PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:
C12Q 1/68, G09F 3/00	A1	**WO 99/13102**
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. März 1999 (18.03.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02615

(22) Internationales Anmeldedatum: 4. September 1998 (04.09.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 38 816.7 5. September 1997 (05.09.97) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BERTLING GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Am Heusteg 47, D–91056 Erlangen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D–91056 Erlangen (DE). KOSAK, Hans [DE/DE]; Johanna–Kirchner–Strasse 26, D–53123 Bonn (DE).

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nürnberger Strasse 69/71, D–91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD FOR MARKING SOLID, LIQUID OR GASEOUS SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MARKIERUNG VON FESTEN, FLÜSSIGEN ODER GASFÖRMIGEN SUBSTANZEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for marking solid, liquid or gaseous substances, whereby the substance to be marked is provided with at least one synthetically produced nucleic acid sequence. Said nucleic acid sequence contains a first sequence section constructed with the 5' terminal end, a second sequence comprised of at least two bases and connected to said nucleic acid sequence, and a third sequence section constructed with the 3' terminal end and connected to the said nucleic acid sequence. In order to simplify the identification of the marking, the invention provides that a first primer group is used with a first primer section corresponding to the first sequence section and a second primer group is used with a third primer section corresponding to the third sequence section. Every primer group four comprises differing primer variants in at least one additional respective base which is provided on the end so that exactly one primer variant of the first primer group together with exactly one primer variant of the second primer group is complimentary to the nucleic acid sequence.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Markierung von festen, flüssigen oder gasförmigen Substanzen, wobei die zu markierende Substanz mit mindestens einer synthetisch hergestellten Nukleinsäuresequenz versehen wird, die einen ersten das 5'–terminale Ende bildenden Sequenzabschnitt, einen damit verbundenen zweiten aus mindestens zwei Basen bestehenden Sequenzabschnitt und einen damit verbundenen dritten das 3'–terminale Ende bildenden Sequenzabschnitt aufweist. Zur Vereinfachung der Identifizierung der Markierung wird vorgeschlagen, daß eine erste Primergruppe mit einem zum ersten Sequenzabschnitt korrespondierenden ersten Primerabschnitt und eine zweite Primergruppe mit einem zum dritten Sequenzabschnitt korrespondierenden dritten Primerabschnitt verwendet wird, wobei jede der Primergruppen vier, sich jeweils in mindestens einer zusätzlichen endständig vorgesehenen Base unter scheidende Primervarianten umfaßt, so daß genau eine Primervariante der ersten Primergruppe zusammen mit genau einer Primervariante der zweiten Primergruppe zur Nukleinsäuresequenz komplementär ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Verfahren zur Markierung von festen, flüssigen oder gasförmigen Substanzen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1. Sie betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1.

Ein solches Verfahren ist aus der US 5,643,728 bekannt. Dabei ist die Markierung in einem bestimmten Sequenzabschnitt einer Nukleinsäuresequenz enthalten. Zur Identifikation der Markierung wird die Nukleinsäuresequenz unter Anwendung der Polymerase-Ketten-Raektion (PCR) vervielfältigt. Anschließend wird die im vervielfältigten Produkt enthaltende Markierung mittels Sequenzierung identifiziert.

Ein weiteres Verfahren ist aus der DE 44 39 896 A1 bekannt. Dabei beherbergen die der zu markierenden Substanz zugefügten DNA-Moleküle einen Längenpolymorphismus, welcher die Markierung trägt. Zur Identifikation der Markierung werden die DNA-Moleküle mittels PCR vervielfältigt und dann einer Gel-Elektrophorese unterzogen. Die als Ergebnis der Gel-Elektopohrese beobachtbare Bandensequenz repräsentiert ähnlich einem Strichcode die Markierung. Die Bandensequenz kann auch in eine Zahl übersetzt werden.

Die vorerwähnten Verfahren sind in mehrfacher Hinsicht nachteilig:

a) Die Verfahren sind zeit- und kostenaufwendig, weil zur Identifikation der Markierung sowohl eine PCR als auch eine Gel-Elektroporese durchgeführt werden müssen;

b) die Verfahren sind schwer automatisierbar, weil die bei der PCR gebildeten Reaktionsprodukte zur Durchführung der Gel-Elektrophorese auf ein Gel übertragen werden müssen;

c) die Verfahren sind fehleranfällig, weil zu deren Durchführung eine Vielzahl von kontaminationsempfindlichen Pipettiervorgängen erforderlich sind;

d) die Verfahren sind aufwendig, weil zu einer Markierung einer Vielzahl von Substanzen die gleiche Anzahl an Markierungs-DNAs hergestellt werden muß.

Ein weiteres Verfahren ist aus der US 5,139,812 bekannt. Dabei wird eine vorgegebene Nukleinsäuresequenz enthaltende Tinte zur fälschungssicheren Markierung von Gegenständen verwendet. Um eine Mehrzahl von Gegenständen unterscheidbar zu markieren, werden mit der Tinte unterschiedliche Beschriftungen aufgebracht. Zur Identifikation einer solchermaßen aufgebrachten Markierung wird die Beschriftung mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Die Identifikation kann auch durch eine radioaktive Markierung der verwendeten Nukleinsäuresequenz erfolgen. - Dieses Verfahren ist vor allem deshalb nachteilig, weil die Aufbringung einer unterscheidbaren Markierung umständlich ist und zur Identifikation der markierte Gegenstand zerstört werden muß.

Aus der WO 95/17737 ist es weiterhin bekannt, zur Markierung von Kunstgegenständen das Blut des Künstlers zu verwenden. Zur Identifikation wird die Markierung mit einer hinterlegten weiteren Blutprobe mittels DNA-Analyse verglichen. - Dieses Verfahren ermöglicht nicht ohne weiteres die Herstellung einer Vielzahl unterschiedlicher Markierungen. Die Indentifikation ist aufwendig.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren und einen Kit zu dessen Durchführung anzugeben, mit dem eine Vielzahl von Substanzen oder Gegenständen fälschungssicher und unterscheidbar markier- und nachfolgend kostengünstig und schnell identifizierbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 20 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 19 und 21 bis 27.

Nach der verfahrensseitigen Lösung der Erfindung ist vorgesehen, daß zur Identifikation eine erste Primergruppe mit einem zum ersten Sequenzabschnitt korrespondierenden ersten Primerabschnitt und eine zweite Primergruppe mit einem zum dritten Sequenzabschnitt korrespondierenden dritten Primerabschnitt verwendet wird, wobei jede der Primergruppen vier, sich jeweils in mindestens einer zusätzlichen endständig vorgesehen Base unterscheidende Primervarianten umfaßt, so daß genau eine Primervariante der ersten Primergruppe zusammen mit genau einer Primervariante der zweiten Primergruppe eine Amplifikation der Nukleinsäuresequenz ermöglicht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann auf einfache Weise eine unterscheidbare Markierung bzw. innere Numerierung einer Vielzahl von Gegenständen erfolgen. Es können mit einer relative kleinen Anzahl unterschiedlicher Markierungs- bzw. Nukleinsäuresequenzen eine große Anzahl an unterschiedlichen Markierungen bereitgestellt werden. Die Markierungen sind schnell und ohne großen Aufwand identifizierbar.

Nach einer Ausgestaltung der Erfindung weist die Nukleinsäuresequenz mehr als 20, vorzugsweise 40 Nukleotide, auf.

Zur Markierung werden vorteilhafterweise Nukleinsäuresequenzen verwendet, die im zweiten Sequenzabschnitt sich unterscheiden. Dieser besteht vorteilhafterweise aus zwei Teilbereichen, von denen jeder mit mindestens einer Base besetzt ist. Die Kombination der beiden Teilbereiche ermöglicht die Darstellung von insgesamt sechzehn verschiedenen Nukleinsäurevarianten, nämlich Adenin (=A) - A, A - Thymidin (=T), A - Guanin (=G), A - Cytosin (=C), T - A, T - T, T - G, T - C, G - A, G - T, G - G, G - C, C - A, C - T, C - G, C - C. Die 16 Nukleinsäurevarianten bilden einen Nukleinsäuresatz.

