



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 26 711 T2 2007.10.25**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 180 549 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 26 711.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP01/02495**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 915 852.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/073120**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.03.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.10.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.02.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

2000087500 27.03.2000 JP

2000087501 27.03.2000 JP

2000087504 27.03.2000 JP

(73) Patentinhaber:

Olympus Co., Tokyo/Tokio, JP

(74) Vertreter:

**WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS,
KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB

(72) Erfinder:

**HORI, Kunio, Chofu-shi, Tokyo 182-0023, JP;
KARAKI, Sachiko, Hino-shi, Tokyo 191-0012, JP;
KANO, Tokio, Kunitachi-shi, Tokyo 186-0003, JP;
TAKAMIYA, Yuji, Sagamihara-shi, Kanagawa
229-0039, JP**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM MESSEN VON POLYMORPHISMEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Polymorphismen und insbesondere ein Verfahren zum genauen und raschen Nachweis eines Orts mit einem Einzelnukleotidaustausch in einer Nukleotidsequenz.

Stand der Technik

[0002] In den letzten Jahren wurde der Zusammenhang zwischen spezifischen Erkrankungen und Genpolymorphismen schnell offensichtlich. Es ist zu erwarten, dass die Analyse von Genpolymorphismen beim Screening krankheitsbezogener Gene, bei der Gendiagnose von Erkrankungen und bei der ärztlichen Betreuung bei Bluttransfusionen und Transplantationen von großem Nutzen sein wird.

[0003] Als Verfahren zum Testen des Polymorphismus eines Gens sind in erster Linie serologische Verfahren und Verfahren unter Verwendung von DNA bekannt. Letztgenanntes Verfahren ist ersterem Verfahren insoweit überlegen, als für die Bestimmung kein speziell ausgebildeter Fachmann erforderlich ist und die Untersuchung automatisch durchgeführt werden kann.

[0004] Das letztgenannte Verfahren hat jedoch Nachteile: (1) Die Vorgehensweise ist kompliziert und man benötigt lange Zeit für die Analyse; (2) wenn der Test auf den Polymorphismus mit einer auf einer Platte, wie einer Mikrotiterplatte, fixierten Sonde erfolgt, ist die Zahl der gleichzeitig bestimmten Einzelelemente beschränkt; (3) der Nachweis kann nicht genau genug erfolgen, da eine Markersubstanz zurückbleibt und eine unspezifische Reaktion stattfindet; und (4) die Untersuchungskosten sind hoch.

[0005] Bis jetzt sind viele Arten von Polymorphismen bekannt geworden. Von diesen hat die Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen (nachfolgend als "SNP" bezeichnet) die Aufmerksamkeit auf sich gezogen. SNP ist als Polymorphismus definiert, bei dem ein einzelnes Nukleotid der Nukleotidsequenz ausgetauscht ist. Bei Menschen beträgt die Homologie zwischen den genomischen DNAs von Individuen 99 % oder weniger. Der Unterschied ist lediglich etwa 1 %. Aus diesem Grund hat das Interesse an SNPs zugenommen.

[0006] Zum Nachweis von SNPs sind zahlreiche verschiedene Verfahren bekannt, einschließlich PCR-RFLP, PCR-SSP und PCR-SSO. Bei all diesen Verfahren wird PCR eingesetzt. Bei diesen Verfahren wird ein PCR-Produkt elektrophoretisch analysiert und mit einer Sondensequenz hybridisiert.

[0007] Bei dem PCR-SSP-Verfahren wird beispielsweise ein sequenzspezifisches Primerreagens verwendet, um den Polymorphismusort spezifisch zu amplifizieren. Das Verfahren wird häufig zur SNP-Bestimmung verwendet. Bei diesem Verfahren muss jedoch nach der Amplifikation eine Elektrophorese durchgeführt werden, um die Anwesenheit von Nebenprodukten festzustellen.

[0008] Außerdem ist ein weiteres Verfahren zum Nachweis von SNPs bekannt. Bei diesem Verfahren werden SNPs mittels der VDA-Methode (High-Density Variant Detection Array) mit einem Mittel wie einem DNA-Chip oder einem DNA-Microarray nachgewiesen (Science, Bd. 280, 15. Mai 1998). Bei der VDA-Methode ist eine Vielzahl von Sonden-DNAs dicht auf der Oberfläche eines Festphasensubstrats angeordnet, und man lässt Proben-DNA mit der oder den Sonden-DNA(s) auf der Oberfläche der festen Phase hybridisieren. Die Effizienz dieses Verfahrens wird jedoch als gering angesehen.

[0009] Da die T_m-Werte für die Polymorphismusorte im Fall von SNPs außerdem fast gleich sind, ist es schwierig, einen Mismatch mit herkömmlichen Verfahren genau nachzuweisen. Aus diesem Grund kann der Nachweis bei herkömmlichen Verfahren nicht mit der für klinische Versuche erforderlichen Genauigkeit erfolgen.

[0010] Die WO 94/16313 offenbart den Einsatz von Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bei einem Verfahren zum Nachweis eines Polymorphismusortes, wobei man eine Testprobe, die einen Polymorphismusort enthält, mit einer Vielzahl von Sonden reagieren lässt, die für verschiedene Polymorphismusorte spezifisch sind und mit dem gleichen Fluoreszenzmarker markiert sind. Eine weitere Sonde, die mit einem zweiten Fluoreszenzmarker markiert ist, hybridisiert an das Target, aber nicht an einen Polymorphismusort. Die Detektion von Kreuzkorrelationssignalen zwischen den unterschiedlich markierten Sonden zeigt das Vorliegen wenigstens eines der getesteten Polymorphismen an.

[0011] R. Rigler, Journal of Biotechnology 41:177-186, 1995, offenbart FCS und ihre Verwendung zum Nachweis von Antigen-Antikörper-Interaktionen.

Offenbarung der Erfindung

[0012] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem sich Polymorphismen rasch, leicht und genau analysieren lassen. Insbesondere besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem sich Polymorphismen selbst dann empfindlich und genau testen lassen, wenn der Polymorphismus an der Stelle eines einzelnen Nukleotids auftritt.

[0013] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines Polymorphismusortes, umfassend:

(1) Umsetzen, im gleichen Reaktionsgefäß, einer Testprobe, die einen Polymorphismusort enthält, mit einer Vielzahl von Sondentypen, die einer Vielzahl von zu identifizierenden Typen des Polymorphismusortes dieser Testprobe entsprechen, wobei diese Sonden mit einer hohen Affinität an die Vielzahl von Typen des Polymorphismusortes binden und so mit Markersubstanzen markiert sind, dass sie sich optisch voneinander unterscheiden; und

(2) optisches Messen und Analysieren einer Positionsänderung der Markersubstanzen durch Mikrobewegung zu einer Vielzahl von Zeitpunkten im Verlauf der Reaktion und dadurch Nachweisen der Typen von Polymorphismusorten der Testprobe.

[0014] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Analyse von Polymorphismen bereitgestellt, das geringere Mengen an Reagens und Testprobe benötigt als herkömmliche Verfahren.

[0015] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt, bei dem man eine Vielzahl von Polymorphismusorten gleichzeitig nachweisen kann, wobei geringe Mengen an Testprobe und Reagens verwendet werden. Gemäß noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt, mit dem man eine äußerst große Anzahl von Polymorphismussequenzen rasch und einfach bestimmen kann. Da bei diesen Verfahren keine B/F-Isolierung, PCR, Elektrophorese und dergleichen erforderlich sind, können leicht verschiedene Typen von Polymorphismen analysiert werden.

[0016] Aus der Idee der vorliegenden Erfindung, wie sie oben beschrieben wurde, ergeben sich auch die folgenden Effekte. Genauer erlaubt die vorliegende Erfindung die Bestimmung nicht nur des Ortes mit dem Einzelnukleotidaustausch, sondern auch der Nukleotidsequenz eines Polymorphismusortes. Außerdem ist es leicht möglich, Blutzellenpolymorphismen wie einen Bluttyp nachzuweisen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0017] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung von DNA einer Testprobe, die mit dem Nachweisverfahren gemäß Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung nachweisbar ist;

[0018] [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung einer Sonde, die zum Nachweis der DNA der Testprobe von [Fig. 1](#) verwendet werden kann;

[0019] [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung, die eine allgemeine Skizze der Reaktion der Sonde I bei dem Nachweisverfahren gemäß Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung zeigt;

[0020] [Fig. 4](#) ist eine schematische Darstellung, die eine allgemeine Skizze der Reaktion der Sonde II bei dem Nachweisverfahren gemäß Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung zeigt;

[0021] [Fig. 5](#) ist eine schematische Darstellung, die ein Beispiel für ein Detektionssystem zeigt, das bei dem Nachweisverfahren gemäß der erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet werden kann;

[0022] [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) zeigen ein Beispiel eines Messteils eines Fluoreszenzmikroskops, das bei der erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet werden kann;

[0023] [Fig. 7](#) ist eine Kurve, die die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität zeigt, wie sie mit dem in [Fig. 5](#) gezeigten Detektionssystem erhalten werden kann;

[0024] [Fig. 8](#) ist eine Kurve, die statistische Daten zeigt, die durch Konvertierung der in

[0025] [Fig. 7](#) gezeigten Daten durch eine Autokorrelationsfunktion erhalten wurden;

[0026] [Fig. 9A-Fig. 9D](#) sind Darstellungen, die das Verfahren zur Bestimmung einer Polymorphismussequenz mit einem Nachweisverfahren gemäß der erfindungsgemäßen Ausführungsform skizzieren; [Fig. 9A](#) zeigt die Bewegung relativ kleiner Moleküle in einem Mikroräum, [Fig. 9B](#) ist eine Kurve, die die zeitlichen Schwankungen im Falle von [Fig. 9A](#) zeigt, [Fig. 9C](#) zeigt die Bewegung relativ großer Moleküle in einem Mikroräum, und [Fig. 9D](#) ist eine Kurve, die die zeitlichen Schwankungen im Falle von [Fig. 9C](#) zeigt;

[0027] [Fig. 10](#) zeigt eine Sonde, wie sie in Beispiel 3 der vorliegenden Erfindung verwendet wird;

[0028] [Fig. 11](#) zeigt ein Anwendungsbeispiel für das erfindungsgemäße Verfahren in der klinischen Medizin;

[0029] [Fig. 12A](#) ist die schematische Ansicht einer auf ein Objektglas getüpfelten Probe, und [Fig. 12B](#) ist ein Querschnitt entlang der Linie XIIB-B von [Fig. 12A](#); und

[0030] [Fig. 13A-Fig. 13C](#) sind Beispiele für Mikrotiterplatten, wie sie in Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung verwendet werden, und [Fig. 13D](#) ist ein Querschnitt entlang der Linie XIIC-C der in [Fig. 13C](#) gezeigten Mikrotiterplatte.

Beste Ausführungsform der Erfindung

[0031] Generell umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von Polymorphismen im Großen und Ganzen zwei Schritte, nämlich einen Reaktionsschritt und einen Nachweisschritt. Der Reaktionsschritt ist ein Schritt, bei dem man eine Sondensubstanz, die in der Lage ist, spezifisch an einen gewünschten Polymorphismusort zu binden, zur Bindung mit dem Polymorphismusort reagieren lässt. Der Nachweisschritt ist ein Verfahren zur Bestimmung der Bewegung von Molekülen während oder nach dem Reaktionsschritt.

Terminologie

[0032] In diesem Text bezeichnet der Begriff "Polymorphismus" entweder eine Allelgruppe, die eine Vielzahl von Alleltypen enthält, die einen einzigen genetischen Locus besetzen, oder individuelle Allele, die zu der Allelgruppe gehören.

[0033] Der Begriff "Polymorphismusort", wie er hier verwendet wird, ist ein Ort, dessen Nukleotidsequenzen sich zwischen polymorphen Genen unterscheiden. Wenn beispielsweise die Nukleotidsequenz des polymorphen Gens A1 AAA TTT (CCC) GGG ist und die Nukleotidsequenz des polymorphen Gens A2 AAA TTT (AGT) GGG ist, entspricht der Ort in Klammern dem Polymorphismusort. Wenn in dem Polymorphismusort ein einzelnes Nukleotid anders ist, wird ein solcher Polymorphismus genauer als "Einzelnukleotidpolymorphismus" bezeichnet.

[0034] Gemäß der Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der nachzuweisende Polymorphismus nicht auf Polymorphismen auf Genebene beschränkt. Der Polymorphismus auf Proteinebene ist ebenfalls umfasst. Der "Polymorphismusort" ist in diesem Fall ein exprimiertes Protein.

[0035] Der Begriff "Ort mit Einzelnukleotidaustausch", wie er hier verwendet wird, bezeichnet einen Polymorphismusort aus einem einzigen Nukleotid, von dem sich der Einzelnukleotidpolymorphismus ableitet.

[0036] Wenn der Ort mit Einzelnukleotidaustausch einmalig oder mehrfach in der Sequenz einer einzigen Testproben-DNA vorkommt, kann man ihn (oder sie) gemäß der Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nachweisen. Wenn man eine Vielzahl von Orten mit Einzelnukleotidaustausch nachweist, kann man eine Vielzahl Typen von Markersubstanzen verwenden.

[0037] Der Begriff "Polymorphismussequenz", wie er hier verwendet wird, bezeichnet eine in dem Polymorphismusort enthaltene Nukleotidsequenz. In obigem Beispiel ist die "Polymorphismussequenz" die Nukleotidsequenz in Klammern.

[0038] Der Begriff "Nukleinsäuresynthetase mit einer Reparaturfunktion", wie er hier verwendet wird, bezeichnet ein Enzym, das einen Mismatch am 3'-Ende einer partiell doppelsträngigen Nukleotidsequenz erkennt, das ungepaarte Nukleotid deletiert und anschließend unter geeigneten Bedingungen zur Komplettierung des Doppelstrangs eine Nukleinsäure synthetisiert. Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst

sen Beispiele für geeignete Enzyme Nukleinsäuresynthetasen. Vorzugsweise werden Ex/Taq oder La/Taq verwendet. Diese Enzyme können von Takara Shuzo Co., Ltd., erhalten werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0039] Der Begriff "Markersubstanz", wie er hier verwendet wird, bezeichnet einen Marker, der zu jedem Messzeitpunkt ein Signal mit etwa gleicher Intensität emittiert. Davon umfasst sind beispielsweise lumineszierende Substanzen, fluoreszierende Substanzen, magnetische Substanzen und radioaktive Stoffe. Zu beachten ist, dass als Markersubstanz eine Substanz gewählt werden sollte, die sich für ein bei dem (später beschriebenen) Nachweisschritt verwendetes Mittel eignet.

[0040] Der Begriff "freie Mikrobewegung" oder "Mikrobewegung", wie er hier verwendet wird, bezeichnet in erste Linie eine Brownsche Bewegung.

