Durchführung einer PCR
	R	rotierbare Achse
	K	Messkurve Kontrollteststelle

### Patentansprüche

1. Verfahren zur 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 besteht,
- b) Bereitstellen einer Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren,
- 10 c) Bereitstellen einer Lösung mit wenigstens einer Art von Signal-Nukleinsäureoligomeren, wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere mit zumindest einem Detektionslabel modifiziert sind, die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Sonden-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen
- 15 und die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen,
- d) Bereitstellen einer Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation, wobei die Reaktionslösung zumindest
- 20 Nukleotide und wenigstens eine Art von Nukleinsäure-Polymerase enthält,
- e) Vermischen und Inkontaktbringen mit der modifizierten Oberfläche von
- der Lösung mit Signal-Nukleinsäureoligomeren,
  - der Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren und
  - der Reaktionslösung zur Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation,
- 25 wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch in einer Konzentration von  $10^{-17}$  mol/l bis  $10^{-3}$  mol/l vorliegen und die Target-Nukleinsäureoligomere in dem hergestellten Gemisch in einer Konzentration von bis zu  $10^{-7}$  mol/l vorliegen,
- f) erste Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine
- 30 oberflächensensitive Detektionsmethode,
- g) Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere mittels Nukleinsäureamplifikation,
- h) zweite Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Methode,

- i) Vergleich der in Schritt h) erhaltenen Werte mit den in Schritt f) erhaltenen Werten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere in Schritt g) durch eine PCR erfolgt und die in Schritt d) bereitgestellte Reaktionslösung zusätzlich zumindest eine Art von Primer enthält, oder die Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere in Schritt g) durch eine isothermale Amplifikation erfolgt.
- 10 3. Verfahren nach zumindest einem der Ansprüche 1 und 2, wobei vor einer Durchführung des Schrittes h) der Schritt g) zumindest 5 mal, insbesondere zumindest 10 mal, bevorzugt zumindest 20 mal durchgeführt wird.
- 15 4. Verfahren nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Konzentration der Signal-Nukleinsäureoligomere in dem in Schritt e) hergestellten Gemisch zwischen  $10^{-15}$  mol/l und  $10^{-5}$  mol/l, bevorzugt zwischen  $10^{-13}$  mol/l und  $10^{-7}$  mol/l, besonders bevorzugt zwischen  $10^{-11}$  mol/l und  $10^{-7}$  mol/l beträgt.
- 20 5. Verfahren nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Konzentration der Target-Nukleinsäureoligomere in dem in Schritt e) hergestellten Gemisch bis zu  $10^{-9}$  mol/l, bevorzugt bis zu  $10^{-11}$  mol/l, besonders bevorzugt bis zu  $10^{-13}$  mol/l I beträgt.
- 25 6. Verfahren nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei als oberflächensensitive Detektionsmethode eine spektroskopische, elektrochemische oder elektrochemolumineszente Detektionsmethode eingesetzt wird.
- 30 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die elektrochemische Detektion durch Amperometrie, Chronocoulometrie, Impedanzmessung oder Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) erfolgt und wobei die spektroskopische Detektion durch Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRF) oder Surface Plasmon Resonance (SPR) erfolgt.

8. Verfahren nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Modifikation der in Schritt a) bereitgestellten modifizierten Oberfläche in der Anbindung von mehreren Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren besteht und die verschiedenen Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die modifizierte Oberfläche gebunden sind.
9. Verfahren nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die in Schritt a) bereitgestellte modifizierte Oberfläche eine Fläche von  $1 \mu\text{m}^2$  bis zu  $1 \text{mm}^2$ , bevorzugt eine Fläche von  $10 \mu\text{m}^2$  bis zu  $100 \mu\text{m}^2$ , besonders bevorzugt eine Fläche von rund  $50 \mu\text{m}^2$  aufweist.
10. Verfahren nach zumindest einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei nach der ersten Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Detektionsmethode und vor einer zweiten Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Detektionsmethode Bedingungen eingestellt oder Maßnahmen ergriffen werden, die zur zumindest überwiegenden Dissoziation von Sonden-Nukleinsäureoligomeren und Signal-Nukleinsäureoligomeren führen.
11. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach zumindest einem der Ansprüche 1 bis 10 umfassend eine modifizierte Oberfläche wie in zumindest einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert und eine effektive Menge an Signal-Nukleinsäureoligomeren wie in zumindest einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert.