Vorteilhafterweise ist der zweite Sequenzabschnitt aus zwei Teilbereichen gebildet, von denen mindestens einer aus einer Mehrzahl Basen besteht. Dementsprechend ist dann die korrespondierende Primervariante endständig mit derselben Anzahl korrespondierender Basen versehen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der Bildung von falschpositiven Proben drastisch reduziert. Der Teilbereich kann aus einer spezifischen Sequenz oder aus mehreren identischen Basen bestehen.

Zur Erhöhung der Kombinationsmöglichkeiten können weitere Nukleinsäuresätze verwendet werden, deren Nukleinsäurevarianten sich im ersten und dritten Sequenzabschnitt unterscheiden. Z.B. können zur Erhöhung der Kombinationsmöglichkeiten von 16 auf 16^2 die vorbeschriebenen Nukleinsäurevarianten eines Nukleinsäuresatzes mit weiteren Nukleinsäurevarianten kombiniert werden, die aus einem zweiten Nukleinsäuresatz ausgewählt sind. Der zweite Nukleinsäuresatz unterscheidet sich vom ersten Nukleinsäuresatz im ersten und dritten Sequenzabschnitt. Analog kann die Kodierungskapazität durch die Verwendung von n Nukleinsäuresätzen auf 16^n erhöht werden.

Der erste und der dritte Sequenzabschnitt weisen vorzugsweise die gleiche Anzahl von Nukleotiden auf. Die erste und der dritte Sequenzabschnitt sind zweckmäßigerweise so ausgebildet, daß sie unter vergleichbaren Stringenzbedingungen aufschmelzbar. - Das ermöglicht eine sehr einfache Amplifikation mittels Polymerase- (PCR) oder Ligase-Ketten-Reaktion (LCR).

Als Nukleinsäuresequenzen können selbstverständlich auch Nukleinsäurederivatsequenzen, insbesondere proteinartige Nukleinsäure (PNA) oder Phosphortionatnukleinsäuren (PTO) oder Hybride davon, verwendet werden. Derartige Nukleinsäurederivatsequenzen zeichnen sich zum Teil durch eine verbesserte Stabilität aus.

Zum Schutz einer oder mehrerer auf feste Gegenstände aufgetragenen Nukleinsäuresequenz/en kann/können diese durch eine Schutzschicht, wie Wachs, abgedeckt sein. Die Nukleinsäuresequenz/en kann/können weiterhin Bestandteil einer auf feste Gegenstände aufgetragenen Schicht, wie einem Lack, sein. Auch durch Impregnation oder Mischung kann eine Markierung bewirkt werden.

Zur Identifikation der mindestens einen Nukleinsäuresequenz wird diese zweckmäßigerweise extrahiert und eine die Nukleinsäuresequenz enthaltende Lösung hergestellt. Die Nukleinsäuresequenz kann dann unter Verwendung der Primervarianten mittels PCR oder LCR vervielfältigt werden. Die vervielfältigte Nukleinsäuresequenz bzw. das Amplifikat wird zweckmäßigerweise nachfolgend mittels Fluoreszenz, DNA, Gel-Elektrophorese, Restriktionsanalyse, Hybridisierung oder mittels Sequenzierung nachgewiesen. Der Nachweis mittels Fluoreszenz ist besonders einfach und schnell durchzuführen. Er kann direkt in einer Mikrotiterplatte erfolgen.

Erfindungsgemäß ist zur Durchführung des Verfahrens ein Kit zur Identifikation einer Markierung, wobei der Kit eine erste Primergruppe mit einem zum ersten Sequenzabschnitt korrespondierenden ersten Primerabschnitt und eine zweite Primergruppe mit einem zum dritten Sequenzabschnitt korrespondierenden dritten Primerabschnitt aufweist, wobei jede der Primergruppen vier sich jeweils in mindestens einer zusätzlichen endständig vorgesehen Base unterscheidende Primervarianten umfaßt, so daß genau eine Primervariante der ersten Primergruppe zusammen mit genau einer Primervariante der zweiten Primergruppe zur Nukleinsäuresequenz komplementär ist.

Vorteilhafterweise weisen die Primervarianten dieselbe oder eine ähnliche Anzahl an Nukleotiden auf. Sie können insbesondere mehr als 10 Nukleotide, vorzugsweise 20 Nukleotide, aufweisen. Insbesondere sind alle Primervarianten mit der Nukleinsäuresequenz unter ähnlichen oder vergleichbare Stringenzbedingungen aufschmelzbar.

Zur Erleichterung des Handlings kann jede der Primervarianten separat von einem Trägermittel aufgenommen sein, wobei das Trägermittel eine Lösung, ein Kunststoff und/oder Mikrokapseln ist/sind. Als besonders vorteilhaft wird es angesehen, daß jeweils zwei unterschiedliche Primervarianten als Gemisch vorliegen, wobei die eine Primervariante aus der erste und die andere Primervariante aus der zweiten Primergruppe ausgewählt ist.

Der Kit kann selbstverständlich auch weitere Primergruppen enthalten, von denen jede jeweils eine zu einem weiteren Nukleinsäuresatz komplementäre Primervariante enthält.

Das Verfahren und der Kit eignen sich insbesondere zur Markierung und Identifikation fester Substanzen, wie Zahlungsmittel, Dokumente, Datenträger und dergleichen. Gleichfalls können flüssige Stoffe, insbesondere Medikamente, Chemikalien, Lebensmittel und dergleichen gasförmige Stoffe, insbesondere Abgase und dergleichen markiert und identifiziert werden.

Nachfolgend wird ein Ausführungsbeispiel der Erfindung anhand der Zeichnung beschrieben. Hierin zeigen

Fig. 1 eine schematisch dargestellte Nukleinsäuresequenz,

Fig. 2 eine tabellarische Übersicht über die Kombinationsmöglichkeiten des zweiten Sequenzabschnitts,

Fig. 3 eine Übersicht über die Kobinationsmöglichkeiten mit 2 x 4 Primervarianten bei der PCR,

Fig. 4 eine schematische Darstellung des Funktionsmechanismus der Vervielfältigung der Nukleinsäuresequenzen mittels PCT,

Fig. 5 eine Übersicht über die Kobinationsmöglichkeiten mit 2 x 4 Primervarianten bei der LCR,

Fig. 6 eine schematische Darstellung des Funktionsmechanismus der Vervielfältigung der Nukleinsäuresequenzen mittels LCR,

Fig. 7 die Identifizierung eines Codes und

Fig. 8 eine schematische Darstellung des Funktionsmechanismus zur Minimierung von Basenfehlpaarungen.

In Fig. 1 ist schematisch eine Nukleinsäuresequenz gezeigt. Sie besteht aus einer ersten 1 das 5'-terminale Ende bildenden Sequenzabschnitt, einem damit verbundenen zweiten Sequenzabschnitt 2, der wiederum mit einem das 3'-terminale Ende bildenden dritten Sequenzabschnitt 3 verbunden ist.

Fig. 2 zeigt in einer tabellarischen Übersicht schematisch die sich aus einer Variation der Basen des zweiten Sequenzabschnitts ergebenden unterschiedlichen Nukleinsäurevarianten. Der erste Sequenzabschnitt 1 und der dritte Sequenzabschnitt 3 bestehen aus jeweils neunzehn Basen. Der diese beiden Sequenzabschnitte verbindende zweite Sequenzabschnitt 2 besteht aus zwei Basen. Dabei steht A für die Base Adenin, G für Guanin, C für Cytosin und T für Thymidin.

Die beiden Basen des zweiten Sequenzabschnitts besetzen die Positionen 20 und 21 der Nukleinsäuresequenz. Wie aus der Fig. 2 ersichtlich ist, können bei gleichbleibendem ersten und dritten Sequenzabschnitt 1 bzw. 3 durch unterschiedliche Besetzung der beiden Basen des zweiten Sequenzabschnitts 2 sechzehn unterschiedliche Nukleinsäurevarianten dargestellt werden. Mittels der sechzehn Nukleinsäurevarianten ist es möglich, sechzehn verschiedene Markierungen herzustellen.