[0041] Der Begriff "Mikroraum", wie er hier verwendet wird, bezeichnet einen kleinen Raum, in dem sich die freie Mikrobewegung der Moleküle zufriedenstellend feststellen lässt. Gemäß einer erfindungsgemäßen Ausführungsform kann der Mikroraum ein Volumen von 10^{-21} l (entsprechend dem Volumen eines Würfels mit jeweils 100 nm Kantenlänge) bis 10^{-3} l haben. Üblicherweise kann der Mikroraum ein Volumen von 10^{-18} l bis 10^{-9} l und ganz besonders typisch von 10^{-15} l bis 10^{-12} l haben. Der Mikroraum kann jede Form annehmen, einschließlich Kugel, Zylinder, Kegel, Würfel oder rechtwinkliges Parallelepipet.

[0042] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Bestimmung einer in einem Polymorphismusort enthaltenen Nukleotidsequenz eines zufällig gewählten polymorphen Gens bereitgestellt. Mit anderen Worten wird ein Verfahren zur Bestimmung des Genotyps eines polymorphen Gens bereitgestellt.

[0043] Im Nachfolgenden werden Polymorphismussequenzen, die bekanntermaßen in einem nachzuweisenden Polymorphismusort eines polymorphen Gens enthalten sind (nachfolgend als "polymorphes Targetgen" bezeichnet), durch PS_1 bis PS_n dargestellt (n ist eine ganze Zahl von 2 oder mehr). In obigem Beispiel ist PS_1 beispielsweise CCC und PS_2 AGT.

[0044] Wenn das Verfahren gemäß der erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird, kann der Typ eines Polymorphismusortes ziemlich schnell bestimmt werden. Außerdem ist es gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung möglich, polymorphe Gene mit einer Vielzahl an Polymorphismusorten und polymorphe Gene mit einer Vielzahl an Typen von Polymorphismusorten nachzuweisen. Beispiele für polymorphe Gene umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, verschiedene SNPs, Haupthistokompatibilitätsantigene, die ein humanes Leukozytenantigen enthalten (nachfolgend als "HLA" bezeichnet) und verschiedene Arten von Genen, die mit Krankheiten in Zusammenhang stehen.

[0045] Zum Nachweis eines Polymorphismusortes oder des Typs eines Polymorphismusortes wird gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zuerst eine Testprobe vorbereitet, die entweder ein polymorphes Targetgen oder ein Protein enthält. Wenn ein solches Verfahren beim Menschen angewandt wird, kann die Testprobe gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, ohne darauf beschränkt zu sein, eine Körperflüssigkeit einschließlich Blut, Rückenmarksflüssigkeit und Hirn-Rückenmark-Flüssigkeit sein.

[0046] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Polymorphismen mit hoher Empfindlichkeit nachzuweisen. Bei Verwendung von Genen kann eine herkömmliche PCR-Amplifikation daher entfallen. Wenn das polymorphe Targetgen jedoch in geringer Menge vorliegt, kann eine PCR-Amplifikation erfolgen.

Beispiel 1

[0047] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Nachweis eines Orts mit einem Einzelnukleotidpolymorphismus in einer Nukleotidsequenz bereitgestellt.

[0048] Der oben erwähnte Reaktionsschritt umfasst allgemein die Hybridisierung von DNA einer Testprobe mit einer markierten DNA-Sonde und die Behandlung des resultierenden Doppelstrangs mit einem Enzym mit einer Reparaturfunktion.

[0049] Bei dem Nachweisschritt wird allgemein die freie Mikrobewegung der Moleküle, die in dem Reaktionssystem für den Reaktionsschritt stattfindet, gemessen und ausgewertet.

1. Reaktionsschritt

[0050] Der Reaktionsschritt dieses Beispiels wird nun unter Bezug auf [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) erläutert. Es handelt sich jedoch um ein Beispiel, so dass es die vorliegende Erfindung nicht einschränkt.

(1) Testproben-DNA

[0051] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Testproben-DNA dieses Beispiels. In dieser Figur hat das polymorphe Gen der Testproben-DNA zwei Polymorphismussequenzen, das heißt, der Polymorphismus liegt als Polymorphismus I oder Polymorphismus II vor. Polymorphismus I und Polymorphismus II sind mit Ausnahme des Einzelnukleotidaustauschs homolog. Außerdem ist der Einzelnukleotidaustausch von Polymorphismus I Adenin (nachfolgend wie in der Figur gezeigt als "Nukleotid (A)" oder "A" bezeichnet). Der Einzelnukleotidaustausch von Polymorphismus II ist Guanin (nachfolgend wie in der Figur gezeigt als "Nukleotid (G)" oder "G" bezeichnet).

(2) Markierte DNA-Sonde

[0052] Eine Sonde zum Nachweis des Orts mit Einzelnukleotidaustausch (gezeigt in [Fig. 1](#)) ist nun in [Fig. 2](#) gezeigt. Sonde I besteht aus einer Sequenz, die zu der Sequenz vom 3'-Ende bis zum Ort des Einzelnukleotidaustauschs von Polymorphismus I komplementär ist. Ferner ist an das Nukleotid am 3'-Ende von Sonde I (das heißt, an das Nukleotid, das mit dem Nukleotid des Ortes des Einzelnukleotidaustauschs gepaart ist) eine Markersubstanz gebunden. In diesem Beispiel ist das 3'-Ende von Sonde I ein markiertes Thymin (nachfolgend wie in der Figur gezeigt als "(T)" oder "T" bezeichnet).

[0053] Ähnlich besteht Sonde II aus einer Sequenz, die zu der Sequenz vom 3'-Ende bis zum Ort des Einzelnukleotidaustauschs von Polymorphismus II komplementär ist. Ferner ist an das Nukleotid am 3'-Ende von Sonde II eine Markersubstanz gebunden. In diesem Beispiel ist das 3'-Ende von Sonde II ein markiertes Cytosin (nachfolgend wie in der Figur gezeigt als "Nukleotid (C)" oder "C" bezeichnet).

(3) Reaktionsschritt

[0054] Als einfachstes Beispiel für die vorliegende Erfindung ist in [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) eine Reaktion in einem Reaktionssystem des Verfahrens nach Beispiel 1 dargestellt. Die Reaktion wird nun simuliert. In diesem Beispiel ist festgelegt, dass die Testproben-DNA, die in der Probe enthalten ist, entweder Polymorphismus I oder II ist. Unter der Annahme, dass die Probe Polymorphismus I enthält, wird die Probe in diesem Fall zuerst in zwei Gefäße gegeben, nämlich Gefäß I und Gefäß II.

[0055] Die in [Fig. 2](#) gezeigten Sonden werden getrennt in die Gefäße gegeben, die sich in den Typen unterscheiden, und mit der Probe reagieren gelassen. [Fig. 3](#) zeigt eine in Gefäß I durchgeführte Reaktion. Tatsächlich verläuft in Gefäß I von [Fig. 3](#) die Hybridisierung von Polymorphismus I mit Sonde I optimal. Wie in [Fig. 3](#) zu sehen, ist Polymorphismus I vollständig mit Sonde I gepaart ([Fig. 3](#)). [Fig. 4](#) zeigt demgegenüber eine in Gefäß II durchgeführte Reaktion. Dabei hybridisiert in Gefäß II von [Fig. 4](#) Polymorphismus I mit Sonde II optimal. Wie in [Fig. 4](#) zu sehen ist, ist am Ort des Einzelnukleotidaustauschs ein Mismatch zu beobachten.

[0056] Anschließend wird sowohl zu dem vollständig gepaarten Doppelstrang als auch zu dem Doppelstrang mit Mismatch eine DNA-Polymerase mit einer Reparaturfunktion gegeben ([Fig. 3](#) und [Fig. 4](#)). In der Folge zeigt die Polymerase an dem vollständig gepaarten Doppelstrang von Gefäß I keine Aktivität (nämlich keine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität) ([Fig. 3](#)).

[0057] Im Gegensatz dazu erkennt die Polymerase von Gefäß II einen Mismatch am 3'-Ende des aus Polymorphismus I und Sonde II gebildeten Doppelstrangs, deletiert das ungepaarte Nukleotid und verlängert den DNA-Strang ([Fig. 4](#)). Im Ergebnis wird das markierte Nukleotid (C) in Gefäß II freigesetzt ([Fig. 4](#)).

[0058] Genauer gesagt können die folgenden zwei Reaktionen ablaufen, wenn DNA-Polymerase als Reagens zur Nukleinsäuresynthese mit dem Produkt einer Hybridisierungsreaktion umgesetzt wird, das möglicherweise einen lokalen Mismatch aufweist.

[0059] Wenn das Produkt der Hybridisierungsreaktion einen Mismatch aufweist, erkennt die DNA-Polymerase den Mismatch. Als Ergebnis wird die Verlängerungsreaktion des DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase angestoßen. Gleichzeitig wird das Markermolekül mit dem ungepaarten Nukleotid im Zuge der Verlängerungs-

reaktion von der Target-DNA abgespalten.

[0060] Andererseits erkennt die DNA-Polymerase in dem anderen Fall, bei dem das Reaktionsprodukt ein vollständig gepaarter Doppelstrang ohne Mismatch ist, die Target-DNA also mit dem Nukleotid mit dem Markermolekül vollständig hybridisiert und gepaart ist, dass der Doppelstrang vollständig gepaart und gebunden ist. In der Folge kommt es zu keiner Verlängerungsreaktion durch die DNA-Polymerase. Selbst wenn eine Verlängerungsreaktion stattfindet, wird die Verlängerung in der Mitte gestoppt. Die Verlängerungsreaktion läuft nicht mehr weiter. Da kein Mismatch vorliegt, zeigt sich die DNA-Polymerase keine Exonukleaseaktivität, die mit der Reparaturfunktion zusammenhängt. Diese einmalige Idee der Erfinder, nämlich die Idee, dass die Reparaturfunktion der DNA-Polymerase verwendet wird, um ein Markermolekül mit einem Mismatchnukleotid zu entfernen, trägt daher stark dazu bei, ein ganz neues und äußerst effektives Verfahren zum Nachweis von Polymorphismen bereitzustellen.

[0061] Wenn der Nachweis unter Verwendung der Reparaturfunktion der DNA Polymerase erfolgt, erfolgt der Nachweis in zwei Stufen: Nachweis, ob Hybridisierung erfolgt ist oder nicht, und Nachweis, ob das Markermolekül durch die Reparaturfunktion abgespalten wurde oder nicht. Dies erlaubt es, ein genaueres Nachweisverfahren bereitzustellen.

[0062] Mit anderen Worten umfasst der zweistufige Nachweis die folgenden zwei Schritte. In einem ersten Nachweisschritt werden eine Probe und ein Markermolekül gemischt und unter Bedingungen, die zu einer Hybridisierung führen, reagieren gelassen. Es wird festgestellt, ob während der Reaktion eine Hybridisierung stattfindet oder nicht. Auf diese Weise lässt sich die An- oder Abwesenheit der Target-DNA und/oder ein gewisser Grad an Hybridisierung bei der Reaktion feststellen. Im zweiten Nachweisschritt gibt man dann die Nukleinsäuresynthetase zu und lässt unter Bedingungen, unter denen eine Synthesereaktion stattfinden kann, reagieren. Das bei diesem Schritt gebildete abgespaltene Molekül wird nachgewiesen. Auf die oben beschriebene Weise wird also die An- oder Abwesenheit einer genetischen Mutation nachgewiesen, und/oder es lässt sich eine mutierte Sequenz bestimmen.

[0063] Der zweistufige Nachweisschritt, der aus dem ersten und zweiten Nachweisschritt besteht, kann entweder kontinuierlich oder getrennt mittels FCS durchgeführt werden. Falls der zweistufige Nachweis mittels FCS erfolgt, lassen sich die folgenden Ergebnisse erhalten. Wenn im ersten Nachweisschritt die Hybridisierung erfolgt, nimmt die Größe des Markermoleküls zu, was die FCS-Reaktionskurve verändert. Wenn im zweiten Nachweisschritt anschließend die Abspaltung erfolgt, nimmt die Größe des Markermoleküls ab. In der Folge verändert sich die Reaktionskurve, die sich bei dem vorherigen Schritt verändert hat, weiter. Wenn wie beschrieben die Reparaturfunktion der DNA-Polymerase verwendet wird, wird zuerst nachgewiesen, ob eine Hybridisierung erfolgt ist oder nicht. Als Zweites wird nachgewiesen, ob das Markermolekül von der Reparaturfunktion abgespalten wurde oder nicht. Dies erlaubt es, ein deutlich genaueres Nachweisverfahren bereitzustellen, das gegenüber herkömmlichen Verfahren deutlich zuverlässiger ist.

[0064] Anzumerken ist, dass der Mismatchnachweis, der mit einem Reagens wie einer DNA-Polymerase mit Reparaturfunktion erfolgt, gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nicht immer mit einem Verfahren erfolgt, bei dem FCS als Mittel zum Nachweis eingesetzt wird. Als Nachweismittel können verschiedene B (gebunden)/F (frei)-Trenntechniken verwendet werden, bei denen eine Trennung basierend auf Bindung oder Nichtbindung erfolgt. In diesem Fall kann der Nachweis erfolgen, indem man die Mengen (B_1) und (B_2) der an die Target-DNA gebundenen Markermoleküle vergleicht, wobei die Mengen B_1 und B_2 in den entsprechenden Stufen des zweistufigen Nachweisverfahrens erhalten werden. Alternativ kann der Nachweis durch Vergleich der Menge (B_1) mit der Menge (F_2) erfolgen, d.h. der Menge des abgespaltenen Markermoleküls. (B_1) ist hier die Menge der nach dem ersten Nachweisschritt erhaltenen Markermoleküle, die in der mit der Target-DNA hybridisierten Sonde enthalten sind. (B_2) ist die Menge der nach dem zweiten Nachweisschritt erhaltenen Markermoleküle, die in der mit der Target-DNA hybridisierten Sonde enthalten sind. (F_2) ist die nach dem zweiten Nachweisschritt abgespaltene Menge an Markermolekülen.

[0065] Die freie Mikrobewegung der bei der oder den obigen Reaktionen) erhaltenen Markermoleküle wird durch die später beschriebenen Nachweismittel bestimmt und ausgewertet. Die freie Mikrobewegung des Targetmoleküls kann abhängig von der Größe des Markermoleküls variieren. Daher kann man Informationen über die Nukleotidsequenz erhalten, indem man die Mikrobewegung der Markermoleküle misst und die Markersubstanz als Unterscheidungsmerkmal verwendet.

(4) Weitere Ausführungsformen des Reaktionsschritts

[0066] Das einfachste Beispiel für den in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren enthaltenen Reaktionsschritt ist oben beschrieben. Es lassen sich jedoch zahlreiche Änderungen und Modifikationen vornehmen. Beispielsweise kann eine Vielzahl Markersubstanzen verwendet werden. Markersubstanzen können nicht nur am 3'-Ende an eine Sonde gebunden sein, sondern auch am 5'-Ende. In einem einzigen Gefäß kann man eine Vielzahl von Sonden mit einer Probe reagieren lassen.