Fig. 1A

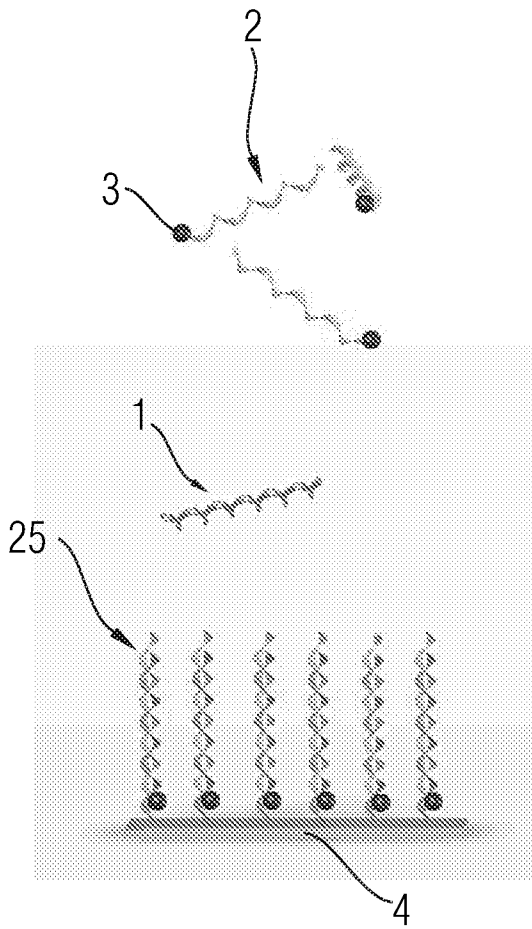


Fig. 1B

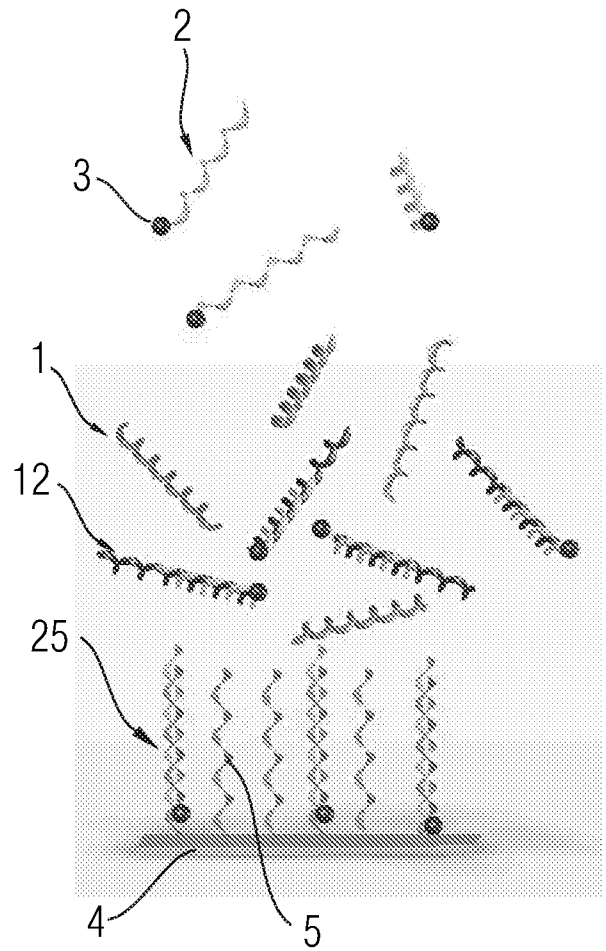


