

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501667

(P2004-501667A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	2 G O 4 7
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	2 G O 5 9
G O 1 N 21/47	G O 1 N 21/47	4 B O 2 9
G O 1 N 29/20	G O 1 N 29/20	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	
	5 O 1	
	M	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 137 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-507054 (P2002-507054)	(71) 出願人	301059639
(86) (22) 出願日	平成13年7月2日 (2001.7.2)		クロンディアグ チップ テヒノロギーズ
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月6日 (2003.1.6)		ゲーエムペーハー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/007575		ドイツ連邦共和国 07743 イエナ
(87) 国際公開番号	W02002/002810		ロープシュテッター シュトラーセ 10
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		5
(31) 優先権主張番号	100 33 334.6	(74) 代理人	100068755
(32) 優先日	平成12年7月1日 (2000.7.1)		弁理士 恩田 博宣
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100105957
			弁理士 恩田 誠
		(72) 発明者	ビッケル、ラルフ
			ドイツ連邦共和国 07743 イエナ
			アム キースヒュゲル 37
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プローブ・アレイ上での分子相互作用の定性的および/または定量的検出方法

(57) 【要約】

本発明は、プローブ・アレイを利用して一定の分子ターゲットを定性的および/または定量的に検出する方法に関する。本発明の検出方法は、特定の溶解度積を有する生成物をもたらす反応を含む。溶解度積は、プローブとターゲットとの相互作用が起こったプローブ・アレイのアレイ要素上に、生成物の沈殿または沈殿物形成を引き起こす。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 所定の部位に固定されたプローブを有するプローブ・アレイの作成；
- b) プローブ・アレイ上に配置されたプローブとターゲットとの相互作用；
- c) 相互作用が起こったアレイ要素における沈殿形成をもたらす反応の遂行；
- d) アレイ要素上における沈殿形成の時間経過の信号強度としての検出；
- e) 沈殿形成を時間の関数として描く曲線関数に基づく、実質的信号強度の決定から成る、プローブ・アレイ上でのプローブとターゲットとの分子相互作用による試料中のターゲットの定性的および/または定量的検出方法。

【請求項 2】

沈殿形成を時間の関数として描く回帰線の傾きに依存してアレイ要素の実質的信号強度を決定することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アレイ要素上における沈殿形成の時間経過が指数関数的増加を示す領域において回帰線を決定することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

所定の時点で検出された信号強度、好ましくは最後の測定での信号強度に、そのアレイ要素について決定された回帰線の傾きとその所定時点までの測定時間を乗じることにより、アレイ要素の実質的信号強度を決定することを特徴とする請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

プローブ・アレイ中の少なくとも 1 つのプローブと相互作用する基準ターゲットが試料中に既知濃度で存在することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

アレイ要素上の沈殿形成を検出する信号強度を少なくとも 1 分ごと、好ましくは 30 秒ごと、より好ましくは 10 秒ごとに記録することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

アレイ要素上の沈殿形成をもたらす反応が、ターゲットに結合する触媒の存在下に可溶性基質を不溶性生成物に転換するものであることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

触媒が酵素であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

酵素が、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびグルコースオキシダーゼからなる群より選択されることを特徴とする請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

可溶性基質が、3,3'-ジアミノベンジジン、4-クロロ-1-ナフトール、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、p-フェニレンジアミン-HCl/ピロカテコール、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、ナフトール/ピロニン、ブロムクロルインドールホスフェート、ニトロテトラゾリウムブルーおよびフェナジンメトスルフェートからなる群より選択されることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

アレイ要素上の沈殿形成をもたらす反応が、可溶性基質を金属析出物に転換するものであることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

アレイ要素上の沈殿形成をもたらす反応が、銀化合物、好ましくは硝酸銀、乳酸銀、酢酸銀または酒石酸銀、を銀に転換する化学的な還元反応であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

還元剤が、ホルムアルデヒドおよびヒドロキノンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

可溶性基質の金属析出物への転換が、ターゲットに結合した金属クラスタまたはコロイド状金属粒子の存在下に起こることを特徴とする請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

可溶性基質の金属析出物への転換が、金クラスタまたはコロイド状金粒子の存在下に起こることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

可溶性基質の金属析出物への転換が、ターゲットに結合したポリアニオンの存在下に起こることを特徴とする請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

触媒もしくはコロイド状金属粒子またはポリアニオンが、プローブとの相互作用の前、その間、または前後にターゲットに結合することを特徴とする請求項 7 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

酵素、金クラスタ、コロイド状金属粒子またはポリアニオンが、直接またはターゲットに結合するアンカー分子を介してターゲットに結合することを特徴とする請求項 7 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 19】

アンカー分子が、ストレプトアビジンまたは抗体からなる群より選択されることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

アレイ要素上に沈殿形成をもたらす反応が、ターゲットと結合するアンカー分子に対する特異的結合パートナーの結合であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

結合パートナー - アンカー分子対が、ビオチン / アビジンまたはストレプトアビジンもしくは抗ビオチン抗体、ジゴキシゲニン / 抗ジゴキシゲニン免疫グロブリン、FITC / 抗FITC免疫グロブリンおよびDNP / 抗DNP免疫グロブリンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

ターゲットが直接に標識を施されることを特徴とする請求項 1 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

ターゲットの標識化を、ターゲットと標識された化合物の両方と相互作用するプローブを用いたサンドウィッチ反応またはサンドウィッチ・ハイブリダイゼーションによって行うことを特徴とする請求項 1 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 24】

ターゲットの標識化を、ホモポリマーヌクレオチド配列をターゲットに付加して連続配列を形成した後、このホモポリマーヌクレオチド配列と相補的な標識オリゴヌクレオチドとのサンドウィッチ・ハイブリダイゼーションによって行うことを特徴とする請求項 1 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

ターゲットとプローブとの相互作用が、2つのヌクレオチド配列間のハイブリダイゼーションであることを特徴とする請求項 1 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

ターゲットとプローブとの相互作用が、抗原構造と対応する抗体またはその超可変領域と

50

の相互作用であることを特徴とする請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 7】

ターゲットとプローブとの相互作用が、受容体と対応するリガンド間の反応であることを特徴とする請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 8】

アレイ要素上の沈殿の存在の検出を、光ビーム、好ましくはレーザ・ビームまたは発光ダイオードの反射、吸収または散乱により行うことを特徴とする請求項 1 ~ 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】

アレイ要素上の沈殿の存在の検出を電氣的に行うことを特徴とする請求項 1 ~ 2 7 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 3 0】

電氣的検出を導電率、容量または電位の測定によって行うことを特徴とする請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

アレイ要素上の沈殿の存在をオートラジオグラフィ、フルオログラフィおよび/または間接的オートラジオグラフィにより検出することを特徴とする請求項 1 ~ 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 2】

アレイ要素上の沈殿の存在を、走査型電子顕微鏡法、電子プローブ・マイクロアナリシス (E P M A)、磁気光学カー (K e r r) 顕微鏡法、磁気力顕微鏡法 (M F M)、原子間力顕微鏡法 (A F M)、圧気楼効果測定法、走査型トンネル顕微鏡法 (S T M) および/または超音波反射断層撮影法により検出することを特徴とする請求項 1 ~ 2 7 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 3 3】

・アレイ要素上での沈殿形成の時間経過をカメラでの写真撮影によって検出するステップ、
 ・画像に含まれるアナログ情報をデジタル形式に変換するステップ、
 ・各アレイ要素について、沈殿形成を時間の関数として描く曲線関数に基づいて実質的信号強度を計算するステップ、および
 ・実質的信号強度を変換して、すべてのアレイ要素の実質的信号強度を表わす人工的な画像とするステップ
 から成る請求項 1 ~ 3 2 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 3 4】

a) プローブ・アレイを備えたアレイ基板、
 b) 反応チャンバ、
 c) ターゲットとプローブとの間の相互作用が起こったアレイ要素上での沈殿形成を検出する装置、および
 d) 以下のようにプログラムされたコンピュータ
 ・検出装置によって記録された信号強度を集める 40
 ・連続的に記録された信号強度を処理し、アレイ要素上の沈殿形成の時間経過の決定、および沈殿形成を時間の関数として描く曲線関数に基づく実質的信号強度決定を保証する
 ・必要であれば、実質的信号強度のアナログ写真への変換を保証する
 から成る請求項 1 ~ 3 3 に記載の方法を実行するための装置。

【請求項 3 5】

検出装置がカメラであることを特徴とする請求項 3 4 に記載の装置。

【請求項 3 6】

カメラが CCD または CMOS カメラであることを特徴とする請求項 3 5 に記載の装置。

【請求項 3 7】

装置が光源を含むことを特徴とする請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれかに記載の装置。 50