Fig. 3 beschreibt die Kombinationen, welche mit einer ersten PG1 und einer zweiten Primergruppe PG2 mit je vier Primervarianten möglich sind. Der 5'-Abschnitt der Primervarianten ist komplementär mit dem ersten bzw. dritten Abschnitt der Nukleinsäuresequenz N. Das 3'-Ende der Primervarianten trägt jeweils eine der vier Basen A, T, G, C. Durch die Kombination

der Primervarianten der ersten PG1 und der zweiten Primergruppe PG2 können sich 16 verschiedene Sequenzen im zweiten Sequenzabschnitt 2 der Nukleinsäuresequenz N hybridisiert werden.

Zur Identifikation insbesondere einer sich lediglich im zweiten Sequenzabschnitt unterscheidenden Nukleinsäuresequenz wird diese zunächst in Lösung gebracht. Die Lösung wird einer PCR unterzogen. Wie aus Fig. 4 ersichtlich ist, werden dabei Primer verwendet, die nur dann mit dem ersten und dritten Sequenzabschnitt 1 bzw. 3 hybridisieren, sofern auch Übereinstimmung mit der sich daran jeweils anschließenden Base des zweiten Sequenzabschnitts 2 besteht. Zur Durchführung der PCR und damit zur Identifikation der Nukleinsäuresequenz sind demzufolge zwei Gruppen unterschiedlicher Primer erforderlich. Eine erste Primergruppe PG1 weist einen zum ersten Sequenzabschnitt 1 korrespondierenden ersten Primerabschnitt auf; eine zweite Primergruppe PG2 weist einen zum dritten Sequenzabschnitt 3 korrespondierenden dritten Primerabschnitt auf. Jeder der Primergruppe PG1, PG2 umfaßt vier Primervarianten PV1 - PV8, welche sich in der jeweils endständig vorgesehenen Base unterscheiden.

Zur Identifikation wird jeweils eine Primervariante PV1 - PV4 der ersten Primergruppe PG1 mit einer Primervariante PV5 - PV8 der zweiten Primergruppe PG2 kombiniert. Es ergeben sich sechzehn mögliche Kombinationen. Die zu identifizierende Nukleinsäuresequenz enthaltende Lösung wird einer PCR jeder der sechzehn Kombinationen unterzogen. Eine Amplifikation wird nur dort beobachtet, wo die Primerkombination eine Hybridisierung mit der zu identifizierenden Nukleinsäuresequenz erlaubt. Die Identifikation kann z.B. dadurch erfolgen, daß das Amplifikat fluoresziert. Die identifizierte Nukleinsäurese-

quenz kann einem vorgegebenen Zahlenwert zugeordnet werden. Dieser Zahlenwert repräsentiert den Code.

Fig. 5 und 6 zeigen die Kombinationen und den Funktionsmechanismus bei der Anwendung der LCR. Dabei werden doppelsträngige Nukleinsäuresquenzen, nämlich DNA-Sequenzen, verwendet. Zur Identifikation kommen doppelsträngige Primervarianten PV1 - PV8 zum Einsatz, die wiederum aus einer ersten PG1 und einer zweiten Primergruppe PG2 ausgewählt sind.

Im ersten Zyklus der in Fig. 6 gezeigten Identifizierungsreaktion wird der komplementäre Gegenstrang der einzelsträngigen Nukleinsäuresequenz N durch Ligation der komplementären Primervarianten PV4 und PV8 gebildet. In den weiteren Zyklen wird die Nukleinsäuresequenz amplifiziert. Da bei der Identifizierungsreaktion in jedem LCR-Ansatz nur eine der sechzehn möglichen Kombinationen der Primervarianten PV1 - PV8 vorhanden ist, kommt es nur in einer der sechzehn Reaktionsansätze zur Amplifiation.

Fig. 7 zeigt beispielhaft die Identifizierung eines komplexen Codes. Der zur Markierung verwendete Stoff enthält hier vier unterschiedliche Nukleinsäuresequenzen. Jede der Nukleinsäuresequenzen ist aus einem anderen Nukleinsäuresatz ausgewählt. Jeder Nukleinsäuresatz unterscheidet sich von den anderen Nukleinsäuresätzen im ersten und dritten Sequenzabschnitt 1 bzw. 3. Die sechzehn Nukleinsäurevarianten jedes Nukleinsäuresatzes unterscheiden sich wiederum in der Besetzung der beiden Basen des zweiten Sequenzabschnitts 2.

Zur Identifikation der Markierung wird eine die vier Nukleinsäuresequenzen enthaltende Lösung auf eine Mikrotiterplatte gegeben, die vier Zeilen Z1 - Z4 mit je sechzehn Feldern F

aufweist. Die 16 Proben der ersten Zeile Z1 werden zur Amplifikation mit je zwei Primervarianten versetzt, von denen eine aus einer ersten PG1 und die andere aus einer zweiten Primergruppe PG2 ausgewählt sind. Die erste Primergruppe PG1 weist einen Sequenzabschnitt auf, der korrespondierend zum ersten Sequenzabschnitt 1 einer ersten in der Probe befindlichen Nukleinsäuresequenz ist. Die zweite Primergruppe PG2 weist einen Sequenzabschnitt auf, der korrespondierend zum dritten Sequenzabschnitt 3 der ersten in der Probe befindlichen Nukleinsäuresequenz ist. Die beiden Primervarianten der ersten und zweiten Primergruppe, hybridisieren nur dann mit dem ersten und dritten Sequenzabschnitt des ersten Nukleinsäuresatzes, wenn Übereinstimmung mit der jeweiligen Base des zweiten Sequenzabschnitts 2 besteht.

Den Proben der zweiten, dritten und vierten Zeile Z2 bis Z4 werden in analoger Weise jeweils zwei Primervarianten einer dritten und vierten, fünften und sechsten sowie siebten und achten Primergruppe zugesetzt. Die vorerwähnten Primergruppen korrespondieren wiederum mit dem ersten und/oder dritten Sequenzabschnitt des zweiten, dritten und vierten Nukleinsäuresatzes.

Der Code ist so definiert, daß der jeweilige Nukleinsäuresatz die Stelle im Code bestimmt. Jeder Nukleinsäurevariante ist ein Zahlenwert zugeordnet, welcher die Wertigkeit der Stelle bestimmt. Im vorliegenden Beispiel ist der erste Stelle im Code der Zahlwert zwei, der zweiten Stelle der Zahlenwert elf, der dritten Stelle der Zahlenwert sechzehn und der vierten Stelle der Zahlenwert fünfzehn zugeordnet.

Die Fig. 8B - 8E zeigen Nukleinsäuresequenzen N, bei denen in jedem Teilbereich des zweiten Abschnitts 2 mehrere Basen vor-

gesehen sind. Dabei kann es sich gemäß Fig. 8B- 8D um mehrere identische Basen handeln. Wie aus Fig. 8E ersichtlich ist, sind aber auch Kombinationen möglich. Die beiden Teilbereiche des zweiten Sequenzabschnitts 2 weisen vorteilhafterweise dieselbe Länge auf.

Bei der Verwendung nur einer Base in einem Teilbereich kann es zu einem Mismatch und damit zu Primerverlängerung kommen. Um eine solche Fehlreaktion zu verhindern, kann der jeweilige Teilbereich mit einer Mehrzahl an Basen besetzt sein.

Die Anzahl der mit dem Verfahren erzeugbaren Codes nimmt mit der Anzahl der verwendeten Nukleinsäuregruppen exponentiell zu. Die Anzahl der dazu erforderlichen Nukleinsäuresequenzen steigt dagegen nur linear. Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich ist, kann mit einer verhältnismäßig kleinen Anzahl an unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen eine große Anzahl an Codes realisiert werden.

Anzahl der Nukleinsäuresätze	Anzahl der Nukleinsäurevarianten	Anzahl der erzeugbaren Codes
1	16 = 1 x 16	$16^1 = 16$
2	32 = 2 x 16	$16^2 = 256$
3	48 = 3 x 16	$16^3 = 4.096$
4	64 = 4 x 16	$16^4 = 65\ 536$
5	80 = 5 x 16	$16^5 = 1.048.576$
6	96 = 6 x 16	$16^6 = 16.777.216$
7	112 = 7 x 16	$16^7 = 268.435.456$
8	128 = 8 x 16	$16^8 = 4.294.967.296$

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform besteht darin, die Markierung aus 5 vorgegebenen Nukleinsäuresätzen zu bilden.