[0067] Nachdem ein Mismatch von einer Nukleinsäuresynthetase mit einer Reparaturfunktion erkannt oder abgespalten wurde, kann die Nukleotidsequenz außerdem von der Spaltstelle zum 3'-Ende hin verlängert werden. In diesem Fall kann die Verlängerung erfolgen, indem man das benötigte Substrat und ein weiter benötigtes Reagens unter Optimalbedingungen zur Verfügung stellt. Alternativ kann die Verlängerung mittels Polymerasekettenreaktion (nachfolgend als PCR bezeichnet) erfolgen. Es muss jedoch nicht immer eine Verlängerung erfolgen.

[0068] Außerdem kann ein in einer Probe enthaltener Polymorphismusort beispielsweise mittels irgendeiner PCR-Methode amplifiziert werden, bevor die obige(n) Reaktion(en) durchgeführt wird bzw. werden.

2. Nachweisschritt

(1) Nachweisprinzip

[0069] Bei dem Nachweisschritt der vorliegenden Erfindung wird die Ausgangssignalintensität von Markermolekülen (ein oder mehrere Moleküle) in einem bestimmten Raum gemessen. Außerdem wird die Zu- oder Abnahme der so erhaltenen Ausgangssignalintensität als Unterscheidungsmerkmal verwendet. Basierend auf der Variation der Ausgangssignalintensität lässt sich die Bewegungsgeschwindigkeit der Markermoleküle erhalten, die sich in das Sichtfeld der Mikromessung hinein- oder aus diesem hinausbewegen. Daher ist das Markermolekül, mit dem eine Sonde markiert wird, vorzugsweise ein Markermaterial, das zu jedem Zeitpunkt ein Signal mit einer konstanten Intensität aussenden kann. Beispiele für solche Markermoleküle umfassen lumineszierende Substanzen, fluoreszierende Substanzen, magnetische Substanzen und radioaktive Stoffe. Als lumineszierende Substanzen und fluoreszierende Substanzen werden vorzugsweise Farbstoffe gewählt, die über einen langen Zeitraum Lumineszenz oder Fluoreszenz emittieren können.

[0070] Beispiele für Fluoreszenzfarbstoffe, die als Marker verwendet werden können, beinhalten verschiedene bekannte Stoffe wie DAPI, FITC, Rhodamin, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 und Cy7.

[0071] Um beispielsweise eine Vielzahl von Elementen zur gleichen Zeit nachzuweisen, kann man eine Vielzahl fluoreszierender Substanzen gleichzeitig verwenden.

[0072] Wenn als Markermolekül ein Material verwendet wird, das einen Lumineszenzfarbstoff oder einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, lässt sich mit einem einfachen Vorrichtungsaufbau die optische Bestimmung des Molekülzustands auf molekularer Ebene durchführen. Wenn bei der in dem später beschriebenen Beispiel 3 durchgeführten Hybridisierung Nukleotidmoleküle komplementär aneinander binden, kann außerdem eine Substanz verwendet werden, die in den Bereich der komplementärer Bindung interkalieren kann, wodurch ihre Fluoreszenzeigenschaften von denen des freien Zustands abweichen. Beispiele für solche Fluoreszenzfarbstoffe umfassen Acridinorange, Thiazolorange, Oxazolgelb und Rhodamin.

[0073] Wenn die Positionsänderung eines fluoreszierenden Moleküls gemessen wird, lässt sich die Fluoreszenz in Form von Daten bestimmen, wenn man zur Fluoreszenzmessung ein Mittel wie einen Fotomultiplier oder eine Fotodiode als Detektionsmittel verwendet. Außerdem kann das Mittel zur Fluoreszenzmessung zur Messung individueller fluoreszierender Moleküle einen Messmodus besitzen, mit dem sich ein einzelnes Photon nachweisen lässt.

[0074] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das bei dem Nachweisschritt zu verwendende Detektionsmittel ein Messmittel, das in der Lage ist, ein von einem Markermolekül abhängig vom Material des Markermoleküls emittiertes Signal zu messen, ein Speichermittel zum Speichern einer Vielzahl von mit dem Messmittel in einer bestimmten Zeit erhaltenen Messdatenwerten, und ein Verarbeitungsmittel zum Verarbeiten der gespeicherten Messdatenwerte durch eine Autokorrelationsfunktion.

[0075] Das Detektionsmittel kann ferner Folgendes umfassen: ein Speichermittel zum Speichern von Mess-

datenwerten für eine Vielzahl von Markermolekülen, die in einem bestimmten Messbereich erhalten wurden, und ein Rechenmittel zum separaten Berechnen der gespeicherten Messdatenwerte pro Markermolekül über eine Autokorrelationsfunktion. Außerdem kann ein Ausgabemittel zur Ausgabe der erhaltenen Daten oder Analyseergebnisse bereitgestellt werden. Das Mittel zur Datenausgabe kann ein Konvertierungsmittel beinhalten, um die durch die Autokorrelationsfunktion erhaltenen Ergebnisse in statistische Daten zu konvertieren, die eine zeitliche Positionsänderung in Bezug auf eine Vielzahl verfolgter Datenwerte ausdrücken.

[0076] Bei dem Nachweisschritt dieses Beispiels kann die Mikrobewegung der Targetmoleküle genau gemessen und ausgewertet werden, indem man die Fluktuationsbewegung der Markermoleküle in einer Flüssigkeit misst. Die Auswertung der Fluktuationsbewegung kann durch die Verarbeitung mit der Autokorrelationsfunktion erfolgen. Wenn eine fluoreszierende Substanz als Markermolekül verwendet wird, kann Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (nachfolgend einfach als "FCS" bezeichnet) eingesetzt werden.

[0077] Was das Verarbeitungsverfahren zur Analyse der Daten angeht, die durch die Messung charakteristischer Eigenschaften eines biologischen Materials durch FCS erhalten wurden, so kann auf den Artikel von Kinjo et al. verwiesen werden (Kinjo, M., Rigler, R., *Nucleic Acids Research* 23, 1795-1799, 1995). Diese Druckschrift beschreibt den Fall, dass die Hybridisierungsreaktion zwischen einer markierten Nukleinsäuresonde und einem Target-Nukleinsäuremolekül durch FCS verfolgt wird. FCS und Verarbeitung von Messdaten werden später genauer beschrieben.

[0078] Mit Hilfe von FCS ist es ohne Trennschritte möglich, nahezu in Echtzeit die Anzahl der fluoreszierenden Teilchen, die in einem äußerst kleinen Volumen einer Probe enthalten sind, und eine Diffusionskonstante zu erhalten. Bei FCS ist keine B/F-Trennung erforderlich, so dass die Messzeit verringert werden kann. Da das Lösungssystem so wie es ist einer Messung unterzogen werden kann, lässt sich die Messzeit weiter verringern. Außerdem kann ein biologisches Molekül unter natürlichen Bedingungen gemessen werden.

[0079] Die Detektion der bei obigem Reaktionsschritt erhaltenen Markermoleküle kann mit folgendem Schritt erfolgen. Der Nachweisschritt gemäß Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung umfasst die Beobachtung der Bewegung der Markermoleküle mit einem Mikroskop in einem Mikrosichtfeld, Konvertieren einer Vielzahl von Messdatenwerten in zeitabhängige statistische Daten, und Erhalt einer Reaktionskurve einer Hybridisierungsreaktion auf Basis der statistischen Daten. In der Reaktionskurve stellt die Anfangshöhe der Kurve die Anzahl der Nukleotidmoleküle dar.

[0080] Der Nachweisschritt der vorliegenden Erfindung erfolgt in einem dreidimensionalen Mikrosichtfeld. Dadurch kann die freie Mikrobewegung der Targetmoleküle in einer probenhaltigen Lösung mit hoher Genauigkeit detektiert und ausgewertet werden. Angenommen, der Nachweisschritt erfolgt durch Messung in einem zweidimensionalen Sichtfeld, dann ist es unmöglich, eine dreidimensionale freie Bewegung wie die Brownsche Bewegung der Markermoleküle zu erfassen. Als Folge sinkt die Messgenauigkeit. Daher ist ein solcher Nachweis nicht bevorzugt.

[0081] Da das bei dem Nachweisschritt verwendete Mikrosichtfeld von einem konfokalen optischen System gebildet wird, lassen sich Messdaten mit einer großen Schärfentiefe erhalten. Daher gelangen in einem Sichtfeld immer ein paar einzelne Markermoleküle in den Fokus, so dass genaue Menge und Ausgabedaten erhalten werden können.

[0082] Das Detektionsmittel zum Nachweis der Bewegung der Mikromoleküle weist vorzugsweise ein Mittel mit einem optischen System auf, um die Bewegung in einem Mikrosichtfeld in einem beugungsbegrenzten Bereich nahe dem Fokus zu messen. Alternativ weist das Detektionsmittel zur Durchführung der Messung in dem von dem konfokalen optischen System gebildeten Mikrosichtfeld vorzugsweise ein Mikroskop auf.

[0083] Da das Mikrosichtfeld ein beugungsbegrenzter Bereich nahe dem Fokus ist, können die einzelnen Markermoleküle mit einem hohen S/N-Verhältnis gemessen werden.

[0084] Der beugungsbegrenzte Bereich wird durch eine Lochblende mit einem mittleren Durchmesser von $15 \pm 5 \mu\text{m}$ gebildet. Daher lassen sich effizient die Messdaten für eine kleine Anzahl ausgewählter Markermoleküle erhalten.

[0085] Ein besonders bevorzugter Mikroraum ist eine nahezu zylindrische Region mit einem mittleren Durchmesser von $200 \pm 50 \text{ nm}$ und einem mittleren Durchmesser auf der optischen Achse von $2000 \pm 500 \text{ nm}$. Daher ist es möglich, die freie Mikrobewegung der in das Messsichtfeld gebrachten Moleküle zu erfassen.

[0086] Das Mikrosichtfeld lässt sich außerdem mit einer optischen Anordnung erhalten, bei der Lichtstrahlen von einer Apertur (Lochblende, Endfläche einer optischen Faser usw.) mit äußerst geringem mittleren Durchmesser emittiert werden. Gebündeltes Laserlicht ist bevorzugt.

[0087] Das Laserlicht, das Anregungslicht ist, wird nur auf einen einzigen Punkt einer Probenlösung fokussiert. Das von dem Punkt emittierte Fluoreszenzlicht kann aufgrund der charakteristischen Eigenschaften des konfokalen optischen Systems von einem Detektionssystem erfasst werden. Tatsächlich ist der Messbereich in einem Gefäß kein idealer Punkt, sondern ein zylindrischer Bereich, wie er in [Fig. 6B](#) gezeigt ist. Der Messbereich kann jede Größe (Volumen) aufweisen, solange er einen Mikroräum bilden kann. Beispielsweise kann die Größe etwa 500 nm (Durchmesser) × 2000 nm (Achsenlänge) betragen. Das Volumen kann in der Größenordnung von Femtolitern liegen.

[0088] Der FCS-Messbereich ist eine Lösung. Die in dem Bereich vorhandenen fluoreszierenden Moleküle bewegen sich in entsprechend der Brownschen Bewegung. Daher ist die Anzahl der in einem bestimmten Messbereich vorliegenden Moleküle nicht immer konstant. Die Anzahl der Moleküle schwankt um einen bestimmten Wert nach oben und unten. Dies wird als "Fluktuation der Anzahl" bezeichnet. Wegen der Fluktuation der Anzahl schwankt außerdem die gemessene Fluoreszenz. Dies wird als "Fluktuation der Fluoreszenzintensität" bezeichnet. Durch Analyse der Fluktuation der Fluoreszenzintensität lassen sich Daten für die Diffusionsgeschwindigkeit und die Anzahl der Moleküle erhalten.

[0089] FCS selbst ist allgemein bekannt. FCS wird in der Patentanmeldung Nr. 10-301316 ausführlich beschrieben. Die Analyse der FCS-Daten kann mit der Analysesoftware "FCS ACC ESS" erfolgen, die dem von Zeiss Co., Ltd. hergestellten ConfoCor (eingetragene Marke) beigelegt ist.

Beispiel 2

[0090] Ein Beispiel für eine Messvorrichtung, die bei der in Beispiel 1 beschriebenen Ausführungsform verwendet werden kann, wird unter Bezug auf [Fig. 5](#) erläutert. [Fig. 5](#) zeigt eine FCS-Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Die Vorrichtung umfasst ein Umkehrfluoreszenzmikroskop **1** mit einem konfokalen optischen System, einen Fotomultiplier **2** zur Messung der von einer Probe emittierten Fluoreszenz, ein Datenverarbeitungsgerät **3** zum Empfang von Messdaten und deren Berechnung durch eine Autokorrelationsfunktion zur Konvertierung in Zahlenwerte oder grafische Diagramme und ein Display **4** zum Anzeigen der Verarbeitungsergebnisse auf einem Bildschirm.

[0091] Eine probenhaltige Lösung **11** wird, wie in [Fig. 5](#) gezeigt, leicht so bereitgestellt, dass die Lösung **11** auf ein Objektglas **13** getüpfelt wird, der sich auf einem Probenhalter **12** befindet. Da für diese Vorrichtung nur eine kleine Menge probenhaltige Lösung verwendet wird, wird auf das Objektglas **13** eine Abdeckung **14** gegeben, um zu verhindern, dass Feuchtigkeit verdunstet. Als Abdeckung **14** wird vorzugsweise ein wenig lichtdurchlässiges Material verwendet. Durch die Abdeckung lassen sich gleichzeitig Luftdichtigkeit und Lichtdichtigkeit gewährleisten. Außerdem wird für die innere Oberfläche der Abdeckung vorzugsweise ein Material mit möglichst geringem Lichtreflexionsvermögen verwendet, um zu verhindern, dass Anregungslicht reflektiert wird.

[0092] Eine Objektivlinse **15** ist direkt unter dem Teil des Objektglases **13** angeordnet, auf den die probenhaltige Lösung **11** getüpfelt wird, und zwar so, dass sie in der probenhaltigen Lösung **11** fokussiert ist. Es ist anzumerken, dass das Fluoreszenzmikroskop **1** ein Reflexionsmikroskop sein kann. Bei einem Reflexionsmikroskop kann die probenhaltige Lösung **11** direkt auf die untere Oberfläche der Objektivlinse **15** getüpfelt werden. Bei dem in [Fig. 5](#) gezeigten Beispiel wird ein Argon (Ar)-Ionenlaser als Laservorrichtung **16** verwendet, die die Lichtquelle für das Fluoreszenzmikroskop **1** ist.

