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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

PCT

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Oktober 2007 (04.10.2007)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/110124 A1

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/001328

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Februar 2007 (15.02.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2006 014 000.1 27. März 2006 (27.03.2006) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **ADVALYTIX AG** [DE/DE]; Eugen-Sänger-Ring 4, 85649 Brunnthal (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **GAUER, Christoph** [DE/DE]; Wiener Platz 8, 81667 München (DE). **WOLFGANG, Mann** [DE/DE]; Hornungsreuth 22a, 95512 Neudrossenfeld (DE).

(74) Anwalt: **MANITZ, FINSTERWALD & PARTNER GBR**; Postfach 31 02 20, 80102 München (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** METHOD OF CHARACTERIZING NUCLEIC ACIDS IN A MIXED SAMPLE

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN IN EINER MISCHPROBE

(57) **Abstract:** The present invention relates to a method of characterizing a mixed sample comprising at least two particles with nucleic acids from different individuals, where each particle comprises nucleic acid from one or more individuals, in particular for the quantitative determination of the absolute and/or relative copy number of a predetermined sequence of an individual, of which nucleic acid is present in the mixed sample, comprising the steps: a) isolating the particles and applying at least two individual particles to a substrate, where each of the at least two particles is deposited in each case individually to a hydrophilic reaction site, surrounded by a hydrophobic zone, of the substrate in a volume of less than 10 µl so that precisely one particle is present per reaction site, b) analysis of at least two of the particles deposited to the substrate at the reaction site of the substrate in order to assign each of the particles to individuals from the mixed sample by means of genotyping, where at least 80% of the particles analysed are to be assigned to an individual, and c) further characterization of the analysed particles. Moreover, the present invention relates to a kit which is suitable in particular for carrying out the abovementioned method.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen, wobei jedes Partikel Nukleinsäure eines oder mehrerer Individuen umfasst, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und /oder relativen Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums, von dem Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist, umfassend die Schritte: a) Vereinzeln der Partikel und Aufbringen von mindestens zwei einzelnen Partikeln auf ein Substrat, wobei jedes der wenigstens zwei Partikel jeweils einzeln auf eine von einem hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstelle des Substrats in einem Volumen von weniger als 10 µl abgelegt wird, so dass pro Reaktionsstelle genau ein Partikel vorliegt, b) Untersuchung von wenigstens zwei der auf dem Substrat abgelegten Partikeln auf der Reaktionsstelle des Substrats, um die Partikel jeweils durch Genotypisierung Individuen aus der Mischprobe zuzuordnen, wobei wenigstens 80% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind, und c) weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel. Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein insbesondere zur Durchführung des vorgenannten Verfahrens geeignetes Kit.

WO 2007/110124 A1

VERFAHREN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN IN EINER MISCHPROBE

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen, wobei jedes Partikel Nukleinsäure eines oder mehrerer Individuen umfasst, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder zur Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer Individuen aus einer Mischprobe, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums, von dem Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist. Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit zur Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer Individuen aus einer Mischprobe, welche Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen enthält, welches insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums, von dem Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist, geeignet ist.

Auf einer Vielzahl technischer Gebiete ergibt sich die Notwendigkeit, Mischproben, d.h. biologische Proben enthaltend Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen, zu charakterisieren, um Rückschlüsse auf die Identität und/oder ein oder mehrere spezifische genotypische Merkmale eines oder mehrerer der Individuen, dessen bzw. deren Nukleinsäure(n) in der Mischprobe enthalten ist/sind, zu gewinnen. Lediglich beispielsweise seien Anwendungen in der Forensik, in der Gentechnik, z.B. im Rahmen von Klonierungen, oder in der medizinische Diagnostik genannt.

In der Forensik stehen beispielsweise häufig von einem Tatort lediglich Proben zur Verfügung, welche die Nukleinsäuren von zwei oder mehr unterschiedlichen Personen enthalten, um aus dieser Mischprobe Rückschlüsse auf die Identität des Täters erlaubende Erkenntnisse zu gewinnen. In der Regel ist dabei unbekannt, wie sich die Mischprobe zusammensetzt, insbesondere von wie vielen verschiedenen Individuen Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist und wie das Mengenverhältnis der Nukleinsäuren der einzelnen Individuen in der Mischprobe untereinander ist.

Auch in der medizinischen Diagnostik stellt sich häufig die Aufgabe, eine Mischprobe zu charakterisieren. Als Alternative zu der Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie, welche für die untersuchte schwangere Frau Infektionsrisiken bergen, wird in der pränatalen Diagnostik in jüngster Zeit versucht, den Genotyp eines Fötus aus maternalem, fetale Zellen enthaltendem Blut zu bestimmen, um etwaige schwere Erkrankungen bereits im pränatalen Stadium erkennen zu können. Da eine Vielzahl von zum Teil schweren Erkrankungen durch Abweichungen von der normalen Kopienzahl von Nukleinsäuresequenzen im Genom verursacht wird, lassen sich durch eine Bestimmung der Kopienzahl bestimmter Chromosomen oder bestimmter Genabschnitte entsprechende Krankheiten schon im Frühstadium der Entwicklung zuverlässig diagnostizieren. Beispiele für zum Teil schwere Anomalien, welche auf eine erhöhte Kopienzahl ganzer Chromosomen zurückzuführen sind, sind die Trisomie 18 (Edward's Syndrom), Trisomie 13 (Pätau-Syndrom) sowie Trisomie 21 (Down-Syndrom). Bei jeder dieser Krankheiten beträgt die Kopienzahl des entsprechenden Chromosoms 18, 13 bzw. 21 pro Zelle drei, wohingegen gesunde Individuen lediglich zwei Kopien der vorgenannten Chromosomen pro Zelle aufweisen. In allen drei Fällen führt die Erhöhung der Kopienzahl des betreffen-

den Chromosoms zu schwersten Entwicklungsstörungen. Neben Krankheiten, welche auf eine erhöhte Kopienzahl ganzer Chromosomen zurückzuführen sind, ist auch eine Vielzahl von Erkrankungen bekannt, welche auf einer veränderte Kopienzahl von Genen oder Genabschnitten beruhen. Lediglich beispielsweise sei in diesem Zusammenhang die Huntington-Krankheit, eine progressiv verlaufende neurodegenerative Erkrankung gekennzeichnet durch abnormale, unwillkürliche Bewegungen bei zunehmendem Verfall der geistigen und körperlichen Fähigkeiten, genannt. Durch die Bestimmung der Kopienzahl der entsprechenden Chromosomen, Gene oder Genabschnitte in den fetalen Zellen lässt sich so bereits pränatal eine etwaige entsprechende Erkrankung diagnostizieren. Allerdings ist die Bestimmung des Genotyps eines Fötus aus maternalem Blut problematisch, da fetale Zellen in maternalem Blut lediglich in einer Häufigkeit von etwa 1:1.000.000 (fetale Zellen/maternale Zellen) vorkommen und das genaue relative Verhältnis zwischen maternalen und fetalen Zellen zunächst nicht bekannt ist und ohne weitere, aufwendige Untersuchungen nicht ermittelt werden kann.

Eine ähnliche Problematik ergibt sich auch in der Krebsdiagnostik, beispielsweise bei der Untersuchung einer Körperprobe auf die Anwesenheit von Krebszellen. Sofern die Körperprobe tatsächlich Krebszellen enthält, handelt es sich um eine Mischprobe enthaltend gesunde Zellen und Krebszellen (welche im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Zellen zweier verschiedener Individuen angesehen werden), wobei das Mengenverhältnis der einzelnen Zelltypen untereinander nicht bekannt ist und mit aufwendigen Untersuchungen bestimmt werden muss, um festzustellen, in welchem fortgeschrittenen Stadium sich der Krebs befindet.

Aufgrund des Vorliegens von Nukleinsäuren verschiedener Individuen und des unbekannten Mengenverhältnisses dieser verschiedenen Nukleinsäu-

ren untereinander ist eine direkte genetische Untersuchung von Mischproben häufig nicht möglich oder führt zu falschen Ergebnissen, da die neben der Nukleinsäure des zu charakterisierenden Individuums enthaltene(n) Nukleinsäure(n) anderer Individuen die Charakterisierung der Nukleinsäure des zu charakterisierenden Individuums stören. Dies ist insbesondere dann gegeben, wenn die Menge an der Nukleinsäure des zu charakterisierenden Individuums in der Mischprobe signifikant geringer ist als die Menge der daneben vorliegenden Nukleinsäure eines anderen Individuums, wie im Falle von maternalem, fetale Zellen enthaltenem Blut. In dem Fall, dass die Mischprobe hinsichtlich des zu charakterisierenden Individuums angereichert wird, bspw. durch Anreicherung der fetalen Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, gelingt es in der Regel nicht, eine reine Probe hinsichtlich des zu charakterisierenden Individuums zu erhalten. Es kommt bei den bekannten Verfahren zu falsch positiven Ergebnissen (eine maternale Zelle wird fälschlicherweise als fetale Zelle typisiert) und/oder falsch negativen Ergebnissen (eine fetale Zelle wird übersehen).

Die vorgenannte Problematik ergibt sich auch bei Einzelzelluntersuchungen, wenn die entsprechende Zelle nicht sauber isoliert wurde und in dem Isolat, unerkannt, andere an dieser angelagerte Zelle(n) vorhanden sind. Insbesondere bei der Isolierung von einzelnen Zellen aus Gewebe kommt es häufig zu einer unerwünschten Kontamination der Einzelzelle mit Nukleinsäuren anderer Zellen, weil an der Zielzelle zumindest nukleinsäurehaltige Zellmembranfragmente anderer Zellen angelagert sind. Die bei der Charakterisierung mit einem solchen Zellisolat erhaltenen Ergebnisse sind aufgrund des vorhandenen Hintergrunds anderer Zellen oftmals falsch (Fendt & Raffeld, J. Clinical Pathology (2000), 53: 666-672).

Dies sei an folgendem Gedankenexperiment erläutert: Es soll anhand einer Körperprobe eines Patienten bestimmt werden, ob Zellen zu Krebszellen mutiert sind. Dabei ist bekannt, dass eine Krebszelle ein bestimmtes Gen überexprimiert, weswegen die zu detektierende Krebszelle eine doppelte Kopienzahl an mRNA des vorgenannten Gens aufweist als die gesunde Zelle. Untersucht man nun eine Mischprobe, die beispielsweise aus einer Krebszelle besteht, an der eine gesunde Zelle anhaftet, erhält man eine Mischantwort, die sich aus Summe der Expression des entsprechenden Gens der gesunden Zelle und der Expression des entsprechenden Gens der mutierten Zelle zusammensetzt. Die durch den mRNA-Gehalt quantifizierbare Genexpression wird im Vergleich zur gesunden Zelle gemessen. Dabei beträgt die entsprechende Genexpression einer gesunden Zelle 100%, die von 2 gesunden Zellen 200% und die von 3 gesunden Zellen 300%, wohingegen die Genexpression einer Krebszelle 200% beträgt. Daher ergibt die Untersuchung der aus einer gesunden Zelle und einer Krebszelle bestehenden Mischprobe eine Genexpression von 300% (100% für die gesunde Zelle plus 200% für die Krebszelle), was im Verhältnis zu einer aus zwei gesunden Zellen bestehenden Referenz mit einer Genexpression von (100%+100%=) 200% zu einem Verhältnis Probe/Referenz von 300/200=1,5 führt. Hätte man hingegen zwei Experimente mit von Zellbestandteilen anderer Zellen freien Einzelzellen durchgeführt, hätte man für eine untersuchte gesunde Zelle (100% Genexpression) ein Verhältnis Probe zu Referenz (1 gesunde Zellen mit 100% Genexpression) von 1 erhalten. Bei der Untersuchung einer Krebszelle (200% Genexpression) hätte man hingegen ein Verhältnis Probe zu Referenz (1 gesunde Zellen mit 100% Genexpression) von 2 erhalten, was im Vergleich zu dem erhaltenen Verhältnis von 1,5 für das Zwei-Zellen-Experiment deutlich leichter festzustellen ist.