Damit können 1.048.576 unterschiedliche Markierungen bereitgestellt werden. - Zur Identifikation wird eine 96-Napf Mikrotiterplatte verwendet, bei der in jedem Napf eine anderes aus zwei Primervarianten hergestelltes Gemisch vorgelegt ist. Die Primervarianten sind jeweils mit einer fluorophoren Gruppe versehen, so daß bei Amplifikation eine Fluoreszenzsignal detektierbar ist. Aus der jeweiligen Position der Fluoreszenzsignale kann auf die Kombination der Primervarianten und damit auf die in der Markierng enthaltenen Nukleinsäuresequenz geschlossen werden. Ein solches Verfahren läßt sich ohne großen Aufwand automatisieren. Es ist kostengünstig und schnell durchführbar.

Die vorgeschlagene biologische Markierung kann auch in einen Strichcode (Bar-Code) übersetzt werden. Dabei definiert die Anzahl der vorgegebenen Nukleinsäuresätze die Anzahl der Striche der Strichcodes. Die Stelle des Strichs im Strichcode wird durch die Art des Nukleinsäuresatzes und seine Breite durch die Nukleinsäurevariante festgelegt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Markierung von festen, flüssigen oder gasförmigen Substanzen, wobei die zu markierende Substanz mit mindestens einer synthetisch hergestellten Nukleinsäuresequenz (N) versehen wird, die einen ersten (1) das 5'-terminale Ende bildenden Sequenzabschnitt, einen damit verbundenen zweiten (2) aus mindestens zwei Basen (A, C, G, T) bestehenden Sequenzabschnitt und einen damit verbundenen dritten (3) das 3'-terminale Ende bildenden Sequenzabschnitt aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Identifikation eine erste Primergruppe (PG1) mit einem zum ersten Sequenzabschnitt (1) korrespondierenden ersten Primerabschnitt und eine zweite Primergruppe (PG2) mit einem zum dritten Sequenzabschnitt (3) korrespondierenden dritten Primerabschnitt verwendet wird, wobei jede der Primergruppen (PG1, PG2) vier, sich jeweils in mindestens einer zusätzlichen endständig vorgesehen Base (A, C, G, T) unterscheidende Primervarianten (PV1 - PV4; PV5 - PV8) umfaßt, so daß genau eine Primervariante (PV1, PV2, PV3, PV4) der ersten Primergruppe (PG1) zusammen mit genau einer Primervariante (PV5, PV6, PV7, PV8) der zweiten Primergruppe (PG2) eine Amplfikation der Nukleinsäuresequenz (N) ermöglicht.

2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz (N) mehr als 20 Nukleotide, vorzugsweise 40 Nukleotide, aufweist.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Mehrzahl an Nukleinsäuresequenzen (N) verwendet wird, die im zweiten Sequenzabschnitt (2) sich unterscheiden.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der zweite Sequenzabschnitt (2) aus zwei Teilbereichen besteht, von denen mindestens einer aus einer Mehrzahl von Basen (A, C, G, T) besteht.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenzen im ersten (1) und dritten Sequenzabschnitt (3) sich unterscheiden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste (1) und der dritte Sequenzabschnitt (3) die gleiche Anzahl an Nukleotiden aufweisen.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste (1) und der dritte Sequenzabschnitt (3) unter vergleichbaren Stringenzbedingungen aufschmelzbar sind.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Primervarianten (PV1 - PV8) unter vergleichbaren Stringenzbedingungen aufschmelzbar sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Nukleinsäuresequenz (N) eine Nukleinsäurederivatsequenz, insbesondere proteinartige Nukleinsäure (PNA) oder Phosphothionatnukleinsäuren (PTO) oder Hybride davon, verwendet wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jeder zu markierende Substanz mit mindestens einer unterscheidbaren Nukleinsäuresequenz (N) versehen wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die auf feste Gegenstände aufgetragene Nukleinsäuresequenz (N) durch eine Schutzschicht abgedeckt wird.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz (N) Bestandteil einer auf feste Gegenstände aufgetragenen Schicht sind.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zu markierende Substanz mit der Nukleinsäuresequenz (N) imprägniert wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz (N) dem zu markierenden Stoff beigemischt wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Identifikation der Markierung die Nukleinsäuresequenz (N) von der Substanz bzw. dem Gegenstand extrahiert oder entfernt wird.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine die extrahierte oder entfernte Nukleinsäuresequenz (N) enthaltende Lösung hergestellt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die in der Lösung enthaltene Nukleinsäuresequenz (N) unter Verwendung der Primervarianten (PV1 - PV8) mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt werden.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die in der Lösung enthaltene Nukleinsäuresequenz (N) unter Verwendung der Primervarianten (PV1 - PV8) mittels Ligase-Ketten-Reaktion (LCR) vervielfältigt wird.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die vervielfältigte Nukleinsäuresequenz (N) mittels Fluoreszenz nachgewiesen wird.

20. Kit zur Identifikation einer Markierung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kit eine erste Primergruppe (PG1) mit einem zum ersten Sequenzabschnitt (1) korrespondierenden ersten Primerabschnitt und eine zweite Primergruppe (PG2) mit einem zum dritten Sequenzabschnitt (3) korrespondierenden dritten Primerabschnitt aufweist, wobei jede der Primergruppen (PG1, PG2) vier sich jeweils in mindestens einer zusätzlichen endständig vorgesehen Base (A, C, G, T) unterscheidende Primervarianten (PV1 - PV4; PV5 - PV8) umfaßt, so daß genau eine Primervariante (PV1, PV2, PV3, PV4) der ersten Primergruppe (PG1) zusammen mit genau einer Primervariante (PV5, PV6, PV7, PV8) der zweiten Primergruppe (PG2) zur Nukleinsäuresequenz (N) komplementär ist.

21. Kit nach Anspruch 20, wobei die Primervarianten Primervarianten (PV1 - PV4; PV5 - PV8) dieselbe oder eine ähnliche Anzahl an Nukleotiden aufweisen.

22. Kit nach einem der Ansprüche 20 oder 21, wobei die Primervarianten (PV1 - PV4; PV5 - PV8) mehr als 10 Nukleotide, vorzugsweise 20 Nukleotide, aufweisen.

23. Kit nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei die Nukleinsäuresequenzen im zweiten Sequenzabschnitt (2) sich unterscheiden.

24. Kit nach einem der Ansprüche 20 bis 23, wobei die jeder der Primervarianten (PV1 - PV8) separat von einem Trägermittel aufgenommen ist.

25. Kit nach Anspruch 24, wobei das Trägermittel eine Lösung, eine Mikrotiterplatte, ein Kunststoff und/oder Mikrokapseln ist/sind.

26. Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche 20 bis 25, wobei jeweils zwei unterschiedliche Primervarianten (PV1 - PV8) als Gemisch an oder in einem Trägermittel aufgenommen sind.

27. Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche 20 bis 26, wobei die Primervarianten (PV1 - PV8) mit einer fluorophoren Gruppe versehen sind, so daß bei Amplifikation ein Fluoreszenzsignal detektierbar ist.