Fig. 2

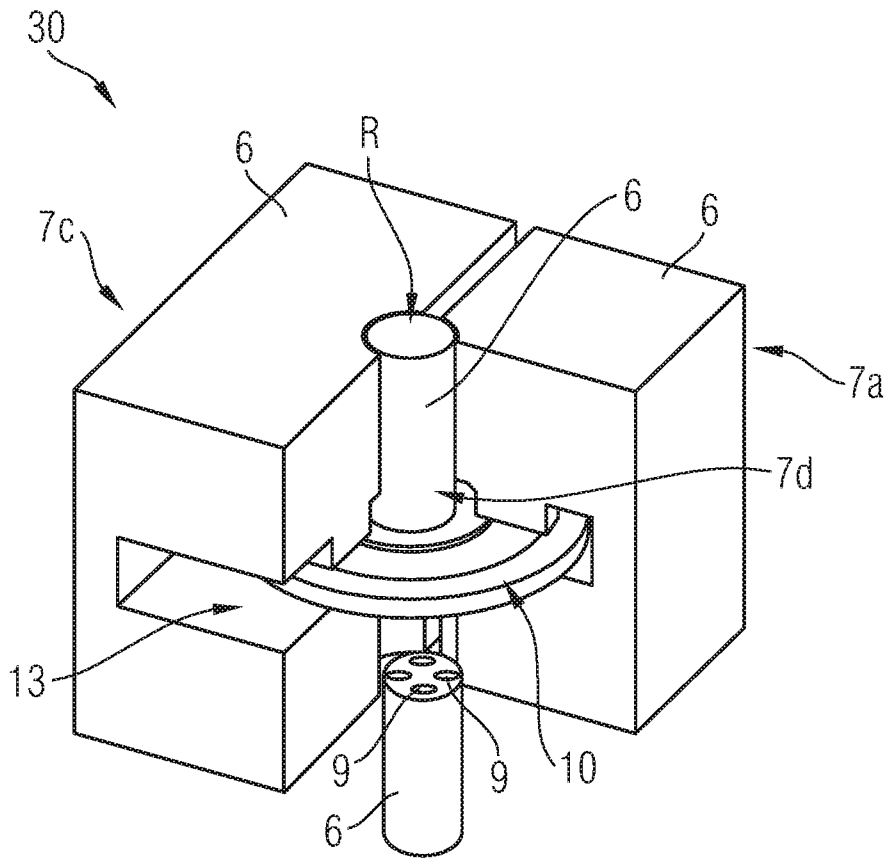


Fig. 3

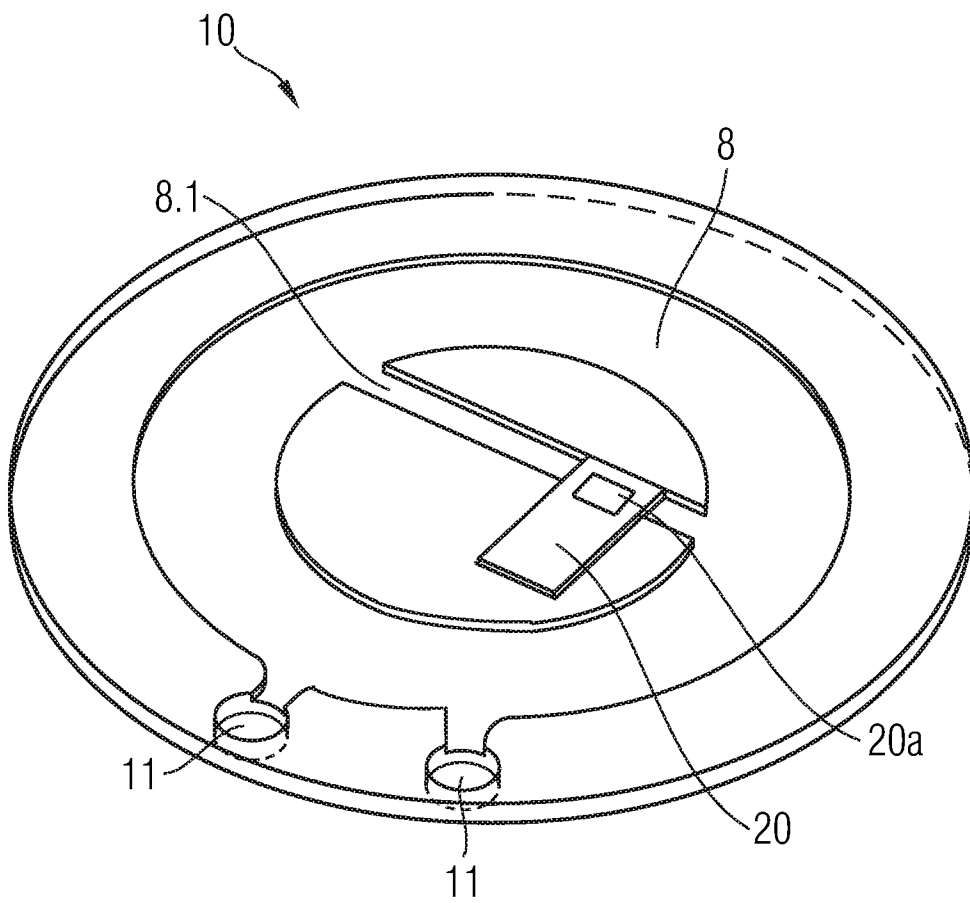


