



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2013 202 721.4**

(22) Anmeldetag: **20.02.2013**

(43) Offenlegungstag: **21.08.2014**

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

(71) Anmelder:  
**Siemens Aktiengesellschaft, 80333, München, DE**

(72) Erfinder:  
**Hayden, Oliver, 91074, Herzogenaurach, DE;**  
**Warnat, Gerald, 21702, Ahlerstedt, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

**WO 00/ 70 073 A1**  
**WO 2007/ 070 542 A2**  
**WO 2007/ 070 572 A2**

**NIEDRIGHAUS, T.P. [u.a.]: Landscape of next-generation sequencing technologies. Anal. Chem. (2011) 83, 4327-4341**

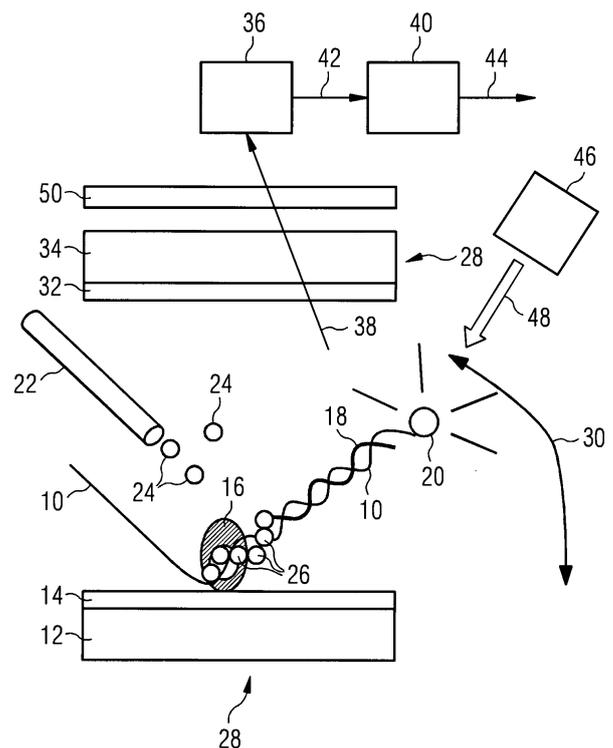
**ZHOU, X. [u.a.]: The next-generation sequencing technology and application. Protein Cell (2010) 1 (6) 520-536**

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Sequenziervorrichtung zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs und Verfahren zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Sequenziervorrichtung zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs (10) mit einer Probenhalterung (12), an welcher eine leitfähige Oberfläche (14) mit mindestens einer Polymerase (16) befestigbar oder befestigt ist, wobei die Sequenziervorrichtung zusätzlich eine Nukleotidzuführeinrichtung (22), mittels welcher verschiedene Typen von Nukleotiden (24) in einer vorgebbaren Reihenfolge an die leitfähige Oberfläche (14) zuführbar sind, eine Anregungseinrichtung (28), mittels welcher ein elektrisches Wechselfeld erzeugbar ist, eine Detektionseinrichtung (36), mittels welcher mindestens ein variierendes Signal (38) ermittelbar ist, und eine Auswerteeinrichtung (40), welche dazu ausgelegt ist, unter Berücksichtigung des mindestens einen variierenden Signals (38) eine Information (44) bezüglich eines Typs eines an mindestens einen Primer (18) polymerisierten Nukleotids (24) und/oder des komplementären Nukleotids mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs (10) auszugeben. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs (10).



## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Sequenziervorrichtung zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs. Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs.

### Stand der Technik

**[0002]** In der US 2010/0035254 A1 ist ein Verfahren zum Sequenzieren mindestens eines DNA-Einzelstrangs beschrieben. Zum Ausführen des Verfahrens wird mindestens eine Polymerase an eine Oberfläche gebunden. Dies soll so ausgeführt werden, dass der mindestens eine zu sequenzierende DNA-Einzelstrang mit einem angebondenen Primer an die Polymerase anbinden kann. Anschließend werden optisch markierte Nukleotide auf die Oberfläche mit der mindestens einen angebondenen Polymerase gegeben. Mittels eines optischen Nachweises eines an dem Primer polymerisierten Nukleotids soll es möglich sein, Rückschlüsse auf die Sequenz des DNA-Einzelstrangs zu schließen.

**[0003]** Allerdings erfordert ein Ausführen des in dem vorausgehenden Absatz beschriebenen Verfahrens die optische Markierung der an den Primer zu polymerisierenden Nukleotide. Die dazu ausgeführte Markierungsmethode kann jedoch die Enzymeigenschaften der Polymerase beeinträchtigen. Dies kann zu einer erhöhten Fehlerrate beim Ermitteln der DNA-Sequenz des DNA-Einzelstrangs führen.

**[0004]** Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist deshalb, eine Möglichkeit zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs zur Verfügung zu stellen, welche keine optische Markierung der zum Polymerisieren eines Komplementärstrangs eingesetzten Nukleotide benötigt.

**[0005]** Gelöst wird diese Aufgabe durch die Sequenziervorrichtung zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs nach Anspruch 1 und das Verfahren zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs nach Anspruch 7.

**[0006]** Die vorliegende Erfindung schafft Möglichkeiten zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs, wobei es ausreichend ist, lediglich ein Markermolekül an einem Ende des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs (z.B. über einen Adapterstrang) und/oder des mindestens einen Primers anzubinden. Die Anbindung kann so erfolgen, dass das mit dem Markermolekül markierte Ende des Nukleinsäureeinzelstrangs oder des Primers während einer Polymerisierung einen vergleichsweise großen Abstand zu der benachbarten Polymerase aufweist. Somit beeinträchtigt das benachbarte Markermolekül

nicht die Enzymeigenschaften der polymerisierenden Polymerase. Das Markermolekül trägt somit zu keiner Steigerung der Fehlerrate bei. Eine Qualität der mittels der vorliegenden Erfindung ausführbaren Sequenzierung ist deshalb vergleichsweise hoch. Insbesondere kann mittels der vorliegenden Erfindung eine Qualität der Sequenzierung realisiert werden, welche für chemische Anwendungen ausreichend ist.

**[0007]** In einer vorteilhaften Ausführungsform der Sequenziervorrichtung umfasst die Sequenziervorrichtung eine Lichtemittiereinrichtung, mittels welcher das mindestens eine Markermolekül anregbar ist. In diesem Fall ist die Detektionseinrichtung vorzugsweise für eine Detektion eines von dem mindestens einen Markermolekül emittierten Lichts als das mindestens eine variierende Signal ausgelegt. Da die leitfähige Oberfläche ein Quenchen des mindestens einen Markermoleküls bewirken kann, ist eine Intensität des mittels der Detektionseinrichtung detektierten Lichts ein Signal, anhand von welchem sich eine Vergrößerung des maximaler Abstands des mindestens einen Markermoleküls von der leitfähigen Oberfläche, und damit eine Verlängerung des durch die Polymerisation verlängerten Primers verlässlich erkennbar ist. Somit kann eine Polymerisierung eines Nukleotids während eines Zuführens eines bestimmten Nukleotidtyps an die leitfähige Oberfläche mit einer relativ geringen Fehlerrate erkannt werden.