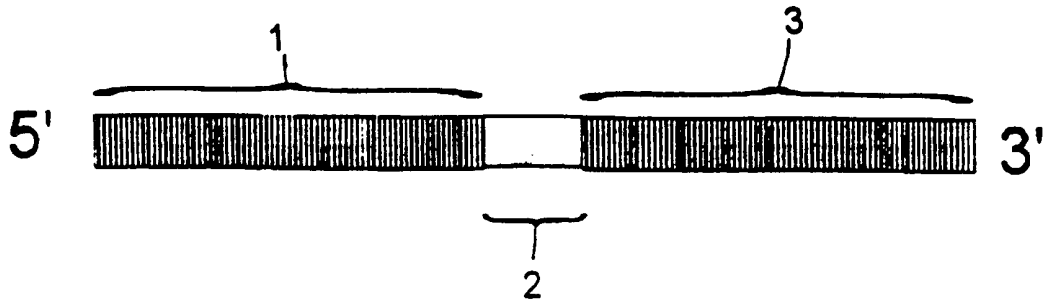
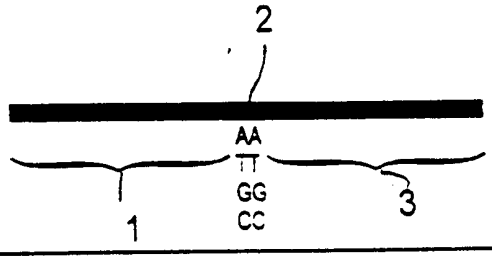