Aber selbst wenn reine, von Fremdnukleinsäure freie Einzelzellen für eine Einzelzelluntersuchung vorgelegt werden, wird mit einer hieran durchgeführten PCR statistisch gesehen nur in 40 bis 70% der Fälle ein Amplifikationsprodukt erhalten, da Einzelzellen in herkömmlichen Mikrotiterplatten häufig, unerkannt, am Rand des Gefäßes abgelegt werden und so nach Zugabe der Reaktionslösung in einem für die PCR typischen Volumen von kleiner 50 µl nicht suspendiert werden. Bei einer in einer 96-well Mikrotiterplatte, in der pro well genau eine Zelle mit herkömmlichen Pipettiervorrichtungen abgelegt wurde, durchgeführten Amplifikationsreaktion werden daher mit den herkömmlichen Verfahren lediglich für etwa 35 bis 65 der Proben Amplifikationsprodukte erhalten.

Derzeit gibt es kein Verfahren, mit dem eine Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen enthaltende Mischprobe, deren qualitative und/oder quantitative Zusammensetzung, d.h. von der die Anzahl der verschiedenen Individuen, von denen in der Mischprobe Nukleinsäure enthalten ist, und/oder das Mengenverhältnis der einzelnen, unterschiedlichen Nukleinsäuren untereinander, unbekannt ist, zuverlässig und schnell hinsichtlich des Genotyps eines in der Mischprobe enthaltenen Individuums analysiert werden kann. Vielmehr führen die zu diesem Zweck bekannten Verfahren aufgrund des Hintergrunds an Nukleinsäuren der anderen, von dem zu untersuchenden Individuum verschiedenen Individuen zu falschen oder zumindest unzuverlässigen Ergebnissen. Zudem sind diese Verfahren zumeist zeitaufwendig und kostenintensiv.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen bereitzustellen, mit dem die absolute und/oder relative Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder der Genotyp ei-

nes oder mehrerer Individuen aus der Mischprobe einfach, schnell und insbesondere zuverlässig bestimmt werden kann.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Verfahren nach Patentanspruch 1 und insbesondere durch ein Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen, wobei jedes Partikel Nukleinsäure eines oder mehrerer Individuen umfasst, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder zur Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer Individuen aus einer Mischprobe, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums, von dem Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist, umfassend die Schritte:

a) Vereinzeln der Partikel und Aufbringen von mindestens zwei einzelnen Partikeln auf ein Substrat, wobei jedes der wenigstens zwei Partikel jeweils einzeln auf eine von einem hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstelle des Substrats in einem Volumen von weniger als 10 µl abgelegt wird, so dass pro Reaktionsstelle genau ein Partikel vorliegt,
b) Untersuchung von wenigstens zwei der auf dem Substrat abgelegten Partikeln auf der Reaktionsstelle des Substrats, um die Partikel jeweils durch Genotypisierung Individuen aus der Mischprobe zuzuordnen, wobei wenigstens 80% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind, und
c) weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel.

Unter einer Mischprobe wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Probe, insbesondere eine biologische Probe, verstanden, welche wenigstens zwei, jeweils Nukleinsäure enthaltende Partikel umfasst, wobei in der Probe, entweder pro Partikel oder in der Gesamtheit der Partikel, Nukleinsäuren von wenigstens zwei verschiedenen Individuen enthalten sind. Der Begriff Partikel bedeutet in diesem Zusammenhang ein kleines Teilchen. Die Nukleinsäure kann dabei in dem Partikel enthalten oder an dem Partikel gebunden sein. Beispiele für entsprechende Partikel sind Zellen, insbesondere unlysierte Zellen mit darin enthaltener Nukleinsäure, und magnetische Partikel mit daran beispielsweise über Hybridisierung an einen Primer gebundener Nukleinsäure.

Der Begriff Individuum umfasst im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht nur eine – im Falle von Menschen – von anderen unterschiedliche Person, sondern insbesondere auch verschiedene Zelltypen einer Person, welche sich voneinander hinsichtlich ihres Genotyps unterscheiden. Beispiele hierfür sind genetische Mosaike oder Chimären, also Zellen unterschiedlichen Genotyps einer Person, die sich durch Vermischung oder Austausch unterschiedlicher Genotypen erst bilden (Chimäre) oder in einem Individuum entstehen (genetisches Mosaik). Ein Beispiel für ein genetisches Mosaik sind Krebszellen, die beispielsweise durch LOH ("*loss of heterozygosity*") entstanden sind.

Ein Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere, dass eine Mischprobe hinsichtlich ihrer Zusammensetzung qualitativ und/oder quantitativ charakterisiert wird. Eine Charakterisierung einer Mischprobe umfasst daher beispielsweise die quantitative Bestimmung der absoluten Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden unterschiedlichen Individuen, die quantitative Bestimmung der relativen Anzahl/Häufigkeit eines Individuums in der

Mischprobe (beispielsweise die Bestimmung des prozentualen Anteils eines Zelltyps A in einer die Zelltypen A und B umfassenden biologischen Probe) und/oder die Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer in einer Mischprobe vertretenen Individuen.

Unter Bestimmung des Genotyps einer oder mehrerer Individuen im Sinne der vorliegenden Erfindung wird insbesondere die Charakterisierung wenigstens einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums hinsichtlich An- oder Abwesenheit, Kopienzahl und/oder Nukleinsäuresequenz verstanden, also insbesondere die Bestimmung der absoluten oder relativen Anzahl einer vorbestimmten Sequenz, beispielsweise eines Genoms, eines Gens oder eines Genabschnitts.

Ferner bedeutet relative quantitative Bestimmung der Anzahl einer vorbestimmten Sequenz in einem Individuum im Sinne der vorliegenden Erfindung die Bestimmung, ob das Genom eines Individuum weniger, gleich viel oder mehr Kopien einer vorbestimmten Sequenz enthält als das einer Referenzprobe und absolute quantitative Bestimmung der Anzahl einer vorbestimmten Sequenz in einem Individuum die Bestimmung, welche konkrete Anzahl an Kopien der vorbestimmten Sequenz in dem Genom des Individuums enthalten ist.

Zudem bezeichnet der Begriff homologe Sequenz im Sinne der vorliegenden Erfindung Sequenzen, welche untereinander eine Ähnlichkeit bezüglich deren Nukleotidsequenz von wenigstens 70 %, bevorzugt wenigstens 80 %, besonders bevorzugt wenigstens 90 % und ganz besonders bevorzugt wenigstens 95 % aufweisen, wohingegen nicht homologe Sequenzen solche sind, welche untereinander eine entsprechend geringere Sequenzähnlichkeit aufweisen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen schnell, einfach und insbesondere zuverlässig charakterisiert werden. Insbesondere lassen sich mit diesem Verfahren zuverlässige Ergebnisse bezüglich der absoluten und relativen Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums erzielen. Des Weiteren erlaubt dieses die zuverlässige Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer Individuen aus der Mischprobe.

Ein wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, dass die Partikel, bspw. Zellen, einer Mischprobe in Schritt a) zunächst derart vereinzelt werden, dass eine spätere Ablage genau eines Partikels bzw. einer Zelle, welche im Gegensatz zu einer Vielzahl der aus dem Stand der Technik bekannten Einzelzellverfahren frei an daran gebundenen anderen Zellen bzw. Bestandteilen anderer Zellen ist, pro Reaktionsstelle des Substrats möglich ist. Dadurch wird gewährleistet, dass diese Zelle bzw. dieses Partikel ohne Hintergrund an individuumsfremder Nukleinsäure analysiert werden kann.

Zudem wird durch die Ablage jeweils einer Zelle auf der von einem hydrophoben Bereich umgebenen hydrophilen Reaktionsstelle eines Substrats die Ausbildung eines aus der in dem Zellisolat enthaltenen oder aus der der Zelle nach dem Ablegen auf der Reaktionsstelle zugefügten Flüssigkeit gebildeten Flüssigkeitstropfens ermöglicht, der vergleichsweise fest an dem Substrat haftet, so dass die nachfolgenden Schritte b) und c) des erfindungsgemäßen Verfahrens direkt auf der Reaktionsstelle durchgeführt werden können, ohne dass die Zelle in ein geschlossenes Reaktionsgefäß oder dergleichen überführt werden muss. Dadurch werden zum einen arbeits- und zeitaufwendige Transferschritte vermieden. Ferner wird dadurch ermöglicht, dass auf dem Substrat umfassend eine entsprechen-

de Anzahl an voneinander räumlich getrennten hydrophilen Reaktionsstellen mehrere Proben parallel aufbereitet werden können, ohne dass die Gefahr besteht, dass sich die räumlich eng beieinander liegenden Flüssigkeitstropfen bei geringfügigen Erschütterungen oder aufgrund des Verlaufens von Flüssigkeitstropfen infolge zu hohen Tropfenvolumens miteinander vermischen.

Insbesondere besteht der Vorteil der erfindungsgemäß vorgesehenen Ablage von Partikeln auf einem solchen Substrat im Gegensatz zur konventionellen Mikrotiterplatte darin, dass unmittelbar vor der eigentlichen Analyse eine optische Kontrolle des zu analysierenden Materials möglich ist. Beispielsweise kann per Mikroskop zweifelsfrei festgestellt werden, dass nur genau eine einzige Zelle auf jeder Reaktionsstelle abgelegt wurde. In einem 3-dimensionalen Reaktionsgefäß ist das aufgrund fehlender Tiefenschärfe des Mikroskops und anderer Gründe nicht ohne erheblichen Aufwand möglich. So kann in Kombination mit der Optimierung der Genotypisierung in Schritt b), welche bspw. durch eine PCR erfolgt erreicht werden, dass wenigstens 80% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind bzw. einem Individuum zugeordnet werden.