**[0008]** In einer vorteilhaften Weiterbildung sind mittels der Lichtemittiereinrichtung verschiedene Markermoleküle mit unterschiedlichen Emissionsspektren gleichzeitig anregbar. Bevorzugter Weise ist in diesem Fall die Detektionseinrichtung dazu ausgelegt, die von den verschiedenen Markermolekülen emittierten Photonen zu detektieren und einem bestimmten Emissionsspektrum der unterschiedlichen Emissionsspektren der Markermoleküle zuzuordnen. Da die verschiedenen Markermoleküle direkt oder indirekt an unterschiedlichen Nukleinsäureeinzelsträngen angebonden sein können, kann die hier beschriebene Sequenziervorrichtung zum gleichzeitigen Sequenzieren verschiedener Nukleinsäureeinzelstränge genutzt werden. Auf diese Weise ist eine Vielzahl verschiedener Nukleinsäureeinzelstränge innerhalb einer vergleichsweise kurzen Zeit sequenzierbar.

**[0009]** In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform ist die Detektionseinrichtung für eine kapazitive Detektion des mindestens einen Markermoleküls ausgelegt. Damit können kostengünstige dielektrische Marker, wie insbesondere Metall-Nanopartikel, als das mindestens eine Markermolekül eingesetzt werden.

**[0010]** Beispielsweise kann die Detektionseinrichtung für eine Einzelmoleküldetektion eines einzigen der Markermoleküle ausgebildet sein. In diesem Fall

ist mittels der Sequenziervorrichtung eine Einzelstrangsequenzierung eines einzelnen Nukleotideinzelstrangs ausführbar. Somit kann auf eine Exprimierung eines nur in einer geringen Konzentration vorhandenen Nukleinsäureeinzelstrangs vor einer Sequenzierung bei einer derartigen Auslegung der Sequenziervorrichtung verzichtet werden.

**[0011]** Als Alternative dazu kann die Detektionseinrichtung auch für eine gleichzeitige Detektion einer Vielzahl von Markermolekülen ausgebildet sein. Eine derartige Detektionseinrichtung kann mittels kostengünstiger Bauteile ausgebildet werden.

**[0012]** Die in den oberen Absätzen aufgezählten Vorteile sind auch bei einem Ausführen eines derartigen Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs gewährleistet.

**[0013]** In einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens wird als der mindestens eine Primer mindestens ein mit mindestens einem Metall-Nanopartikel als das mindestens eine Markermolekül markierter Primer an die mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang angebunden. Somit können zum Ausführen des Verfahrens kostengünstige Metall-Nanopartikel anstelle von Fluorophoren eingesetzt werden.

**[0014]** In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens wird als der mindestens eine Primer mindestens ein Primer mit einer ersten Nukleotidanzahl, welche kleiner als eine zweite Nukleotidanzahl mindestens eines an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang legierten Adapterstrangs ist, an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang angebunden. Wie unten genauer ausgeführt wird, kann bei einer derartigen Wahl der ersten Nukleotidanzahl und der zweiten Nukleotidanzahl bei jeder Sequenzierung eine Referenzmessung ausgeführt werden. Somit kann beispielsweise eine Fehljustage an einer zum Ausführen des Verfahrens verwendeten Vorrichtung schnell erkannt und behoben werden.

**[0015]** In einer speziellen Ausführungsform des Verfahrens wird als der mindestens eine Primer mindestens ein Primer an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang angebunden wird, dessen Teilsequenz zusammen mit einer Teilsequenz des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs eine Restriktionssequenz für ein Restriktionsenzym ergibt. In einem nachfolgenden Verfahrensschritt kann mittels des Restriktionsenzym ein nicht zu sequenzierender Teilstrang des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs von einem zumindest teilweise zu sequenzierenden Reststrang des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs abgetrennt werden. Die Sequenzierung des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs kann somit speziell auf die zu ermittelnden Nukleotide begrenzt werden.

**[0016]** In einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens wird mittels einer Einzelmoleküldetektion eines einzigen der Markermoleküle eine Einzelstrangsequenzierung ausgeführt. Das Verfahren kann somit auch ausgeführt werden, wenn lediglich eine vergleichsweise geringe Konzentration des zu sequenzierenden Nukleinsäureeinzelstrangs vorliegt.

**[0017]** Als Alternative dazu kann jedoch auch eine Gruppe gleicher Nukleinsäureeinzelstränge gleichzeitig sequenziert werden. In der Regel können für eine derartige gleichzeitige Sequenzierung gleicher Nukleinsäureeinzelstränge kostengünstige Komponenten verwendet werden.

**[0018]** In einer vorteilhaften Weiterbildung können auch verschiedene Nukleinsäureeinzelstränge mit voneinander abweichenden Sequenzen, an welchen unterschiedliche Markermoleküle direkt oder indirekt angebunden sind, gleichzeitig sequenziert werden. Somit können mehrere verschiedene Nukleinsäureeinzelstränge in einer vergleichsweise kurzen Zeit sequenziert werden.

**[0019]** Mittels eines Ausführens des hier beschriebenen Verfahrens kann als der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang mindestens ein Mikro-RNA-Strang sequenziert werden. Die Ausführbarkeit des Verfahrens ist jedoch nicht auf ein Sequenzieren mindestens eines Mikro-RNA-Strangs limitiert.

#### Beschreibung der Figuren

**[0020]** Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Figuren im Detail erläutert, wobei diese Figuren den Umfang der Erfindung nicht einschränken sollen. Es zeigen:

**[0021]** Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der Sequenziervorrichtung;

**[0022]** Fig. 2 eine schematische Darstellung zum Erläutern einer ersten Ausführungsform des Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs;

**[0023]** Fig. 3 eine schematische Darstellung zum Erläutern einer zweiten Ausführungsform des Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs;

**[0024]** Fig. 4 und Fig. 5 schematische Darstellungen zum Erläutern einer dritten und einer vierten Ausführungsform des Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs; und

**[0025]** Fig. 6a–Fig. 6c schematische Darstellungen zum Erläutern einer fünften Ausführungsform des

Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0026]** Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der Sequenziervorrichtung.

**[0027]** Die in Fig. 1 schematisch dargestellte Sequenziervorrichtung ist zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs **10** geeignet. Der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** kann ein DNA-Einzelstrang, ein RNA-Einzelstrang oder ein PNA-Einzelstrang sein. Insbesondere kann als der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mindestens ein Mikro-RNA-Strang sequenzierbar sein. Somit sind eine Vielzahl verschiedener Typen von Nukleinsäureeinzelsträngen **10** mittels der im Weiteren beschriebenen Sequenziervorrichtung sequenzierbar.