Fig. 1



	Base 20	Base 21
1	A	A
2	A	T
3	A	G
4	A	C
5	T	A
6	T	T
7	T	G
8	T	C
9	G	A
10	G	T
11	G	G
12	G	C
13	C	A
14	C	T
15	C	G
16	C	C

Fig. 2

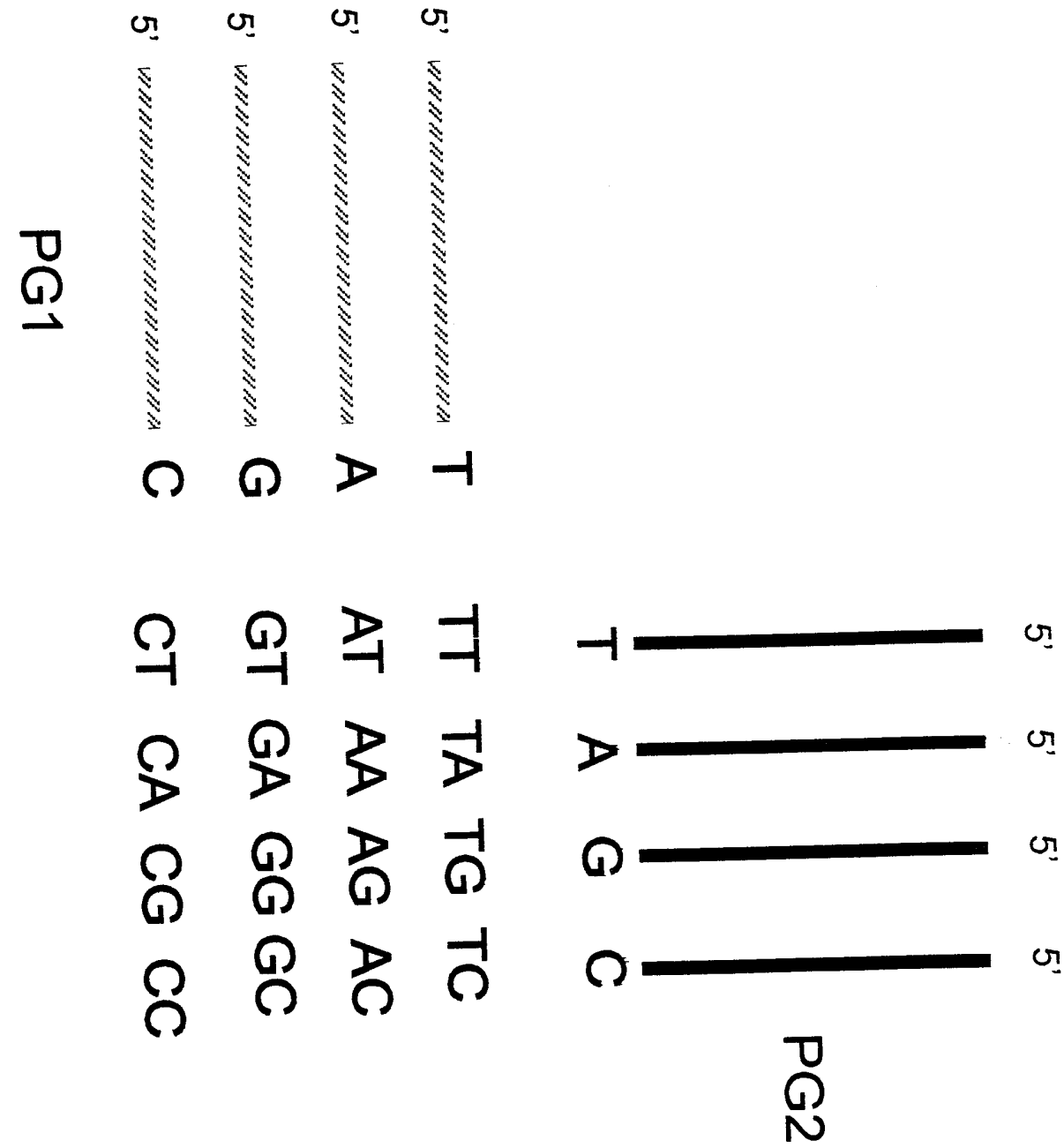

5'
5'
5'
5'
T
A
G
C
PG2
5'
5'
5'
5'
T
A
G
C
TT
AT
GT
CT
TA
AA
GA
CA
TG
AG
GG
CG
TC
AC
GC
CC
PG1

Fig. 3

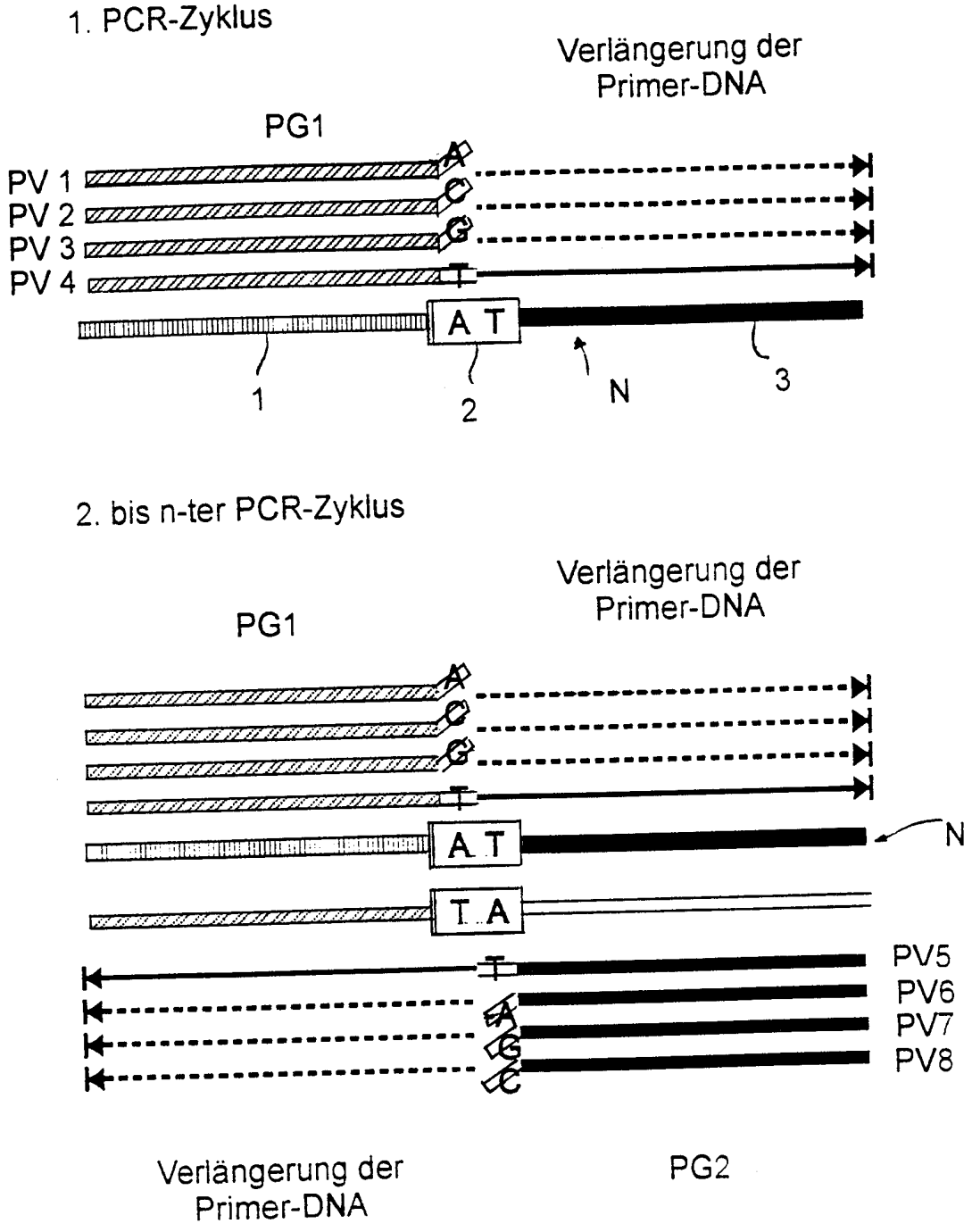
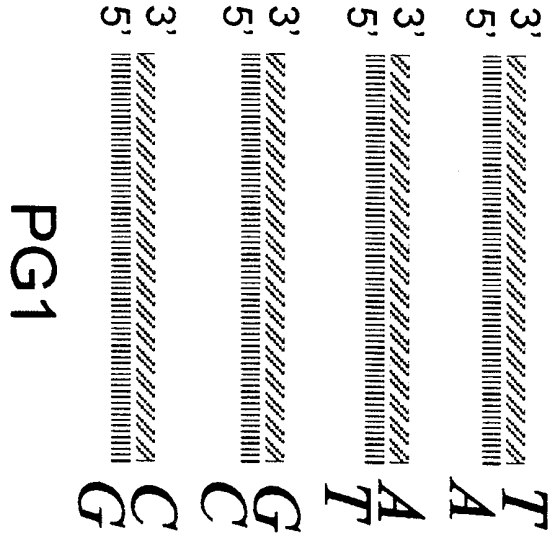
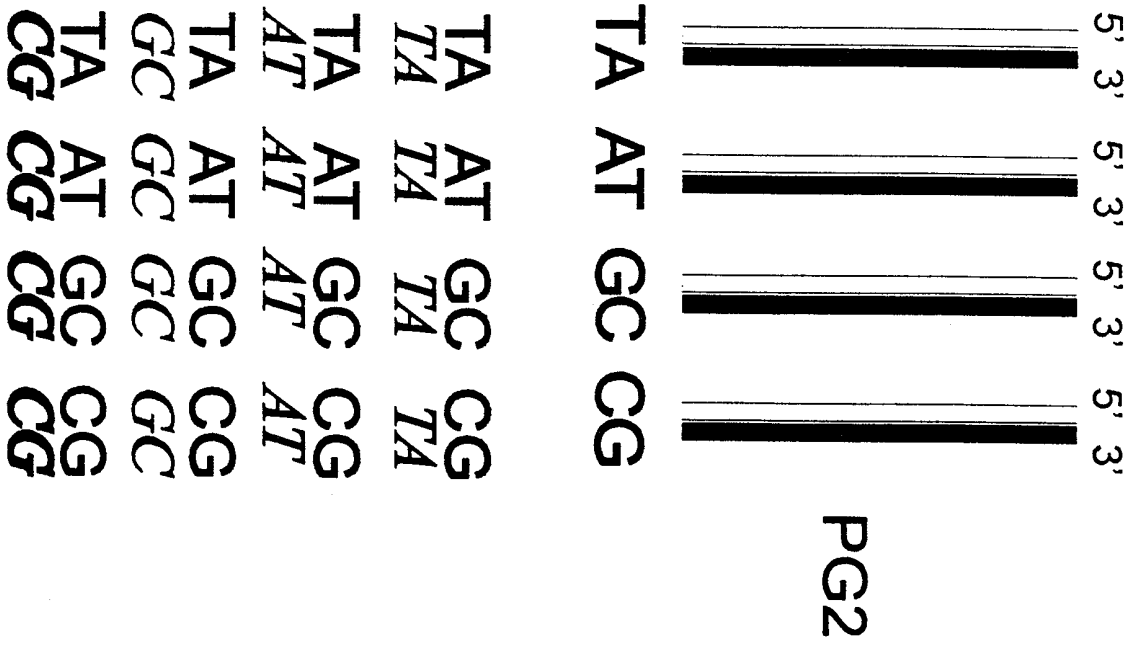

1. PCR-Zyklus
Verlängerung der Primer-DNA
PG1
PV 1
PV 2
PV 3
PV 4
A T
1
2
N
3
2. bis n-ter PCR-Zyklus
Verlängerung der Primer-DNA
PG1
A T
T A
N
PV5
PV6
PV7
PV8
Verlängerung der Primer-DNA
PG2