Indem die Zelle in einem Volumen von vorzugsweise weniger als 1 µl auf die Reaktionsstelle aufgebracht wird, können die Verfahrensschritte b) und c) direkt auf der Reaktionsstelle ausgeführt werden, ohne dass vorher die Probe eingedampft oder in ein geschlossenes Reaktionsgefäß transferiert werden muss. Des Weiteren wird durch das minimale, nach der Vereinzelung bei der Zelle verbleibende Flüssigkeitsvolumen die Ablage größerer Mengen an potentiell die nachfolgenden Verfahrensschritte b) und c), insbesondere wenn diese Verfahrensschritte eine Enzymreaktion umfassen, störenden Kontaminanten auf der Reaktionsstelle verhindert. Im Unterschied dazu wird bei einer Vielzahl der bekannten Einzelzellverfah-

ren die Zelle aus Zellkulturmedium oder Körperflüssigkeit, wie Blut oder dergleichen, isoliert, wobei die Zelle in einem beträchtlichen Volumen an Zellkulturmedium oder Körperflüssigkeit in einem Reaktionsgefäß abgelegt wird. Aufgrund der in diesem Volumen an Zellkulturmedium oder Körperflüssigkeit enthaltenen, signifikanten Mengen an Kontaminanten ist bei diesen Verfahren eine enzymatische Reaktion ohne weitere zeit- und arbeitsaufwendige Aufreinigung der Probe nicht möglich.

Aus dem vorstehenden Grund ist es bevorzugt, die wenigstens zwei einzelnen Partikel jeweils in einem Volumen von weniger als 100 nl, besonders bevorzugt weniger als 10 nl, ganz besonders bevorzugt weniger als 1 nl und höchst bevorzugt weniger gleich 100 pl auf der entsprechenden Reaktionsstelle des Substrats abzulegen.

Ein weiteres wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Zuordnung der wenigstens zwei auf den Reaktionsstellen jeweils einzeln abgelegten Zellen bzw. Partikel zu einem in der Mischprobe enthaltenen Individuum durch eine auf der Reaktionsstelle des Substrats durchgeführte Bestimmung, von welchen der in der Mischprobe vertretenen Individuen die abgelegten Partikel Nukleinsäure enthalten, wobei wenigstens 80% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind bzw. zugeordnet werden. Dadurch wird vor der weiteren Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Verfahrensschritt c) zum einen verifiziert, dass es sich bei den auf den Reaktionsstellen abgelegten Zellen tatsächlich um reine, an Bestandteilen individuumsfremder Zellen freie Einzelzellen handelt. Zum anderen kann dadurch verifiziert werden, ob es sich bei jeder der abgelegten Zellen um eine Zielzelle oder um eine falsch positive Zelle handelt. Mithin können die Ergebnisse einer im Anschluss daran durchgeführten weiteren Charakterisierung der untersuchten Zelle eindeutig einem Individuum zugeordnet werden. Aufgrund der Vereinze-

lung und der anschließenden Zuordnung der abgelegten Partikel zu einem in der Mischprobe enthaltenden Individuum durch genetische Analyse kann so eine zweifelsfreie Aussage getroffen werden kann.

Vorzugsweise sind bei der Untersuchung durch Genotypisierung in Verfahrensschritt b) wenigstens 85%, insbesondere bevorzugt wenigstens 90%, besonders bevorzugt wenigstens 95%, ganz besonders bevorzugt wenigstens 98% und höchst bevorzugt 100% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Verfahrensschritt c) die Bestimmung der absoluten und/oder relativen Anzahl an in der Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder die Bestimmung des Genotyps des auf der Reaktionsstelle des Substrats abgelegten Partikels. Damit werden Ergebnisse betreffend die quantitative und/oder qualitative Zusammensetzung der Mischprobe erhalten. Bei dieser Ausführungsform kann beispielsweise aus maternalem, fetale Zellen enthaltendem Blut bestimmt werden, ob der Fötus Trisomie 21 aufweist oder nicht. Alternativ dazu kann mit dieser Ausführungsform das Fortschreiten von Krebs bei einem Patienten ermittelt werden, indem der prozentuale Anteil an Krebszellen in einem Krebsgewebe, d.h. einer Mischprobe enthaltend Krebszellen und gesunde Körperzellen, bestimmt wird.

Vorzugsweise handelt es sich bei den auf den Reaktionsstellen des Substrats abgelegten Partikeln um Zellen, besonders bevorzugt um unlysierte Zellen. Letzteres ist deshalb bevorzugt, weil bei einer unlysierten Zelle im Unterschied zu einer lysierten Zelle durch optische Kontrolle sichergestellt ist, dass diese das ganze Genom eines Individuums umfasst. Alternativ

dazu kann es sich bei den Partikeln jedoch jeweils um jedes, Nukleinsäure eines spezifischen Individuums aufweisendes Teilchen handeln, wie beispielsweise um ein mit einer DNA- oder RNA-Sonde markiertes Teilchen mit an die Sonde hybridisierter DNA oder RNA.

In Weiterbildung des Erfindungsgedankens wird vorgeschlagen, die Vereinzelung und/oder das Aufbringung der wenigstens zwei Partikel auf das Substrat mittels einer Kapillare, mittels Laser-Druck-Katapult-Technik ("*Laser Pressure Catapulting*"-Technik) oder mittels eines Durchflusszytometers, vorzugsweise mittels eines Fluoreszenz aktivierten Zellsorters ("*Fluorescence Activated Cell Sorters*"; FACS), durchzuführen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, dass mit jeder der vorgenannten Techniken aus einer Mischprobe gezielt an Bestandteilen anderer Zellen freie Einzellzellen präpariert und auf einem Substrat abgelegt werden können. Dies ist deshalb vorteilhaft, weil das Partikel bzw. die Zelle nur Nukleinsäure eines Individuums aufweist und so ohne Hintergrund an Fremdnukleinsäure genetisch untersucht werden kann. Ein weiterer Vorteil der vorgenannten Verfahren ist, dass sich mit diesen die Partikel bzw. Zellen in einem äußerst geringen Flüssigkeitsvolumen auf dem Substrat ablegen lassen und so direkt, d.h. ohne weitere Aufreinigung, enzymatisch untersucht werden können. Im Unterschied dazu werden mit den herkömmlichen Verfahren für eine Einzelzellpräparation, beispielsweise der Mikromanipulation, bei der die Einzelzelle aus einer hochverdünnten Suspension mit einer Kapillare unter Einsatz eines Mikroskops abgesaugt wird, die Zellen mit erhebliche Mengen an Flüssigkeit isoliert. Aufgrund der in der Flüssigkeit, beispielsweise Zellkulturmedium oder Blut, enthaltenen Kontaminanten, wie Proteasen, Nukleasen, Salzen und dergleichen, erfordern solche Isolate eine Entfernung nicht nur der Flüssigkeit, sondern auch der Kontaminanten, bevor die so isolierte Zelle in einer enzymatischen Reaktion eingesetzt werden kann.

Beispiele für kommerziell erhältliche Geräte, welche eine der vorgenannten Techniken nutzen, sind das manuelle Kapillarsystem bspw. der Firma Eppendorf, Hamburg, das automatisiertes System CellCelector der Firma AVISO GmbH, Gera, auf Laser Pressure Catapulting Technik basierende Geräte bspw. der Firma PALM, Bernried und FACS-Vorrichtungen bspw. der Firmen Becton Dickinson und Dako Cytomation.

Die Funktionsweise von FACS-Vorrichtungen ist üblicherweise wie folgt: Eine die Partikel bzw. Zellen enthaltende Flüssigkeitssuspension wird durch eine Düse geführt, an der der Flüssigkeitsstrom in einzelne voneinander getrennte Flüssigkeitstropfen aufgetrennt wird, wobei die einzelnen Flüssigkeitstropfen jeweils eine vorbestimmte Anzahl an Zellen enthalten, alle oder selektiv einzelne Flüssigkeitstropfen nach der Abtrennung von der Düse elektrisch aufgeladen werden und die einzelnen Flüssigkeitstropfen durch ein elektrisches Feld geführt werden, wodurch ein oder mehrere elektrisch aufgeladene Flüssigkeitstropfen selektiv auf ein Substrat gelenkt werden können. Beim Durchführen der einzelnen Flüssigkeitstropfen durch das elektrische Feld wird nur der elektrisch aufgeladene Tropfen bzw. werden nur die elektrisch aufgeladenen Tropfen abgelenkt und auf das entsprechend positionierte Substrat aufgebracht. Die Auftrennung der Flüssigkeitssuspension an der Düse erfolgt durch piezoelektrische Modulation, bei der auf den durch die Düse strömenden Flüssigkeitsstrahl eine periodische Druckschwankung ausgeübt wird, aufgrund der sich an der Düse Flüssigkeitstropfen mit einer definierten und reproduzierbaren Größe ausbilden und diese von dem Flüssigkeitsstrahl abreißen. Durch entsprechende Einstellung der Konzentration der Zellen in der Flüssigkeitssuspension, der Strömungsgeschwindigkeit der Suspension und entsprechende Einstellung der piezoelektrischen Modulation kann erreicht werden, dass jeder Flüssigkeitstropfen definierter und reproduzierbarer Größe

eine vorbestimmte Anzahl an Zellen, beispielsweise genau eine Zelle, enthält. Die Abtrennung der Tropfen von der Düse erfolgt aufgrund des Impulses der Druckschwankungen unterstützt durch die Schwerkraft.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Substrat um einen Objektträger, besonders bevorzugt um einen Glasobjektträger, zum einen weil diese flach sind und zum anderen weil sich diese hervorragend zum Aufbringen hydrophiler Bereiche (hier auch als Reaktionsstellen bezeichnet) und hydrophober Bereiche eignen.

Um nachfolgende enzymatische Reaktionen in den auf dem Substrat abgelegten Flüssigkeitstropfen zu ermöglichen, wird in Weiterbildung des Erfindungsgedankens vorgeschlagen, die hydrophilen Reaktionsstellen auf dem Substrat im Wesentlichen kreisförmig auszubilden und diese mit einem zumindest im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophoben Bereich zu umgeben. Um eine symmetrische Anordnung zu erhalten sollte der kreisringförmige hydrophobe Bereich die kreisförmig ausgebildeten hydrophilen Bereiche vorzugsweise konzentrisch umgeben.

Eine noch bessere Ausbildung von Flüssigkeitstropfen auf dem Substrat wird erreicht, wenn der die hydrophile Reaktionsstelle umgebende hydrophobe Bereich auf dem Substrat außenseitig von einem hydrophilen Bereich umgeben ist, welcher vorzugsweise im Wesentlichen kreisringförmig ist und den hydrophoben Bereich, besonders bevorzugt, konzentrisch, umgibt. Bevorzugt ist auch der äußere hydrophile Kreisring außenseitig von einem hydrophoben Bereich umgeben. Somit besteht eine besonders bevorzugte Anordnung aus einem von zwei Kreisringen konzentrisch umgebenen kreisförmigen hydrophilen Bereich, wobei der innere der beiden Kreisringe hydrophob und der äußere der beiden Kreisringe hydrophil ist,

wobei der äußere hydrophile Kreisring außenseitig von einem hydrophoben Bereich umgeben ist.