[0093] Falls nötig, können verschiedene Vorgänge wie das Einlegen/Entnehmen des Objektglases **13** in das/aus dem Fluoreszenzmikroskop **1**, das Tüpfeln der probenhaltigen Lösung auf das Objektglas **13** und das Öffnen/Schließen der Abdeckung **14** automatisch erfolgen.

[0094] Die obige Detektion kann wie in [Fig. 5](#) gezeigt mit einem konfokalen Mikroskop erfolgen. Das konfokale Mikroskop selbst ist dem Fachmann bekannt.

[0095] Die Detektion kann mit einem konfokalen Mikroskop erfolgen und umfassen:

- (1) Verwendung von Laserlicht als Anregungslicht;
- (2) Durchleiten von Laserlicht durch ein Filter (IF), Bündeln des Laserlichts und Ausrichten auf einen einzi-

gen Punkt einer Probe mittels eines dichroitischen Spiegels (DM);
 (3) Anregen einer fluoreszierenden Substanz in der Probe durch das Laserlicht zur Fluoreszenzemission;
 (4) Durchleiten der Fluoreszenz durch eine Lochblende, damit nur die von der fluoreszierenden Substanz im Fokus der Probe emittierte Fluoreszenz durch eine Fotomultipliierröhre (PMT) amplifiziert wird; und
 (5) Detektieren der auf diese Weise amplifizierten Fluoreszenz.

[0096] [Fig. 5](#) zeigt ein Beispiel für einen Argonionenlaser. Abhängig von der Art der fluoreszierenden Substanz können sich in der Wellenlänge unterscheidende Krypton-Argonionenlaser, Helium-Neonlaser und Helium-Cadmiumlaser verwendet werden. [Fig. 5](#) ist lediglich eine schematische Ansicht eines typischen Konfokalmikroskops. Es versteht sich von selbst, dass auch andere Systeme als das in [Fig. 5](#) gezeigte Konfokalmikroskop verwendet werden können.

[0097] Bei dem Nachweisverfahren wird nur Fluoreszenz detektiert, die von einem Einzel- und Mikropunkt emittiert wird. Daher kann die Detektion ohne Background durchgeführt werden, und die Nachweisempfindlichkeit ist im Vergleich mit einer üblichen Fluoreszenzdetektion deutlich höher.

[0098] Der Nachweis eines polymorphen Targetgens erfolgt über einen Zeitraum in einer Größenordnung von im Allgemeinen Millisekunden bis Minuten und in aller Regel in einer Größenordnung von Sekunden.

[0099] Nach Erhalt der Detektionsergebnisse werden die Ergebnisse analysiert, um festzustellen, welche Nukleinsäuresonde an das polymorphe Targetgen bindet. Wenn der Typ der an das polymorphe Targetgen gebundenen Nukleinsäuresonde festgestellt ist, lässt sich der Typ des polymorphen Targetgens ermitteln.

[0100] [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) sind Vergrößerungen eines Messblocks des Fluoreszenzmikroskops **1** von [Fig. 5](#). In [Fig. 6A](#) wird ein Mikroraum **20** gebildet, der durch die Lage des Objektglases **13** und der Objektivlinse **15** mit der bestimmten Apertur (FA = 1,2 in der Figur) definiert ist. Wie in [Fig. 6B](#) gezeigt, ist der Mikroraum **20** tatsächlich der Brennpunkt des Laserlichts, der ein gewisses Volumen besitzt. Die Form des Mikrorraums **20** ist eine nahezu zylindrische Form, die sich um einen verengten Mittelteil nach oben und unten erstreckt (siehe [Fig. 6B](#)). Das Sichtfeld **20** wird durch die Länge Z auf der optischen Achse und den mittleren Radius Y um die Referenzposition als Brennpunkt begrenzt. In dem Mikroraum **20** kann die Fluoreszenz einzelner fluoreszierender Moleküle genau gemessen werden. Der Grund hierfür ist, dass das Volumen des Mikrorraums **20** auf das Minimum reduziert ist, das ausreicht, um die Mikrobewegung der fluoreszierenden Moleküle zu verfolgen. Mit diesem Aufbau ist es möglich, das außer in der Nähe des Brennpunkts in der probenhaltigen Lösung **11** auftretende Hintergrundrauschen der fluoreszierenden Moleküle zu eliminieren.

[0101] Nachfolgend wird nun die Analyse mit der obigen FCS-Vorrichtung erläutert.

[0102] Wenn die Fluoreszenzintensität der fluoreszierender Moleküle, die sich in den Konfokalbereich hinein- und aus diesem herausbewegen (wie in [Fig. 6](#) gezeigt), pro Molekül erfasst wird, lässt sich die Fluktuation der Fluoreszenzintensität feststellen. Wenn die in Form von Daten erhaltene Fluktuation der Fluoreszenzintensität außerdem durch eine Autokorrelationsfunktion konvertiert wird, ergeben sich statistische Daten. Auf diese Weise können Anzahl und Größe der fluoreszierenden Moleküle ausgewertet werden, ohne die Moleküle isolieren zu müssen.

[0103] Ein Beispiel für gemäß der obigen Ausführungsform gemessene Daten, ist in [Fig. 7](#) in Form einer Kurve gezeigt. In der Kurve von [Fig. 7](#) ist die Fluoreszenzintensität I (t) auf der senkrechten Achse aufgetragen und die Zeit (t) ist auf der waagerechten Achse aufgetragen. Wenn die Daten durch die unten gezeigte Autokorrelationsfunktion konvertiert werden, ergibt sich die in [Fig. 8](#) gezeigte Kurve.

[0104] Die Autokorrelationsfunktion ist

$$G(\tau):G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle$$

[0105] Wenn diese durch das Quadrat der mittleren Intensität $\langle I \rangle$ normiert und entwickelt wird, ergibt sich die folgende Näherung:

$$G(\tau) / \langle I \rangle^2 = C(\tau)$$

$$= 1 + \frac{1}{N} \left[\frac{1}{1 + 4D\tau / w_{xy}^2} \right] \left[\frac{1}{1 + 4D\tau / w_z^2} \right] \frac{1}{2} \dots (1)$$

wobei $c(0) = 1 + 1/N$, worin $\tau = 0$, D = Diffusionskonstante, N = Anzahl der Moleküle in der Lösung.

[0106] Das Konzept der Analyse lässt sich unter Bezug auf [Fig. 9A](#) bis [Fig. 9D](#) verstehen. Wenn das Markermolekül nicht gebunden ist, ist die Größe des Moleküls gering. Folglich ist die Geschwindigkeit der Brownschen Bewegung hoch ([Fig. 9A](#)) und die Frequenz in der Funktion $I(t)$ ist hoch ([Fig. 9B](#)). Im Gegensatz dazu nimmt die Geschwindigkeit der Brownschen Bewegung ab, wenn das Markermolekül gebunden ist ([Fig. 9C](#)). Folglich lassen sich Werte mit hoher Frequenz erhalten ([Fig. 9D](#)). Wenn die Analyse, wie oben erwähnt, mit der auf Basis der Fluoreszenzintensität erhaltenen Autokorrelationsfunktion durchgeführt wird, lässt sich folglich der Zustand der Markermoleküle ermitteln.

[0107] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung können die obigen Ausführungsformen wie nachfolgend beschrieben modifiziert werden.

[0108] Abhängig vom Typ der Nukleotidsequenz des Polymorphismusortes kann eine Markersubstanz mit einer anderen Fluoreszenzwellenlänge an das Nukleotidmolekül des 3'-Endes der Sonde gebunden werden. Die so präparierte Sonde wird zur Hybridisierung in gleicher Weise wie in Beispiel 1 mit einer Testproben-DNA gemischt. Das Nukleotid, das nicht mit der Nukleotidsequenz gepaart ist, wird enzymatisch entfernt. Anschließend erfolgt die Detektion durch FCS. Zu diesem Zeitpunkt werden die einzelnen Markersubstanzen auf Basis ihrer unterschiedlichen Wellenlängen analysiert. Durch die Analyse wird deutlich, welche Sonde vollständig mit der Nukleotidsequenz gepaart ist. Gleichzeitig wird der Typ des Nukleotids am 3'-Terminus identifiziert. Dadurch wird festgestellt, welcher Typ Polymorphismus vorliegt. Im Ergebnis lässt sich der Einzelnukleotid austausch zuverlässiger nachweisen. Bei einer anderen Art Fluoreszenz kann außerdem die Wellenlänge des Anregungslichts verändert werden. Alternativ kann die Wellenlänge des Detektionslichts verändert werden, indem man auf dem Detektionselement ein Filter anbringt.

[0109] Zuvor wurde ein Beispiel für die FCS-Vorrichtung beschrieben. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf das obige Beispiel beschränkt. Jedes Element der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann modifiziert und verändert werden.

[0110] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Einzelnukleotidnachweis bereitgestellt, das einfach und schnell durchzuführen ist. Dieser Vorteil ergibt sich aus dem ursprünglich gefundenen Prinzip der vorliegenden Erfindung. Genauer lässt sich der gewünschte Nachweis der vorliegenden Erfindung durchführen, indem jede für einen Polymorphismus spezifische Sonde mit einem Marker markiert wird, die Sonde mit einer Testproben-DNA reagieren gelassen wird und der Marker nachgewiesen wird. Auf diese Weise kann die Reaktion auf molekularer Ebene erfasst werden. Dazu wird die Markersubstanz zu einer Vielzahl von Zeitpunkten gemessen, wodurch die zeitabhängige Positionsänderung nachgewiesen und ausgewertet wird. Folglich kann die Positionsänderung, die abhängig von der Größe des Moleküls variiert, quantitativ bestimmt werden.

[0111] Daher sind keine Arbeitsschritte erforderlich, wie sie bei herkömmlichen Verfahren erforderlich sind, einschließlich B/F-Trennung, Reaktion des Substrats mit einem Enzymmarkerreagens, Exposition eines RI-Markerreagens mit einem strahlungsempfindlichen Film, PCR und Elektrophorese.

[0112] Genauer gesagt benötigt man bei herkömmlichen Verfahren PCR und eine Verlängerung der Nukleotidsequenz um bis zu 200 bis 300 Nukleotide, damit bei der Elektrophorese eindeutige Ergebnisse erhalten werden. Elektrophorese und PCR sind jedoch gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nicht immer erforderlich. Wenn zur Verbesserung der Zuverlässigkeit eine PCR durchgeführt wird, lassen sich ausreichend zuverlässige Daten erhalten, wenn die Nukleotidsequenz um 10 bis 30 Basen verlängert wird.

[0113] Das Nachweisverfahren gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung lässt sich mit äußerst geringen Mengen an Testprobe und Reagens durchführen. Tatsächlich reicht es aus, wenn die Testprobe in einem Volumen in einer Größenordnung von Femtolitern (fl) enthalten ist. Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es daher möglich, gleichzeitig eine Vielzahl von Testproben zu messen, indem man sehr kleine Gefäße verwendet. Außerdem ist es möglich, die Mengen an Testprobe und Detektionsrea-

gens, beispielsweise eines Enzymreagens, die zum Nachweis erforderlich sind, zu verringern.

[0114] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann man außerdem eine Vielzahl von Reagenzien, die für verschiedene Polymorphismusorte spezifisch sind, im gleichen Gefäß mischen und dadurch gleichzeitig auf die Testprobe aufbringen. Als Folge davon lässt sich nicht nur die Menge an Proben-DNA, sondern auch die Anzahl der Reaktionsgefäße verringern. Darüber hinaus lässt sich auf einfache Weise ein Test auf ein polymorphes Gen durchführen.

[0115] Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung lässt sich ein Einzelnukleotidaustausch mit hoher Empfindlichkeit feststellen. Da das Verfahren des obigen Beispiels in einem homogenen System durchgeführt wird, das vom Background wenig beeinträchtigt wird, ist die Nachweisgenauigkeit hoch. Dies ist eine Folge des Nachweisprinzips der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 3

[0116] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Nachweis eines Polymorphismus eines Nukleotids bereitgestellt, der kein SNP ist.

[0117] Genauer gesagt stellt diese Ausführungsform ein Verfahren zum Nachweis eines Polymorphismus bereit, das die Schritte umfasst:

Vorbereiten einer Testprobe, die ein Polynukleotid umfasst;

Mischen von Nukleinsäuresonden PR_1 bis PR_n , die mit einem nachweisbaren Marker markiert sind und in der Lage sind, spezifisch an Polymorphismussequenzen PS_1 bis PS_n zu binden, mit der Testprobe, wodurch die Nukleinsäuresonden PR_1 bis PR_n an das Polynukleotid binden;

Nachweis der Nukleinsäuresonden PR_1 bis PR_n in einem Mikroraum; und

Analysieren der Detektionsergebnisse um festzustellen, welche der Nukleinsäuresonden PR_1 bis PR_n an das – Polynukleotid gebunden ist, wodurch festgestellt wird, welche der Polymorphismussequenzen PS_1 bis PS_n der Nukleotidsequenz des Polymorphismusortes entspricht.

[0118] Gemäß dieser Ausführungsform ist es möglich festzustellen, welche der Polymorphismussequenzen PS_1 bis PS_n (n ist eine ganze Zahl von 2 oder mehr) der in dem Polynukleotid enthaltenen Nukleotidsequenz des Polymorphismusortes entspricht.

[0119] Gemäß dieser Ausführungsform wird ein Verfahren zur Feststellung des in einem bestimmten Polynukleotid, insbesondere einem polymorphen Gen, enthaltenen Polymorphismusortes bereitgestellt, und gleichzeitig wird ein Verfahren bereitgestellt, mit dem sich die Nukleotidsequenz des Polymorphismusortes rasch und einfach bestimmen lässt.

[0120] Falls das polymorphe Targetgen mittels PCR amplifiziert wird, ist es notwendig, ein Primerpaar zu wählen, das den zu bestimmenden Polymorphismusort einrahmt.

[0121] Anschließend werden die Nukleinsäuresonden PR_1 bis PR_n (n ist eine ganze Zahl von 2 oder mehr), die Nukleotidsequenzen enthalten, die zu den entsprechenden Polymorphismussequenzen PS_1 bis PS_n komplementär sind, mit der Testprobe gemischt. Da die Nukleinsäuresonde PR_1 eine Nukleotidsequenz enthält, die zu der Polymorphismussequenz PS_1 komplementär ist, kann die Nukleinsäuresonde PR_1 nur an ein polymorphes Targetgen binden, wenn das polymorphe Targetgen den Typ PS_1 hat. Wenn die polymorphen Targetgene PS_2 bis PS_n sind, können sie dementsprechend an die jeweiligen Nukleinsäuresonden PR_2 bis PR_n binden.

[0122] Wenn das polymorphe Targetgen keine unbekannte Polymorphismussequenz enthält, ist gibt es in dem polymorphen Gen irgendeine der Polymorphismussequenzen PS_1 bis PS_n . Wenn man das polymorphe Gen daher mit den Nukleinsäuresonden PR_1 bis PR_n mischt, wird irgendeine der Nukleinsäuresonden PR_1 bis PR_n an einen Polymorphismusort des polymorphen Gens binden.