**[0028]** Die Sequenziervorrichtung weist eine Probenhalterung **12** auf, an welcher eine leitfähige Oberfläche **14** befestigbar oder befestigt ist. Die leitfähige Oberfläche **14** ist derart funktionalisiert und/oder funktionalisierbar, dass mindestens eine Polymerase **16** an der leitfähigen Oberfläche **14** anbindbar ist. Die mindestens eine Polymerase **16** ist insbesondere so an der leitfähigen Oberfläche **14** anbindbar, dass der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit einem an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10** angebondenen Primer **18** und mindestens einem an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10** und/oder dem Primer **18** angebondenen Markermolekül **20** an die an der leitfähigen Oberfläche **14** angebondene Polymerase **16** anbinden kann.

**[0029]** Die mindestens eine Polymerase **16** wird vorzugsweise kovalent an der leitfähigen Oberfläche **14** verankert. Die leitfähige Oberfläche **14** kann beispielsweise eine Gold-Elektrode sein. Bevorzugter Weise ist in diesem Fall die mindestens eine Polymerase **16** mittels einer Thiolbindung an die leitfähige Oberfläche **14** gebunden. Auch eine Biotin-Avidin/Streptavidin-Bindung kann zum Anbinden der mindestens einen Polymerase **16** genutzt werden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine Vielzahl von Bindungsmöglichkeiten zum Anbinden der mindestens einen Polymerase **16** an die leitfähige Oberfläche **14** nutzbar ist. Bezüglich der verschiedenen Möglichkeiten zum Anbinden der mindestens einen Polymerase **16** an die leitfähige Oberfläche **14** wird insbesondere auf die US 2010/0035254 A1 hingewiesen. Eine Anordnung von mehreren Polymerasen **16** kann stochastisch oder durch eine Strukturierung der leitfähigen Oberfläche **14** gewählt werden.

**[0030]** Als Markermoleküle **20** eignen sich organische und anorganische Marker. Beispielsweise können als Markermoleküle **20** Fluorophore eingesetzt

werden. Bevorzugter Weise ist genau ein Markermolekül **20** an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10** oder dem Primer **18** angebonden. Unter einer Anbindung eines Markermoleküls **20** an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10** kann auch verstanden werden, dass das Markermolekül **20** an einem (vorzugsweise an dem 5-Ende) an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10** legierten Adapterstrang chemisch angebonden ist. Bevorzugt wird eine Anbindposition des mindestens einen Markermoleküls **20**, bei welcher während einer Polymerisierung weiterer Nukleotide an den Primer **18** ein Abstand zwischen der tätigen Polymerase **16** und dem mindestens einen Markermolekül **20** entweder zu- oder abnimmt. Vorzugsweise liegt das Markermolekül **20** an dem 5-Ende des Adapterstrangs **52**/des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** oder an dem 3-Ende des Primers **18** vor. Die Einsetzbarkeit der Sequenziervorrichtung ist jedoch nicht auf die hier beschriebenen Möglichkeiten der Anbindung des mindestens einen Markermoleküls **20** beschränkt.

**[0031]** Die Sequenziervorrichtung weist auch eine Nukleotidzuführeinrichtung **22** auf, mittels welcher verschiedene Typen von Nukleotiden **24** in einer vorgebbaren Reihenfolge an die leitfähige Oberfläche **14** mit der mindestens einen angebondenen Polymerase **16**, dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang **10**, dem angebondenen Primer **18** und dem mindestens einen angebondenen Markermolekül **20** zuführbar sind. Die Nukleotidzuführeinrichtung **22** kann insbesondere für eine mikrofluidische sequenzielle Zuführung ausgelegt sein. Dabei können die verschiedenen Nukleotide **24**, wie beispielsweise Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin zum Sequenzieren eines DNA-Strangs, nacheinander und in unterschiedlichen Zeitabschnitten auf die leitfähige Oberfläche **14** zugegeben werden. Sofern ein zugegebenes Nukleotid **24** die richtige Base aufweist, kann es an dem mindestens einen Primer **18**, bzw. an einen an dem mindestens einen Primer **18** neupolymerisierten Fortsetzungsstrang **26**, polymerisiert werden. Nicht verwendete Nukleotide **24** können mittels einer Spüleinrichtung von der leitfähigen Oberfläche **14** entfernt werden.

**[0032]** Mittels einer Anregungseinrichtung **28** der Sequenziervorrichtung ist ein elektrisches Wechselfeld erzeugbar, mittels welchem der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem angebondenen Primer **18** und dem mindestens einen angebondenen Markermolekül **20** zumindest teilweise so in eine Schwingbewegung **30** versetzbar, dass ein Abstand zwischen der leitfähigen Oberfläche **14** und dem mindestens einen Markermolekül **20** variierbar ist. Der Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem angebondenen Primer **18** ist unter physiologischen Bedingungen, wie beispielsweise einem pH-Wert von 7, 2, ein negativ geladenes Polymer. Deshalb kann der Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem angebondenen Primer **18** in dem erzeugten elektrischen Wechsel-

feld zwischen zwei Extremstellungen hin- und herbewegt werden. In einer ersten Extremstellung liegt der Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem angebundenen Primer **18** (als positiver Pol) auf der leitfähigen Oberfläche **14**. Demgegenüber ist der Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem angebundenen Primer **18** in einer zweiten Extremstellung (als negativer Pol) näherungsweise senkrecht zu der leitfähigen Oberfläche **14** ausgerichtet.

**[0033]** Bei einem Vorliegen des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** mit dem angebundenen Primer **18** in der ersten Extremstellung ist der Abstand zwischen dem mindestens einen Markermolekül **20** und der leitfähigen Oberfläche **14** minimal, während der Abstand zwischen dem mindestens einen Markermolekül **20** und der leitfähigen Oberfläche **14** bei einem Vorliegen des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** mit dem angebundenen Primer **18** in der zweiten Extremstellung kurzzeitig maximal wird. Sofern eine Distanz zwischen dem mindestens einen Markermolekül **20** und der Polymerase **16** vergleichsweise kurz ist, ist die Schwingbewegung **30** in Phase mit dem elektrischen Wechselfeld. Eine vergleichsweise große Distanz zwischen der Polymerase **16** und dem mindestens einen Markermolekül **20** bewirkt demgegenüber eine Schwingbewegung **30** außer Phase zu dem elektrischen Wechselfeld. Da eine Polymerisierung eines Nukleotids **24** an dem Primer **18**, bzw. an den neu polymerisierten Fortsetzungsstrang **26**, eine Vergrößerung (oder Verkleinerung) der Distanz zwischen der Polymerase **16** und dem mindestens einen Markermolekül **20** bewirkt, kann durch einen Vergleich der Phase der Schwingbewegung **30** im Verhältnis zu dem elektrischen Wechselfeld auf die Polymerisierung des Nukleotids **24** rückgeschlossen werden.