Fig. 4A

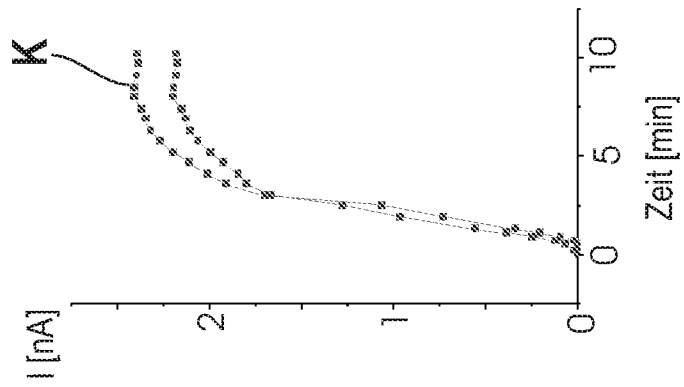


Fig. 4B

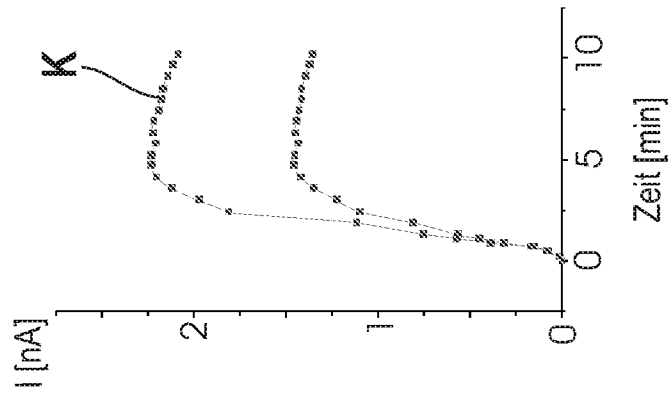


Fig. 4C

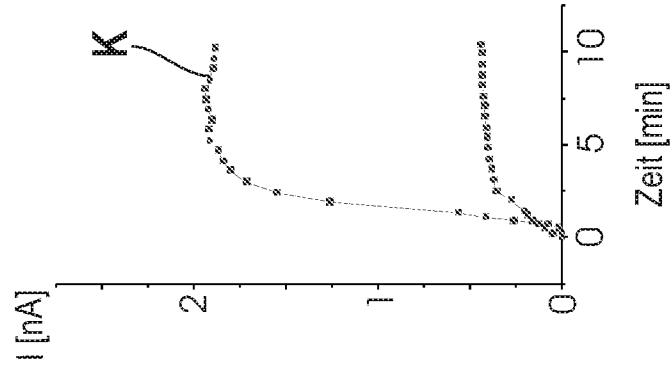


Fig. 5A