[0123] Da jede Nukleotidsonde PR_1 bis PR_n mit einer nachweisbaren Markersubstanz, besonders bevorzugt einer fluoreszierenden Substanz oder einer lumineszierenden Substanz, markiert ist, lässt sich das polymorphe Gen, an das die Nukleinsäuresonde gebunden ist, mit der weiter unten beschriebenen Nachweisoperation nachweisen.

[0124] Die an die Nukleinsäuresonden gebundenen Markersubstanzen können gleicher Art sein. Bevorzugt werden jedoch wenigstens zwei Arten von Markersubstanzen verwendet, um festzustellen, welche Nuklein-

säuresonde an das polymorphe Targetgen bindet. Wenn nur eine einzige Art von Markersubstanz verwendet wird, kann man feststellen, welche Nukleinsäuresonde an das polymorphe Targetgen bindet, indem man die Länge jeder Nukleinsäuresonde ändert.

[0125] Nachdem irgendeine der Nukleinsäuresonden PR₁ bis PR_n an das polymorphe Targetgen gebunden ist, werden die in dem Mikroräum vorliegenden Nukleinsäuresonden PR₁ bis PR_n bestimmt.

[0126] Das in dem Mikroräum vorliegende polymorphe Targetgen kann nachgewiesen werden, indem man den Marker der an das Gen gebundenen Nukleinsäuresonde nachweist. Da das Volumen des Mikroräums wie oben beschrieben äußerst klein ist, erfolgt der Nachweis vorzugsweise mit Laserlicht. Genauer wird die Fluoreszenz in dem Mikroräum unter einem mikroskopischen Sichtfeld detektiert.

[0127] Der Detektionsschritt lässt sich mit einer Vorrichtung durchführen, wie sie beispielsweise in Beispiel 2 gezeigt ist. Bei dieser Ausführungsform kann wie nachfolgend beschrieben insbesondere FCS angewandt werden, um herauszufinden, welche Nukleinsäuresonde an das Targetallel gebunden ist.

- (1) Laserlicht wird auf den in [Fig. 6B](#) gezeigten Mikroräum gerichtet,
- (2) die von einer in dem Mikroräum vorhandenen fluoreszierenden Substanz emittierte Fluoreszenzintensität wird zeitabhängig gemessen, um die in [Fig. 9A](#) bis [Fig. 9D](#) gezeigten Daten zu erhalten,
- (3) Berechnen eines Erwartungswerts für das Produkt I(t) × I(t + τ), den Fluoreszenzintensitäten von zwei verschiedenen Zeitpunkten, zum Erhalt einer Autokorrelationsfunktion:

Gleichung G(τ): $G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle$

- (4) Die in Schritt (3) erhaltene Autokorrelationsfunktion wird mit der folgenden Gleichung 2 getestet:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[\left\{ \frac{1 - y}{1 + \frac{\tau}{\tau_{ungebunden}}} \sqrt{\frac{1}{1 + s^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{ungebunden}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1 + \frac{\tau}{\tau_{gebunden}}} \sqrt{\frac{1}{1 + s^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{gebunden}}}} \right\} \right] \dots (2)$$

wobei N die mittlere Anzahl fluoreszierender Moleküle ist;

$\tau_{ungebunden} = \omega^2/4D_{ungebunden}$: translationale Diffusionszeit der freien Nukleinsäuresonde;

$\tau_{gebunden} = \omega^2/4D_{gebunden}$: translationale Diffusionszeit der gebundenen Nukleinsäuresonde;

y ist der Anteil der gebundenen Nukleinsäuresonde; und

s ist ω/z_0 (ω ist der Durchmesser des Nachweisbereichs; $2z_0$ ist die Länge des Bereichs, $D_{ungebunden}$ und $D_{gebunden}$ sind translationale Diffusionskonstanten der ungebundenen Nukleinsäuresonde und der gebundenen Nukleinsäuresonde, und

- (5) Autokorrelationen vor und nach Zugabe jeder der Nukleinsäuresonden.

[0128] Um mittels FCS festzustellen, welche Nukleinsäuresonde gebunden ist, kann beispielsweise jede der Nukleinsäuresonden zur Unterscheidung mit Fluoreszenzmarkern markiert sein, die sich in der Anregungswellenlänge und/oder der Fluoreszenzwellenlänge unterscheiden.

[0129] Wenn die Nukleinsäuresonden unterschiedliche Größe haben, unterscheiden sich außerdem die Brownsche Bewegung und die Autokorrelationsfunktion. Daher lässt sich feststellen, welche Nukleinsäuresonde an eine Sequenz gebunden ist, wenn man Nukleinsäuresonden unterschiedlicher Größe verwendet. Es versteht sich von selbst, dass sich der Typ der an ein Targetallel gebundenen Nukleinsäuresonde feststellen lässt, indem man Sonden mit unterschiedlicher Größe und unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern verwendet.

[0130] Das Targetallel lässt sich nicht nur mit einem Nachweisverfahren bestimmen, bei dem eine Hybridisierungsreaktion als Unterscheidungsmerkmal verwendet wird, sondern auch, indem man eine PCR-Reaktion mit einer als Sonde verwendeten markierten Sequenz als Primer durchführt und den Markertyp des amplifizierten Produkts bestimmt. Außerdem kann die PCR-Reaktion zur Unterscheidung verwendet werden. Wenn eine der-

artige PCR-Reaktion zur Unterscheidung verwendet wird, können die Targetalleltypen auf Basis der Unterschiede der den verschiedenen Größen der amplifizierten Produkte zugeschriebenen Autokorrelationsfunktionen bestimmt werden, wenn die Primer so konstruiert sind, dass abhängig vom Typ des Polymorphismus amplifizierte Produkte unterschiedlicher Größe gebildet werden.

[0131] Wie zuvor beschrieben, kann der Typ des Polymorphismusortes eines Targetallels mit der vorliegenden Erfindung sehr rasch und einfach bestimmt werden.

Bestimmung des HLA-Typs (siehe [Fig. 10](#))

[0132] Gemäß dem in Beispiel 3 gezeigten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Bestimmung beispielsweise des HLA-Typs bereitgestellt.

[0133] In diesem Beispiel wird der Typ der Polymorphussequenz bestimmt, die eine Alloantigenität gegen die Region DRB1 von Klasse II-HLA zeigt. DRB1*15 und DRB1*16 sind Subtypen von DR2. DRB1*15 (Sequenz Nr. 1) und DRB1*16 (Sequenz Nr. 2) unterscheiden sich nur in Nukleotid 141 (T → C) und in Nukleotid 180 (G → C).

[0134] Sonde 1, die eine Nukleotidsequenz besitzt, die komplementär zur Nukleotidsequenz von Nukleotid 141-180 von DRB1*15 ist, und Sonde 2, die eine Nukleotidsequenz besitzt, die komplementär zur Nukleotidsequenz von Nukleotid 141-180 von DRB1*16 ist, werden präpariert. Sonde 1 wird mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Sonde 2 wird mit Rhodamin markiert. Jede der Sonden 1 und 2 wird bis zu einer Konzentration von etwa 10⁻⁸ M zu einer Lösung gegeben.

[0135] Die Nukleotidsequenz von Nukleotid 60-200 wird mittels PCR amplifiziert, wobei ein Primerpaar verwendet wird, das in der Lage ist, spezifisch an eine Konsensusregion zu binden. Zur Herstellung einer DNA-Testprobe wird dann eine Lösung mit einer Konzentration von etwa 10⁻⁸ versetzt.

[0136] Ein Tropfen der DNA-Testprobe wird auf die Oberfläche eines Deckglases gegeben. Nach Zugabe von Sonde 1 und Sonde 2 erfolgt eine Hybridisierungsreaktion bei einer Temperatur von etwa 58 bis 60 °C.

[0137] Die Änderung der Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenz und Lumineszenz wird vor und nach der Hybridisierungsreaktion bestimmt.

[0138] Falls der Typ der Testproben-DNA beispielsweise ein DRB1*15-Homotyp ist, wird nur Sonde 1 gebunden. In der Folge ändert sich nur die Autokorrelationsfunktion der von FITC emittierten Gelb-Grün-Fluoreszenz. Auf der anderen Seite wird nur Sonde 2 gebunden, wenn der Typ der Testproben-DNA ein DRB1*16-Homotyp ist. In der Folge ändert sich nur die Autokorrelationsfunktion der von Rhodamin emittierten Gelb-Grün-Fluoreszenz. Außerdem werden sowohl Sonde 1 als auch Sonde 2 gebunden, falls der Typ der Testproben-DNA ein Heterotyp von DRB1*15 und DRB1*16 ist. In der Folge ändert sich sowohl die Autokorrelationsfunktion der von FITC emittierten als auch die der von Rhodamin emittierten Fluoreszenz. Ist der Typ der Testproben-DNA weder DRB1*15 noch DRB1*16, ändern sich die Autokorrelationsfunktionen überhaupt nicht.

[0139] Sonde 1 und Sonde 2 sind wie oben beschrieben mit verschiedenen Markersubstanzen markiert. Wenn sie in das gleiche Gefäß gegeben werden, kann man daher feststellen, welche Sonde an die Testproben-DNA bindet. Angesichts neuerer Erkenntnisse, dass es in HLA zahlreiche polymorphe Elemente gibt, hat das erfindungsgemäße Verfahren einen großen Vorteil, weil die Analyse erfolgen kann, indem viele Sondentypen gleichzeitig in das gleiche Gefäß gegeben werden.

[0140] Bei dem Verfahren dieses Beispiels werden Sonden verwendet, die mit verschiedenen Markersubstanzen markiert sind. Es können jedoch auch Sonden verschiedener Länge verwendet werden. In diesem Fall muss jede Sonde so gewählt sein, dass sie eine Länge aufweist, die groß genug ist, um den Unterschied in der Fluktuation durch FCS bestimmen zu können. In den obigen Beispielen, in denen DRB1*15 und DRB1*16 getrennt erkannt werden, können beispielsweise Sonde 1 und Sonde 3 (Sequenz Nr. 3; um 20 Nukleotide länger als Sonde 1) verwendet werden.

[0141] [Fig. 11](#) zeigt ein Anwendungsbeispiel für das Verfahren der vorliegenden Erfindung für einen klinischen Test. Gemäß dem Anwendungsbeispiel lassen sich die Subklassentypen vieler Polymorphussequenzen rasch bestimmen. Daher eignet sich dieses Verfahren, um den Typ eines HLA festzustellen, da es in dem

HLA zahlreiche Polymorphismusorte gibt und für jeden der Polymorphismusorte viele Subklassen identifiziert wurden.

[0142] Wie sich aus [Fig. 11](#) ergibt, werden die Polymorphismussequenzen (A2, A26, B40....) eines HLA in die Vertiefungen in einer flachen Glasplatte gegeben. Genauer werden unterschiedliche Polymorphismussequenzen in Vertiefungen verschiedener Spalten gegeben. Danach wird eine Gruppe von Sonden zugegeben, die in der Lage ist, spezifisch an Subklassen der Polymorphismussequenzen zu binden. Wie in diesem Beispiel ausgeführt, wird anschließend für jede Vertiefung getrennt festgestellt, welche Sonde gebunden ist. Auf diese Weise lassen sich die Subtypen vieler Polymorphismussequenzen feststellen. Es versteht sich von selbst, dass die Polymorphismussequenzen, die in die Vertiefungen gegeben werden, nicht auf solche von HLA beschränkt sind. In die Vertiefungen können polymorphe Gene unterschiedlicher Typen gegeben werden.

[0143] Gemäß dem Verfahren des Beispiels der vorliegenden Erfindung lassen sich Polymorphismusorte vieler Typen von Polynukleotiden rasch und einfach bestimmen.

Beispiel 4

[0144] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung ist es möglich, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem sich der Bluttyp, ebenfalls ein Polymorphismus, testen lässt.

[0145] Dieses Verfahren kann beispielsweise wie nachfolgend beschrieben durchgeführt werden. Zuerst lässt sich eine Antigen/Antikörper-Reaktion in einer Probe direkt beobachten, wenn die Bewegung des markierten Antikörpers mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie verfolgt wird. Wenn der Zustand des markierten Antikörpers auf diese Weise analysiert wird, lässt sich feststellen, ob eine Antigen/Antikörper-Reaktion stattfindet oder nicht.

[0146] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ist es daher möglich, die Bluttypen von Blutzellen zu bestimmen, also ein Blutgruppentest und ein reverser Blutgruppentest für rote Blutzellen, und irreguläre Antikörper und Anti-Blutzellenspezifische Antigene und Antikörper und Antikörper gegen Viren und Bakterien nachzuweisen.

[0147] Um ein Antigen oder einen Antikörper als Nachweisziel in einer Testprobe nachzuweisen, wird also ein mit einer fluoreszierenden Substanz markierter Antikörper oder ein mit einer fluoreszierenden Substanz markiertes Antigen verwendet, der bzw. das spezifisch für das obige Antigen oder den obigen Antikörper ist. Antigen oder Antikörper werden zuerst mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten reagieren gelassen. Anschließend wird die Fluktuation der Fluoreszenzintensität der fluoreszierenden Substanz abhängig von der Zeit gemessen. Die erhaltenen Daten werden durch die Fluoreszenzautokorrelationsfunktion konvertiert. Als Ergebnis lassen sich die Anzahl und die Größe der mit der fluoreszierenden Substanz markierten Moleküle bestimmen.

[0148] Bei dem Verfahren gemäß der Ausführungsform der vorliegenden Erfindung müssen von Anfang bis Ende des Bestimmungsprozesses keine in der Testprobe vorhandenen Substanzen durch Arbeitsschritte wie B/F-Trennung abgetrennt werden. In diesem Beispiel wird die Bewegung der Markermoleküle durch ein kontinuierliches zeitabhängiges Monitoring bestimmt, angefangen mit dem Zeitpunkt, zu dem die Probe und das unterscheidende Reagens in das Reaktionsgefäß gegeben werden und über den Zeitraum, über den die Reaktion in dem Gefäß erfolgt. Auf diese Weise ist es möglich, die sich mit der Zeit durch die Antigen/Antikörper-Reaktion veränderte Bewegung der Markermoleküle festzustellen. Außerdem kann die Bestimmung, die abhängig von der Antigen/Antikörper-Reaktion schwankt, die in dem obigen Reaktionssystem abläuft, unter natürlichen Bedingungen genau erfolgen.