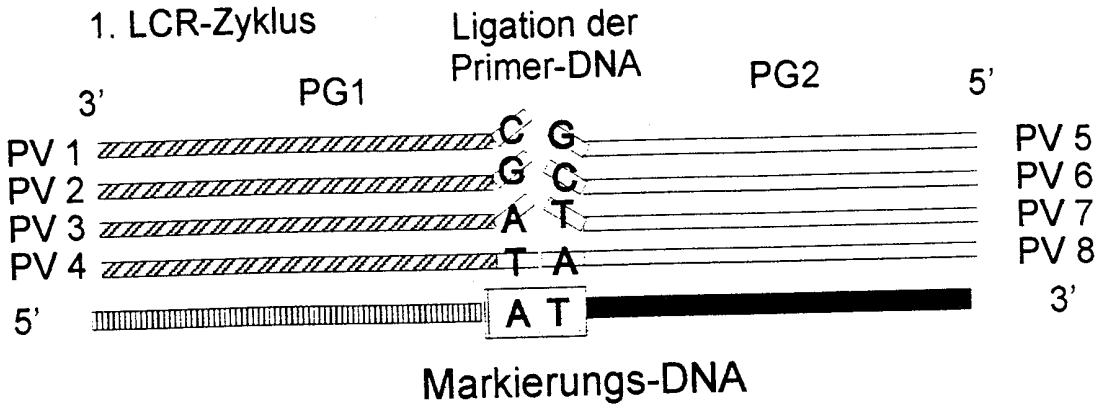
Fig. 4





TA AT GC CG
TA AT GC CG
TA AT GC CG
TA AT GC CG

Fig. 5



2. bis n-ter Zyklus LCR-Zyklus

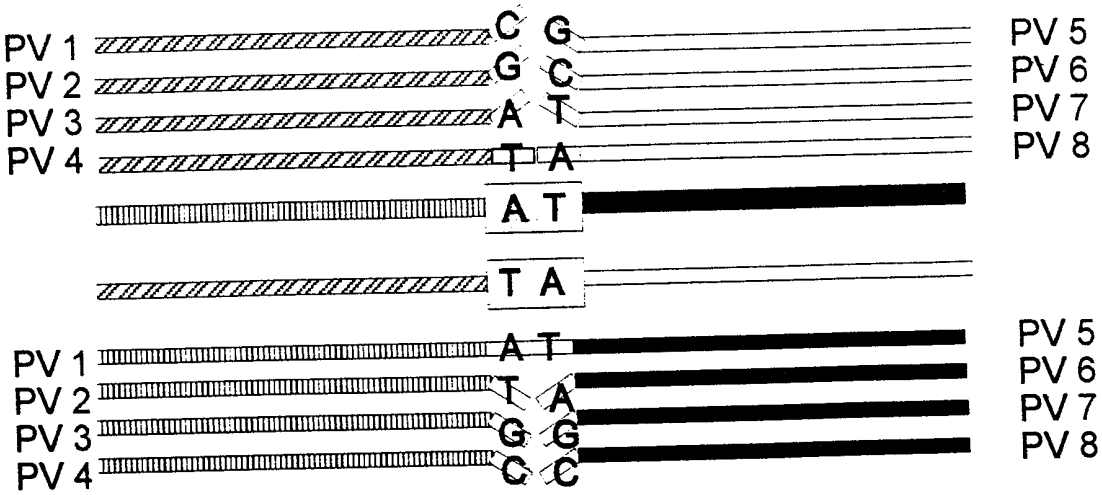


Fig. 6

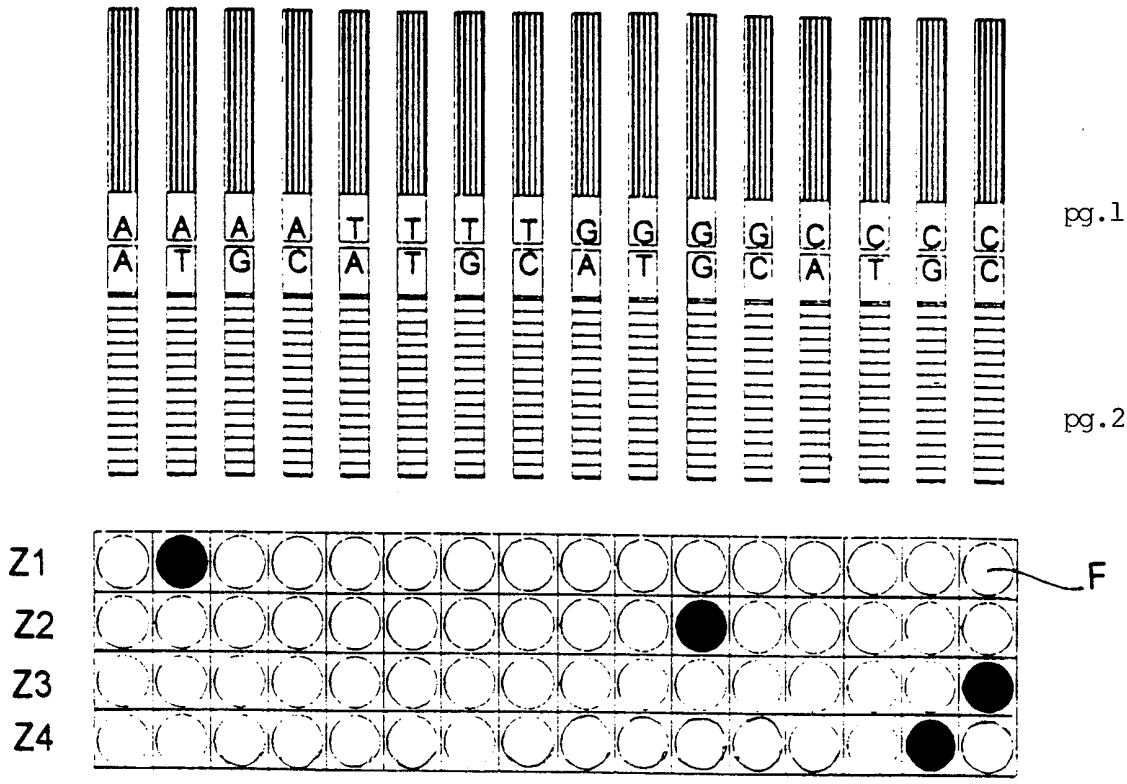


Fig. 7

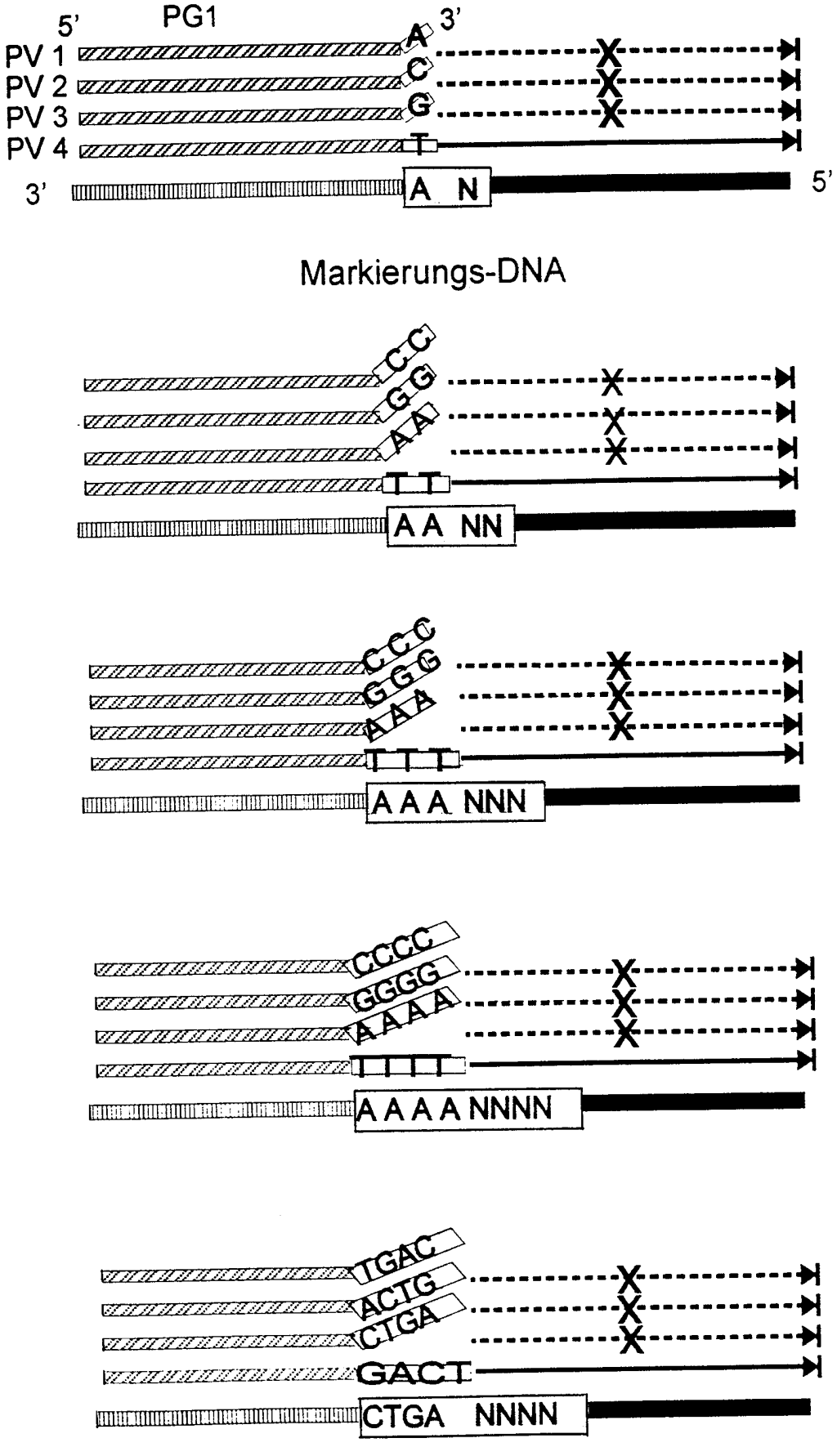

5'
PG1
3'
PV 1
PV 2
PV 3
PV 4
A
C
G
T
3'
A N
5'
Markierungs-DNA
CC
GG
AA
TT
A A NN
CCC
GGG
AAA
TTT
A A A NNN
CCCC
GGGG
AAAA
TTTT
A A A A NNNN
TGAC
ACTG
CTGA
GACT
CTGA NNNN

Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 98/02615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68 G09F3/00

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)
IPC 6 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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 17954 A (PABIO ;ALESTROEM PETER (NO)) 13 June 1996 see the whole document	1-27
Y	WO 90 14441 A (CETUS CORP) 29 November 1990 see the whole document	1-27
Y	WO 91 17265 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 14 November 1991 see the whole document	1-27
Y	WO 94 04918 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 3 March 1994 see the whole document	1-27

-/--

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

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 February 1999	19/02/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hagenmaier, S

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int...ational Application No
PCT/DE 98/02615