【請求項38】

光源がレーザ、発光ダイオード(LED)および高圧ランプからなる群より選択されることを特徴とする請求項37に記載の装置。

【請求項39】

高度に統合された自律的装置であることを特徴とする請求項24～38のいずれかに記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、プローブ・アレイを利用して所定の分子ターゲットを定性的および/または定量的に検出するための装置および方法に関する。

10

【0002】

生物医学的試験は、多くの場合、特定の位置に存在する既知量の分子(分子プローブ)と検出対象である分子(分子ターゲット)との分子相互作用の検出に基づいている。現行の試験は、通常、1つの試料についていくつかのプローブを併用して行われる(D. J. ロッカー(D. J. Lockhart)、E. A. ウィンツラー(E. A. Winzler); Genomics, gene expression and DNA arrays; Nature (2000)、第405巻、827～836頁)。従来技術では、この際に、WO00/12575に記載されているように、プローブが所定の方法で適当な基質上に固定されるか(例えば、米国特許第5,412,087号、WO98/36827参照)、合成によって作成される(例えば、米国特許第5,143,854号、米国特許第5,658,734号、WO90/03382参照)。

20

【0003】

この種の相互作用は、通常、以下のようにして検出される。所定の基質に1または複数のプローブを所定の方法で付着させる。ターゲット溶液をプローブと接触させ、所定の条件下でインキュベートする。インキュベートした結果、プローブとターゲットとの間で特異的相互作用が発展する。この結果生じた結合は、プローブに対して特異的ではない分子との結合に比べ、明らかに安定性が強い。次いで、この系を適当な溶媒で洗い、特異的に結合していない分子を除去する。

【0004】

現在、ターゲットとプローブとの間の相互作用を検出するために多くの方法が用いられている。これらの方法のうちいくつかについて以下に述べる。

30

E. リデル(E. Lidell)およびI. ウィークス(I. Weeks)、Antibody Technology、BIOS Scientific Publisher Limited (1995)は、ターゲットを染料または蛍光染料で標識し、これをそれぞれ光度計または蛍光光度計を用いて検出する。

【0005】

また、F. ロッツペイヒ(F. Lotzspeich)、H. ゴルバス(H. Zorbass)、Bioanalytik、Spektrum Akademischer Verlag、Heidelberg、Berlin (1998)は、予め蛍光マーカで標識したターゲットの蛍光を光学的に検出することについて記載している。

40

【0006】

Nature Biotechnology (1998)、第16巻、725～727頁には、ターゲット-プローブ共役体の質量分光分析による検出が記載されている。表面プラズマ共鳴などの質量感受的方法も用いられる(J. M. ブロックマン(J. M. Brockman)ら、A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA interactions with surface plasmon resonance imaging、J. Am. Chem. Soc. (1999)、第121巻、8044～8051頁)。米国特許第5,605,662号は、相互作用の直接的な電氣的検

50

出方法を開示している。ドイツ特許公報 1 9 5 4 3 2 3 2 号には、検出用ビーズを用いてターゲットを標識することが記載されている。この方法では、ターゲットとプローブとの間で相互作用させた後、その存在を光学的に検出する。

【0007】

欧州特許公報 0 0 6 3 8 1 0 号は、抗原または免疫グロブリンの形式のターゲットを多孔質固体基質に固定する方法を開示している。次いで、慣用の免疫学的手法、特に E L I S A 法により、その同定と定量が検討される。

【0008】

プローブ・アレイを用いて分子相互作用を検出する様々な手法が記載されている。古典的なシステムは、ターゲット分子を蛍光発色団で標識し、次いで、特定の波長でターゲット分子を選択的に励起し、その蛍光強度を比較することに基づくものである。光学的な構成や成分の異なる様々な技術的解決策がこのために実現可能である。こうしたアプローチの問題点や限界は、信号ノイズ(バックグラウンド)に起因する。これは、おおまかに言えば、用いる染料の増白や消光、媒体、アセンブリ要素および光学部品の自己蛍光、ならびに光学システム内での散乱、反射光や外部光などの効果によって生ずるものである。

10

【0009】

この結果、プローブ・アレイの定性的および定量的比較のための高感度蛍光検出器のアセンブリでは技術的要求が高度のものとなる。また、中間体のスクリーニングや高スループットを実現するためには、ある程度の自動化が要求されるため、特別なシステムが必要である。

20

【0010】

標準的な 蛍光アセンブリを最適化するものとして、CCD型検出器が知られている。これは、入射光および透過光による暗視野での蛍光発色団の励起を、散乱や反射などの光学的影響から識別することができる(例えば、C. E. フーパー(C. E. Hooper)ら、「Quantitative Photon Imaging in the Life Sciences Using Intensified CCD Cameras」、Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence(1990)、337~344頁参照)。次いで高解像度光学システムを用いて、照明またはスクリーニング下に検定結果のマッピングを行う。多重スペクトル光源を使用すれば、励起フィルタを種々組み合わせるにより、様々な蛍光発色団が比較的簡単に利用できるようになる。しかし、自己蛍光や照明の不均一などの全体的な光学的影響のため、複雑な照明光学システムやフィルタシステムが必要となるという問題点がある。

30

【0011】

例えば、米国特許第 5, 3 0 4, 8 1 0 号に記載された共焦点走査システムは、2つのピンホールを用いて光軸上で蛍光信号を選別することに基づくものである。この場合、試料の調整が困難になるか強力な自動焦点システムが必要となる。こうしたシステムの技術的解決策は非常に複雑である。レーザやピンホール、あるいは冷却した検出器(例えば、PMT、アヴァランシュ・ダイオード、CCD)などの必要な部品を、複雑で高度に正確な機械的伝導要素や光学システムと組み合わせる最適な状態に組み立てなければならず、大変な努力が必要となる(例えば、米国特許第 5, 4 5 9, 3 2 5 号; 米国特許第 5, 1 9 2, 9 8 0 号; 米国特許第 5, 8 3 4, 7 5 8 号参照)。部品点数が多さやその機能から、小型化や価格の程度には限界がある。

40

【0012】

現状では、プローブ・アレイによる分析は、通常、蛍光の光学的測定による(A. マーシャル(A. Marshall)およびJ. ホジソン(J. Hodgson)、DNA Chips: An array of possibilities、Nature Biotechnology、第16巻(1998)、27~31頁; G. ラムジー(G. Ramsay)、DNA Chips: State of the Art、Nature Biotechnology(1998年1月16日)、40~44頁参照)。信号バ

50

ックグラウンドの高さがこの方法の欠点であり、正確さにも限界がある。技術的要求が高い場合が多く、検出方法のコストが高くつくこともさらなる欠点である。

【0013】

したがって、プローブとターゲットとの相互作用を、定性的および/または定量的に、かつ低い技術的コストで、極めて正確に測定し得る高度に組み立てられたアレイが必要である。

【0014】

選択性が増し代替部品の利用が可能となれば、従来に代わる画像化技術、例えば、蛍光偏光法や固相结合検定のための時間分解蛍光法を確立するための動機付けともなる。しかし、こうした解決策は、特に高度に組み立てられた分析に対しては、現状ではアイデア段階である。偏光により励起された蛍光発色団による偏光軸回転効果はマイクロタイター形式での定量に用いられている。また、高スループットなシステム(HTS-systeme)を適当に修飾された高分子フィルムを偏光フィルタとして用いることにより、廉価に組み立てる試みもなされている(I. Gryczcynski)ら、「Polarisation sensing with visual detection」、Anal. Chem. (1999)、第71巻、1241~1251頁参照)。しかし、利用可能な光強度と検出器の点で、マイクロアッセイへの適用は困難である。このタイプのシステムでは、光源(例えば、レーザ、LED、高圧ランプ)、偏光フィルタ(おそらくはコーティングした高分子フィルム)および検出器(CCD、CMOS-カメラ)を統合する必要があり、解決策は目下わかっていない。

10

20

【0015】

最近の展開としては、ランタニド(M. Kwiatowski)ら、Solid-phase synthesis of chelate-labeled oligonucleotides: application in triple-colour ligase-mediated gene analysis、Nucleic Acids Research (1994)、第22巻、13頁)や量子ドット(M. P. Bruchez)ら、Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels、Science (1998)、第281巻、2013頁)などの無機材料の蛍光を用いるものがある。蛍光の持続時間がナノ秒域の特異的蛍光を利用して選択的定量を行うことも考えられており、部位レベルでの解像度を有する特異性が実現できるが、非常にコストが高く、商業レベルでは用いられていない。ゲル化ランタニドなどの、発光持続時間がマイクロ秒域の染料は、染料を可動相に転換する必要があり、部位特異的な検出ができない。