[0149] Das Verfahren gemäß der Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfordert keine Schritte außer einer spezifischen Reaktion, d. h. keinen Reaktionsschritt zur Koagulation, keinen Waschschrift und keinen Schritt zur Bildung eines Zentrifugalreaktionskoagulationsmusters, die bei einem herkömmlichen Transfusionsonstest durchgeführt werden. Außerdem kann das Ergebnis der Bestimmung bei diesem Verfahren unmittelbar nach Mischen der Probe und des Reagens angegeben werden. Daher lässt sich die Zeit für die Untersuchung verringern und die Untersuchung vereinfachen, und unspezifische Reaktionen lassen sich im Vergleich mit herkömmlichen Verfahren verringern.

[0150] Nachdem der Reaktionsschritt wie oben beschrieben durchgeführt wurde, kann der Nachweisschritt mit der Vorrichtung gemäß Beispiel 2 erfolgen. Die erhaltenen Daten werden wie nachfolgend erläutert analysiert. Das Fluoreszenzsignal wird etwa eine Minute lang gemessen. Die erhaltenen Fluoreszenzsignale wer-

den nacheinander in einem Speicherelement gespeichert und zur Auswertung gleichzeitig für die Fluoreszenzautokorrelationsfunktion $G(t)$ verwendet. Dieses Vorgehen kann vorher programmiert werden.

[0151] Die Fluoreszenzautokorrelationsfunktion $G(t)$ erfolgt entsprechend der nachfolgenden Gleichung 3 auf Basis der mittleren Anzahl N fluoreszierender Moleküle im Messbereich, der Translationszeit (τ_{mono}) und der Translationszeit (τ_{poly}) gemäß dem Verfahren von Rigler et al. (siehe *Fluorescence Spectroscopy – New methods and applications*, Springer Berlin, 13-24, In J. R. Ladowicz (Hrsg.), 1992). Die Zeit τ_{mono} ist die Translationszeit eines freien, mit einem Marker markierten Substratmoleküls, das als nichtreaktives Molekül dient, das eine fluoreszierende Markersubstanz enthält. Die Zeit τ_{poly} ist die Translationszeit des nach der Antigen/Antikörper-Reaktion an das Targetmolekül gebundenen markierten Substratmoleküls.

$$G(t) = 1 + \frac{1}{N} \left[\left\{ \frac{1-y}{1 + \frac{t}{\tau_{\text{mono}}}} \sqrt{\frac{1}{1 + s^2 \cdot \frac{t}{\tau_{\text{mono}}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1 + \frac{t}{\tau_{\text{poly}}}} \sqrt{\frac{1}{1 + s^2 \cdot \frac{t}{\tau_{\text{poly}}}}} \right\} \right] \dots (3)$$

[0152] In Gleichung 3 ist y der Anteil einer Reaktionskomponente, τ_{mono} ist $W_0^2/4D_{\text{mono}}$, $\tau_{\text{poly}} = W_0^2/4D_{\text{poly}}$, $S = W_0/Z_0$ (wobei W_0 der Durchmesser eines Volumenelements eines in einem Mikrosichtfeld nahe dem Brennpunkt gebildeten, in etwa zylindrischen Messbereichs ist (siehe [Fig. 3](#)), und $2Z_0$ gibt die Länge des Volumenelements an). D_{mono} und D_{poly} sind translationale Diffusionskoeffizienten der nichtbindenden Komponente bzw. der bindenden Komponente.

[0153] Ein solcher beispielhafter Aufbau lässt sich auf zahlreichen verschiedenen Gebieten verwenden, die nicht nur Verfahren im Zusammenhang mit dem Bluttyp beinhalten, wie sie später beschrieben werden, sondern auch Tests zur Feststellung infektiöser viraler oder bakterieller Krankheiten und Bestimmungstests mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen.

[0154] Außerdem beeinträchtigt bei dieser Ausführungsform des Verfahrens die Änderung des Molekulargewichts des Antikörpers durch Modifikation des Moleküls nicht die Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem Protein. In diesem Fall erfolgt der Nachweis auf Basis der Beobachtung, welches Antikörperreagens (genauer, welches Molekulargewicht) seine Bewegungsgeschwindigkeit verändert hat. Mit einer einzigen fluoreszierenden Substanz lassen sich mehrere Einzelheiten bestimmen.

[0155] Die Reaktionsgefäße, die bei diesem Beispiel verwendet werden können, umfassen die oben genannten Objektgläser, auf die die Probe aufgetropft werden kann ([Fig. 12A](#) und [Fig. 12B](#)), Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl von Mikrovertiefungen ([Fig. 11](#)) und Platten mit einer geeigneten Anzahl von Mikrovertiefungen ([Fig. 13A](#) und [Fig. 13D](#)). Da für die Reaktion nur ein kleines Volumen erforderlich ist, lässt sich in diesem Fall auch eine Ultramikrotiterplatte mit beispielsweise 384 Vertiefungen verwenden. Wenn eine Ultramikrotiterplatte verwendet wird, lässt sich der Bluttest mit extrem hoher Geschwindigkeit und hohem Durchsatz durchführen.

[0156] In folgendem Beispiel erfolgte die FCS-Messung mit der in [Fig. 5](#) gezeigten FCS-Vorrichtung. Genauer gesagt wurde eine Probe in Form eines Flüssigkeitstropfens auf einen Probenobjektträger gegeben und auf eine handelsübliche Vorrichtung gestellt (ConfoCor, Carl Zeiss Jena GmbH). Der Flüssigkeitstropfen der Probe wurde mit einem CW Ar⁺-Laserstrahl angeregt, der durch eine Objektivlinse mit 40-facher Vergrößerung ging (C-Apochromat, NA = 1,2). Das resultierende Emissionslicht wurde mit einer Lawinendiode (APD), SPCM-200-PQ (hergestellt von EG & G Co., Ltd.), im Einzelphotonen-Zählmodus in Form eines Fluoreszenzsignals gemessen. Das so gemessene Fluoreszenzsignal wurde analysiert und mit einem Digitalkorrelator, ALV 5000/E (ALV GmbH), ausgewertet. Das Volumen der Probe nahe dem Brennpunktbereich wurde auf Basis des Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 6G bestimmt. Außerdem wurde das Volumenelement unter Verwendung der Fluoreszenzkonzentration und einer Flu-dUTP-Lösung bestimmt.

[0157] Zu diesem Zeitpunkt wurden die mittlere Anzahl von Molekülen und der translationale Diffusionskoeff-

fiziert im Nachweisbereich (10^{-15} l) erhalten. Die nachfolgende Ausführungsform zeigt ein Verfahren zur Identifizierung eines Bluttyps, das die Schritte umfasst: Nachweisen einer zeitabhängigen Veränderung von Daten vor und nach einer spezifischen Reaktion, Konvertieren der Daten und Feststellen der Größe der Moleküle auf Basis der Diffusionsgeschwindigkeit, wie in **Fig. 9** gezeigt.

(1) Blutgruppentest zur Bestimmung des Bluttyps roter Blutzellen

[0158] Ein mit einer fluoreszierenden Substanz wie FITC markiertes Antikörperreagens wurde, wie in **Fig. 13B** gezeigt, in eine Kontrollvertiefung eines Objektglases mit einer Vielzahl von Vertiefungen als Messgefäß dispensiert. Danach erfolgt sofort die Messung. Das Volumen des Messgefäßes kann auf beispielsweise etwa 10 μ l eingestellt werden, was als Volumen für einen FCS-Messbereich ausreicht. Die Kontrollvertiefung und die Messvertiefung sind nicht notwendig voneinander getrennt. Die Messungen vor und nach Zugabe des Reagens können als Kontroll- und Testgruppe betrachtet werden.

[0159] Die Konzentration roter Blutzellen in einer einzusetzenden Probe kann im Vergleich mit der bei einem herkömmlichen Blutgruppentest eingesetzten Konzentration niedrig sein. Die Konzentration roter Blutzellen beträgt beispielsweise 103 bis 104 Zellen/ μ l, besonders bevorzugt 2 bis 5×103 Zellen/ μ l. Wenn diese Ausführungsform für den Test des Bluttyps verwendet wird, kann der Test daher in einem kleineren Blutvolumen durchgeführt werden als ein herkömmlicher Test. Insbesondere kann der Verdünnungsfaktor für Vollblut etwa 0,1 % betragen.

[0160] Als weiteres Reaktionssystem neben dem Reaktionssystem, das in **Fig. 13C** gezeigt ist, kann ein System verwendet werden, wie es in **Fig. 13A** gezeigt ist. Bei dem System von **Fig. 13C** werden ein mit FITC markierter Anti-A-Antikörper und ein mit FITC markierter Anti-B-Antikörper in getrennten Vertiefungen getestet, während bei dem System von **Fig. 13A** ein mit FITC markierter Anti-A-Antikörper und ein mit Cy3 markierter Anti-B-Antikörper in derselben Vertiefung vermischt werden. Die Bestimmung basiert auf der Mobilitätsänderung der als Marker verwendeten fluoreszierenden Substanz. Wenn sich die Mobilität ändert, wird festgestellt, dass der Antikörper mit Blutzellen reagiert hat (positive Reaktion (+)). Wenn sich die Mobilität nicht ändert, wird festgestellt, dass der Antikörper nicht mit Blut reagiert hat (negative Reaktion (-)).

Tabelle 1

	Bluttyp getesteter Blutzellen			
	A	B	0	AB
FITC (Anti-A)	+	-	-	+
Cy 3 (Anti-B)	-	+	-	+

[0161] Entsprechend dem Reaktionsverfahren kann die Messung in nur einem Schritt erfolgen, bei dem ein Antigen und ein Antikörper gemischt werden. Daher benötigt man keine Inkubation und Zentrifugation, wie sie zur Bildung eines Koagulationsmusters erforderlich sind. Da der Messbereich äußerst klein ist, können außerdem die Mengen (Volumina) an Blutzellen und Antikörperreagens, die bei der Reaktion verwendet werden, klein sein. Folglich lassen sich die Reaktionskosten verringern. Außerdem kann die Reaktion zwischen einem einzelnen Antigen und einem einzelnen Antikörper basierend auf der Mobilitätsänderung des fluoreszierenden Moleküls direkt und in einfacher Weise erfasst werden, ohne dass eine feste Oberfläche und ein Koagulationsmuster verwendet werden müssten. Daher ist das Risiko unspezifischer Reaktionen geringer. Daher kann eine quantitative Bestimmung mit einem numerischen Messwert erfolgen. Dies ist ein wichtiges Merkmal bei der Lösung des Problems eines Transfusionstests, nämlich der Bestimmung eines Blut-Subtyps.

[0162] Wie in **Fig. 13A** gezeigt, lassen sich für eine einzige Testprobe außerdem im gleichen Gefäß zahlreiche Einzelheiten bestimmen. Daher ist es möglich, die Messzeit und die Mengen an Testproben und Reagenzien usw. zu verringern.

[0163] Die Probe des Reaktionssystems kann ferner mit geeigneten Mitteln wie Ultraschall gerührt werden.

(2) Reverser Gruppentest zur Bestimmung des Bluttyps roter Blutzellen

[0164] Nach Mischen der Standardblutzellen von Typ A und Typ B und einem zu testenden Serum wird die

Mischung in die Vertiefung gegeben, in die ein fluoreszenzmarkierter Standardantikörper dispensiert wurde. Unmittelbar nach dem Mischen erfolgt sofort die Messung. In diesem Fall erfolgt die Bestimmung hauptsächlich auf Basis einer Konkurrenzreaktion zwischen dem im Testserum vorliegenden, gegen den Bluttyp gerichteten Antikörper und dem Standardantikörper.

[0165] Die Standardblutzellen von Typ A und Typ B und die fluoreszenzmarkierten Standardantikörper vom Anti-A-Typ und vom Anti-B-Typ werden in derselben Vertiefung pro Testprobe vermischt und reagieren gelassen, wobei in gleicher Weise wie bei dem Blutgruppentest verschiedene fluoreszierende Substanzen verwendet werden.

[0166] Die Bestimmung erfolgt basierend auf der Mobilitätsänderung der als Marker dienenden fluoreszierenden Substanz. Wenn sich die Mobilität ändert, wird festgestellt, dass der Antikörper mit Blutzellen reagiert hat (positive Reaktion (+)). Wenn sich die Mobilität nicht ändert, wird festgestellt, dass der Antikörper nicht mit den Blutzellen reagiert hat (negative Reaktion (-)).

Tabelle 2

	Bluttyp getesteter Blutzellen			
	A	B	0	AB
FITC (Anti-A)	-	+	-	+
Cy 3 (Anti-B)	+	-	-	+

(3) Screeningtest auf irreguläre Antikörper

[0167] Zur Durchführung des Screeningtests auf irreguläre Antikörper gegen rote Blutzellen wird zuerst ein fluoreszenzmarkiertes Anti-Humanglobulin-Serum, das als sekundärer Antikörper dient, in eine Reaktionsvertiefung dispensiert. Anschließend werden die Standardblutzellen, d. h. zwei oder drei Typen normaler humaner Blutzellen vom Typ 0 (die genügend Antigene zur Bestimmung klinisch wichtiger Antikörper enthalten), in üblicher Weise mit dem zu testenden Serum gemischt. Unmittelbar nach dem Mischen wird die resultierende Mischung in Reaktionsvertiefungen dispensiert und dem Nachweisverfahren unterzogen.

[0168] Das fluoreszenzmarkierte Serum kann an andere Globuline als die in das Testserum freigesetzten irregulären Antikörper gebunden sein, wodurch sich die Mobilität der fluoreszierenden Substanz ändert. Wenn ein irregulärer, an die Standardblutzellen gebundener Antikörper vorhanden ist, ändert sich die Mobilität der fluoreszierenden Substanz jedoch deutlicher als im obigen Fall. Folglich lässt sich das Vorliegen irregulärer Antikörper leicht feststellen.

(4) Anwendung

[0169] Die obigen Ausführungsformen lassen sich verwenden, wenn nach dem Screenen ein Antikörper identifiziert wird. In diesem Fall wird der Antikörper identifiziert, indem man Testblutzellen zur Antikörperidentifizierung verwendet, wobei klinisch bedeutsame Antigene als Testgruppe eingeteilt sind. Genauer gesagt wird der Antikörper identifiziert, indem man in getrennten Vertiefungen mit den Testblutzellen reagieren lässt und sein Reaktionsmuster analysiert.

[0170] Bei der Reaktion mit den Standardblutzellen können die Standardblutzellen außerdem gegebenenfalls in einem Reaktionsgefäß immobilisiert sein. Alternativ kann man ein Reaktionsgefäß mit einer Partitionierung verwenden, die verhindert, dass sich Blutzellen in das Mikrosichtfeld bewegen. Mit diesem Aufbau lässt sich der Hintergrund minimieren.

[0171] Der gesamte Inhalt der hier zitierten Druckschriften bildet vollinhaltlich Bestandteil der vorliegenden Beschreibung.