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 02702 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 26 January 1995 see the whole document	1-27
Y	WO 97 32040 A (ROYAL INFIRMARY OF EDINBURGH N ;STIRLING DAVID (GB); LUDLAM CHRIST) 4 September 1997 see the whole document	1-27
A	WO 87 06383 A (BIOTECHNICA LTD) 22 October 1987 see the whole document	1-27
A	US 5 139 812 A (LEBACQ PHILIPPE) 18 August 1992 see the whole document	1-27
A	WO 96 19586 A (VISIBLE GENETICS INC ;DUNN JAMES M (CA)) 27 June 1996 see the whole document	1-27
A	SANO T ET AL: "Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING, vol. 14, no. 2, July 1997, page 37-40 XP004126263 see the whole document	1-27
T	WO 98 55657 A (CELLSTORE ;GIFFORD DAVID K (US)) 10 December 1998 see the whole document	1-27

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 98/02615

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9617954 A	13-06-1996	AU 3992395 A	26-06-1996
		CA 2206486 A	13-06-1996
		EP 0795029 A	17-09-1997
		NO 972610 A	07-08-1997
WO 9014441 A	29-11-1990	AT 142274 T	15-09-1996
		AU 643217 B	11-11-1993
		AU 5741990 A	18-12-1990
		CA 2017211 A	22-11-1990
		DE 69028402 D	10-10-1996
		DE 69028402 T	17-04-1997
		DK 477220 T	21-10-1996
		EP 0477220 A	01-04-1992
		ES 2091243 T	01-11-1996
		JP 4505708 T	08-10-1992
		US 5451505 A	19-09-1995
WO 9117265 A	14-11-1991	AT 156193 T	15-08-1997
		AU 663289 B	05-10-1995
		AU 7854191 A	27-11-1991
		CA 2082050 A	05-11-1991
		DE 69127080 D	04-09-1997
		DE 69127080 T	26-02-1998
		DK 527850 T	16-02-1998
		EP 0527850 A	24-02-1993
		ES 2106780 T	16-11-1997
		GB 2259363 A,B	10-03-1993
		GR 3025155 T	27-02-1998
		SG 49087 A	18-05-1998
		US 5665538 A	09-09-1997
WO 9404918 A	03-03-1994	AT 155885 T	15-08-1997
		AU 690076 B	23-04-1998
		AU 4970893 A	15-03-1994
		CA 2143339 A	03-03-1994
		DE 69312498 D	04-09-1997
		DE 69312498 T	05-02-1998
		DK 657028 T	16-02-1998
		EP 0657028 A	14-06-1995
		ES 2107193 T	16-11-1997
		GR 3025156 T	27-02-1998
		SG 47622 A	17-04-1998
		US 5643728 A	01-07-1997
WO 9502702 A	26-01-1995	AU 700332 B	24-12-1998
		AU 7130094 A	13-02-1995
		EP 0774012 A	21-05-1997
		SG 52549 A	28-09-1998
		US 5763176 A	09-06-1998
WO 9732040 A	04-09-1997	AU 1889797 A	16-09-1997
WO 8706383 A	22-10-1987	DK 644187 A	08-02-1988
		EP 0303610 A	22-02-1989
		JP 2726877 B	11-03-1998
		JP 63503242 T	24-11-1988
US 5139812 A	18-08-1992	FR 2649518 A	11-01-1991

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. ational Application No
PCT/DE 98/02615

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5139812 A		DE 69008625 D	09-06-1994
		DE 69008625 T	01-12-1994
		EP 0408424 A	16-01-1991
		ES 2056405 T	01-10-1994
		JP 3058800 A	13-03-1991
WO 9619586 A	27-06-1996	US 5776737 A	07-07-1998
		AU 4113696 A	10-07-1996
		CA 2208428 A	27-06-1996
		DE 19581886 T	07-05-1998
		GB 2311370 A,B	24-09-1997
WO 9855657 A	10-12-1998	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 98/02615

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68 G09F3/00

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 17954 A (PABIO ;ALESTROEM PETER (NO)) 13. Juni 1996 siehe das ganze Dokument	1-27
Y	WO 90 14441 A (CETUS CORP) 29. November 1990 siehe das ganze Dokument	1-27
Y	WO 91 17265 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 14. November 1991 siehe das ganze Dokument	1-27
Y	WO 94 04918 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 3. März 1994 siehe das ganze Dokument	1-27

-/--

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

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" 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	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
11. Februar 1999	19/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hagenmaier, S

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 98/02615

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 02702 A (SLATER JAMES HOWARD ;MINTON JOHN EDWARD (GB)) 26. Januar 1995 siehe das ganze Dokument	1-27
Y	WO 97 32040 A (ROYAL INFIRMARY OF EDINBURGH N ;STIRLING DAVID (GB); LUDLAM CHRIST) 4. September 1997 siehe das ganze Dokument	1-27
A	WO 87 06383 A (BIOTECHNICA LTD) 22. Oktober 1987 siehe das ganze Dokument	1-27
A	US 5 139 812 A (LEBACQ PHILIPPE) 18. August 1992 siehe das ganze Dokument	1-27
A	WO 96 19586 A (VISIBLE GENETICS INC ;DUNN JAMES M (CA)) 27. Juni 1996 siehe das ganze Dokument	1-27
A	SANO T ET AL: "Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING, Bd. 14, Nr. 2, Juli 1997, Seite 37-40 XP004126263 siehe das ganze Dokument	1-27
T	WO 98 55657 A (CELLSTORE ;GIFFORD DAVID K (US)) 10. Dezember 1998 siehe das ganze Dokument	1-27

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 98/02615

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9617954 A	13-06-1996	AU 3992395 A	26-06-1996
		CA 2206486 A	13-06-1996
		EP 0795029 A	17-09-1997
		NO 972610 A	07-08-1997
WO 9014441 A	29-11-1990	AT 142274 T	15-09-1996
		AU 643217 B	11-11-1993
		AU 5741990 A	18-12-1990
		CA 2017211 A	22-11-1990
		DE 69028402 D	10-10-1996
		DE 69028402 T	17-04-1997
		DK 477220 T	21-10-1996
		EP 0477220 A	01-04-1992
		ES 2091243 T	01-11-1996
		JP 4505708 T	08-10-1992
		US 5451505 A	19-09-1995
WO 9117265 A	14-11-1991	AT 156193 T	15-08-1997
		AU 663289 B	05-10-1995
		AU 7854191 A	27-11-1991
		CA 2082050 A	05-11-1991
		DE 69127080 D	04-09-1997
		DE 69127080 T	26-02-1998
		DK 527850 T	16-02-1998
		EP 0527850 A	24-02-1993
		ES 2106780 T	16-11-1997
		GB 2259363 A,B	10-03-1993
		GR 3025155 T	27-02-1998
		SG 49087 A	18-05-1998
		US 5665538 A	09-09-1997
WO 9404918 A	03-03-1994	AT 155885 T	15-08-1997
		AU 690076 B	23-04-1998
		AU 4970893 A	15-03-1994
		CA 2143339 A	03-03-1994
		DE 69312498 D	04-09-1997
		DE 69312498 T	05-02-1998
		DK 657028 T	16-02-1998
		EP 0657028 A	14-06-1995
		ES 2107193 T	16-11-1997
		GR 3025156 T	27-02-1998
		SG 47622 A	17-04-1998
		US 5643728 A	01-07-1997
WO 9502702 A	26-01-1995	AU 700332 B	24-12-1998
		AU 7130094 A	13-02-1995
		EP 0774012 A	21-05-1997
		SG 52549 A	28-09-1998
		US 5763176 A	09-06-1998
WO 9732040 A	04-09-1997	AU 1889797 A	16-09-1997
WO 8706383 A	22-10-1987	DK 644187 A	08-02-1988
		EP 0303610 A	22-02-1989
		JP 2726877 B	11-03-1998
		JP 63503242 T	24-11-1988
US 5139812 A	18-08-1992	FR 2649518 A	11-01-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 98/02615

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5139812 A		DE 69008625 D	09-06-1994
		DE 69008625 T	01-12-1994
		EP 0408424 A	16-01-1991
		ES 2056405 T	01-10-1994
		JP 3058800 A	13-03-1991
WO 9619586 A	27-06-1996	US 5776737 A	07-07-1998
		AU 4113696 A	10-07-1996
		CA 2208428 A	27-06-1996
		DE 19581886 T	07-05-1998
		GB 2311370 A,B	24-09-1997
WO 9855657 A	10-12-1998	KEINE	