**[0034]** In der Ausführungsform der **Fig. 1** umfasst die Anregungseinrichtung **28** die als erste Elektrode ausgebildete leitfähige Oberfläche **14** und eine zweite Elektrode **32**, welche an einem Substrat **34** angebracht ist. Die Elektroden **14** und **32** der Anregungseinrichtung **28** können durch einen Mikrofluidik-Kanal getrennt sein. In einer alternativen Ausführungsform der Anregungseinrichtung **28** können die Elektroden auch auf einem gemeinsamen Substrat vorliegen. Optionaler Weise können die zweite Elektrode **32** und das Substrat **34** transparent/lichtdurchlässig sein. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die in **Fig. 1** dargestellte Ausführung der Anregungseinrichtung **28** lediglich beispielhaft zu interpretieren ist.

**[0035]** Die Sequenzier Vorrichtung hat auch eine Detektionseinrichtung **36**, mittels welcher mindestens ein mit dem variierenden Abstand zwischen der leitfähigen Oberfläche **14** und dem mindestens Markermolekül **20** variierendes Signal **38** ermittelbar ist. Das mindestens eine Signal **38** variiert vorzugsweise entsprechend der Schwingbewegung **30** in Phase oder außer Phase zu dem elektrischen Wechselfeld. So-

mit kann eine Auswerteeinrichtung **40** der Sequenzier Vorrichtung anhand eines von der Detektionseinrichtung **36** unter Berücksichtigung des mindestens einen variierenden Signals **38** bereitgestellten Ausgabesignals **42** eine Polymerisierung eines Nukleotids **24** an den Primer **18**, bzw. an den neu-polymerisierten Fortsetzungsstrang **26**, ermitteln/feststellen. Das Anwachsen des Primers **18**, bzw. des neu polymerisierten Fortsetzungsstrangs **26**, kann von der Auswerteeinrichtung **40** aufgrund einer Änderung der Phase der Signale **38** und **42** im Verhältnis zum elektrischen Wechselfeld verlässlich erkannt werden. Die Sequenzier Vorrichtung nutzt somit eine dynamische Messung von Strangeigenschaften/Stranglängen, wobei eine Auflösung gewährleistet ist, welche eine Detektion einer Einzelpolymerisierung eines Nukleotids **24** erlaubt.

**[0036]** Da der Typ der gerade auf die leitfähige Oberfläche **14** zugegebenen Nukleotide **24** aufgrund der vorgebbaren Reihenfolge der Nukleotidzuführeinrichtung **22** bekannt ist, kann rückgeschlossen werden, welche Base das neu polymerisierte Nukleotid **24** trägt. Somit ist die Sequenz des Fortsetzungsstrangs **26** ermittelbar, worauf auf die komplementäre Sequenz des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** rückgeschlossen werden kann. Die Auswerteeinrichtung **40** ist zusätzlich dazu ausgelegt, eine Information **44** bezüglich des Typs des an den Primer **18**, bzw. an den neu polymerisierten Fortsetzungsstrang **26**, neu-polymerisierten Nukleotids **24** und/oder des komplementären Nukleotids des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** auszugeben.

**[0037]** Die Sequenzier Vorrichtung ermöglicht somit eine Sequenzierung mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs **10** ohne die Verwendung von markierten Nukleotiden **24**. Stattdessen ist es ausreichend, wenn lediglich ein Markermolekül **20** an einem Ende des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs **10** oder an einem Ende des mindestens einen Primers **18** angebunden ist. Das in einem großen Abstand zu der benachbarten Polymerase **16** angebundene Markermolekül **20** beeinträchtigt deshalb nicht die Enzymeigenschaften der polymerisierenden Polymerase **16**. Das Markermolekül **20** trägt somit zu keiner Steigerung einer Fehlerrate bei. Die von der Sequenzier Vorrichtung ausgeführten Sequenzierungen sind verlässlich und (nahezu) fehlerfrei.

**[0038]** Wie in **Fig. 1** dargestellt ist, kann die Detektionseinrichtung **36** für eine Einzelmoleküldetektion eines einzigen der Markermoleküle **20** ausgebildet sein. Als Alternative dazu kann die Detektionseinrichtung **36** jedoch auch für eine gleichzeitige Detektion einer Vielzahl von Markermolekülen **20**, welche an Nukleinsäureeinzelsträngen **10** mit der gleichen Sequenz direkt oder indirekt angebunden sind, ausgebildet sein.

**[0039]** In der Ausführungsform der **Fig. 1** weist die Sequenziervorrichtung zusätzlich eine Lichtemittiereinrichtung **46** auf, mit welcher mindestens ein als Markermolekül **20** eingesetzter Fluorophor anregbar ist. Ein von der Lichtemittiereinrichtung **46** emittiertes Licht **48** liegt vorzugsweise im Absorptionsspektrum des mindestens einen Markermoleküls **20**. Die Detektionseinrichtung **36** ist für eine Detektion eines von dem mindestens einen Markermolekül **20** emittierten Lichts **38** als dem mindestens einen Signal **38** ausgelegt. Mittels eines geeignet gewählten Filters **50** kann sichergestellt werden, dass lediglich das von dem mindestens einen Markermolekül **20** emittierte Licht **38** von der Detektionseinrichtung **36** detektiert wird. Somit ist eine fluoreszenzhintergrundfreie Detektion ausführbar. Ein einer Intensität des Lichts **38** entsprechendes Ausgabesignal **42** kann anschließend an die Auswerteeinrichtung **40** ausgegeben werden.

**[0040]** Ein vergleichsweise kleiner Abstand zwischen dem mindestens einen Markermolekül **20** und der leitfähigen Oberfläche **14** bewirkt ein Quenchen des jeweiligen als Markermolekül **20** eingesetzten Fluorophors. Somit kann die Schwingbewegung **30** mittels der Intensität des von dem mindestens einen Markermolekül **20** emittierten Lichts **38** verlässlich wiedergegeben werden. Damit kann bei einer optischen Auslegung der Sequenziervorrichtung eine Polymerisierung eines Nukleotids **24** anhand der sich ändernden Phasenlage der variierenden Intensität des von dem mindestens einen Markermolekül **20** emittierten Lichts **38** verlässlich erkannt werden.

**[0041]** In einer Weiterbildung der Sequenziervorrichtung der **Fig. 1** können mittels der Lichtemittiereinrichtung **46** verschiedene Markermoleküle **20** mit unterschiedlichen Emissionsspektren gleichzeitig anregbar sein. Die verschiedenen Markermoleküle können an Nukleinsäureeinzelsträngen **10** mit unterschiedlichen Sequenzen angebunden sein. Bevorzugter Weise ist die Detektionseinrichtung **36** in diesem Fall dazu ausgelegt, die von den verschiedenen Markermolekülen **20** emittierten Photonen zu detektieren und einem bestimmten Emissionsspektrum der unterschiedlichen Emissionsspektren der Markermoleküle **20** zuzuordnen. Somit kann gezielt erkannt werden, an welchem/welchen der unterschiedlichen Nukleinsäureeinzelstränge **10** ein Nukleotid **24** mit einer bestimmten Base polymerisiert wird. Mittels der hier beschriebenen Weiterbildung der Sequenziervorrichtung können deshalb unterschiedliche Nukleinsäureeinzelstränge **10** mit verschiedenen Sequenzen gleichzeitig sequenziert werden.