[0172] Weitere Vorteile und Modifikationen ergeben sich für den Fachmann auf einfache Weise. Daher ist die Erfindung in ihren breiteren Aspekten nicht auf die gezeigten und hier beschriebenen speziellen Einzelheiten und repräsentativen Ausführungsformen beschränkt. Daher lassen sich verschiedene Modifikationen durch-

führen, ohne von Geist und Umfang der allgemeinen Erfindungsidee, wie sie durch die anhängenden Ansprüche und ihre Äquivalente definiert wird, abzuweichen.

Gewerbliche Anwendbarkeit

[0173] Die vorliegende Erfindung eignet sich zum Test krankheitsbezogener Gene für klinische Behandlungen wie Genbehandlung und Diagnose, zum Test von Polymorphismen bei der Bluttransfusion und bei der Organtransplantation. Die vorliegende Erfindung eignet sich ferner zur Grundlagenforschung an Polymorphismen und krankheitsbezogenen Genen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Polymorphismusortes, umfassend:

- (1) Umsetzen, im gleichen Reaktionsgefäß, einer Testprobe, die einen Polymorphismusort enthält, mit einer Vielzahl von Sondentypen, die einer Vielzahl von zu identifizierenden Typen des Polymorphismusortes dieser Testprobe entsprechen, wobei diese Sonden mit einer hohen Affinität an die Vielzahl von Typen des Polymorphismusortes binden und so mit Markersubstanzen markiert sind, dass sie sich optisch voneinander unterscheiden; und
- (2) optisches Messen und Analysieren einer Positionsänderung der Markersubstanzen durch Mikrobewegung zu einer Vielzahl von Zeitpunkten im Verlauf der Reaktion und dadurch Nachweisen der Typen von Polymorphismusorten der Testprobe.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Testprobe ein Testproben-DNA-Fragment ist, das eine Sequenz eines Polymorphismusortes enthält, wobei die Testprobe zum Hybridisieren mit einer Vielzahl von DNA-Sondentypen umgesetzt wird, die jeweils Sequenzen besitzen, die zu einer Vielzahl von zu identifizierenden und in dem Testproben-DNA-Fragment enthaltenen Polymorphismussequenzen komplementär sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Markersubstanzen der Vielzahl von DNA-Sondentypen jeweils an das Nukleotid gebunden sind, das den Polymorphismusorten entspricht, und wobei man vor Messen und Analysieren einer Positionsänderung der Markersubstanzen eine Nukleinsäuresynthetase mit einer Reparaturfunktion mit einem erhaltenen hybridisierten Produkt reagieren lässt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Nukleinsäuresynthetase ein Enzym mit einer Exonukleaseaktivität ist.

5. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Polymorphismusort ein Einzelnukleotidpolymorphismus ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Testprobe ein Polynukleotid enthält, das einen Polymorphismusort mit einer Polymorphismussequenz enthält, die ausgewählt ist aus PS_1 bis PS_n , und die Vielzahl von Sondentypen DNA-Sonden PR_1 bis PR_n sind, die Nukleotidsequenzen enthalten, die zu den jeweiligen Polymorphismussequenzen PS_1 bis PS_n komplementär sind, und wobei die Positionsänderung der Markersubstanz in einem Mikroraum von 10^{-21} bis 10^{-3} L gemessen wird, um festzustellen, welche der DNA-Sonden PR_1 bis PR_n an das Polynukleotid bindet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Polynukleotid ein Gen für ein humanes Histokompatibilitätsantigen ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Vielzahl von Sondentypen eine Vielzahl von Antikörpern ist, die jeweils für ein Vielzahl von in der Testprobe enthaltenen Antigenen spezifisch sind, wobei die Markersubstanzen fluoreszierende Substanzen sind.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Polymorphismusort von einem Protein gebildet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Testprobe rote Blutzellen sind und das Antigen ein Oberflächenantigen von roten Blutzellen ist.

11. Verfahren zum Nachweis eines Polymorphismusortes, umfassend:

- (1) Einbringen einer Testprobe, einer Vielzahl von Antigentypen, die jeweils für eine Vielzahl von in der Testprobe enthaltenen zu identifizierenden Antikörpern spezifisch sind, und einer Vielzahl von Antikörpern, die mit

den zu identifizierenden Antikörpern um die Antigene konkurrieren und die so mit Markersubstanzen markiert sind, dass sie sich optisch voneinander unterscheiden; und

(2) optisches Messen und Analysieren einer Positionsänderung der Markersubstanzen durch Mikrobewegung zu einer Vielzahl von Zeitpunkten im Verlauf der Reaktion und dadurch Nachweisen des Polymorphismusortes.

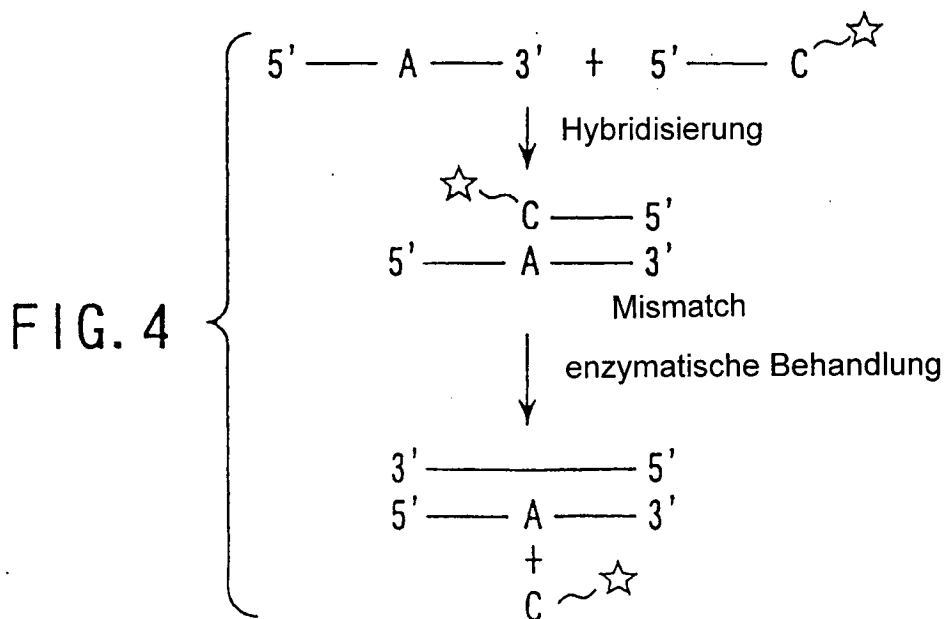
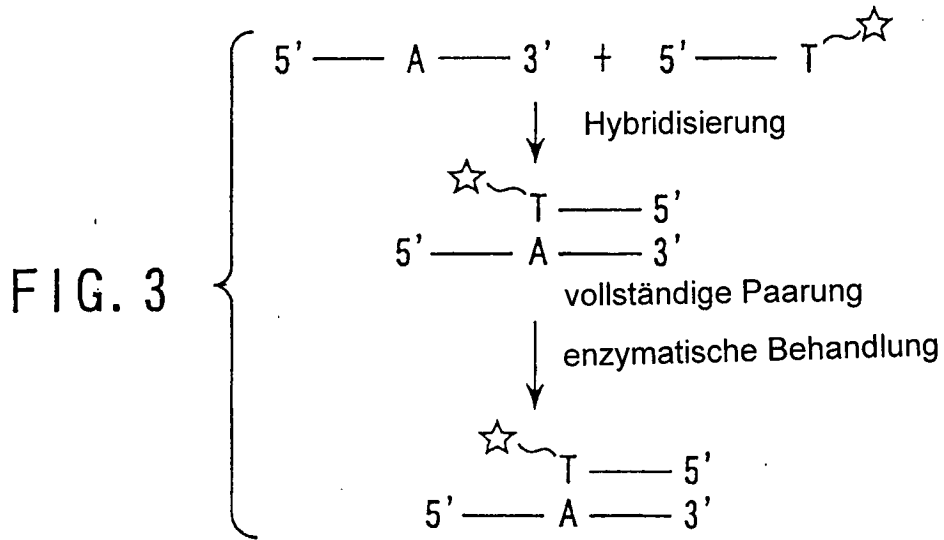
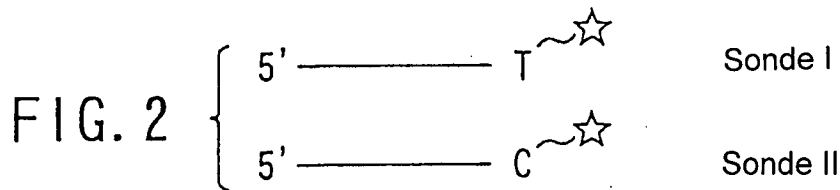
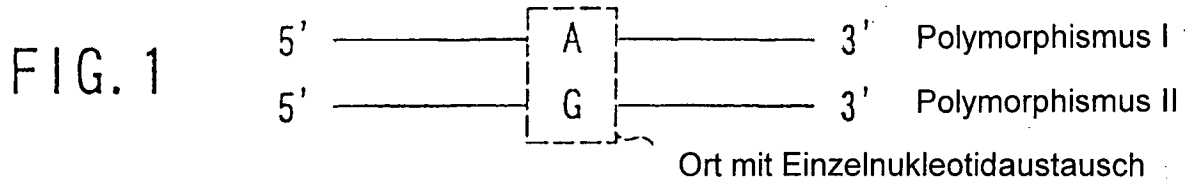
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Testprobe eine Körperflüssigkeit ist, die aus einem Organismus stammt.

13. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, 8 and 11, wobei die Markersubstanzen fluoreszierende Substanzen sind, der Nachweis mit einem konfokalen Mikroskop erfolgt und die Analyse mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie erfolgt.

14. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die optische Bestimmung die Messung der Fluktuation der Markersubstanzen beinhaltet.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