30

【0016】

微粒子はブラウン管での使用でなじみ深いものであり(F. van de Rijke)ら、Up-Converting Phosphors: A New Reporter Technology for Nucleic Acid Microarrays、European EC Meeting on Cytogenetics (2000、イタリア、パリーにて開催)参照)、生物学的マーカとしての使用は、検出技術において、感度および小型化の点、特に励起光源がデータ伝送に使用されるものである(980nmレーザ・ダイオード)ことから、大きな潜在的可能性を有している。しかし、こうした技術は、アレイでターゲット/プローブ相互作用を検出するためのものとしては商業的に利用可能なものではない。検出器は、発光用部品(例えば、レーザ、LED、高圧ランプ)、励起および検出光の変調システム(例えば、チョッパ・ブレード、電子シャッタ)ならびに時間遅延信号の検出システム(例えば、CCD-、CMOS-カメラ)を含むであろう。しかし、粒子と生体試料との間の適合性が低いと考えられる点に基本的問題がある。

40

【0017】

プローブ・アレイを使用する場合に対し、ターゲットを固定したアレイを使用した場合は

50

、既知の複数のプローブを1バッチで組合せ可能とするために、調べようとする物質を付けたアレイを分析を行う度に製造しなければならないという根本的問題がある。それゆえ、頻りにアレイを作成する必要があるため、これを診断用途には用いるには大きな限界がある。そうした物質は生体起源であるため、バッチごとに差ができるのは避けられない。多孔質基質を用いた場合は、塗布する液体が横方向に広がり得るため、製造されるアレイで実現できる最大解像度に限界がある。現状の定着技術では、多孔質材料上の個々の要素を200 μm より小さくすることはほとんど不可能である。

【0018】

したがって、本発明の目的は、上記の従来技術の問題点、特に検出システムの複雑な構造、高い信号バックグラウンド、特に信号の増白や検定対象物と試験システムとの整合性が適切でないことによる問題点を解消することを目的とする。

10

【0019】

特に、本発明の目的は、プローブ・アレイ上のプローブ・ターゲット間の分子相互作用を高精度で、簡単かつ廉価に定性的および/または定量的に検出可能とする方法および装置を提供することにある。

【0020】

さらに本発明の目的は、プローブ・ターゲット間の弱い相互作用を強い信号強度で信頼性をもって検出し得るように、検出についての高い動的分解能を実現することにある。

【0021】

本発明のこうした目的あるいは他の目的は、請求の範囲に記載された特徴を有する実施形態により達成される。

20

驚くべきことに、プローブ分子(以下、プローブという)とターゲット分子(以下、ターゲットという)との分子相互作用が、プローブ・アレイ上で、単純かつ廉価な方法によって高精度に検出し得ることが見出された。本発明の方法による検出は、所与の溶解度を有する生成物をもたらす反応を用いて、プローブ・ターゲット間相互作用が起こったプローブ・アレイのアレイ要素上に生成物を沈殿させることにより行われる。

【0022】

好ましくは、結合したターゲットには、プローブ・ターゲット間相互作用が起こるアレイ要素上への低溶解度沈殿物を形成する可溶性基質の反応を触媒するか、可溶性基質を転換してプローブ・ターゲット間相互作用が起こるアレイ要素上の低溶解度沈殿物とする結晶核として機能する標識を施す。

30

【0023】

このようにして、非多孔質担体上のプローブ・アレイを用いることにより、多くのプローブ・ターゲット間相互作用の定性的および定量的分析を同時に行うことができる。この際、プローブサイズは1000 μm 以下、好ましくは100 μm 以下、特に好ましくは50 μm 以下を達成することができる。

【0024】

酵素標識の使用が、免疫細胞化学および免疫学的マイクロタイター・プレートを用いた試験(E.リデル(E. Lidell)およびI.ウィークス(I. Weeks)、Antibody Technology、BIOS Scientific Publishers Limited(1995)参照)で知られている。例えば、酵素は、基質を、通常、着色物質である低溶解度生成物への転換を触媒することができる。アレイでの分子相互作用を検出する別の方法としては、金属標識を用いる方法があり得る。その場合、コロイド状の金または所定の金クラスターを、任意選択でストレプトアビジンなどの中間分子を介して、ターゲットに結合する。次いで、銀などのより活性な金属を用いた後続する反応により、生成物を増強する。

40

【0025】

本発明の方法に従い、沈殿の検出を行うことにより、プローブ・アレイに結合したターゲットの濃度を相対的に定量する。その方法は、ターゲットに結合した標識の濃度を検出することから成り、ここで標識は、プローブ・ターゲット間相互作用が起こるアレイ要素上

50

への低溶解度沈殿物を形成する可溶性基質の反応を触媒するか、この種の反応の結晶核として機能する。例えば、ナノ金粒子で標識したHPLC精製オリゴヌクレオチドの場合、結合ターゲットと金粒子との比は1：1である。本発明の他の実施形態では、この比は1を超える値でもよいし小数でもよい。

【0026】

ターゲットと結合したマーカまたは標識の濃度 ($c(L)$) はアレイ要素上の沈殿の濃度 ($c(P)$) と以下の関係にある：

$$c(L) = [F \cdot c(P)] / t$$

式中、Fは沈殿形成反応の時間経過を特徴付ける曲線の関数であり、tは時間である。

【0027】

Fは反応の時間経過から測定できる。時間経過が線形的 (Fが定数) な場合、形成される沈殿と結合した標識の濃度との関係は一義的な対応関係にあり、この場合、 $c(P)/t$ は $c(L)$ 、したがって標識されたターゲットの濃度の測定に対応する。したがって、沈殿形成反応の時間経過が既知の場合にのみ、対応するアレイ要素に結合したターゲットの濃度を一義的に相対的に決めることができる。

10

【0028】

従来法では、ターゲットがアレイ上に配置されたプローブと相互作用した後でかつ相互作用が起こるアレイ要素上の沈殿形成に至る反応の開始後、一定時間経過した時点で、写真撮影するか画像を取り、測定されたグレー値 (沈殿の形成程度に依存して決まる) に濃度を割り当てる。しかし、この方法は各アレイ要素について非常に狭い濃度範囲でしか満足の行く結果を与えず、したがって、反応の特異性を評価するには問題がある。その理由は沈殿形成が著しく非線形だからである。すなわち、沈殿形成は時間経過に従って指数関数的に増加し、その後、飽和して水平な不変状態 (プラトー) に達する。この指数関数的な増加部分についてのみ、グレー値と結合ターゲット量とは対応関係にある。アレイ要素の飽和 - 不変状態化は、関係するプローブ - ターゲット相互作用に依存しており、したがって、アレイ要素ごとに飽和に達する時間は異なっている。これは沈殿反応終了後の定量を妨げる。アレイを構成するどの要素も確実に水平の不変域に至らないように実験パラメータを決定することは不可能である。反応速度は、温度、光、塩濃度、pHその他の要因に強く依存しているからである。

20

【0029】

したがって、1枚の写真を撮っただけでは、すべてのアレイ要素で、沈殿が、沈殿形成の対時間依存性が指数関数領域にあるという保障はない。このため、既に沈殿形成反応が水平の飽和域に達しているアレイ要素からの信号と、沈殿形成反応が未だ指数関数領域にあるアレイからの信号とでは、グレー値などの信号強度間の比較を行っても結果は歪んだものになる。

30

【0030】

上記の問題を解消すべく、本発明は以下のステップを含む、プローブ・アレイ上でのプローブとターゲットとの分子相互作用による試料中のターゲットの定性的および/または定量的検出方法を提供する。

- a) 所定の部位に固定されたプローブを有するプローブ・アレイの作成；
- b) プローブ・アレイ上に配置されたプローブとターゲットとの相互作用；
- c) 相互作用が起こったアレイ要素での沈殿形成反応の遂行；
- d) アレイ要素上における沈殿形成の時間経過の信号強度としての検出；
- e) 沈殿形成を時間の関数として描く曲線関数に基づく、アレイ要素の実質的信号強度の決定。

40

【0031】

本発明を説明するために以下の定義を用いる。

本発明に関連して、分子プローブとは、ある特徴的な結合性または所定の反応性にに基づいて他の分子を検出するために使用される分子を意味する。

本発明に関連して、プローブ・アレイとは、各プローブの位置が個別に定められている複

50

数の分子プローブを表面上に配置したアレイを意味する。

【0032】

本発明に関連して、アレイ要素とは、分子プローブを定着させるための表面上の所定領域を意味する。すべての占有アレイ要素の合計がプローブ・アレイである。

【0033】

本発明に関連して、マイクロタイター・プレートとは、所定グリッド上に配置された反応容器アレイを意味し、これは、様々な生物学的、化学的、診断化学的試験の自動化を可能にする。

【0034】

本発明に関連して、ターゲットとは分子プローブとによって検出される分子を意味する。 10

本発明に関連して、HTS（英語：high throughput screening）とは、活性物質を高スループットでシステムティックに探索することを意味する。

【0035】

本発明に関連して、基質とは、適当な反応媒体に溶解し、触媒、結晶核および還元剤の作用の結果として局所的に析出する分子または複数の分子の組合せを意味する。

【0036】

本発明に関連して、担体とは、その上にプローブ・アレイが構築される固体を意味する。本発明に関連して、標識とは、ターゲットと結合し、可溶性基質の低溶解度沈殿形成反応を触媒するか、可溶性基質が低溶解度沈殿に転換する際の結晶核として機能する基を意味する。 20