Besonders gute Ergebnisse werden insbesondere erhalten, wenn die Hydrophilie der hydrophilen Reaktionsstelle und die Hydrophobie des diese umgebenden Bereichs derart eingestellt werden, dass sich bei Auftrag von weniger 10 µl Wasser auf die Reaktionsstelle ein Wassertropfen mit einem Kontaktwinkel von 20 bis 70°, bevorzugt von 30 bis 60° und besonders bevorzugt von 40 bis 50° ausbildet. Dadurch wird gewährleistet, dass sich ein stabiler Flüssigkeitstropfen ausbildet, der fest an der Reaktionsstelle haftet, so dass sich der Flüssigkeitstropfen nicht schon bei geringsten Vibrationen des Substrats, wie diese etwa beim Transport des Substrats beispielsweise innerhalb eines Labors vorkommen, von der Glasplatte löst oder auf der Glasplatte verläuft.

Vorzugsweise beträgt der Durchmesser der hydrophilen Reaktionsstelle, sofern diese, wie dies bevorzugt ist, im Wesentlichen kreisförmig ausgestaltet ist, zwischen 0,3 und 3 mm.

Um das parallele Aufbereiten mehrerer Proben zu ermöglichen, wird in Weiterbildung des Erfindungsgedankens vorgeschlagen, auf dem Substrat 2 bis 1.000, vorzugsweise 12 bis 256, besonders bevorzugt 24 bis 96 und ganz besonders bevorzugt 48 verschiedene, im Wesentlichen kreisförmige hydrophile Reaktionsstellen vorzusehen, die jeweils konzentrisch von einem im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophoben Bereich umgeben sind, welcher außenseitig von einem im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophilen Bereich umgeben ist, an den sich außenseitig vorzugsweise wiederum ein hydrophober Bereich anschließt.

Grundsätzlich ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Charakterisierung aller Mischproben geeignet, unabhängig von der Art der eingesetzten Partikel und unabhängig von der Anzahl der in der Mischprobe vertretenen verschiedenen Individuen. Gute Ergebnisse werden insbesondere erhalten, wenn die Mischprobe Nukleinsäure von wenigstens zwei, aber weniger gleich 10 verschiedenen Individuen, besonders bevorzugt von wenigstens zwei, aber weniger gleich 5 verschiedenen Individuen, ganz besonders bevorzugt von zwei oder drei verschiedenen Individuen und höchst bevorzugt von genau zwei verschiedenen Individuen enthält.

Grundsätzlich kann das erfindungsgemäße Verfahren für alle Mischproben eingesetzt werden, unabhängig von den Konzentrationsunterschieden der einzelnen Nukleinsäuren untereinander. Gute Ergebnisse werden insbesondere erhalten, wenn der Konzentrationsunterschied der von den einzelnen Individuen in der Mischprobe enthaltenen Nukleinsäuren untereinander zwischen 1:1.000 und 1:1, bevorzugt zwischen 1:100 und 1:1 und besonders bevorzugt zwischen 1:10 und 1:1 beträgt.

Beträgt jedoch der Anteil der Nukleinsäure des zu untersuchenden Individuums an der Mischprobe, relativ zu den Nukleinsäuren der anderen Individuen, weniger als 1:1.000, wie dies beispielsweise bei maternalem Blut enthaltend fetale Zellen regelmäßig der Fall ist, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Mischprobe vor der Vereinzelung und vor dem Aufbringen auf das Substrat gemäß Schritt a) bezüglich der Partikel mit der Nukleinsäure des zu untersuchenden Individuums anzureichern, da andernfalls eine große Zahl an Partikeln untersucht werden muss, bis statistisch ein Zielpartikel des zu untersuchenden Individuums auf dem Substrat aufgebracht ist. Die Anreicherung kann auf jede dem Fachmann bekannte Weise erfolgen, beispielsweise mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, die spezifisch an den anzureichernden Zelltyp binden und ihn

so markieren. Alternativ dazu können beschichtete Fängerpartikel bzw. beschichtete Magnetpartikel eingesetzt werden. Ein weiteres Beispiel für eine geeignete Anreicherungsmethode ist der Einsatz eines Durchflusszytometers, insbesondere eines Fluoreszenz aktivierten Zellsorters ("*Fluorescence Activated Cell Sorters*"; FACS), der in der Regel mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Klassifizierung von Partikeln und/oder deren Anreicherung arbeitet. Das Gerät bietet bei der Anreicherung der anzureichernden Partikel- bzw. Zellspezies den Vorteil, dass die Fluoreszenzerkennung und die Anreicherung in einem Gerät vereinigt sind.

Aufgrund der vorgenannten Charakteristika eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zur Charakterisierung von Mischproben, die maternales Blut enthaltend fetale Zellen umfassen, und bevorzugt zur Charakterisierung von aus maternalem Blut enthaltend fetale Zellen bestehenden Mischproben.

Gleichermaßen ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Charakterisierung einer gesunde Zellen sowie durch LOH gekennzeichnete Krebszellen enthaltenden Mischprobe oder bevorzugt einer aus gesunden Zellen sowie durch LOH gekennzeichneten Krebszellen bestehenden Mischprobe prädestiniert.

Zudem hat sich das erfindungsgemäße Verfahren als ebenso geeignet zur Charakterisierung einer gesunde Zellen sowie durch MIN (Mikrosatelliten-Instabilität) gekennzeichnete Krebszellen enthaltenden Mischprobe oder bevorzugt einer aus gesunden Zellen sowie durch MIN gekennzeichneten Krebszellen bestehenden Mischprobe erwiesen.

Erfindungsgemäß wird nach der Vereinzelung der Partikel und dem Aufbringen von wenigstens zwei einzelnen Partikels auf jeweils eine von einem

hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstelle eines Substrats in einem Volumen von weniger als 10 µl das auf jeder einzelnen Reaktionsstelle des Substrats abgelegte Partikel gemäß Verfahrensschritt b) einem in der Mischprobe vertretenen Individuum zugeordnet und werden anschließend die in Verfahrensschritt b) untersuchten Partikel gemäß Verfahrensschritt c) weiter charakterisiert. Vorzugsweise erfolgt die Zuordnung der Partikel zu einem in der Mischprobe enthaltenen Individuum gemäß Schritt b) mittels einer Amplifikationsreaktion, wobei in der Amplifikationsreaktion geeigneterweise Primerpaare für für das Zielindividuum spezifische Genabschnitte eingesetzt werden.

Bei der weiteren Charakterisierung der untersuchten Partikel kann es sich beispielsweise um die Bestimmung der absoluten Anzahl an in der Mischprobe vorliegenden Partikeln enthaltend Nukleinsäure eines Individuums oder um die Bestimmung des relativen Anteils der Partikel enthaltend Nukleinsäure eines Individuums bezogen auf die gesamte Mischprobe handeln. Gleichermaßen kann die weitere Charakterisierung der Mischprobe die Bestimmung der relativen oder absoluten Kopienzahl eines Chromosoms, eines Gens oder eines Genabschnitts sein. Insbesondere im letztgenannten Fall ist es bevorzugt, dass auch die weitere Charakterisierung der Partikel gemäß Schritt c) auf der Reaktionsstelle des Substrats mittels einer Amplifikationsreaktion erfolgt.

Bei der Amplifikationsreaktion kann es sich um jede dem Fachmann bekannte Reaktion handeln, mit der Nukleinsäuren, sei es DNA oder RNA, vervielfältigt, vorzugsweise nahezu exponentiell vervielfältigt werden kann. Insbesondere die Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Amplifikationsreaktion hat sich als vorteilhaft erwiesen.

Unabhängig von der Art der durchgeführten Amplifikationsreaktion hat es sich insbesondere in dem Fall, dass die Partikel Zellen sind, als vorteilhaft erwiesen, vor der Durchführung der Amplifikationsreaktion die auf den Reaktionsstellen abgelegten Partikel thermisch oder durch wenigstens einen Gefrier/Tau-Zyklus aufzuschließen.

Vorzugsweise handelt es sich bei der durchgeführten Amplifikationsreaktion um eine spezifische Amplifikationsreaktion.

Insbesondere in den Fällen, in denen die Partikel in der Mischprobe extrem wenig Nukleinsäure, beispielsweise weniger als 1 pg, enthalten, was beispielsweise in dem Fall, dass als Partikel magnetische Teilchen mit auf der Oberfläche über Sonden hybridisierter Nukleinsäure eingesetzt werden, vorkommen kann, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, vor der Amplifikationsreaktion für die Zuordnung der Partikel zu einem in der Mischprobe enthaltenen Individuum gemäß Schritt b) und/oder vor der Amplifikationsreaktion für die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Schritt c) die in/auf den Partikeln enthaltenen Nukleinsäuren durch eine unspezifische PCR zu vermehren. Nach der unspezifischen PCR kann eine spezifische PCR erfolgen.

Erfindungsgemäß werden in Schritt b) wenigstens zwei, jeweils einzeln auf jeweils einer Reaktionsstelle auf dem Substrat abgelegte Partikel untersucht, um diese durch Genotypisierung auf den Reaktionsstellen des Substrats Individuen aus der Mischprobe zuzuordnen. Zu diesem Zweck haben sich die nachfolgend beschriebenen Ausführungsformen als besonders geeignet erwiesen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die für die Durchführung der Amplifikationsreaktion notwendigen

Reaktionskomponenten, im Falle einer PCR vorzugsweise die Primer, auf der hydrophilen Reaktionsstelle vorgelegt, bevor das Partikel auf der Reaktionsstelle abgelegt wird. Allerdings ist es auch möglich, die Reaktionskomponenten nach Ablegen des Partikels auf der hydrophilen Reaktionsstelle des Substrats in Form von Flüssigkeit auf das Partikel aufzubringen.

In Weiterbildung des Erfindungsgedankens wird vorgeschlagen, die Amplifikationsreaktion dazu anzupassen, eine oder wenigstens zwei zueinander homologe und/oder nicht homologe Sequenzen aus dem kodierenden DNA-Bereich und/oder bevorzugt aus dem nicht kodierenden DNA-Bereich zu amplifizieren. Bekanntermaßen ist der nicht kodierende DNA-Bereich wesentlich polymorpher als der kodierende DNA-Bereich, so dass durch Amplifikation von Sequenzen aus dem nicht kodierenden DNA-Bereich mit einer relativ großen Wahrscheinlichkeit individuenspezifische Sequenzen amplifiziert werden können. Dies ist sowohl bei forensischen Mischproben als auch bei der Charakterisierung des Genotyps fetaler Zellen aus maternalem Blut enthaltend fetale Zellen vorteilhaft.