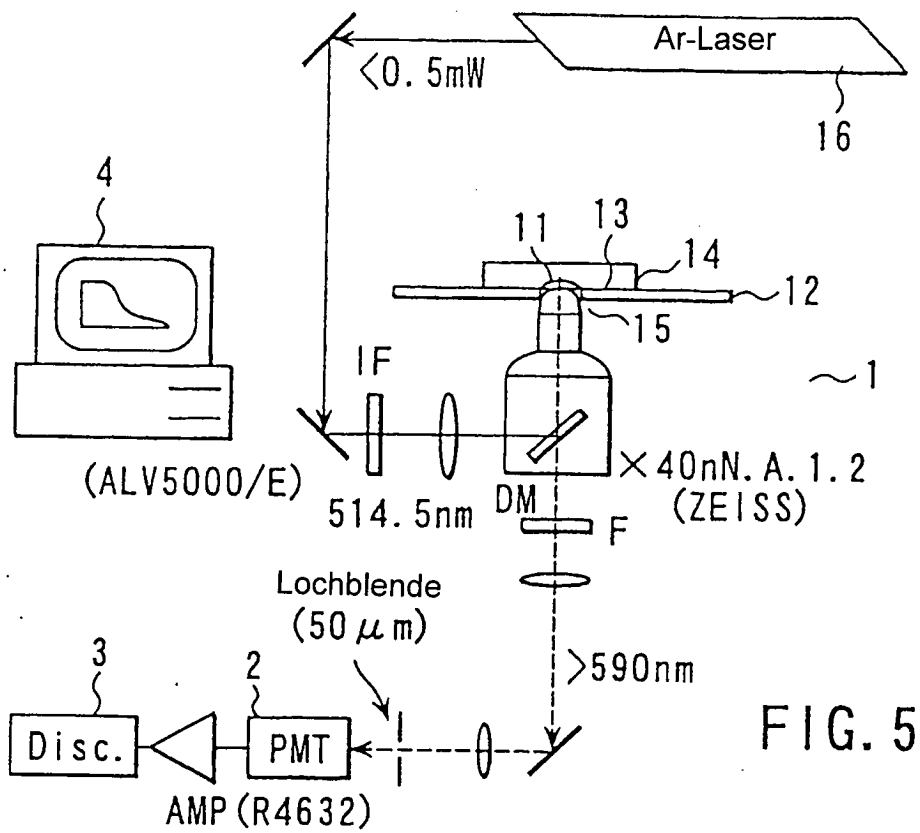


FIG. 5

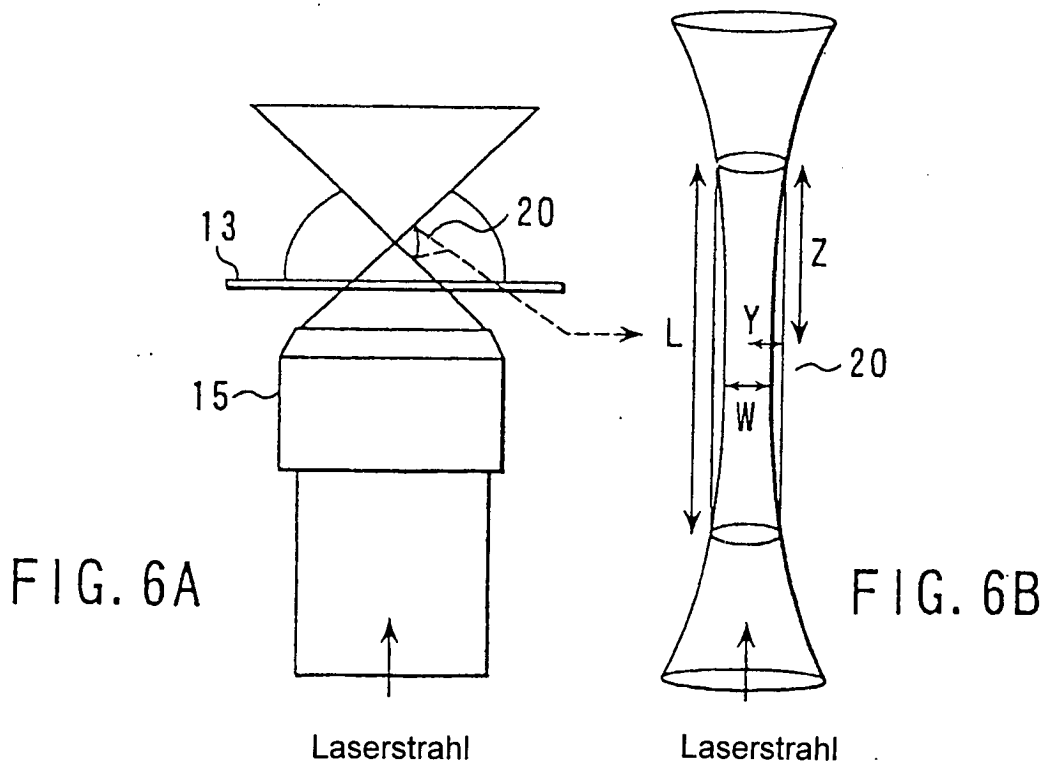


FIG. 6A

FIG. 6B

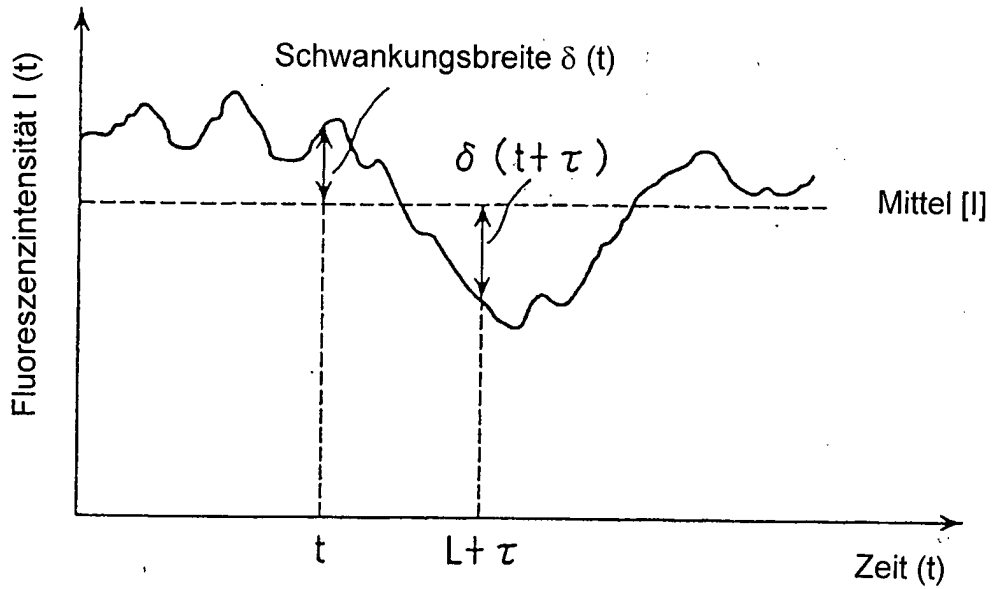


FIG. 7

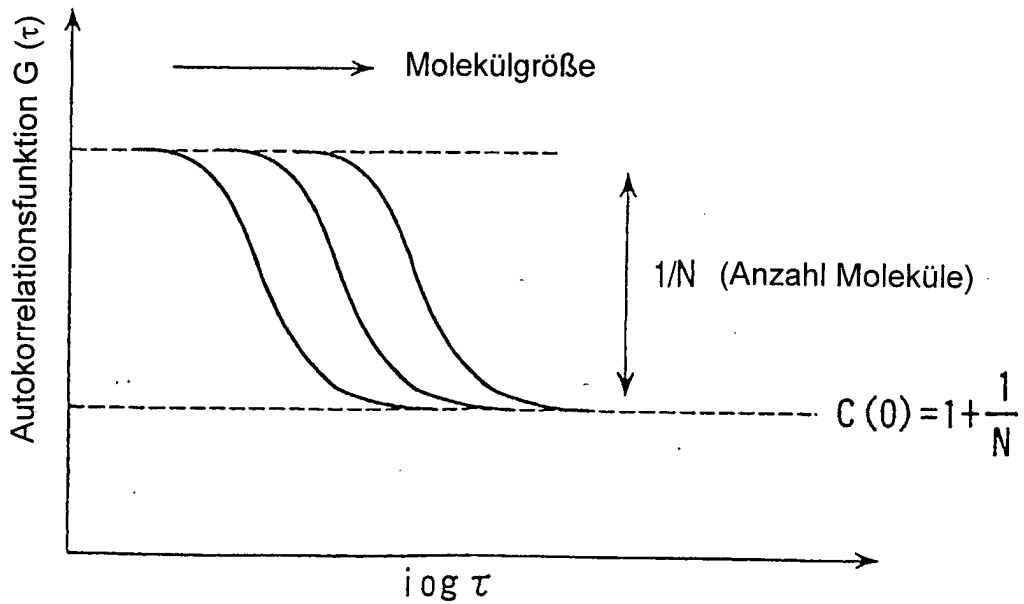


FIG. 8

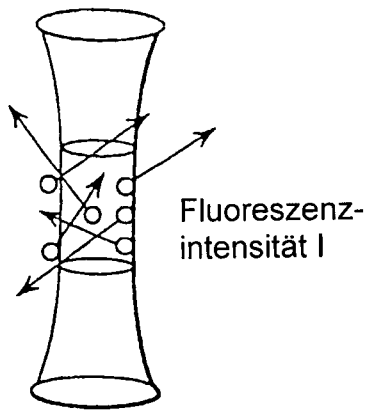
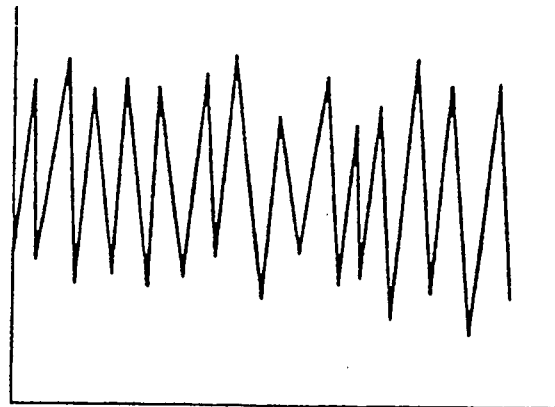


FIG. 9A



Zeit (t)

FIG. 9B

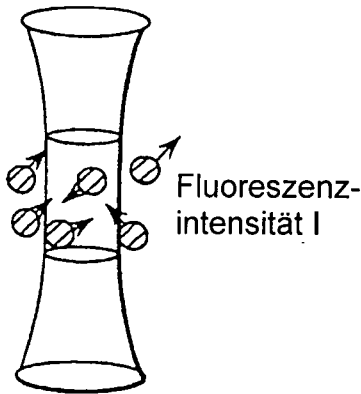
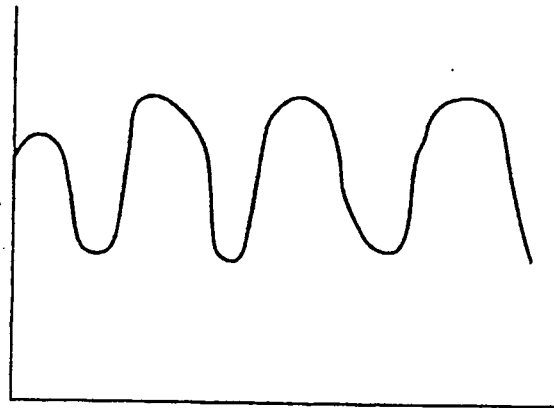


FIG. 9C



Zeit (t)

FIG. 9D

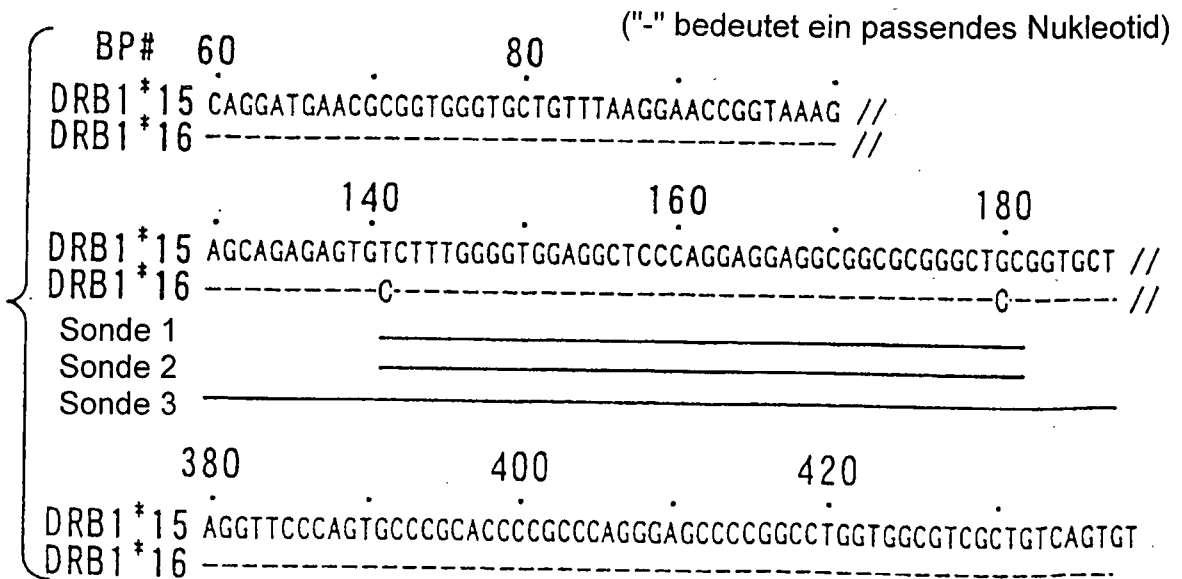


FIG. 10

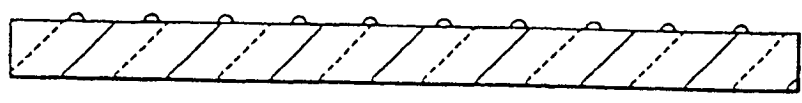
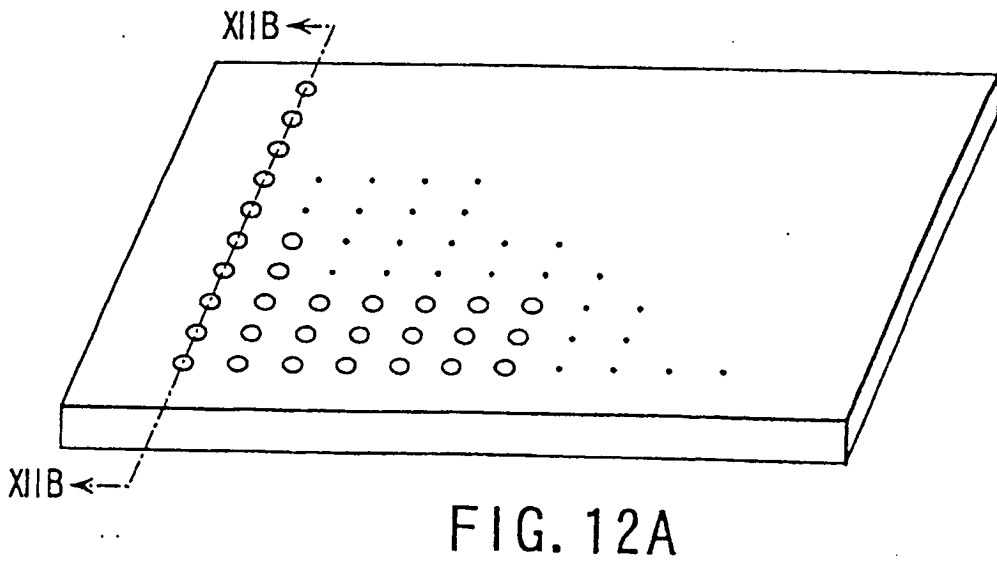
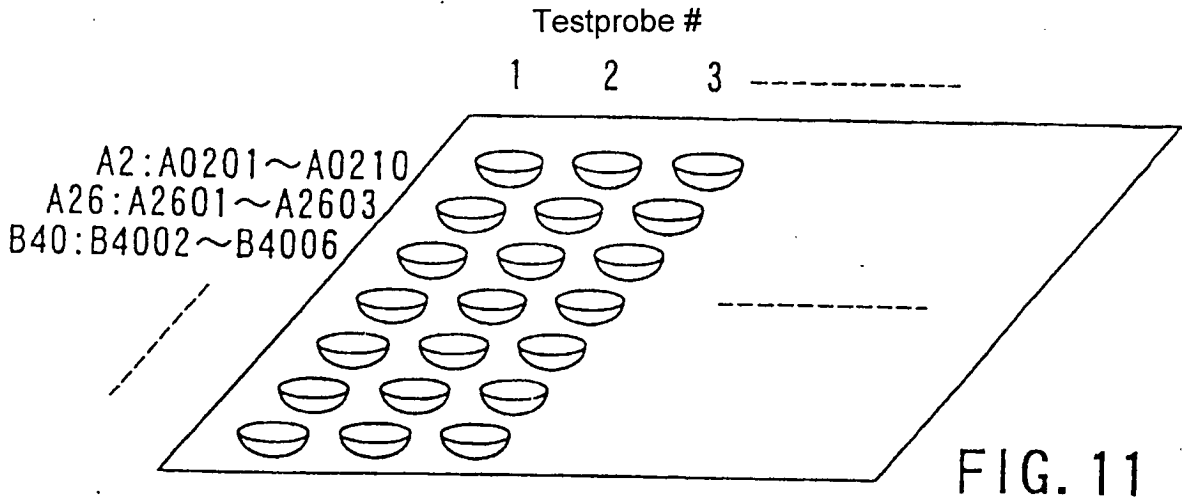


FIG. 12B

FIG. 13A

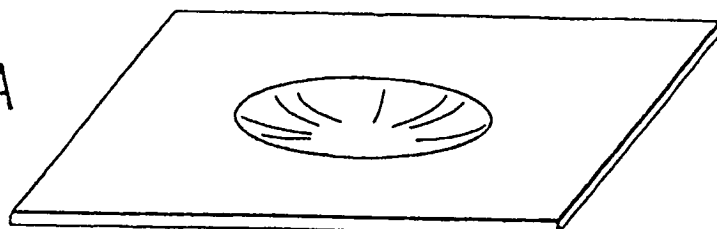


FIG. 13B

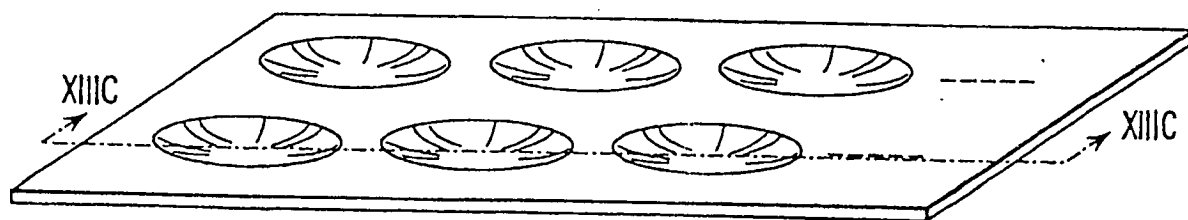
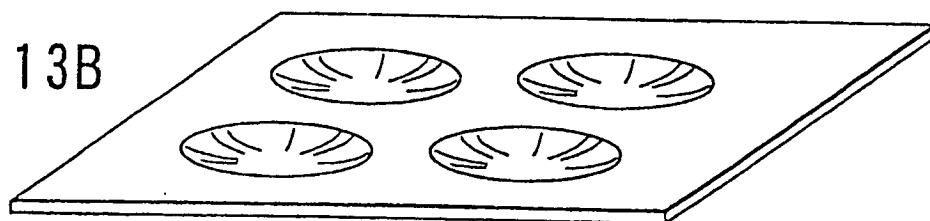


FIG. 13C



FIG. 13D