【0037】

本発明に関連して、実質的信号強度とは、アレイ要素上でのプローブとターゲットとの間の相互作用、したがって、結合したターゲットの定量値を意味し、それは沈殿形成を時間の関数として描く曲線関数に基づいて決定される。

【0038】

本発明の方法の本質的特徴は、沈殿形成の時間経過によってアレイ要素の実質的信号強度を決定することにある。本発明によれば、時間の関数としてのアレイ要素上の沈殿形成は、好ましくは曲線関数として記述され、これに基づいて実質的な信号強度が決定される。沈殿形成の時間経過を考慮しているため、この実質的な信号強度は、結合ターゲット量を正しく示す尺度である。 30

【0039】

特に、本発明によれば、沈殿形成の時間経過の一部または全体は、回帰線として記述してもよい。この実施形態では、実質的な信号強度は回帰線の傾きに依存して描かれる。この傾きは、結合したターゲットの濃度の直接の尺度であり、すなわち、回帰線の傾きが大きければ大きい程、より多くのターゲットが結合している。すべてのアレイ要素を同一条件下に監視すれば、各アレイ要素における沈殿形成の時間的増加は濃度の特性値となり、本実験の場合、支配的条件に対して正規化されている。このため、結合したターゲットの相対量が確実に正確に決定される。

【0040】

本発明の特に好ましい実施形態では、沈殿形成の時間経過が指数関数的増加領域にある回帰線は、1つのアレイ要素に対して決定される。 40

本発明の1つの実施形態では、回帰線は、沈殿形成を時間の関数として描くことができる曲線関数の変曲点を通して引かれる接線に対応する。曲線関数の変曲点は曲線関数の一次導関数の最大値から決定される。

【0041】

本発明の別の実施形態では、回帰線は、沈殿形成を時間の関数として描くことができる曲線関数の頂点を線でつなぐことにより決定される。曲線関数の頂点は、曲線関数の二次導関数の最大値から決定される。

【0042】

沈殿形成の時間経過によって各アレイ要素に対する実質的な信号強度を決定し、その後、 50

これらの実質的な信号強度をアナログ・イメージに変換することにより、測定のダイナミック・レンジを拡大することができる。つまり、検出可能な範囲が広がる。測定のダイナミック・レンジを拡大できるのは、もはや検出システムの色深度が決定的な要素ではなく、プローブ・アレイの各要素の表面に析出した沈殿の時間経過によるからである。沈殿反応の増加量を評価することにより、グレー値分布の実質的な信号強度を決定することが可能になり、したがってダイナミック・レンジが広がるのである。

【0043】

本発明の方法はさらに、簡単な構成で廉価な検出システムが使用できるという利点を有する。例えば、グレー値深度を測定するのに、わずか8ビット、すなわち256グレー値のカメラを用いることができる。これで、計算および実質的なマッピング後、24ビット(16777216グレー値)または48ビット(33554432グレー値)の実焦点深度が得られる。このため、プローブ・アレイ上でのターゲットとプローブの相互作用が弱いものと強いものを同時に検出する可能性を明瞭に高めることができる。

10

【0044】

本発明の好ましい実施形態では、調べようとする試料中に既知濃度の基準ターゲットを含有させる。基準ターゲットはプローブ・アレイの少なくとも1つのプローブと相互作用をする。この基準ターゲットとプローブとの相互作用は沈殿形成の時間的増加量に依存して測定され、他のターゲットの濃度を(プローブとターゲットとの相互作用によって生じるその実質的な信号強度の基準ターゲット濃度との相対値に従って)定量するための基準として機能する。

20

【0045】

調べるターゲットはどのような種類のものでもよいが、好ましくは、生体試料である。ターゲットは好ましくは分離、精製し、複製および/または増幅した後、本発明の方法に従って検出および定量する。

【0046】

本発明に関連して、プローブ・アレイとは、プローブを所定部位に固定したものであり、従来法に従って製造される。本発明によれば、プローブ・アレイはプローブ・アレイをその表面に形成し得る担体を含む。この種類の担体は、ガラス、フィルター、電子デバイス、高分子、金属材料などおよびこれらの組合せの群から選択される材料で形成し得る。アレイは、画定部位、いわゆるアレイ要素を含むのが好ましく、アレイ要素は、各アレイ要素が1種類のプローブのみを含む特定のパターンで形成されていることが特に好ましい。

30

【0047】

本発明のさらに別の実施形態では、アレイ要素中で沈殿の時間経過を検出するのに用いられる信号強度は、毎分、好ましくは30秒ごと、より好ましくは10秒ごとに記録する。沈殿形成の時間依存が一義的に測定可能であり、例えば、指数領域にある回帰線の傾きが、結合したターゲットの濃度の尺度として導出できるならば、信号記録のためには他の時間間隔を取ってもよい。

【0048】

アレイ要素の実質的な信号強度は、例えば、ある時点で検出された信号強度、好ましくは最後の測定での信号強度に、そのアレイ要素についての回帰線の傾きとその時点までの測定継続時間を乗じることにより決定される。この実施形態では明らかに、信号強度の検出時点がすべてのアレイ要素で等しいという相対的な定量化が必要である。

40

【0049】

本発明に従って沈殿の検出により、プローブ・アレイ上における結合したターゲットの濃度を相対的に定量するためのさらなる条件は、プローブ・ターゲット間相互作用が起こったアレイ要素上への低溶解度沈殿物を形成する可溶性基質の反応を触媒するか、この種の反応の結晶核として機能する標識をターゲットに施すことである。

【0050】

本発明の1つの実施形態では、ターゲットにはこの種の標識を直接に施すことができる。あるいは、ターゲットの直接的標識ではなく、ターゲットと標識された化合物の両方と相

50

相互作用するプローブを用いたサンドウィッチ・ハイブリダイゼーションまたはサンドウィッチ反応を行ってもよい。この種の反応の例としては、以下のものがある。

【0051】

・ターゲット配列に相補的な配列と標識したオリゴヌクレオチドとのサンドウィッチ・ハイブリダイゼーション。

・ターゲット配列と鎖状にハイブリダイズする標識したオリゴヌクレオチドのサンドウィッチ・ハイブリダイゼーション（本発明に関連して、ターゲット配列と鎖状にハイブリダイズするとは、その少なくとも一部にターゲット配列と他のオリゴヌクレオチドとの両方に相補性を示す標識した一群のオリゴヌクレオチドが存在することである。他のオリゴヌクレオチドは自己相補的であるか互いに相補的であり、これにより、ハイブリダイゼーションの際にターゲット配列と結合した標識されたオリゴヌクレオチド鎖が生成する）。

10

【0052】

・例えば、WO99/10362に記載されているような、ターゲット配列と相補的でありデンドリマーなどの多重標識構造と結合するオリゴヌクレオチドとのサンドウィッチ・ハイブリダイゼーション。

【0053】

ターゲットの標識との結合の可能性としてさらに好ましいものは、ホモポリマー領域、例えばポリA配列を、合成によりまたは酵素作用によりターゲットに導入することであり、これにより、米国特許第6,103,474号に記載されているような連続配列を形成する。この実施形態では、標識化は好ましくは、上述の様々な変法で、ホモポリマー配列と相補的な標識されたオリゴヌクレオチドとのサンドウィッチ・ハイブリダイゼーションによって実行される。

20

【0054】

本発明の他の好ましい実施形態では、ターゲットに付加されたホモポリマー配列部分を増幅する際に、標識された塩基を同時に取り込ませることにより信号増幅が行われる。特に好ましい実施形態は環状の1本鎖テンプレート（これはホモポリマー配列との相補性を示す）を用いたRCA機構を使用することである。

【0055】

次に示す表1は、ターゲットとプローブとの相互作用が起こったアレイ要素上での沈殿形成に適する可能性として考えられる一連の反応をまとめたものである（但し、これはそうした反応の完全なリストとして示すものではない）。

30

【0056】

【表1】

触媒または結晶核	基質
ホースラディッシュ・ ペルオキシダーゼ	DAB (3,3'-ジアミノベンジジン) 4-CN (4-クロロ -1-ナフトール) AEC (3-アミノ -9- エチルカルバゾール) HYR (p-フェニレンジアミン -HCl とピロカテコール) TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) ナフトール / ピロニン
アルカリホスファターゼ	ブロムクロロインドイルホスフェート (BCIP) および ニトロテトラゾリウムブルー (NBT)
グルコースオキシダーゼ	t-NBT および m-PMS (ニトロテトラゾリウムブルークロライド および フェナジンメトスルフェート)
金粒子	硝酸銀 酒石酸銀