Aus demselben Grund hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Amplifikationsreaktion dazu anzupassen, eine oder wenigstens zwei zueinander homologe und/oder nicht homologe hochpolymorphe Sequenzen zu amplifizieren. Insbesondere in den Fällen, in denen die Amplifikationsreaktion dazu angepasst ist, eine oder wenigstens zwei zueinander homologe und/oder nicht homologe Sequenzen zu amplifizieren, welche aus der STR-Sequenzen, VNTR-Sequenzen, SNP-Sequenzen und beliebigen Kombinationen hiervon bestehenden Gruppe ausgewählt sind, werden gute Ergebnisse erhalten. STR- bzw. *short tandem repeat*-Sequenzen sind hochpolymorphe Sequenzen, welche aus lediglich zwei bis vier bp langen Wiederholungseinheiten bestehen und zwischen den einzelnen Individuen

eine hohe Variabilität aufweisen. Im Unterschied dazu bestehen VNTR- bzw. *variable number of tandem repeat*-Sequenzen aus etwa 15 bis 30 bp Länge aufgebauten repetitiven DNA-Abschnitten, deren Gesamtlänge durch die Anzahl der Wiederholungen dieser Grundeinheit bestimmt ist. Auch VNTR-Sequenzen sind in der Regel hochpolymorph, d.h. die Anzahl der jeweiligen Wiederholungseinheiten unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Individuen sehr stark. Bei SNP's (*single nucleotide polymorphism*) handelt es sich um die einfachsten Polymorphismen, bei denen sich die homologen Sequenzen nur durch jeweils eine Base unterscheiden. Auch diese Sequenzen eignen sich hervorragend für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, da sich diese zwischen den einzelnen Individuen sehr stark unterscheiden. Abgesehen davon sind jedoch auch alle anderen hochpolymorphen Sequenzen als Marker für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

Ferner ist es bevorzugt, dass die Amplifikationsreaktion, insbesondere eine in Schritt c) eingesetzte Amplifikationsreaktion dazu angepasst ist, eine oder wenigstens zwei zueinander homologe und/oder nicht homologe Sequenzen zu amplifizieren, welche in dem Genom des Individuums jeweils pro Allel nur einmal vorkommen. So können bei der Charakterisierung der Amplifikationsprodukte Rückschlüsse auf die einzelnen Allele eines Individuums gezogen werden, so dass beispielsweise die Anzahl einzelner Allele eines Individuums in einer Mischprobe bestimmt werden kann.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgen die Untersuchung gemäß Schritt b) und die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Schritt c) gleichzeitig ab, d.h. in einem Verfahrensschritt.

Vorzugsweise ist die Amplifikationsreaktion dazu angepasst, zwischen 1 und 100, vorzugsweise zwischen 2 und 20 und besonders bevorzugt zwischen 5 und 15 zueinander homologe und/oder nicht homologe Sequenzen des zu untersuchenden Individuums der Mischprobe zu amplifizieren. Dadurch werden genügend verschiedene Amplifikationsprodukte erhalten, um gezielte individuenspezifische Ergebnisse bei der Charakterisierung der Amplifikationsprodukte zu erhalten. Andererseits ist der experimentelle Aufwand noch nicht zu groß.

Zur weiteren Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Verfahrensschritt c) kann bspw. die Anzahl der bei der Amplifikationsreaktion erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte bestimmt werden, wobei die Bestimmung der Anzahl vorzugsweise die Bestimmung der An- bzw. Abwesenheit wenigstens eines Amplifikationsprodukts sowie Bestimmen eines zweiten physikalisch und/oder chemisch messbaren Parameters der erhaltenen Amplifikationsprodukte umfasst. Zur Bestimmung der An- bzw. Abwesenheit von Amplifikationsprodukten können alle dem Fachmann zu diesem Zweck bekannten Verfahren eingesetzt werden, wobei lediglich beispielsweise Gelelektrophorese, gängige Hybridisierungstechniken, beispielsweise solche auf einem DNA-Array, genannt seien. Dabei kann es in Abhängigkeit von den eingesetzten Detektionsverfahren zweckmäßig sein, Schwellenwerte zu definieren, oberhalb derer die Anwesenheit eines PCR-Produktes und unterhalb derer die Abwesenheit eines PCR-Produktes angenommen wird.

Um den korrekten Ablauf der Amplifikationsreaktion zu überprüfen und insbesondere Fehler an dem eingesetzten Thermocycler frühzeitig zu erkennen, wird in Weiterbildung des Erfindungsgedankens vorgeschlagen, parallel zu der Amplifikationsreaktion eine Amplifikationsreaktion unter gleichen Bedingungen mit einer Kontrollprobe, die bei korrektem Ablauf

der PCR zu einer bekannten Anzahl an Amplifikationsprodukten mit einer bekannten Länge führt, durchzuführen.

Für die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Verfahrensschritt c) hat es sich zudem als vorteilhaft erwiesen, die Parameter in der Amplifikationsreaktion derart einzustellen, dass die relative Häufigkeit für eine positive Amplifikationsreaktion für die zu amplifizierenden, zueinander homologen und/oder nicht homologen Sequenzen jeweils zumindest im Wesentlichen gleich hoch ist. So wird zuverlässig ausgeschlossen, dass aufgrund etwaiger Unzulänglichkeiten bei der Durchführung der Amplifikationsreaktion nur einzelne Amplifikationsprodukte erhalten werden und andere nicht, was zu einem falschen Ergebnis bei der Analyse führen könnte. Insbesondere wenn die Parameter in der Amplifikationsreaktion derart gewählt werden, dass die relative Häufigkeit für eine positive Amplifikationsreaktion für jede der zueinander homologen und/oder nicht homologen Sequenzen zwischen 0,2 und weniger als 1, bevorzugt zwischen 0,4 und 0,6 sowie besonders bevorzugt etwa 0,5 beträgt, werden gute Ergebnisse erhalten.

Insbesondere in den Fällen, in denen die relative Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines in der Mischprobe vertretenen Individuums bestimmt werden soll, sollte zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte vor, nach oder bevorzugt parallel zu der Amplifikationsreaktion für die wenigstens zwei zu untersuchenden Partikel wenigstens eine Amplifikationsreaktion unter denselben Bedingungen wie den für die wenigstens zwei aus der Mischprobe auf jeweils einer Reaktionsstelle abgelegten Partikel eingesetzten mit einer Referenzprobe durchgeführt werden, wobei die Referenzprobe vorzugsweise die gleiche Menge an Nukleinsäure wie die abgelegten Partikel aufweist und die Referenzprobe vorzugsweise einen bekannten Genotyp aufweist. Aus dem Vergleich der Anzahl der mit dieser

wenigstens einen Amplifikationsreaktion erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte mit der Anzahl an mit der mit den abgelegten Partikeln durchgeführten Amplifikationsreaktion(en) erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukten kann so die relative Kopienzahl der untersuchten, vorbestimmten Sequenz des untersuchten Individuums ermittelt werden.

Für die Fälle, in denen die absolute Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz des zu untersuchenden Individuums bestimmt werden soll, wird in Weiterbildung des Erfindungsgedankens vorgeschlagen, die Anzahl an mit den wenigstens zwei abgelegten Partikeln durchgeführten Amplifikationsreaktion(en) erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukten mit wenigstens einer Häufigkeitsverteilung zu vergleichen. Eine solche Häufigkeitsverteilung wird vorzugsweise erhalten durch getrenntes, jeweils mehrmaliges Durchführen der gleichen und unter denselben Reaktionsbedingungen wie den für die wenigstens zwei aus der Mischprobe auf den Reaktionsstellen abgelegten Partikel eingesetzte Amplifikationsreaktion mit wenigstens zwei verschiedenen Referenzproben, wobei in den Amplifikationsreaktionen die gleiche wie in den Partikeln enthaltene Menge an Nukleinsäure eingesetzt wird und die wenigstens zwei verschiedenen Referenzproben jeweils eine bekannte, voneinander verschiedene Kopienzahl der vorbestimmten Sequenz aufweisen. Dabei können die Amplifikationsreaktionen für die Referenzproben vor, nach oder besonders bevorzugt parallel zu der Amplifikationsreaktion für die zu untersuchenden Partikel durchgeführt werden. Durch anschließendes Bestimmen der pro Referenzprobe erhaltenen Anzahl an unterschiedlichen Amplifikationsprodukten und Vergleich dieser Anzahlen mit der mit den für die auf den Reaktionsstellen des Substrats abgelegten Partikeln durchgeführten Amplifikationsreaktionen erhaltenen Anzahlen an unterschiedlichen Amplifikationsprodukten kann so die absolute Kopienzahl einer vorbestimmten Se-

quenz des zu untersuchenden Individuums bzw. der zu untersuchenden Individuen ermittelt werden.

Vorzugsweise wird eine Häufigkeitsverteilung verwendet, für deren Aufnahme die für jede der wenigstens zwei Referenzproben durchgeführte Amplifikationsreaktion mehrfach, bspw. zehn- oder hundertfach, durchgeführt wurde. Da in den Amplifikationsreaktionen für die Aufnahme der Häufigkeitsverteilung Ausgangsmaterial mit einer bekannten Kopienzahl der vorbestimmten Sequenz eingesetzt wird, kann aus diesem Vergleich zuverlässig auf die Anzahl der Kopien der vorbestimmten Sequenz in dem zu untersuchenden Partikel der Mischprobe geschlossen werden.

Alternativ zu der Durchführung einer Amplifikationsreaktion zur Zuordnung der wenigstens zwei zu untersuchenden Partikels zu einem in der Mischprobe enthaltenen Individuum durch eine auf der Reaktionsstelle des Substrats durchgeführte Genotypisierung gemäß Verfahrensschritt b) und/oder zur weiteren Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Verfahrensschritt c) kann die Zuordnung der untersuchten Partikel zu einem in der Mischprobe enthaltenen Individuum und/oder die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel auf der Reaktionsstelle des Substrats auch durch eine Genexpressionsuntersuchung auf mRNA-Ebene erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen, wobei jedes Partikel Nukleinsäure eines oder mehrerer Individuen umfasst, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder zur Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer In-

dividuen aus einer Mischprobe, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums, von dem Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist, umfassend die Schritte:

a) Vereinzeln der Partikel und Aufbringen von 2 bis 1.000, vorzugsweise 2 bis 100, besonders bevorzugt 2 bis 10 und ganz besonders bevorzugt 2 bis 5 Partikeln auf eine von einem hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstelle eines Substrats in einem Volumen von weniger als 10 µl und
b) Untersuchung von wenigstens zwei Reaktionsstellen des Substrats mit auf den Reaktionsstellen abgelegten Partikeln, um die Partikel jeweils durch Genotypisierung Individuen aus der Mischprobe zuzuordnen, wobei wenigstens 80% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind, und
c) weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit zur Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer Individuen aus einer Mischprobe, welche Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen enthält, zur Durchführung des vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend:

a) wenigstens ein Primerpaar, welches dazu angepasst ist, in wenigstens einer PCR einen polymorphen Bereich, der von wenigstens einer der in der Mischprobe enthaltenen Nukleinsäuren umfasst ist, zu amplifizieren,
b) ein Substrat, vorzugsweise ein Glasobjektträger, auf dem wenigstens eine, bevorzugt zwischen 2 und 1.000 und besonders bevor-

zugt zwischen 24 und 96, von einem hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstelle(n) vorgesehen ist,

c) ggf. PCR-Puffer und

d) ein Protokoll für die Durchführung der PCR gemäß a).