**[0042]** Es wird darauf hingewiesen, dass die in der **Fig. 1** wiedergegebene optische Auslegung der Sequenziervorrichtung lediglich beispielhaft zu interpretieren ist. Beispielsweise kann die Detektionseinrichtung **36** auch für eine kapazitive Detektion des mindestens einen Markermoleküls **20** ausgelegt sein.

Auch anhand einer Phase einer detektierten Kapazität im Verhältnis zu dem elektrischen Wechselfeld kann auf die Phase der Schwingbewegung **30** rückgeschlossen werden. Somit sind auch bei einer derartigen Auslegung der Sequenziervorrichtung die oben schon beschriebenen Vorteile gewährleistet.

**[0043]** **Fig. 2** zeigt eine schematische Darstellung zum Erläutern einer ersten Ausführungsform des Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs.

**[0044]** In einem optionalen Verfahrensschritt kann vor der Sequenzierung des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs **10** mindestens ein Adapterstrang **52** an jeweils einen Nukleinsäureeinzelstrang **10** legiert werden. Der Adapterstrang **52** kann auch als Fängerstrang (Capture Probe) bezeichnet werden.

**[0045]** Anschließend wird der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit jeweils einem angebondenen Adapterstrang **52** und einem zu dem Adapterstrang **52** passenden Primer **18** auf eine leitfähige Oberfläche mit mindestens einer daran angebondenen Polymerase aufgebracht. Wahlweise kann mindestens ein (nicht dargestelltes) Markermolekül an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10**, bzw. dem Adapterstrang **52**, und/oder dem Primer **18** (chemisch) angebunden sein.

**[0046]** Ein elektrisches Wechselfeld wird an der leitfähigen Oberfläche mit der mindestens einen an der leitfähigen Oberfläche angebundenen Polymerase, an welcher der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10**/dem Adapterstrang **52** angebundenen Primer **18** und dem mindestens einen an dem Nukleinsäureeinzelstrang **10** und/oder dem Primer **18** angebundenen Markermolekül angebunden ist, erzeugt. Das Erzeugen des elektrischen Wechselfeldes erfolgt derart, dass mittels des elektrischen Wechselfeldes der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem angebundenen Primer **18** und dem mindestens einen angebundenen Markermolekül zumindest teilweise so in eine Schwingbewegung versetzt wird, dass ein Abstand zwischen der leitfähigen Oberfläche und dem mindestens einen Markermolekül variiert wird.

**[0047]** Gleichzeitig oder zwischenzeitlich werden verschiedene Typen von Nukleotiden in einer vorgegebenen Reihenfolge an die leitfähige Oberfläche mit der einen angebundenen Polymerase, dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang **10**, dem angebundenen Primer **18** und dem mindestens einen angebundenen Markermolekül zugeführt. Wie oben bereits ausgeführt ist, wird während des Erzeugens des elektrischen Wechselfeldes mindestens ein mit dem variierenden Abstand zwischen der leitfähigen Ober-

fläche und dem mindestens einen Markermolekül variierendes Signal ermittelt. Anschließend wird unter Berücksichtigung des mindestens einen variierenden Signals eine Polymerisierung eines Nukleotids an den Primer **18** ermittelt und ein Typ des an dem Primer **18** polymerisierten Nukleotids und/oder des komplementären Nukleotids des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** festgelegt. Zum Erkennen des Typs des an dem Primer **18** polymerisierten Nukleotids und/oder des komplementären Nukleotids des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** wird in der Regel auch die Reihenfolge der zu verschiedenen Zeiten zugeführten verschiedenen Typen von Nukleotiden berücksichtigt.

**[0048]** Nach einer Sequenzierung des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** kann dieser abgelöst werden. Ein weiterer Nukleinsäureeinzelstrang **10** kann danach von der gleichen Polymerase **16** eingefangen und sequenziert werden. Somit kann eine einzelne Polymerase **16** für mehrere Sequenzierungen genutzt werden.

**[0049]** In der Ausführungsform der **Fig. 2** weist der Adapterstrang **52** die gleiche Länge wie der Primer **18** auf, wobei eine Sequenz des Adapterstrangs **52** vorzugsweise einer Erkennungssequenz des Primers **18** entspricht. Die Ausführbarkeit des Verfahrens ist jedoch nicht darauf limitiert.

**[0050]** **Fig. 3** zeigt eine schematische Darstellung zum Erläutern einer zweiten Ausführungsform des Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs.

**[0051]** In der Ausführungsform der **Fig. 3** wird als der mindestens eine Primer **18** mindestens ein Primer **18** mit einer ersten Nukleotidanzahl, welche kleiner als eine zweite Nukleotidanzahl des mindestens einen an dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang **10** legierten Adapterstrangs **52** ist, an dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang **10** angebunden. Da die Sequenz des an den Nukleinsäureeinzelstrang **10** angrenzenden Teilstrangs **54** des Adapterstrangs **52**, für welche der Primer **18** keine komplementären Basen aufweist, bekannt ist, kann somit eine Referenzmessung ausgeführt werden. Sofern bei der Referenzmessung die bekannte Basenabfolge des Teilstrangs **54** ermittelt wird, kann davon ausgegangen werden, dass die zum Ausführen des Verfahrens eingesetzten Komponenten richtig justiert/geeicht sind. Andernfalls kann mit einer Überprüfung der Komponenten begonnen werden. Somit ist bei der Ausführungsform der **Fig. 3** das Vorliegen eines Fehlers an der zum Sequenzieren des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** verwendeten Apparatur schnell erkennbar und behebbar.

**[0052]** **Fig. 4** und **Fig. 5** zeigen schematische Darstellungen zum Erläutern einer dritten und einer vier-

ten Ausführungsform des Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs.

**[0053]** Bei der Ausführungsform der **Fig. 4** ist genau ein Markermolekül **20** an dem Adapterstrang **52** (mittels einer chemischen Bindung **55**) angebunden. Vorzugsweise liegt das Markermolekül **20** an dem 5-Ende des Adapterstrangs **52** vor.

**[0054]** Demgegenüber ist in der Ausführungsform der **Fig. 5** genau ein Markermolekül **20** (mittels einer chemischen Bindung **55**) an dem Primer **18** angebunden. In diesem Fall wird eine Anbindung des Markermoleküls **20** an das 3-Ende des Primers **18** bevorzugt.

**[0055]** Die in **Fig. 4** und **Fig. 5** wiedergegebenen Anbindpositionen der Markermoleküle **20** sind jedoch lediglich beispielhaft zu interpretieren. Als das mindestens eine Markermolekül **20** kann ein Fluorophor eingesetzt werden. Als Alternative dazu kann jedoch auch ein dielektrischer Marker, wie insbesondere ein Metall-Nanopartikel, als Markermolekül **20** verwendet werden. Somit kann auch eine kapazitive Messung zum Ausführen der hier beschriebenen Verfahren genutzt werden.

**[0056]** **Fig. 6a–Fig. 6c** zeigen schematische Darstellungen zum Erläutern einer fünften Ausführungsform des Verfahrens zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs.