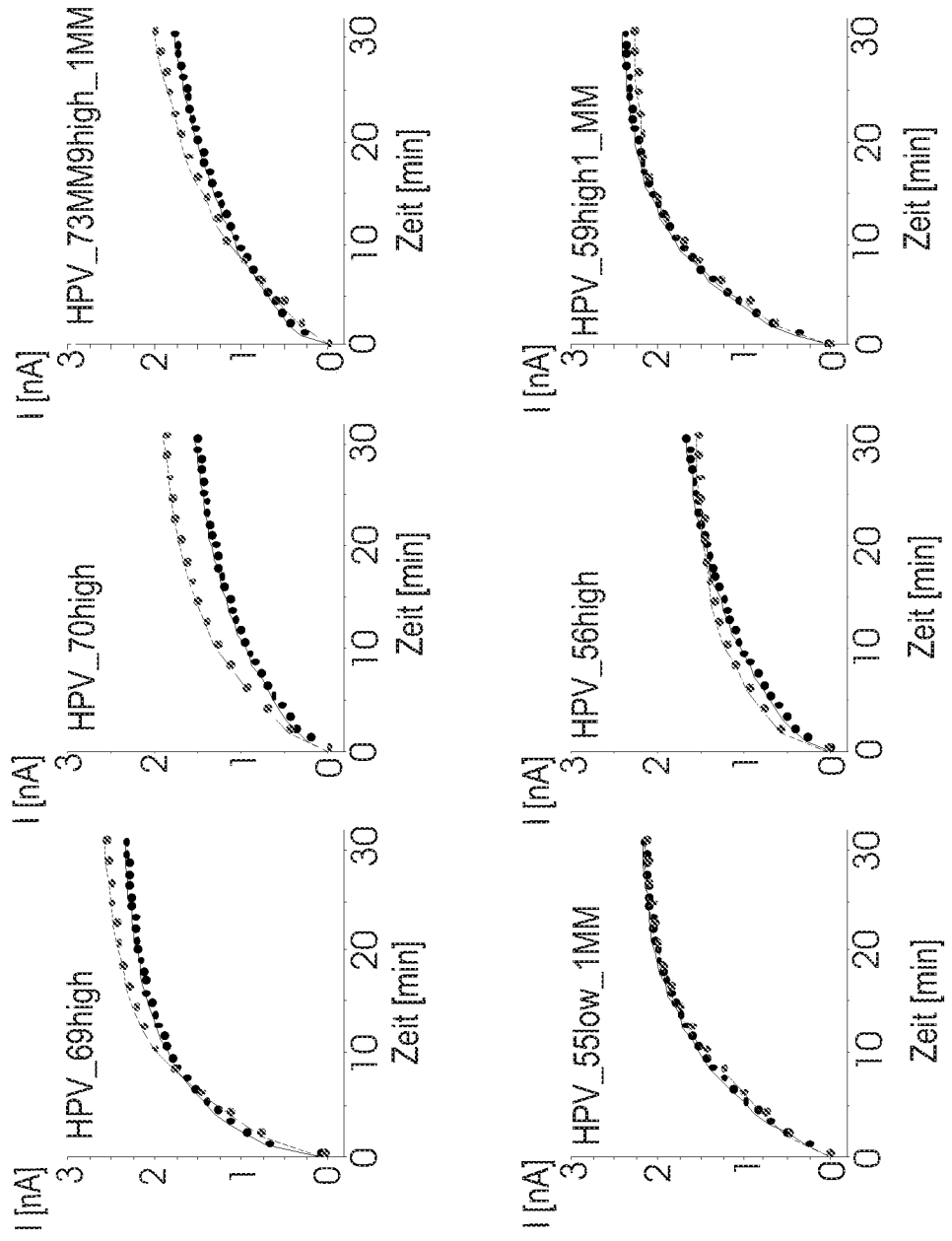


Fig. 5B

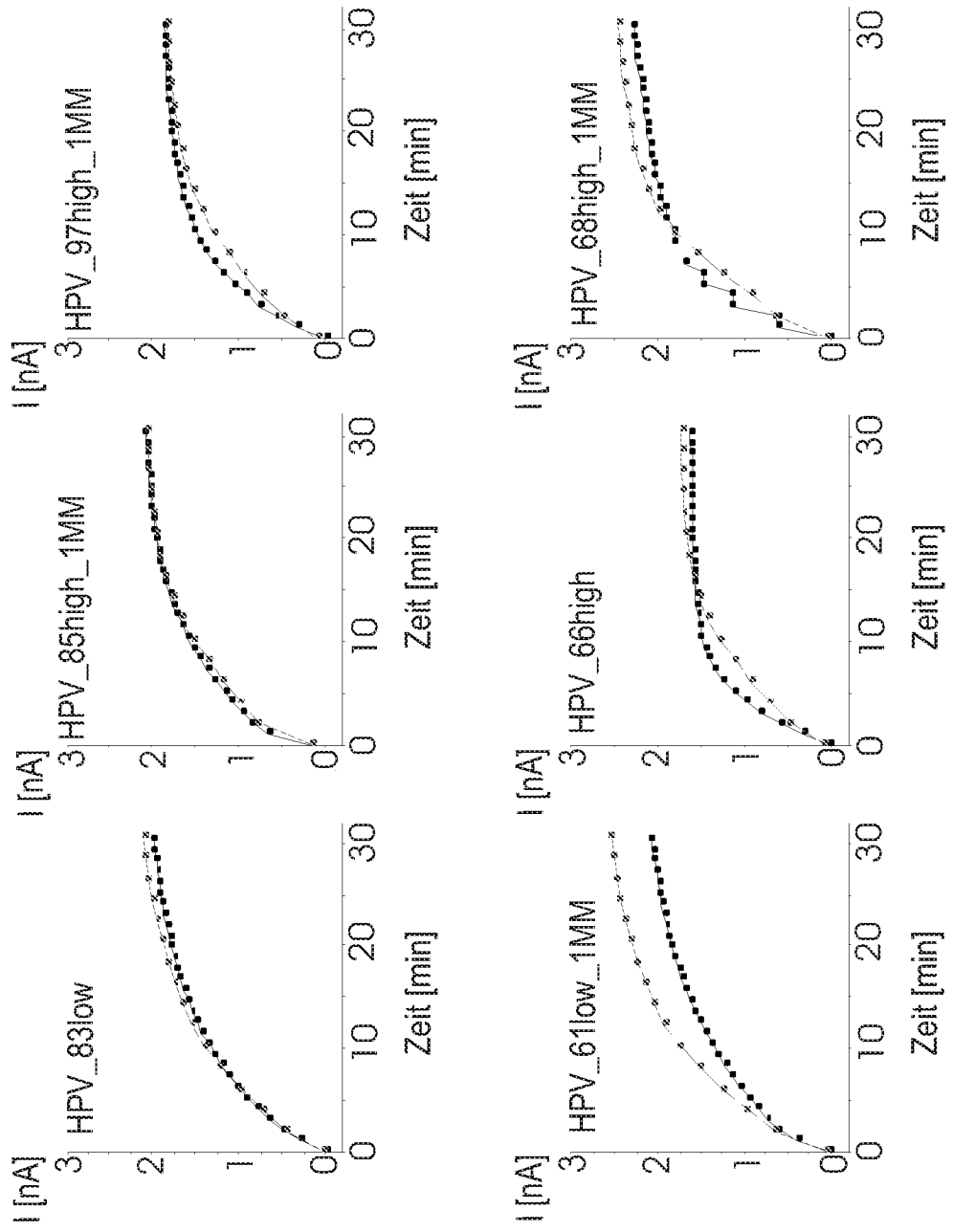