Unter einem polymorphen Bereich wird im Sinne der vorliegenden Erfindung ein Bereich aus dem Genom verstanden, der sich zwischen zwei zufällig ausgewählten, untereinander nicht verwandten Individuen mit einer Wahrscheinlichkeit von wenigstens 25%, vorzugsweise wenigstens 50%, besonders bevorzugt wenigstens 80% und ganz bevorzugt wenigstens 90%, bspw. in der Länge der Sequenz oder in der Sequenz selbst, unterscheidet.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die auf dem in dem Kit enthaltenden Substrat vorgesehenen hydrophilen Reaktionsstellen im Wesentlichen kreisförmig ausgebildet und jeweils von einem im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophoben Bereich, der außenseitig von einem im Wesentlichen kreisringförmig ausgebildeten hydrophilen Bereich konzentrisch umgeben ist, konzentrisch umgeben, wobei der Durchmesser der hydrophilen Reaktionsstellen zwischen 0,3 und 3 mm beträgt. Vorzugsweise ist der äußere hydrophile Kreisring außenseitig von einem hydrophoben Bereich umgeben.

Optional kann das erfindungsgemäße Kit neben den Bestandteilen a), b), d) und ggf. c) wenigstens einen der nachfolgenden Bestandteile umfassen:

e_1) eine Referenzprobe mit einem bekannten Genotyp und vorzugsweise mit einer bezüglich einer vorbestimmten Sequenz bekannten Kopienzahl und/oder

e_2) das Ergebnis wenigstens einer, unter den gleichen wie in dem Protokoll gemäß e) vorgeschrieben, durchgeführten Amplifikationsreaktion mit einer Referenzprobe, wobei die Reaktionsbedingungen so gewählt waren, dass wenigstens ein Amplifikationsprodukt mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 20% und weniger als 100% entstand, und/oder

e_3) wenigstens eine Häufigkeitsverteilung, welche durch getrenntes jeweils mehrmaliges Durchführen der gleichen und unter denselben Reaktionsbedingungen wie der in dem Protokoll e) vorgeschriebenen wenigstens einen Amplifikationsreaktion mit wenigstens zwei verschiedenen Referenzproben, wobei die wenigstens zwei verschiedenen Referenzproben jeweils eine bekannte, voneinander verschiedene Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz aufwiesen, sowie anschließendes Bestimmen der pro Referenzprobe erhaltenen Anzahl an unterschiedlichen Amplifikationsprodukten erhalten wurde, und

Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand von diese erläuternden, diese aber nicht einschränkenden Beispielen erläutert:

Beispiel 1

Ziel der nachfolgenden Untersuchung war die quantitative relative Bestimmung der Anzahl an in einer Mischprobe umfassend gesunde Zellen und Krebszellen einer Person enthaltenen Krebszellen.

Für die Untersuchungen wurde als Substrat ein Glasobjektträger eingesetzt, auf dem 48 räumlich voneinander getrennte kreisrunde, hydrophile Reaktionsstellen, welche jeweils, von innen nach außen betrachtet, von einem kreisringförmigen, hydrophoben Bereich und einem sich daran

anschließenden kreisringförmigen, hydrophilen Bereich konzentrisch umgeben waren, angeordnet waren.

Für die Bestimmung wurden mit einem LaserCapture Mikroskop Zellen aus der Mischprobe, d.h. dem Krebsgewebe, vereinzelt und zufällig jeweils 1 Zelle aus der Mischprobe in einem Volumen von weniger als 1 µl auf den 48 hydrophilen Reaktionsstellen des Substrats abgelegt. Anschließend wurde auf jede Reaktionsstelle eine Reaktionslösung enthaltend ein den Genabschnitt D85522 amplifizierendes Primerpaar, Reaktionspuffer und Taq-Polymerase zugefügt, so dass das Gesamtvolumen der auf jeder Reaktionsstelle vorliegenden Flüssigkeit 1 µl betrug. Anschließend wurden die einzelnen Flüssigkeitstropfen mit Öl überschichtet, das Substrat in einen PCR-Thermocycler überführt und eine PCR durchgeführt. Abschließend wurde von jedem Flüssigkeitstropfen eine Teilmenge entnommen, diese auf ein Gel aufgetragen, die in den Teilmengen enthaltenden Amplifikationsprodukte durch Gelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen DNA-Banden visualisiert.

Während eine gesunde heterozygote Zelle zwei Allele des Genabschnitts D85522 enthält, weist eine LOH-Krebszelle nur ein solches Allel auf, da das andere durch Deletion verloren gegangen ist ("*loss of heterozygosity*").

Die Gelektrophorese ergab, dass 12 der untersuchten 48 Zellen bei der PCR nur ein Amplifikationsprodukt ergaben und mithin den LOH-Krebszellen zugeordnet werden konnten, wohingegen die anderen 36 Proben bei der PCR zwei Amplifikationsprodukte ergaben. Folglich betrug die relative Häufigkeit an Krebszellen in dem Gewebe 25%.

Beispiel 2

Es sollte überprüft werden, ob es sich bei einer vorliegenden biologischen Probe um eine Mischprobe mit weiblichen und männlichen Zellen handelt und wenn ja, wie groß der Anteil der weiblichen Zellen in der Mischprobe ist.

Eine Stichprobe der Zellsuspension wurde mit einem FACS Sorter der Firma DAKO sortiert und jeweils eine der Zellen auf den 48 Reaktionsstellen des in Beispiel 1 beschriebenen Substrats abgelegt.

Anschließend wurde auf jede Reaktionsstelle eine Reaktionslösung enthaltend die für männliche und weibliche Zellen spezifischen Primerpaare, Reaktionspuffer und Taq-Polymerase zugefügt.

Dabei wurden je 2 pmol von fünf Primerpaaren eingesetzt, welche daran angepasst waren in einer Multiplex PCR fünf verschiedene PCR-Fragmente aus humaner männlicher DNA (Typ XY) oder 4 unterschiedliche PCR-Fragmente aus humaner weiblicher DNA (Typ XX) zu amplifizieren. Es handelte sich dabei um die folgenden Primer:

Primername	**Länge des amplifizierten Genabschnitts**
ChrX-STR5589-CX1	243 bp
ChrX-STR861-CX2	312 bp
ChrX-STR3309-CX3	346 bp
ChrX-STR6285-CX5	467 bp
ChrY-STR596-CY2	604 bp

Insgesamt enthielt die Reaktionslösung die nachfolgend aufgeführten Inhaltsstoffe:

Komponente	**Endkonzentration**	**1 Reaktion**	**50 Reaktionen**
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	1x	0.5 µL	25 µL
5x Q-Solution	0.7 x	0.14 µL	7 µL
Primer	0.2 pmol	0.1 µL	5 µL
Template: Einzelzelle	1x /Reaktion	0.1 µL	5 µL
AdvaGold PCR dye	1x	0.1 µL	5 µL
ddH_2O		0.06 µL	3 µL

Jeweils 1 µl dieser Reaktionslösung wurde auf die einzelnen Reaktionsstellen pipettiert. Anschließend wurden die einzelnen Flüssigkeitstropfen mit Öl überschichtet, das Substrat in einen PCR-Thermocycler überführt und eine PCR mit der nachfolgenden Temperaturführung durchgeführt.

94°C 10 Min.

94°C 30 Sek.
64°C 60 Sek.
72°C 60 Sek. 35 Zyklen

72°C 10 Min.

Nach der PCR wurde zu jedem Flüssigkeitstropfen 4 µl "6x loading dye" (MBI Fermentas) zugegeben, dann 3 µl der so erhaltenen PCR/Farbstoffmischung auf ein 8%-iges PAA-TBE Gel aufgetragen und unter üblichen Elektrophoresebedingungen elektrophoretisiert. Als Standard wurde eine 100 bp-Leiter von Promega eingesetzt. Abschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die für jede einzelne Probe erhaltene Anzahl an unterschiedlichen Amplifikationsprodukten bestimmt.

Dabei ergab sich, dass 2 der 48 Proben männliche Zellen waren, während die restlichen 46 Proben weibliche Zellen waren. Der Anteil der weiblichen Zellen an der Mischprobe betrug demnach 96%.

Beispiel 3

Es sollte in einem Verfahrensschritt bestimmt werden, ob in einer Mischprobe Zellen mit dem Genotyp Trisomie 21 vorliegen.

Während gesunde Körperzellen diploid sind, also 2 Kopien von Chromosom 21 aufweisen, enthalten entsprechende Trisomiezellen 3 Kopien des Chromosoms 21.

Für die Versuchsdurchführung wurden aus der Mischprobe 48 Einzelzellen auf jeweils einer Reaktionsstelle eines wie in Beispiel 1 beschriebenen Substrats abgelegt und einer Multiplex PCR unterzogen, wobei Primerpaare eingesetzt wurden, die 20 für Chromosom 21 spezifische PCR-Produkte amplifiziert.

Es wurde folgendes Ergebnis erhalten (Anzahl untersuchte Zellen: 48):

Anzahl der detektierten Banden	Anzahl der Fälle (von 48)
0	0
1	4
2	5
3	10
4	21
5	6
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	0
13	0
14	0
15	1
16	0
17	0
18	1
19	0
20	0

Die erhaltenen Werte wurden mit einer Häufigkeitstabelle verglichen, in denen die vorgenannte PCR unter denselben Bedingungen mit zwei verschiedenen Referenzproben, nämlich einmal einer gesunden, zwei Kopien Chromosom 21 aufweisenden Zelle und einmal einer Trisomie 21-Zelle, mehrmals durchgeführt wurde sowie die Anzahl der bei jeder Bestimmung

erhaltenen Amplifikationsprodukte bestimmt und in Form einer Häufigkeitstabelle aufbereitet wurde.

Der Vergleich mit der Häufigkeitstabelle zeigte, dass in der untersuchten Mischprobe 2 Zellen enthalten waren, die eine Trisomie 21 aufweisen, nämlich diejenigen Proben, die bei der PCR 15 Amplifikationsprodukte bzw. 17 Amplifikationsprodukte ergaben, wohingegen die anderen 46 Proben nur zwei Kopien des Chromosoms 21 enthielten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen, wobei jedes Partikel Nukleinsäure eines oder mehrerer Individuen umfasst, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder zur Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer Individuen aus einer Mischprobe, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums, von dem Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist, umfassend die Schritte:

   a) Vereinzeln der Partikel und Aufbringen von mindestens zwei einzelnen Partikeln auf ein Substrat, wobei jedes der wenigstens zwei Partikel jeweils einzeln auf eine von einem hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstelle des Substrats in einem Volumen von weniger als 10 µl abgelegt wird, so dass pro Reaktionsstelle genau ein Partikel vorliegt,
   b) Untersuchung von wenigstens zwei der auf dem Substrat abgelegten Partikeln auf der Reaktionsstelle des Substrats, um die Partikel jeweils durch Genotypisierung Individuen aus der Mischprobe zuzuordnen, wobei wenigstens 80% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind, und
   c) weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
   dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass

die wenigstens zwei einzelnen Partikel jeweils in einem Volumen von weniger als 100 nl, bevorzugt weniger als 10 nl, besonders bevorzugt weniger als 2 nl und ganz besonders bevorzugt weniger gleich 100 pl auf der entsprechenden Reaktionsstelle des Substrats abgelegt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
bei der Untersuchung durch Genotypisierung in Schritt b) wenigstens 85%, bevorzugt wenigstens 90%, besonders bevorzugt wenigstens 95%, ganz besonders bevorzugt wenigstens 98% und höchst bevorzugt 100% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Schritt c) die Bestimmung der absoluten und/oder relativen Anzahl an in der Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder eine Genotypisierung ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die wenigstens zwei auf den Reaktionsstellen des Substrats abgelegten Partikel Zellen, vorzugsweise unlysierte Zellen, oder, vorzugsweise magnetische, Partikel mit daran gebundener Nukleinsäure sind.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass

die Vereinzelung und/oder das Aufbringung der wenigstens zwei Partikel auf das Substrat mittels einer Kapillare, mittels Laser-Druck-Katapult-Technik ("*Laser Pressure Catapulting*"-Technik) oder mittels eines Durchflusszytometers, vorzugsweise mittels eines Fluoreszenz aktivierten Zellsorters ("*Fluorescence Activated Cell Sorters*"; FACS), erfolgt.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass das Substrat ein Objektträger, vorzugsweise ein Glasobjektträger, ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die hydrophile(n) Reaktionsstelle(n) auf dem Substrat im Wesentlichen kreisförmig ausgebildet und von einem im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophoben Bereich, vorzugsweise konzentrisch, umgeben ist/sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass der die hydrophile Reaktionsstelle umgebende hydrophobe Bereich auf dem Substrat außenseitig von einem hydrophilen Bereich umgeben ist, welcher vorzugsweise im Wesentlichen kreisringförmig ist und den hydrophobe Bereich, besonders bevorzugt, konzentrisch umgibt, und der äußere hydrophile Bereich außenseitig von einem hydrophoben Bereich umgeben ist.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass

die Hydrophilie der hydrophilen Reaktionsstelle und die Hydrophobie des diese umgebenden Bereichs derart eingestellt werden, dass sich bei Auftrag von weniger als 10 µl Wasser auf die Reaktionsstelle ein Wassertropfen mit einem Kontaktwinkel von 20 bis 70°, bevorzugt von 30 bis 60° und besonders bevorzugt von 40 bis 50° ausbildet.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die hydrophile Reaktionsstelle im Wesentlichen kreisförmig ausgestaltet ist und einen Durchmesser zwischen 0,3 und 3 mm aufweist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass das Substrat 2 bis 1.000, vorzugsweise 12 bis 256, besonders bevorzugt 24 bis 96 und ganz besonders bevorzugt 48 verschiedene, im Wesentlichen kreisförmige hydrophile Reaktionsstellen aufweist, die jeweils konzentrisch von einem im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophoben Bereich umgeben sind, welcher außenseitig von einem im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophilen Bereich umgeben ist, der wiederum außenseitig von einem hydrophoben Bereich umgeben ist.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die Mischprobe Nukleinsäure von wenigstens zwei verschiedenen Individuen, aber weniger gleich 10, besonders bevorzugt von wenigstens zwei, aber weniger gleich 5, ganz besonders bevorzugt von zwei oder drei und höchst bevorzugt von genau zwei verschiedenen Individuen enthält.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass der Konzentrationsunterschied der von den einzelnen Individuen in der Mischprobe enthaltenen Nukleinsäuren untereinander zwischen 1:1.000 und 1:1, bevorzugt zwischen 1:100 und 1:1 und besonders bevorzugt zwischen 1:10 und 1:1 beträgt.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die Mischprobe vor der Vereinzelung und vor dem Aufbringen auf das Substrat gemäß Schritt a) bezüglich der Partikel mit der Nukleinsäure des zu untersuchenden Individuums angereichert wird, wobei die Anreicherung vorzugsweise mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, die spezifisch an den anzureichernden Partikeltyp binden und ihn so markieren, mittels beschichteter Fängerpartikel oder beschichteter Magnetpartikel oder mittels eines Durchflusszytometers, besonders bevorzugt mittels eines Fluoreszenz aktivierten Zellsorters ("Fluorescence Activated Cell Sorters"; FACS), erfolgt.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die Mischprobe maternales Blut enthaltend fetale Zellen umfasst oder bevorzugt aus maternalem Blut enthaltend fetale Zellen besteht.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die Mischprobe eine Mischung aus gesunden Zellen und aus Krebszellen, die LOH aufweisen, ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die Mischprobe eine Mischung aus gesunden Zellen und aus Krebszellen, die MIN aufweisen, ist.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die Untersuchung der wenigstens zwei Partikel durch Genotypisierung gemäß Schritt b) und/oder die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Schritt c) auf der Reaktionsstelle des Substrats durch eine Amplifikationsreaktion erfolgt, wobei vorzugsweise das Reaktionsvolumen der Amplifikationsreaktion weniger als 10 µl, besonders bevorzugt weniger als 5 µl und ganz besonders bevorzugt weniger als 1 µl beträgt.

20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die Amplifikationsreaktion eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die wenigstens zwei auf den Reaktionsstellen abgelegten Partikel Zellen sind und die Zellen vor der Durchführung der Amplifikationsreaktion thermisch oder durch wenigstens einen Gefrier/Tau-Zyklus aufgeschlossen werden.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
eine spezifische Amplifikationsreaktion durchgeführt wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass vor der Amplifikationsreaktion zur Untersuchung der wenigstens zwei Partikel zwecks Zuordnung zu einem in der Mischprobe enthaltenen Individuum gemäß Schritt b) und/oder zur Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Schritt c) die in/auf den wenigstens zwei abgelegten Partikeln enthaltene Nukleinsäure durch eine unspezifische PCR vermehrt wird.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die für die Durchführung der Amplifikationsreaktion notwendigen Reaktionskomponenten, vorzugsweise die Primer, auf die hydrophilen Reaktionsstellen vorgelegt werden, bevor die wenigstens zwei Partikel auf den Reaktionsstellen abgelegt werden.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 24, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die Amplifikationsreaktion dazu angepasst ist, eine oder wenigstens zwei zueinander homologe und/oder nicht homologe Sequenzen aus dem kodierenden DNA-Bereich und/oder aus dem nicht kodierenden DNA-Bereich zu amplifizieren.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 25, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass die Amplifikationsreaktion dazu angepasst ist, eine oder wenigstens zwei zueinander homologe und/oder nicht homologe hochpolymorphe Sequenzen zu amplifizieren, welche bevorzugt aus der aus STR-Sequenzen, VNTR-Sequenzen, SNP-Sequenzen und beliebigen Kombinationen hiervon bestehenden Gruppe ausgewählt ist/sind.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 26,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die Amplifikationsreaktion dazu angepasst ist, zwischen 1 und 100, vorzugsweise zwischen 2 und 20 und besonders bevorzugt zwischen 5 und 15 zueinander homologe und/oder nicht homologe Sequenzen zu amplifizieren.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 27,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
zur Analyse der Amplifikationsreaktion die Anzahl der bei der Amplifikationsreaktion erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte bestimmt wird, wobei die Bestimmung der Anzahl vorzugsweise die Bestimmung der An- bzw. Abwesenheit wenigstens eines Amplifikationsprodukts sowie Bestimmen eines zweiten physikalisch und/oder chemisch messbaren Parameters der erhaltenen Amplifikationsprodukte umfasst.

29. Verfahren nach Anspruch 28,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die An- bzw. Abwesenheit von Amplifikationsprodukten mittels Gelelektrophorese, mittels einer Hybridisierungstechnik auf einem DNA-Array, einem Bead-System oder einer anderen optischen, elektrischen oder elektrochemischen Messung erfolgt.

30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
das bzw. die Amplifikationsprodukt(e) STR-Abschnitte und/oder VNTR-Abschnitte sind und als zweiter Parameter die Länge der erhaltenen Amplifikationsprodukte, vorzugsweise mit Kapillare-

lektrophorese, bestimmt wird, wobei die Anzahl der erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte der Anzahl der erhaltenen Amplifikationsprodukte mit sich unterscheidender Länge entspricht.

31. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
das bzw. die Amplifikationsprodukt(e) SNP-Abschnitte sind und als zweiter Parameter die Sequenz der erhaltenen Amplifikationsprodukte, vorzugsweise durch DNA-Sequenzierung oder ein Hybridisierungsverfahren, bestimmt wird, wobei die Anzahl der erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte der Anzahl der erhaltenen Amplifikationsprodukte mit sich unterscheidender Sequenz entspricht.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 31,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die Parameter in der Amplifikationsreaktion derart gewählt werden, dass die relative Häufigkeit für eine positive Amplifikationsreaktion für jede der zueinander homologen und/oder nicht homologen Sequenzen jeweils zumindest im Wesentlichen gleich ist, und/oder, dass die relative Häufigkeit für eine positive Amplifikationsreaktion für jede der zueinander homologen und/oder nicht homologen Sequenzen zwischen 0,2 und weniger als 1, bevorzugt zwischen 0,4 und 0,6 sowie besonders bevorzugt etwa 0,5 beträgt.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 32,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte wenigstens eine Amplifikationsreaktion unter denselben Bedingungen wie den für die wenigstens zwei aus der Mischprobe auf den Reaktionsstellen abge-

legten Partikel eingesetzten mit einer Referenzprobe, welche vorzugsweise die gleiche Menge an Nukleinsäure, wie die abgelegten Partikel, aufweist, und, welche vorzugsweise einen bekannten Genotyp aufweist, durchgeführt wird und die Anzahl der mit dieser wenigstens einen Amplifikationsreaktion erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukte mit der Anzahl an mit den mit den abgelegten Partikeln durchgeführten Amplifikationsreaktionen erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukten verglichen wird.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 33,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die Anzahl an mit den mit den wenigstens zwei abgelegten Partikeln durchgeführten Amplifikationsreaktionen erhaltenen unterschiedlichen Amplifikationsprodukten mit wenigstens einer Häufigkeitsverteilung verglichen wird, welche durch getrenntes, jeweils mehrmaliges Durchführen der gleichen und unter denselben Reaktionsbedingungen wie den für die aus der Mischprobe auf den Reaktionsstellen abgelegten Partikel eingesetzten Amplifikationsreaktionen, wobei in den Amplifikationsreaktionen die gleiche wie in den Partikeln enthaltene Menge an Nukleinsäure eingesetzt wurde/wird, mit wenigstens zwei verschiedenen Referenzproben, wobei die wenigstens zwei verschiedenen Referenzproben jeweils eine bekannte, voneinander verschiedene Kopienzahl der vorbestimmten Sequenz aufweisen, sowie anschließendes Bestimmen der pro Referenzprobe erhaltenen Anzahl an unterschiedlichen Amplifikationsprodukten, erhalten wurde/wird.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass

die Untersuchung der wenigstens zwei Partikel durch Genotypisierung zwecks Zuordnung zu einem in der Mischprobe enthaltenen Individuum gemäß Schritt b) und/oder die weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel gemäß Schritt c) auf den Reaktionsstellen des Substrats durch eine Genexpressionsuntersuchung auf mRNA-Ebene erfolgt.