10

20

30

40

50

生体試料を酵素や金、特にナノ結晶金で標識することについては、文献に十分に記載されている（例えば、F. ロッツペヒ (F. Lottspeich) および H. ゴルバス (H. Zorbas)、Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag (Springer Academic Press)、Heidelberg, Berlin (1998); E. リデル (E. Lidell) および I. ウィークス (I. Weeks)、Antibody Technology, BIOS Scientific Publishers Limited (1995) 参照)。

【0057】

本発明による方法で利用できる不溶性沈殿による他のプローブ-ターゲットの相互作用の検出法としては、以下に記載のものが挙げられる。Immunogold-Silver Staining, Principles, Methods and Applications, Eds: M. A. ヘイヤット (M. A. Hayat)、1995、CRC Press; Eur J Immunogenet 1991 Feb-Apr; 18 (1-2): 33-55 HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. エーリッヒ H (Erlich H)、ブガワン T (Bugawan T)、ベゴヴィッチ AB (Begovich AB)、シャーフ S (Scharf S)、グリフィス R (Griffith R)、サイキ R (Saiki R)、ヒグチ R (Higuchi R)、ウォルシュ PS. (Walsh PS.) Department of Human Genetics, Cetus Corp., Emeryville, California 94608; Mol Cell Probes 1993 Jun; 7 (3): 199-207 A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of Listeria monocytogenes. Bsatt N, Batt CA. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853. Immunogenetics 1990;

32 (4) : 231 - 41 Erratum in: Immunogenetics 1
 991; 34 (6) : 413 Rapid HLA - DPB typing using
 enzymatically amplified DNA and nonradi-
 oactive sequence - specific oligonucleotide
 probes. ブガワン TL (Bugawan TL)、ベゴヴィッチ AB (B
 egovich AB)、エーリッヒ HA. (Erlich HA.) Departm
 ent of Human Genetics、Cetus Corporation、
 Emeryville、CA 94608. Hum Immunol 1992 Dec
 ; 35 (4) : 215 - 22 Generic HLA - DRB 1 gene ol
 igotyping by a nonradioactive reverse do 10
 t - blot methodology. エリアオウ JF (Eliaou JF)、パ
 ーナード F (Palmade F)、アヴィネンス O (Avinens O)、エド
 ウアール E (Edouard E)、バラゲール P (Ballaguer P)、ニ
 コラス JC (Nicolas JC)、クロット J. (Clot J.) Labor
 atory of Immunology、Saint Eloi Hospital、
 CHU Montpellier、France. J Immunol Methods
 1984 Nov 30; 74 (2) : 353 - 60 Sensitive visu 20
 alization of antigen - antibody reactions
 in dot and blot immune overlay assays wi
 th immunogold and immunogold / silver stai
 ning. メールマンス M (Moeremans M)、ダネエルス G (Daneel
 ls G)、ヴァン・ダイク A (Van Dijck A)、ランガンジェ G (La
 nganger G)、デ・メイ J. (De Mey J.) Histochemis
 try 1987; 86 (6) : 609 - 15 Non - radioactive in
 situ hybridization. A comparison of sever
 al immunocytochemical detection systems
 using reflection - contrast and electron
 microscopy. クレメンス AF (Creemers AF)、ヤンセン・イン・
 デ・ヴァル N (Jansen in de Wal N)、ウィーガンツ J (Wie
 gant J)、ダークス RW (Dirks RW)、ヴァイスベーク P (Weis 30
 beek P)、ヴァン・デア・プレーグ M (van der Ploeg M)、ラ
 ンドジャン JE (Landegent JE)。

【0058】

本発明に関連して、不溶性沈殿によるプローブ - ターゲットの相互作用の考えられる検出
 法の変法としては、以下のものが挙げられる。

本発明の1つの実施形態では、標識に、可溶性基質を不溶性生成物に転換する触媒、好ま
 しくは酵素を付与する。アレイ要素上で沈殿形成をもたらす反応は、この場合、ターゲッ
 トに結合した触媒（好ましくは、酵素）存在下での可溶性基質の不溶性生成物への転換で
 ある。酵素は好ましくは、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、アルカリホスファタ
 ーゼおよびグルコースオキシダーゼからなる群から選択される。可溶性基質は、好ましく 40
 は、3, 3' - ジアミノベンジジン、4 - クロロ - 1 - ナフトール、3 - アミノ - 9 - エ
 チルカルバゾール、p - フェニレンジアミン - HCl / ピロカテコール、3, 3', 5,
 5' - テトラメチルベンジジン、ナフトール / ピロニン、ブロムクロルインドイルホスフ
 ェート、ニトロテトラゾリウムブルーおよびフェナジンメトスルフェートを含む群から選
 択される。例えば、3, 3' - ジアミノベンジジンなどの無色の可溶性水素供与体は、過
 酸化水素の存在下に不溶性の有色生成物に転換される。酵素ホースラディッシュ・ペルオ
 キシダーゼは、供与体の水素イオンを過酸化水素に転移させて水を形成する。

【0059】

本発明の好ましい実施形態では、アレイ要素上で沈殿形成をもたらす反応は、金属沈殿形
 成反応である。特に、アレイ要素上での沈殿形成反応は、銀化合物（好ましくは硝酸銀、 50

乳酸銀、酢酸銀または酒石酸銀など)を銀に転換する化学的還元反応であることが好ましい。好ましい還元剤はホルムアルデヒドおよび/またはヒドロキノンである。

【0060】

金属化合物の沈殿析出が、金属クラスタまたはコロイド状金属粒子、特に金クラスタまたはコロイド状金粒子で標識されたターゲット化合物の存在下で起こるならば特に好ましい。すなわちこの場合、金属クラスタまたはコロイド状金属粒子は、ターゲットに結合する標識である。例えば、硝酸銀は銀原子に転換されるが、この過程では、溶液からの銀イオンが結晶核である金の上に析出し、次いで、第2ステップでホルムアルデヒドなどの還元剤の作用により還元される。このようにして不溶性の銀原子が生じる。

【0061】

別の実施形態としては、金属化合物の沈殿析出は、ターゲットに結合したポリアニオンの存在下で起こる。ターゲット自身がポリアニオンでない場合は、ポリアニオンを結晶核として用いることもあり得る。例えば、ポリアニオンで標識されたターゲットを硝酸銀溶液に曝す。すると銀カチオンはポリアニオン上に選択的に析出していく。次いで銀イオンは還元剤によって銀原子に転換される。

10

【0062】

酵素、触媒、コロイド状金属粒子またはポリアニオンは、直接またはターゲットに結合するアンカー分子を介してターゲットに結合させることができる。基本的に上記標識はターゲットに直接結合させる必要はない。標識は第2ステップで、それ自体がターゲットに結合するストレプトアビジンなどのアンカー分子を用いて結合させることができる。

20

【0063】

関連する触媒または結晶核とアンカー分子用の特異的結合パートナーからなる共役体を利用することによっても、上記手順の効果を実現することができる。その場合、アレイ要素上に沈殿形成をもたらす反応は、ターゲットと結合するアンカー分子に対する特異的結合パートナーの結合である。

【0064】

結合パートナー - アンカー分子対は、好ましくは、ビオチン / アビジンまたはストレプトアビジンもしくは抗ビオチン抗体、ジゴキシゲニン / 抗ジゴキシゲニン免疫グロブリン、FITC / 抗FITC免疫グロブリンおよびDNP / 抗DNP免疫グロブリンからなる群から選択される。

30

【0065】

上記のいずれの実施形態でも、可溶性触媒は触媒反応によって不溶性沈降生成物に転換される。この生成物は表面近くにあるため、表面に直接析出し、様々な方法で洗浄しても除去されない固相沈殿を形成する。

【0066】

さらに本発明においては、標識、特に酵素、金属クラスタ、コロイド状金属粒子またはポリアニオンを、プローブとの相互作用の前、その間または後に、ターゲットに結合させることが可能である。

【0067】

本発明のさらに別の好ましい実施形態では、ターゲットとプローブとの相互作用は、2種類のヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションである。ターゲットとプローブ・アレイ中のプローブのハイブリダイゼーションは、既知の標準的プロトコルの1つに従って行う(特にロットスピーヒ(Lottspeich)およびゾルバス(Zorbass)、1998参照)。得られたハイブリッドは、例えば、ソラレン挿入とこれに続く「架橋」によって共有結合で安定化するか、あるいは米国特許第4,599,303号に記載されているように、例えば、挿入剤の結合により非共有結合により安定化することができる。

40

【0068】

ターゲットをプローブ・アレイ中のプローブとハイブリダイズさせた後、あるいはハイブリダイズしたターゲットを標識した後、通常は洗浄を行い、非特異的な、従ってより弱い結合成分を除去する。