**[0057]** Bei der Ausführungsform der **Fig. 6a–Fig. 6c** wird als der mindestens eine Primer **18** mindestens ein Primer **18** an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang **10** angebunden, dessen Teilsequenz zusammen mit einer Teilsequenz des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs **10** eine Restriktionssequenz für ein Restriktionsenzym **56** ergibt. Mittels des jeweiligen Restriktionsenzym **56** wird anschließend ein nicht zu sequenzierender Teilstrang **58** des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** von einem zumindest teilweise zu sequenzierenden Reststrang **60** des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** abgetrennt (vergleiche **Fig. 6a** und **Fig. 6b**).

**[0058]** Der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit dem angebundenen Primer **18** wird anschließend auf die leitfähige Oberfläche mit der mindestens einen daran angebundenen Polymerase **16** gegeben. Somit kann der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mit einem daran angebundenen Primer **18** an die mindestens eine Polymerase **16** binden und die oben bereits ausgeführten Verfahrensschritte sind durchführbar.

**[0059]** Die Ausführungsform der **Fig. 6a** bis **Fig. 6c** eignet sich zum schnellen Re-Sequenzieren von Abschnitten, welche stochastisch verteilt vorliegen. Das entsprechende Verfahren kann auch mit zwei Pri-

mern **18** für den Forward- und den Reverse-Strang ausgeführt werden. Limitierend ist in diesem Fall nur die Bildung von Primer-Primer-Hybridisierungen bei einer Verwendung von vielen unterschiedlichen Primern **18**.

**[0060]** Das Verfahren der **Fig. 6a** bis **Fig. 6c** eignet sich auch für eine Kombination aus Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung ohne eine Library-Präparation für die Sequenzierung. Beispielsweise wird in einem Mikrofluidik-Kanal eine Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einem Molecular-Beacon-Primer ausgeführt. In diese Lösung wird in der Folge ein Restriktionsenzym **56** und die Polymerase **16** zugesetzt. Das an die Polymerase **16** gebundene und amplifizierte Produkt kann stochastisch auf der leitfähigen Oberfläche **14** in ausreichender Verdünnung verankert werden.

**[0061]** Die oben ausgeführten Verfahren ermöglichen eine markierungsfreie Sequenzierung. Insbesondere ist eine Sequenzierung mit einer im Vergleich zu ISFET-Messungen hohen Ionenstärke ausführbar. Eine Gesamtkonzentration der Ionen kann über 500  $\mu\text{M}$  liegen. Eine Konzentration von Magnesium-Ionen kann z.B. größer als 100  $\mu\text{M}$  sein. Ideal sind Konzentrationen von Magnesium-Ionen und einer Taq-Polymerase zwischen 0,5 bis 5 mM.

**[0062]** Alle mittels der **Fig. 2–Fig. 6c** wiedergegebenen Verfahren können mittels einer Einzelmoleküldetektion eines einzigen der Markermoleküle **20** als eine Einzelstrangsequenzierung ausgeführt werden. Durch eine geeignete Wahl von Fluorophoren können auch Einzelmolekülmessungen ohne ein schnelles Bleichen des Fluorophors ausführbar sein. Als Alternative dazu kann jedoch auch eine Gruppe gleicher Nukleinsäureeinzelstränge **10** gleichzeitig mittels eines der Verfahren sequenziert werden. In einer Weiterbildung können auch verschiedenen Nukleinsäureeinzelstränge **10** mit voneinander abweichenden Sequenzen, an welchen unterschiedliche Markermoleküle (direkt oder indirekt) angebunden sind/werden, gleichzeitig mittels eines der oben beschriebenen Verfahren sequenziert werden. Auf diese Weise können verschiedene Nukleinsäureeinzelstränge **10** innerhalb einer vergleichsweise kurzen Zeit sequenziert werden.

**[0063]** Mittels der oben beschriebenen Verfahren können RNA-Stränge, DNA-Stränge und/oder PNA-Stränge sequenziert werden. Insbesondere kann als der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang **10** mindestens ein Mikro-RNA-Strang sequenziert werden. Ein derartiger Mikro-RNA-Strang kann eine Anzahl von ungefähr 20 Nukleotiden, wie beispielsweise 21 bis 23 Nukleotide, aufweisen. Vorteilhafterweise muss ein derartiger Mikro-RNA-Strang vor seiner Sequenzierung nicht mehr mittels einer Restriktion fragmentiert werden.

**[0064]** Die Länge eines sequenzierbaren Nukleinsäureeinzelstrangs **10** hängt von der gestreckt vorliegt Stranglänge/der Persistenzlänge ab. Somit sind in der Regel etwa 100 Basen mittels der oben erläuterten Verfahren verlässlich ermittelbar. Es wird darauf hingewiesen, dass zum Ausführen der oben beschriebenen Verfahren keine Thiol-Funktionalisierung des Nukleinsäureeinzelstrangs **10** notwendig ist.

**[0065]** Alle oben beschriebenen Verfahren ermöglichen eine sehr schnelle Sequenzierung. Es wird insbesondere darauf hingewiesen, dass zum Ausführen der oben beschriebenen Verfahren keine Zwischenschritte zum Entfernen eines Fluorophors nach einer Polymerisierung notwendig sind.

**[0066]** Mittels der oben ausgeführten Verfahren kann auch eine Detektion eines Strangtyps mit mehreren Polymerasen **16** ausgeführt werden, bei welcher amplifizierte Nukleinsäureeinzelstränge **10** gerichtet zu einem Sensor mikrofluidisch transportiert werden.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- US 2010/0035254 A1 [0002, 0029]

## Patentansprüche

1. Sequenziervorrichtung zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs (10) mit:  
 einer Probenhalterung (12), an welcher eine leitfähige Oberfläche (14) befestigbar oder befestigt ist, wobei die leitfähige Oberfläche (14) derart funktionalisiert und/oder funktionalisierbar ist, dass mindestens eine Polymerase (16) an der leitfähigen Oberfläche (14) so anbindbar ist, dass der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang (10) mit mindestens einem an dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) angebondenen Primer (18) und mindestens einem an dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) und/oder dem mindestens einen Primer (18) angebondenen Markermolekül (20) an die an der leitfähigen Oberfläche (14) angebondene Polymerase (16) anbindbar ist;  
 gekennzeichnet durch  
 eine Nukleotidzuführeinrichtung (22), mittels welcher verschiedene Typen von Nukleotiden (24) in einer vorgebbaren Reihenfolge an die leitfähige Oberfläche (14) mit der mindestens einen angebondenen Polymerase (16), dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10), dem mindestens einen angebondenen Primer (18) und dem mindestens einen angebondenen Markermolekül (20) zuführbar sind;  
 eine Anregungseinrichtung (28), mittels welcher ein elektrisches Wechselfeld erzeugbar ist, mittels welchem der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang (10) mit dem mindestens einen angebondenen Primer (18) und dem mindestens einen angebondenen Markermolekül (20) zumindest teilweise so in eine Schwingbewegung (30) versetzbar ist, dass ein Abstand zwischen der leitfähigen Oberfläche (14) und dem mindestens einen Markermolekül (20) variierbar ist;  
 eine Detektionseinrichtung (36), mittels welcher mindestens ein mit dem variierenden Abstand zwischen der leitfähigen Oberfläche (14) und dem mindestens einen Markermolekül (20) variierendes Signal (38) ermittelbar ist; und  
 eine Auswerteeinrichtung (40), welche dazu ausgelegt ist, unter Berücksichtigung des mindestens einen variierenden Signals (38) eine Polymerisierung eines Nukleotids (24) an den mindestens einen Primer (18) zu ermitteln, und eine Information (44) bezüglich eines Typs des an den mindestens einen Primer (18) polymerisierten Nukleotids (24) und/oder des komplementären Nukleotids des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs (10) auszugeben.

2. Sequenziervorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Sequenziervorrichtung eine Lichtemittiereinrichtung (46) umfasst, mittels welcher das mindestens eine Markermolekül (20) anregbar ist, und die Detektionseinrichtung (36) für eine Detektion eines von dem mindestens einen Markermolekül (20) emittierten Lichts (38) als das mindestens eine variierende Signal (38) ausgelegt ist.

3. Sequenziervorrichtung nach Anspruch 2, wobei mittels der Lichtemittiereinrichtung (46) verschiedene Markermoleküle (20) mit unterschiedlichen Emissionsspektren gleichzeitig anregbar sind, und die Detektionseinrichtung (36) dazu ausgelegt ist, die von den verschiedenen Markermolekülen (20) emittierten Photonen zu detektieren und einem bestimmten Emissionsspektrum der unterschiedlichen Emissionsspektren der Markermoleküle (20) zuzuordnen.

4. Sequenziervorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Detektionseinrichtung (36) für eine kapazitive Detektion des mindestens einen Markermoleküls (20) ausgelegt ist.

5. Sequenziervorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detektionseinrichtung (36) für eine Einzelmoleküldetektion eines einzigen der Markermoleküle (20) ausgebildet ist.

6. Sequenziervorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Detektionseinrichtung (36) für eine gleichzeitige Detektion einer Vielzahl von Markermolekülen (20) ausgebildet ist.

7. Verfahren zum Sequenzieren mindestens eines Nukleinsäureeinzelstrangs (10) mit den Schritten:  
 Erzeugen eines elektrisches Wechselfelds an einer leitfähigen Oberfläche (14) mit mindestens einer an der leitfähigen Oberfläche (14) angebondenen Polymerase (16), an welche der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang (10) mit mindestens einem an dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) angebondenen Primer (18) und mindestens einem an dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) und/oder dem mindestens einen Primer (18) angebondenen Markermolekül (20) angebonden ist, derart, dass der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang (10) mit dem mindestens einen angebondenen Primer (18) und dem mindestens einen angebondenen Markermolekül (20) zumindest teilweise so in eine Schwingbewegung (30) versetzt wird, dass ein Abstand zwischen der leitfähigen Oberfläche (14) und dem mindestens einen Markermolekül (20) variiert wird;  
 Zuführen von verschiedenen Typen von Nukleotiden (24) in einer vorgegebenen Reihenfolge an die leitfähige Oberfläche (14) mit der mindestens einen angebondenen Polymerase (16), dem mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10), dem mindestens einen angebondenen Primer (18) und dem mindestens einen angebondenen Markermolekül (20);  
 Ermitteln mindestens eines mit dem variierenden Abstand zwischen der leitfähigen Oberfläche (14) und dem mindestens einen Markermolekül (20) variierenden Signals (38); und  
 Ermitteln einer Polymerisierung eines Nukleotids (24) an den mindestens einen Primer (18) und Festlegen eines Typs des an den mindestens einen Primer (18) polymerisierten Nukleotids (24) und/oder des kom-

plementären Nukleotids des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs (10) unter Berücksichtigung des mindestens einen variierenden Signals (38).

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei als der mindestens eine Primer (18) mindestens ein mit mindestens einem Metall-Nanopartikel als das mindestens eine Markermolekül (20) markierter Primer (18) an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) angebunden wird.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei als der mindestens eine Primer (18) mindestens ein Primer (18) mit einer ersten Nukleotidanzahl, welche kleiner als eine zweite Nukleotidanzahl mindestens eines an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) legierten Adapterstrangs (52) ist, an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) angebunden wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei als der mindestens eine Primer (18) mindestens ein Primer (18) an den mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrang (10) angebunden wird, dessen Teilsequenz zusammen mit einer Teilsequenz des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs (10) eine Restriktionssequenz für ein Restriktionsenzym (56) ergibt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei mittels des Restriktionsenzym (56) ein nicht zu sequenzierender Teilstrang (58) des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs (10) von einem zumindest teilweise zu sequenzierenden Reststrang (60) des mindestens einen Nukleinsäureeinzelstrangs (10) abgetrennt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei mittels einer Einzelmoleküldetektion eines einzigen der Markermoleküle (20) eine Einzelstrangsequenzierung ausgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei eine Gruppe gleicher Nukleinsäureeinzelstränge (10) gleichzeitig sequenziert werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei verschiedene Nukleinsäureeinzelstränge (10) mit voneinander abweichenden Sequenzen, an welchen unterschiedliche Markermoleküle (20) direkt oder indirekt angebunden sind, gleichzeitig sequenziert werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 14, wobei als der mindestens eine Nukleinsäureeinzelstrang (10) mindestens ein Mikro-RNA-Strang sequenziert wird.