Fig. 5C

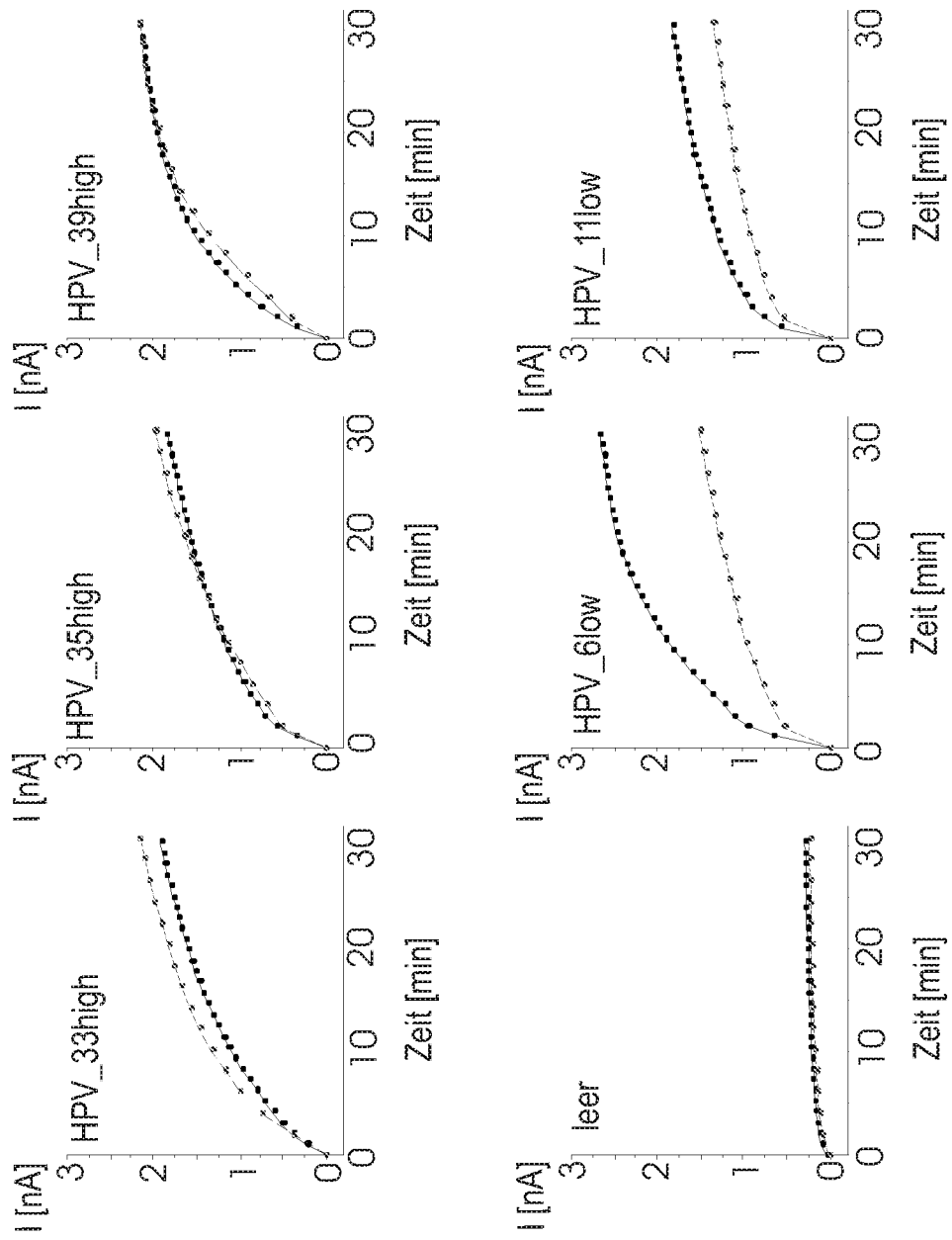
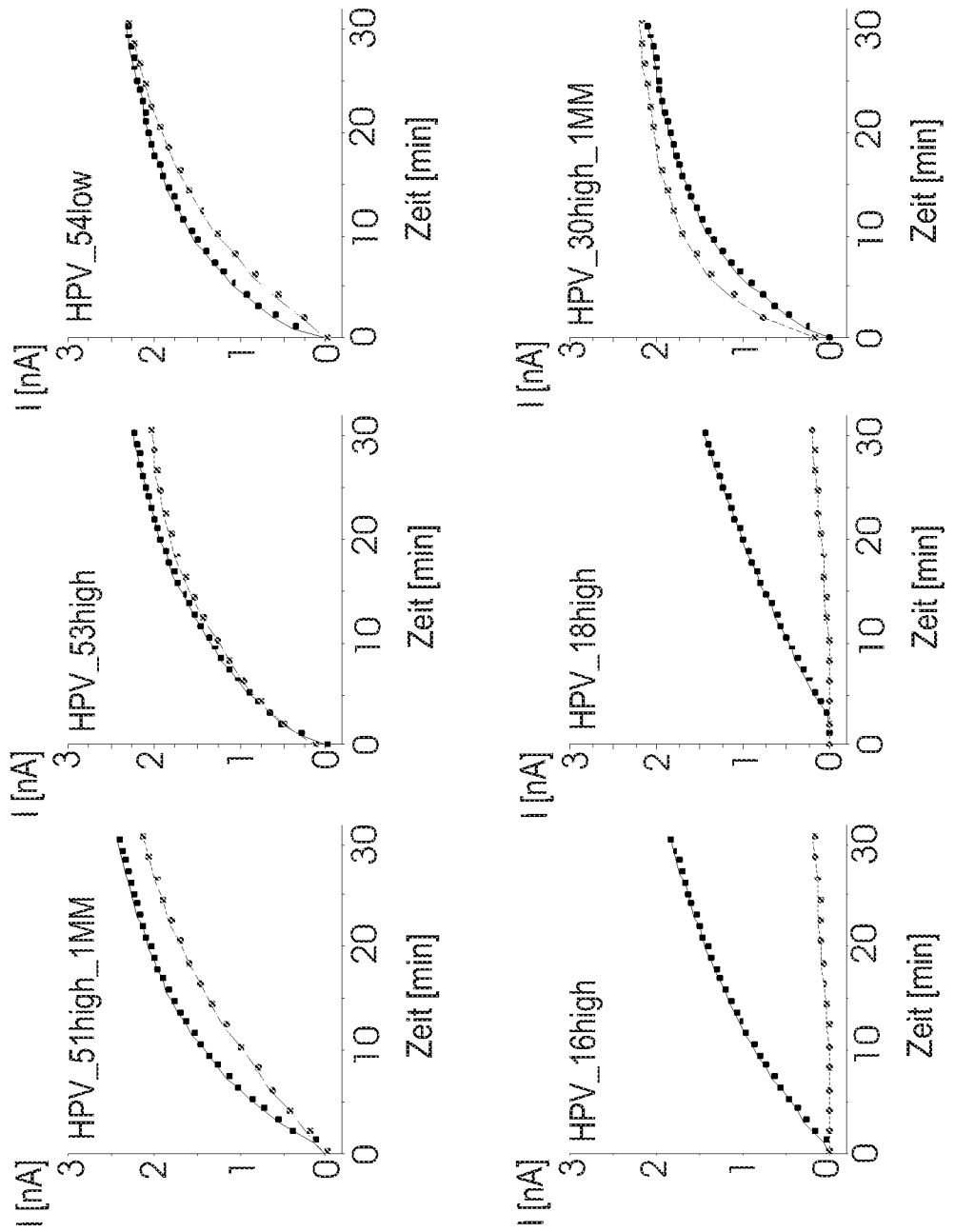