50

【0069】

代替として、ターゲットとプローブの相互作用は、抗原構造と対応する抗体またはその超可変領域との反応または受容体と対応するリガンドとの間の反応である。

【0070】

特異的プローブによるターゲットの結合すなわち認識は、通常、最適条件下では自発的な非共有反応である。これには非共有化学結合を含まれる。媒体組成や他の化学的および物理的因子は結合の速度および強度に影響を与える。例えば、核酸の認識では、ストリンジエンシーが低く高温であれば、それだけ2本のストランド（これらは完全には相補的ではない）間の結合の速度および強度は低くなる。結合条件の最適化は、抗原-抗体またはリガンド-受容体の相互作用でも必要である。もっとも、通常、結合条件はそれ程特異的なものではない。

10

【0071】

本発明の1つの実施形態では、アレイ要素上の沈殿の存在は、光ビーム、好ましくはレーザー・ビームまたは発光ダイオードの沈殿による反射、吸収または散乱により検出される。沈殿は顆粒状であるため光ビームは変化して反射される。沈殿はまた強い光散乱をもたらすので、これを従来の検出システムで記録することができる。沈殿が銀の沈殿のように暗色の表面として現れる場合、光吸収を検出し記録することができる。検出解像度はカメラの画素数による。

【0072】

例えば、特異的反応によって強度の増した領域は、透過光中（影を伴うコントラスト）または入射光中（反射を伴うコントラスト）の非常に単純な光学的構造としての検出することができる。検出された陰影領域の強度は金粒子などの標識の存在度や粒子の核形成状態に正比例している。

20

【0073】

電気伝導性を有する沈殿や誘電率が周囲と異なる沈殿が用いられる場合は、別の実施形態として電氣的に反応を検出してもよい。

電氣的測定は、微小電極アレイによる導電率測定や微小容量（キャパシティ）センサあるいは電界効果トランジスタ・アレイ（FETアレイ）による電圧測定に基づいて行うことができる。電気伝導度が微小電極で測定される場合、沈殿後に2つの電極間の電気抵抗が変化する（E. ブラウン（E. Braun）、Y. アイヒェン（Y. Eichen）、U. シルヴァン（U. Sivan）、G. ベン-ヨーゼフ（G. Ben-Yoseph）、Nature、第391巻、775頁（1998））。誘電率が微小容量（キャパシティ）センサで測定される場合、2つの並置した電極間の容量の変化が測定される（M. マドウ（M. Madou）、Fundamentals of Microfabrication、CRC Press、Boca Raton（1997））。電位がFETアレイで測定される場合、センサ表面の電位の変化が測定される（M. マドウ（M. Madou）、Fundamentals of Microfabrication、CRC Press、Boca Raton（1997））。

30

【0074】

放射性基質または放射同位体で標識された基質が用いられる場合、アレイ要素上での沈殿の存在はオートラジオグラフィ、フルオログラフィおよび/または間接的オートラジオグラフィによって検出することができる。オートラジオグラフィでは、放射性的沈殿で覆われた表面をX線フィルムに接触させる。フルオログラフィでは、放射性沈殿と接触した表面にサリチル酸ナトリウムなどの蛍光化学物質（これは放射性物質の放射線エネルギーを蛍光に変換する）を重ねる。増強用スクリーンを用いた間接的オートラジオグラフィでは、線を放射する沈殿で覆われた表面を増強スクリーン上に置く。これにより放射線は青色光に転換される（上記F. ロッツペイチ（F. Lotzpeich）、H. ゴルバス（H. Zorbass）参照）。しかし、放射能に基づく検出は、健康および安全上の危険があり、このためこれらに関する規制要件を充足しなければならず、望ましくない場合が多い。

40

50

【0075】

本発明のさらに別の実施形態では、アレイ要素上の沈殿は走査型電子顕微鏡法、電子プローブ・マイクロアナリシス (EPMA)、磁気光学カー (Kerr) 顕微鏡法、磁気力顕微鏡法 (MFM)、原子間力顕微鏡法 (AFM)、屢気楼効果測定法、走査型トンネル顕微鏡法 (STM) および / または超音波反射断層撮影法によって検出する。

【0076】

SEM および / または EPMA による反応の検出は、基質の種類にはほとんど依存しない。走査型電子顕微鏡法 (SEM) では、焦点を結んだ電子ビームが試料上を走査する (J. ゴールドスタイン (J. Goldstein) ら、Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Plenum, New York, 1981)。電子プローブ・マイクロアナリシス (EPMA) では、焦点を結んだ電子ビームによってトリガされた2次プロセスが、部位分解分析のために用いられる (J. ゴールドスタイン (J. Goldstein) ら、Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Plenum, New York, 1981)。

10

【0077】

磁気を有するか、磁性体粒子によって標識された基質を用いる場合は、反応を磁気光学カー顕微鏡法やMFMによって検出することができる。磁気光学カー顕微鏡法では磁場による偏光面の回転 (カー-ファラデー効果) を利用している (A. ヒューバート (A. Hubert)、R. シェーファー (R. Schaffer)、Magnetic Domains, Springer, 1998)。

20

【0078】

反応の結果、表面上の基質の光学密度が変化し、これは屢気楼効果により検出することができる。屢気楼効果では、焦点を結んだ光ビームによって表面が局所的に温められ、これが屈折率変化として測定される。表面を走査することにより、表面の局所的吸収特性イメージが得られる (A. マンデルリス (A. Mandelis)、Progress in Photothermal and Photoacoustic Science and Technology, Volume 1, Elsevier, New York (1992))。相互作用反応の検出を行うための基質から熱を利用した別の部位分解法としては、マイクロサーモフィル・アレイがあり、これは基質の結晶化または沈殿形成の際のエンタルピーを測定するものである (J. M. ケーラー (J. M. Kohler)、M. ツーレン (M. Zieren)、Thermochemica acta (1998)、第310巻、25頁)。

30

【0079】

STM および AFM も基質の反応を検出するのに適している。原子間力顕微鏡法 (AFM) では、マイクロチップまたはナノチップで表面を走査し、表面のトポグラフィを測定する (E. ブラウン (E. Braun)、Y. アイヒェン (Y. Eichen) U. シヴァン (U. Sivan)、G. ベン-ヨーゼフ (G. Ben-Yoseph)、Nature, 第391巻、775頁 (1998))。磁気力顕微鏡法 (MFM) は、ナノチップを用いて局所的な磁気感受率の違いを検出するものである (A. ヒューバート (A. Hubert)、R. シェーファー (R. Schaffer)、Magnetic Domains, Springer, 1998)。走査型トンネル顕微鏡法 (STM) では、ナノチップを用いてトンネル電流を測定し、ナノ・レベルでの表面トポグラフィを決定する (O. Marti、M. Amrein、STM and SFM in biology, Academic Press Inc., San Diego, 1993)。

40

【0080】

より変わった方法、例えば、超音波反射断層撮影法などを用いることもできる。断層撮影法は断面に基づいて3次元画像を形成する方法である (F. Natterer、Mathematische Methoden der Computer-Tomographie, Westdt. Vlg., Wiesbaden, 1997)。超音波反射断層撮

50

影法は、断面画像を生成するのに超音波断層撮影法を用いるものである (V. Fleischer、F. Bergner、DGZfP NDT Conference Dresden 1997)。

【0081】

本発明の具体的実施形態では、以下のステップを含む方法が利用できる。

- ・アレイ要素上での沈殿形成の時間経過をカメラでの写真撮影によって検出する。
- ・画像に含まれるアナログ情報をデジタル形式に変換する。
- ・各アレイ要素について、沈殿形成を時間の関数として描く曲線関数に基づいて実質的信号強度を計算する。
- ・実質的信号強度を変換して、すべてのアレイ要素の実質的信号強度を表わす人工的な写真とする。

【0082】

本発明に関連して、写真とは、プローブ・アレイについて測定された信号強度を表現する一群の画素であり、例えば、直接にスクリーンに映したり記録のためにプリンタに送れたりするものを意味する。

【0083】

本発明に関連して、人工的な写真とは、プローブ・アレイについて所定実質的信号強度を表現する一群の画素であり、例えば、直接にスクリーンに映したり記録のためにプリンタに送れるものを意味する。

【0084】

本発明の別の形態は、本発明に従って上記の方法を遂行するための装置に関する。これは以下のものを含む。

- a) プローブ・アレイを備えたアレイ基板
- b) 反応チャンバ
- c) ターゲットとプローブとの間の相互作用が起こったアレイ要素上での沈殿形成を検出する装置、および
- d) 以下のようにプログラムされたコンピュータ
 - ・検出装置によって記録された信号強度を集める。
 - ・連続的に記録された信号を処理し、アレイ要素上の沈殿形成の時間経過の決定、および沈殿形成を時間の関数として描く曲線関数に基づく実質的信号強度決定を保証する。
 - ・必要であれば、実質的な信号強度のアナログ写真への変換を保証する。