Es folgen 3 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

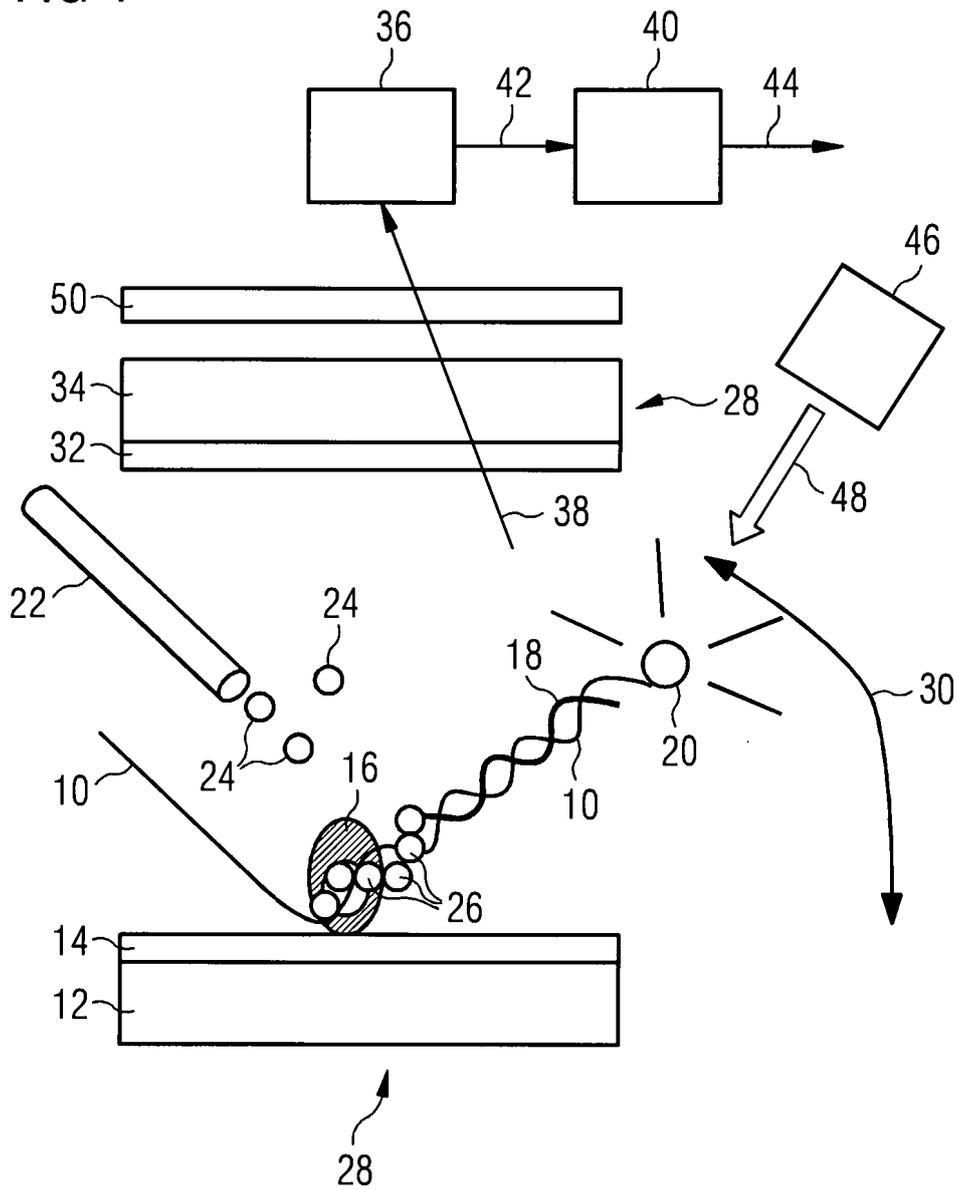


FIG 2

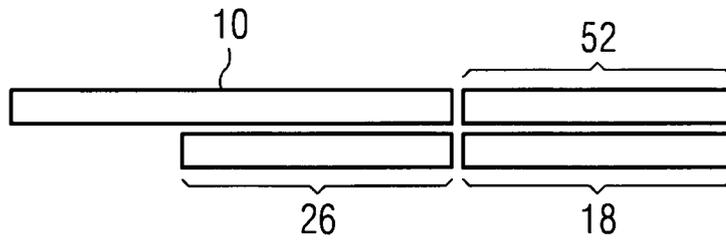


FIG 3

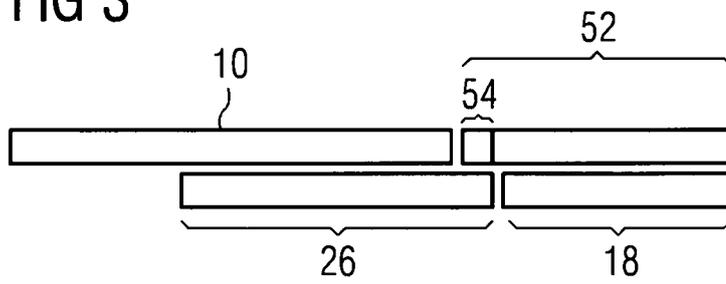


FIG 4

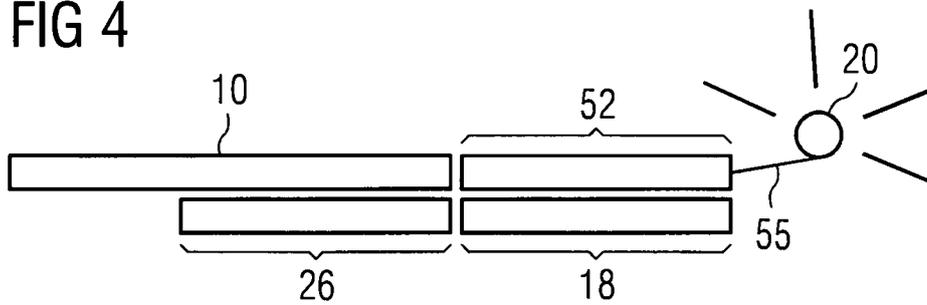


FIG 5

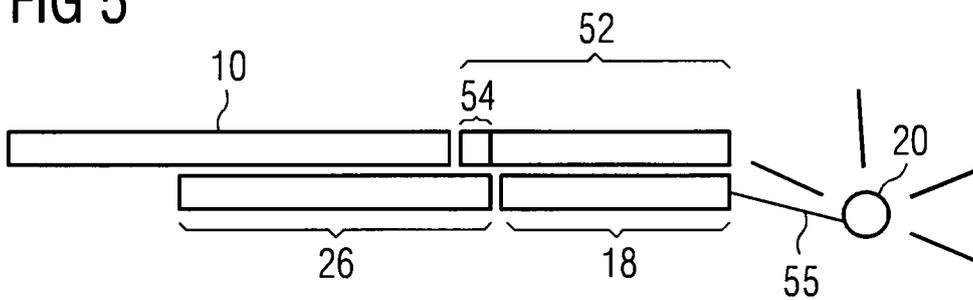


FIG 6a

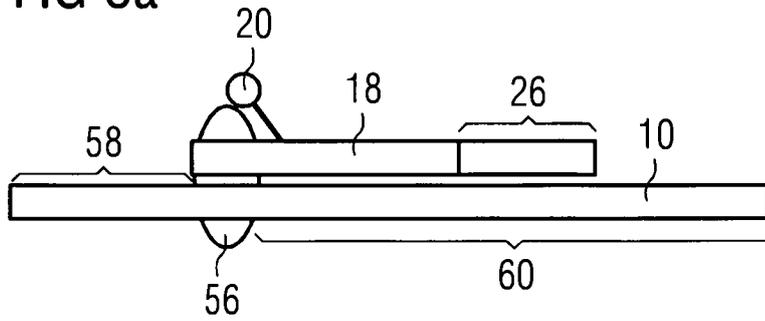


FIG 6b

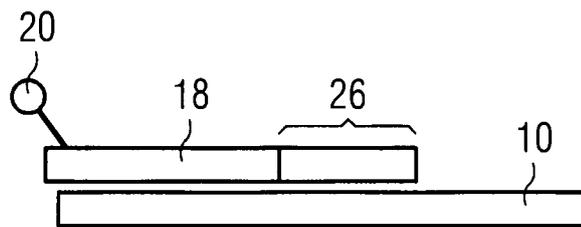


FIG 6c