Fig. 5D



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DE2010/075152
---

**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 practical, search terms used)  
 EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, 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	US 2002/115088 A1 (KURN NURITH [US]) 22 August 2002 (2002-08-22) siehe ganzes dokument, bes. par. 49-54 und Ansprüche	1-11
X	----- US 2004/110214 A1 (KIM KYU WON [KR] ET AL) 10 June 2004 (2004-06-10) the whole document	1-11
X	----- EP 2 039 781 A1 (FIDICULA GMBH [DE]) 25 March 2009 (2009-03-25) the whole document	11
A	----- WO 00/42217 A2 (HARTWICH GERHARD [DE]) 20 July 2000 (2000-07-20) the whole document -----	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  <b>14 April 2011</b>	Date of mailing of the international search report  <b>28/04/2011</b>
---	---

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  <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Mueller, Frank</p>
--	---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/DE2010/075152
---

Patent document cited in search report	Publication date	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002115088	A1	22-08-2002	NONE	
US 2004110214	A1	10-06-2004	KR 20040050587 A	16-06-2004
EP 2039781	A1	25-03-2009	DE 102007044664 A1	02-04-2009
			US 2010041030 A1	18-02-2010
WO 0042217	A2	20-07-2000	AT 238436 T	15-05-2003
			AU 758063 B2	13-03-2003
			BR 0007571 A	27-11-2001
			CA 2371938 A1	20-07-2000
			CN 1352697 A	05-06-2002
			CZ 20012503 A3	16-01-2002
			DE 50001859 D1	28-05-2003
			EP 1144685 A2	17-10-2001
			ES 2198282 T3	01-02-2004
			HU 0105170 A2	29-05-2002
			JP 2003521465 T	15-07-2003
			MX PA01007183 A	06-05-2002
			NO 20013471 A	13-09-2001
			SI 1144685 T1	31-10-2003
			TR 200101930 T2	21-06-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2010/075152

## 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, BIOSIS, Sequence Search, 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	US 2002/115088 A1 (KURN NURITH [US]) 22. August 2002 (2002-08-22) siehe ganzes dokument, bes. par. 49-54 und Ansprüche	1-11
X	US 2004/110214 A1 (KIM KYU WON [KR] ET AL) 10. Juni 2004 (2004-06-10) das ganze Dokument	1-11
X	EP 2 039 781 A1 (FIDICULA GMBH [DE]) 25. März 2009 (2009-03-25) das ganze Dokument	11
A	WO 00/42217 A2 (HARTWICH GERHARD [DE]) 20. Juli 2000 (2000-07-20) das ganze Dokument	1-11

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" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. April 2011

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/04/2011

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

Mueller, Frank

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2010/075152

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2002115088	A1	22-08-2002 KEINE	
US 2004110214	A1	10-06-2004 KR 20040050587 A	16-06-2004
EP 2039781	A1	25-03-2009 DE 102007044664 A1 US 2010041030 A1	02-04-2009 18-02-2010
WO 0042217	A2	20-07-2000 AT 238436 T AU 758063 B2 BR 0007571 A CA 2371938 A1 CN 1352697 A CZ 20012503 A3 DE 50001859 D1 EP 1144685 A2 ES 2198282 T3 HU 0105170 A2 JP 2003521465 T MX PA01007183 A NO 20013471 A SI 1144685 T1 TR 200101930 T2	15-05-2003 13-03-2003 27-11-2001 20-07-2000 05-06-2002 16-01-2002 28-05-2003 17-10-2001 01-02-2004 29-05-2002 15-07-2003 06-05-2002 13-09-2001 31-10-2003 21-06-2002