【0085】

検出装置は、好ましくはカメラ、特にCCDまたはCMOSカメラあるいは同様のカメラであり、通常はプローブ・アレイの全領域を記録する。

既に述べたように、本発明に従って、沈殿(例えば、結晶核として機能する金粒子上への銀原子)の析出を通じた増強プロセスにおいて時間分解検出を行い、時間経過から相対的な占有率を計算することにより、たとえ8ビットの検出法を用いたとしても、測定データの動的解像度は著しく増大する。この目的のための装置構成は、反応チャンバを機械的に含むことと修正された取得ソフトウェアによって特徴付けられる。ソフトウェアは、連続的な記録を処理し得るという特徴を有する。この目的のため、プローブ・アレイの各要素について各時点でのグレー値が測定される。すべてのアレイ要素に対して、実質的な信号強度が沈殿形成の時間経過に依存して計算される。この値に基づいて、例えば最後の測定でのグレー値が速度と測定時間の積に関連付けられ、これにより測定範囲が拡大される。このようにして、たとえ廉価な8ビットのカメラを用いたとしても、弱いプローブ-ターゲット間相互作用と強いプローブ-ターゲット間相互作用との間での優れた解像度、および結合したターゲットの正確な定量が保証される。

【0086】

好ましい実施形態では、本発明の装置は、好ましくは特にレーザ、発光ダイオード(LED)および高圧ランプから選択される光源を含む。

沈殿を光学的に検出する本発明装置の構成例における部品は、均一に照明するための低出

力(500mcd)光源、例えば、LED、および検出器、例えば、CCDカメラを含む。基質の触媒的な析出から得られる増強効果のため、特に金/銀システムを使用した場合、システムの光学特性の変化は非常に大きく、単純なフラット・ベッド型スキャナ、円形スキャナおよび同様な装置でも沈殿を測定するのに適している。

【0087】

典型的な検出時間は1秒以下であるが、蛍光検出用の比較的感度の良いCCDシステムでは約10秒~80秒であり、ビデオ規格に対応した信号転送率を有する廉価な消費者向けカメラも使用できる。

【0088】

このシステムは小型化に大変適している。システム全体は、現場で使用可能な独立携帯装置として設計可能である。また、本発明の好ましい実施形態では、高度に統合された自律的装置として製品化できる。このため、医学的な診断、法医学、最近のスクリーニングなどに用いるマイクロアレイとして高感度な応用が可能であり、それらを、医学的または生物学的な実験施設に頼ることなく素人でも迅速に行うことができる。

【0089】

以下、本発明の方法の利用可能な応用として、移植医療における組織分類における例について述べる。移植や自己免疫性では、免疫学的に関係のある遺伝子の構造、発現および遺伝の分析が特に関心を集めている。というのも、特異的抗原認識(組織適合性抗原、Tリンパ球受容体)についても、エフェクタ機構(抗体、Fc-受容体)についても非常に多型的なシステムが存在し、これらは非常に複雑な遺伝的調節機構に服しているからである。弱い移植抗原、また、強い移植抗原は特に、いずれも移植拒絶に大きな影響を及ぼす。これらの強い抗原は主要組織適合性抗原と呼ばれ、一般に遺伝子としては主要組織適合性抗原共役体(MHC)内にコードされている。MHCはまだ脊椎で検出されたのみであり、ヒトではHLA(ヒト白血球抗原)と呼ばれている。HLA共役体はヒトの第6染色体の短腕に位置しており(6p21.1~6p21.3)、約3500キロ塩基の部分を含む。HLA分子は極めておおまかに言えば2つのクラス(クラスIとクラスII)に分類でき、これらはさらにサブグループに分けられる。HLA遺伝子産物は、その全体がその生物の対応する遺伝的特性の原因となっている。それらの遺伝子の位置は、非常に多数の変異対立遺伝子に受継がれており、既知となったその対立遺伝子の数は益々多くなっている。HLAシステムの対立遺伝子型分類は、生物について血清学および分子生物学的分析で正確に行うことができる。移植すべき細胞種の医学的関連および研究で必要な詳細さに応じて、遺伝子型分類は様々に行うことができる。分類が詳細であり、これによる供与者と受容者との一致が良好であればあるほど、組織の不寛容や移植拒絶などの予測される問題は少なくなる。移植の種類が様々あることに加え、一義的な個体識別は、輸血、疾病関連、および法医学においても重要である。

【0090】

本発明の実施形態の例には、検出限界の原理の証明および発現モニタリングの例が含まれる。しかし、用いられている固有の原則は他の応用例にも適用できる。生物の発現モニタリングなどの定量的分析の他に、多数の定性的分析が可能である。

【0091】

例えば、HLA遺伝子産物は、その全体がその生物の対応する遺伝的特性の原因となっている。その遺伝子の位置は、非常に多数の対立遺伝子の組合せにおいて遺伝子しており、既知となったその対立遺伝子の数は益々多くなっている。移植すべき細胞種の医学的関連および研究で必要な詳細さに応じて、対立遺伝子型分類は様々に行うことができる。分類が詳細であり、これによる供与者と受容者との一致が良好であればあるほど、組織の不寛容や移植拒絶などの予測される問題は少なくなる。MHC分子の発見以来、これらの分子やその遺伝子の多型の同定のために様々な方法が開発され用いられてきた。一方には、生化学的な細胞および血清学的手法があり、他方には分子生物学的的手法があり、これらは根本的な違いがある。前者は発現産物を例えば、特異的抗体の使用により排他的に分析するものであるが、第2の群はコード領域と非コード領域の配列の相違を、ハイブリダイゼー

10

20

30

40

50

ションや核酸増幅技術を用いて検出する (ビドウェル J. (Bidwell J.)、1994 *Advances in DNA-based HLA-typing methods*. *Immunol Today*, 15 (7) : 303 ~ 7頁)。ここに記載した発明の結果、単離後、適当な標識および可能な増幅を行って診断上関連のある対立遺伝子構造を個体のゲノムDNAの配列バックグラウンド中で強調し、プローブ・アレイ (DNAチップ) を用いて多量のハイブリダイゼーションを平行して行う。HLAタイピングを可能な限り詳細に行うことも可能になる。他の方法と比較して、ここに記載したハイブリダイゼーションの検出と信号の増強は、既知の対立遺伝子特異的プローブを用いるならば、簡単な検出器との組合せで最小の診断時間で最大のゲノム・タイピングが可能な非常に経済的な方法を提供する。

10

【0092】

他の応用分野としては医薬および診断の領域が挙げられる。生物における内在および外来性物質 (例えば薬品) の代謝において、一連の遺伝的多型、変異、欠失など、およびこれに伴うタンパク質レベルでの効果が根本的役割を果たす。これらのDNA配列における個体の遺伝子型の分布は、ある種の診断的描像と関連する表現型をもたらす (例えば、p53遺伝子と哺乳類の癌やミトコンドリア遺伝子のDループ、16-S-rRNA、ND3-5、CytB、tRNA^{Trp}、tRNA^{Leu}における変種と肺癌および膀胱癌 (フリス MS (Fliss MS)ら、(2000) *Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumours and bodily fluids*. *Science*, 17; 287 (5460) : 2017 - 9) または生物中での生体異物の様々な作用)。後者は、例えば、チトクロームP450遺伝子 (CYP2D6、CYP2C19、CYP2A6、CYP2C9、CYP2E1)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子 (GSTM1、GSTT1)、N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (NAT2)、アポリポrotein E遺伝子 (ApoE) その他多数において示されてきた。これらの研究結果すべてをまとめることで、配列の違いを平行して検出するDNAプローブを有するアレイを構成することができる。上記のハイブリダイゼーションの増強検出法と簡単な光学システムにより、定性的な遺伝子型分類を迅速かつ廉価に行うことができる。これは、いずれも、個体識別マーカとしての個人個人に特定された薬剤の使用および診断の両方に関係がある。

20

以下の実施例および図面は本発明を説明するためのものであり、限定的に理解されるべきではない。

30

【0093】

(実施例)

実施例1: 核酸のハイブリダイゼーションの検出 (定量分析)

担体の調製

アミノ修飾した以下の20ヌクレオチドの配列

5' - NH₂ - CCTCTGCAGACTACTATTAC - 3'

をエポキシ化した3×3mmのガラス表面上の所定位置に共有結合により固定した。この目的のために、0.5Mリン酸塩バッファに溶解したオリゴヌクレオチド5μM溶液0.1μlをガラス表面上に塗り37℃で乾燥した。プローブ・アレイを30分間60℃に加熱することにより、塗られたオリゴヌクレオチドとガラス表面のエポキシ基との共有結合を固定した。次いで、プローブ・アレイを蒸留水で激しく洗浄し、その後、100mM KCIで30分間洗浄した。さらに100mM KCIで短時間洗浄し、蒸留水で洗浄した後、プローブ・アレイを37℃で10分間乾燥した。