36. Verfahren zur Charakterisierung einer Mischprobe enthaltend wenigstens zwei Partikel mit Nukleinsäuren unterschiedlicher Individuen, wobei jedes Partikel Nukleinsäure eines oder mehrerer Individuen umfasst, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Anzahl an in einer Mischprobe vorliegenden Partikeln mit Nukleinsäure eines Individuums und/oder zur Bestimmung des Genotyps eines oder mehrerer Individuen aus einer Mischprobe, insbesondere zur quantitativen Bestimmung der absoluten und/oder relativen Kopienzahl einer vorbestimmten Sequenz eines Individuums, von dem Nukleinsäure in der Mischprobe enthalten ist, umfassend die Schritte:

a) Vereinzeln der Partikel und Aufbringen von 2 bis 1.000, vorzugsweise 2 bis 100, besonders bevorzugt 2 bis 10 und ganz besonders bevorzugt 2 bis 5 Partikeln auf eine von einem hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstelle eines Substrats in einem Volumen von weniger als 10 µl und
b) Untersuchung von wenigstens zwei Reaktionsstellen des Substrats mit auf den Reaktionsstellen abgelegten Partikeln, um die Partikel jeweils durch Genotypisierung Individuen aus der Mischprobe zuzuordnen, wobei wenigstens 80% der untersuchten Partikel einem Individuum zuzuordnen sind, und
c) weitere Charakterisierung der untersuchten Partikel.

37. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 36, umfassend:

a) wenigstens ein Primerpaar, welches dazu angepasst ist, in wenigstens einer PCR einen polymorphen Bereich, der von wenigstens einer der in der Mischprobe enthaltenen Nukleinsäuren umfasst ist, zu amplifizieren,

b) ein Substrat, vorzugsweise ein Glasobjektträger, auf dem wenigstens zwei, bevorzugt zwischen 2 und 1.000 und besonders bevorzugt zwischen 24 und 96, jeweils von einem hydrophoben Bereich umgebene hydrophile Reaktionsstellen vorgesehen sind,

c) ggf. PCR-Puffer und

d) ein Protokoll für die Durchführung der PCR gemäß a).

38. Kit nach Anspruch 37,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , dass
die hydrophile Reaktionsstellen auf dem Substrat im Wesentlichen kreisförmig ausgebildet und jeweils von einem im Wesentlichen kreisringförmigen hydrophoben Bereich, der außenseitig von einem im Wesentlichen kreisringförmig ausgebildeten hydrophilen Bereich konzentrisch umgeben ist, konzentrisch umgeben sind, wobei der Durchmesser der hydrophilen Reaktionsstellen zwischen 0,3 und 3 mm beträgt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/001328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/51668 A (IMMUNIVEST CORP [US]; GOHEL DHANESH [US]; HARA SHAWN MARK O [US]; RAO) 19 July 2001 (2001-07-19) page 27, line 23 - page 28, line 8; claim 9; figure 5	1-8, 10-35,37
X	US 2005/233362 A1 (LOKEN MICHAEL R [US]) 20 October 2005 (2005-10-20) paragraph [0011] paragraph [0013] paragraph [0030] paragraph [0041] - paragraph [0051]	1-8, 10-35,37
X	WO 02/064821 A (ADVALYTIX AG [DE]; GAUER CHRISTOPH [DE]) 22 August 2002 (2002-08-22) the whole document	1-7, 10-18

-/--

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

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"E" earlier 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
22 June 2007	05/07/2007

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	Werner, Andreas

2

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

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAYLOR L C ET AL: "Application of High-Density Optical Microwell Arrays in a Live-Cell Biosensing system" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 278, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 132-142, XP002197799 ISSN: 0003-2697 figure 3	1-8, 10-35,37
X	BROGAN ET AL: "Optical fiber-based sensors: application to chemical biology" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, vol. 9, no. 5, October 2005 (2005-10), pages 494-500, XP005086083 ISSN: 1367-5931 the whole document	1-8, 10-35,37
X	US 2005/244850 A1 (HUANG HIU [US] ET AL) 3 November 2005 (2005-11-03) figure 3; example 4	36-38
A	RONDELEZ YANNICK ET AL: "Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology." NATURE BIOTECHNOLOGY MAR 2005, vol. 23, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 361-365, XP002431619 ISSN: 1087-0156 page 361, column 2, paragraph 2 page 364, column 1, paragraph 2; figures 1-3	1-8, 10-35, 37,38
A	CHEN CHRISTOPHER S ET AL: "Micropatterned surfaces for control of cell shape, position and function" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 14, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 356-363, XP002431620 ISSN: 8756-7938 the whole document	1-35,37, 38
A	JAE-SUK LEE ET AL: "Micropatterning of cultured cells on polystyrene surface by using an excimer laser" APPLIED PHYSICS LETTERS USA, vol. 65, no. 4, 25 July 1994 (1994-07-25), pages 400-402, XP002431621 ISSN: 0003-6951 figure 1	1-35,37, 38

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/001328

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WIXFORTH A ET AL: "Nanopumpen für das Chiplabor" GIT FACHZEITSCHRIFT FUER DAS LABORATORIUM, DARMSTADT, DE, vol. 5, May 2002 (2002-05), pages 594-596, XP009009065 ISSN: 0016-3538 figure 1	1-35,37, 38
A	US 2003/186250 A1 (SHAH SHISHIR [US]) 2 October 2003 (2003-10-02) the whole document	1-35,37, 38
A	BOLAND C R ET AL: "A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 58, no. 22, 15 November 1998 (1998-11-15), pages 5248-5257, XP001080197 ISSN: 0008-5472 the whole document	17,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/001328

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/EP2007/001328

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-35 (in full) and 37-38 (in part)

Method and kits for characterising a mixed sample, characterised in that individual particles are placed on each reaction point.

---

2. Claims 36 (in full) and 37-38 (in part)

Method and kits for characterising a mixed sample, characterised in that 2-1000 particles are placed on each reaction point.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/001328

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0151668 A	19-07-2001	AU 2791301 A	24-07-2001
		CA 2397341 A1	19-07-2001
		EP 1246942 A1	09-10-2002
		JP 2003523185 T	05-08-2003
US 2005233362 A1	20-10-2005	US 2006234275 A1	19-10-2006
WO 02064821 A	22-08-2002	AU 2002224954 A1	28-08-2002
		DE 10103954 A1	05-12-2002
		EP 1409722 A2	21-04-2004
		US 2004101975 A1	27-05-2004
US 2005244850 A1	03-11-2005	US 2005277128 A1	15-12-2005
		US 2005272049 A1	08-12-2005
US 2003186250 A1	02-10-2003	US 2005014184 A1	20-01-2005

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/001328

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12Q1/68

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q

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

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/51668 A (IMMUNIVEST CORP [US]; GOHEL DHANESH [US]; HARA SHAWN MARK O [US]; RAO) 19. Juli 2001 (2001-07-19) Seite 27, Zeile 23 - Seite 28, Zeile 8; Anspruch 9; Abbildung 5	1-8, 10-35,37
X	US 2005/233362 A1 (LOKEN MICHAEL R [US]) 20. Oktober 2005 (2005-10-20) Absatz [0011] Absatz [0013] Absatz [0030] Absatz [0041] - Absatz [0051]	1-8, 10-35,37
X	WO 02/064821 A (ADVALYTIX AG [DE]; GAUER CHRISTOPH [DE]) 22. August 2002 (2002-08-22) das ganze Dokument	1-7, 10-18

-/--

[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
22. Juni 2007	05/07/2007

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	Werner, Andreas

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TAYLOR L C ET AL: "Application of High-Density Optical Microwell Arrays in a Live-Cell Biosensing system" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 278, 15. Februar 2000 (2000-02-15), Seiten 132-142, XP002197799 ISSN: 0003-2697 Abbildung 3	1-8, 10-35,37
X	BROGAN ET AL: "Optical fiber-based sensors: application to chemical biology" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, Bd. 9, Nr. 5, Oktober 2005 (2005-10), Seiten 494-500, XP005086083 ISSN: 1367-5931 das ganze Dokument	1-8, 10-35,37
X	US 2005/244850 A1 (HUANG HIU [US] ET AL) 3. November 2005 (2005-11-03) Abbildung 3; Beispiel 4	36-38
A	RONDELEZ YANNICK ET AL: "Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology." NATURE BIOTECHNOLOGY MAR 2005, Bd. 23, Nr. 3, März 2005 (2005-03), Seiten 361-365, XP002431619 ISSN: 1087-0156 Seite 361, Spalte 2, Absatz 2 Seite 364, Spalte 1, Absatz 2; Abbildungen 1-3	1-8, 10-35, 37,38
A	CHEN CHRISTOPHER S ET AL: "Micropatterned surfaces for control of cell shape, position and function" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, Bd. 14, Nr. 3, Mai 1998 (1998-05), Seiten 356-363, XP002431620 ISSN: 8756-7938 das ganze Dokument	1-35,37, 38
A	JAE-SUK LEE ET AL: "Micropatterning of cultured cells on polystyrene surface by using an excimer laser" APPLIED PHYSICS LETTERS USA, Bd. 65, Nr. 4, 25. Juli 1994 (1994-07-25), Seiten 400-402, XP002431621 ISSN: 0003-6951 Abbildung 1	1-35,37, 38

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/001328

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WIXFORTH A ET AL: "Nanopumpen für das Chiplabor" GIT FACHZEITSCHRIFT FUER DAS LABORATORIUM, DARMSTADT, DE, Bd. 5, Mai 2002 (2002-05), Seiten 594-596, XP009009065 ISSN: 0016-3538 Abbildung 1	1-35,37, 38
A	US 2003/186250 A1 (SHAH SHISHIR [US]) 2. Oktober 2003 (2003-10-02) das ganze Dokument	1-35,37, 38
A	BOLAND C R ET AL: "A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 58, Nr. 22, 15. November 1998 (1998-11-15), Seiten 5248-5257, XP001080197 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument	17,18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/001328

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN **PCT/ISA/** 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-35 (vollumfänglich) und 37-38 (teilweise)

   Verfahren und Kits zur Charakterisierung einer Mischprobe, dadurch charakterisiert, dass auf jeder Reaktionsstelle einzelne Partikel abgelegt werden.

   ---

2. Ansprüche: 36 (vollumfänglich) und 37-38 (teilweise)

   Verfahren und Kits zur Charakterisierung einer Mischprobe, dadurch charakterisiert, dass auf jeder Reaktionsstelle 2-1000 Partikel abgelegt werden.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/001328

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0151668 A	19-07-2001	AU 2791301 A	24-07-2001
		CA 2397341 A1	19-07-2001
		EP 1246942 A1	09-10-2002
		JP 2003523185 T	05-08-2003
US 2005233362 A1	20-10-2005	US 2006234275 A1	19-10-2006
WO 02064821 A	22-08-2002	AU 2002224954 A1	28-08-2002
		DE 10103954 A1	05-12-2002
		EP 1409722 A2	21-04-2004
		US 2004101975 A1	27-05-2004
US 2005244850 A1	03-11-2005	US 2005277128 A1	15-12-2005
		US 2005272049 A1	08-12-2005
US 2003186250 A1	02-10-2003	US 2005014184 A1	20-01-2005