40

【0094】

相補的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションを行うために、ピオチンで標識した5' - Bio - GTAATA GTAAGTCTGCAGAGG - 3' の配列を有する20bp長のオリゴヌクレオチドを用いた。反応混合物を全量50μlの緩衝液 (0.25M NaPO₄、4.5% SDS、1mM EDTAの1×SSC溶液) に取り、段階的に以下の濃度とした: 10nM、

50

1 n M、1 0 0 p M、1 0 p M、1 p M、1 0 0 f M、1 0 f M、1 M。

【0095】

準備したプローブ・アレイを各濃度段階のハイブリダイゼーション混合物中に置いた。得られたハイブリダイゼーション混合物を95 で5分間、次いで50 で60分間インキュベートした。この後、プローブ・アレイを2 x S S C + 0 . 2 % S D S、2 x S S C および0 . 2 x S S C (マニアティス (M a n i a t i s) ら (1 9 8 9)) 内でそれぞれ10分間振とうし、洗浄後、圧縮空気を吹き付けて乾燥した。

【0096】

ハイブリダイゼーションの検出

ストレプトアビジン - 金共役体の6 x S S P E (5 2 . 5 g N a C l、2 6 . 4 g N a H ₂ P O ₄ x H ₂ O、2 . 2 2 g N a O H を水で全量1容積としたもの)の1 : 5 0 希釈液をプローブ・アレイ + 0 . 0 0 5 % T r i t o n 溶液に塗り30 で15分間インキュベートした。次いで、プローブ・アレイを2 x S S C (1 7 . 5 g N a C l と 8 . 8 g クエン酸ナトリウム1 l 水溶液を1 0 N N a O H でp H 7 . 0 に調整したもの) + 0 . 2 % S D S (ドデシル硫酸ナトリウム)、2 x S S C および0 . 2 x S S C でそれぞれ10分間振とうし、洗浄し、圧縮空気を吹き付けて乾燥した。金 - ストレプトアビジン共役体の代わりに金粒子で直接修飾したターゲットも用いた。

【0097】

次に、金粒子をプローブ・アレイ上に固定する。これを0 . 1 % 硝酸銀の3 % 炭酸ナトリウム溶液および0 . 0 2 % ホルムアルデヒド溶液で増強した。その混合物を反応の少し前に新たに調製した。15分間インキュベートし、この間、赤色光下に22 で反応を監視した。図1に示す装置で連続的に記録した。

【0098】

検出限界は10 p M 未満であることがわかった。

図3はハイブリダイゼーションの結果を示す。

- A - 濃度10 n M の場合のターゲットのハイブリダイゼーション、
- B - 濃度1 n M の場合のターゲットのハイブリダイゼーション、
- C - 濃度100 p M の場合のターゲットのハイブリダイゼーション、
- D - 濃度10 p M の場合のターゲットのハイブリダイゼーション。

【0099】

実施例2 : 発現プロファイリング法原理の証明 - プローブ・アレイ (プローブ数 : 3 5 6 個) に対する *Corynebacterium glutamicum* 由来のゲノムRNAのハイブリダイゼーション検出

【0100】

DNA - アレイは細胞の全生理学的状態を測定するためにしばしば用いられる (発現プロファイリング) 。この目的のために対応する細胞からRNAを単離し、適当な方法で標識し、相補的プローブを有するプローブ・アレイとハイブリダイズさせた。以下の実施形態では、本発明の方法を、*Corynebacterium glutamicum* 由来の細胞RNAの検出に用いた。

【0101】

プローブ・アレイの調製

アミノ修飾した25または30塩基長の様々なオリゴヌクレオチドおよび様々な長さのcDNAを356個含むプローブ・アレイを用い、クローンディグ・チップ・テクノロジー (C L O N D I A G C h i p T e c h n o l o g i e s) 社 (ドイツ、イエーナ (J e n a) 所在) から販売されている標準タイプのエポキシ化顕微鏡用スライドガラスをアレイ用基板としてプローブ・アレイを作成した。すべてのオリゴヌクレオチドは、a c e A - 遺伝子およびi c d - 遺伝子の部分配列と相補的である。プローブ・アレイはバイオロボティクス (B i o r o b o t i c s) 社 (英国) のM i c r o - G r i d I A r r a y e r を用い、メーカーの取扱説明書に従って配列して作成した。取扱説明書に従い、アミノ修飾したDNAは、0 . 5 M リン酸塩バッファ中最終濃度5 μ M で顕微鏡ス

ライドガラスに塗布し、次いで乾燥した。顕微鏡用スライドガラスを60℃で30分間加熱することにより、アミノ修飾オリゴヌクレオチドとガラス表面上のエポキシ基との間で共有結合を形成した。次いで、スライドガラスを蒸留水で激しく洗浄し、次いで100 mM KClで30分間洗浄した。さらに短時間洗浄した後、最初は100 mM KClで、次いで蒸留水で洗浄し、37℃で10分間、プローブ・アレイを乾燥した。

【0102】

*Corynebacterium glutamicum*からの全RNAの調製
Fast RNA Kit (Bio 101社)を用い、メーカー取扱説明書に従い*Corynebacterium glutamicum*から全RNAを単離した。50 µgのRNAをBiotin Chem Link (ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim)社、ドイツ)を用いメーカー取扱説明書に従い85℃で30分かけてビオチン化した。次いで、メーカー取扱説明書に従いRNAをMicrocon-30-カラム (ミリポア (Millipore)社)で濃縮し、次いでRNAアーゼを含まない脱イオン水で数回洗浄した。次いで、溶出液を真空乾燥して5 µlとした。

10

【0103】

RNAのハイブリダイゼーション
ビオチン化RNAを100 µlのハイブリダイゼーション用バッファ (0.25 M NaPO₄、4.5% SDS、1 mM EDTAの1×SSC溶液)に取り、65℃3分間で変性した。DNAコートしたスライドガラスの表面をハイブリダイゼーション・チャンバ (Hybrislip、シグマ (Sigma)社、ドイツ、ダイセンホーフエン (Deisenhofen)所在)で覆った。次いで、このスライドガラスをマイクロタイター・プレート用挿入部を備えたサーモスタット・シェーカ (エッペンドルフ (Eppendorf)社、ドイツ、ハンブルグ所在)上で50℃まで加熱した。次いでチャンバを変性ハイブリダイゼーション溶液で満たし、メーカーの取扱説明書に従いハイブリダイゼーション・チャンバを閉じた。50℃で60分間インキュベーションを続けた。次いでハイブリダイゼーション溶液を取り除きハイブリダイゼーション・チャンバを取り外した。次いで、スライドガラスを振とうし30℃で2×SSC+0.2% SDSで10分間、室温で2×SSCおよび0.2×SSC洗浄し (Maniatisら、1989)、圧縮空気で乾燥した。

20

【0104】

ハイブリダイゼーションの検出
ストレプトアビジン-金共役体 (EM-STP5、ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル (British BioCell International)社)の6×SSPE+0.005% Triton1:50希釈液 (Maniatisら、1989)をスライドガラスに塗り、次いでこれを30℃で15分間インキュベートした。次いで、プローブ・アレイを2×SSC+0.2% SDS、2×SSCおよび0.2×SSCでそれぞれ10分間振とう洗浄し、圧縮空気を吹き付けて乾燥した。プローブ・アレイ上に固定された金粒子をLM/EM Silver Enhancing Kit (SEKL15、ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル (British BioCell International)社)を用いて増強した。メーカーの取扱説明書に従い、開始液と増強剤溶液各2滴を混合し、その15 µlをプローブ・アレイ表面にピペットで載置した。15分間インキュベートし、この間、赤色光下に22℃で反応を監視し、図1に示す装置で連続的に記録した。最終的な変化の評価は、15分間のインキュベーション後に行った (図4参照)。

30

40

【0105】

実施例3：核酸ハイブリダイゼーションの検出および特異性
各々16ヌクレオチド長の16個のアミノ修飾オリゴヌクレオチド (プローブ)をMicroGrid II-Arrayer (バイオロボティクス (BioRobotics)社)を用いて所定部位に塗布し、ガラス表面を有するエポキシ化3D-顕微鏡スライドガラス (75 mm×25 mm) (エリプサ (Elipsa)社)上に共有結合により固定し

50

た（アレイ要素）。オリゴヌクレオチド配列は以下の通りである（いずれも3' - NH₂ - 修飾あり）：

【0106】

1 :	3' -	A T G	G C G	T T T	A G A	A C C	C	- 5'
2 :	3' -	A T G	C C G	T A T	G G A	A T C	C	- 5'
3 :	3' -	A T G	T C G	T G T	C G A	A A C	C	- 5'
4 :	3' -	A T G	A C G	T C T	T G A	A G C	C	- 5'
5 :	3' -	A C G	G C A	T T T	A G T	A C C	G	- 5'
6 :	3' -	A C G	C C A	T A T	G G T	A T C	G	- 5'
7 :	3' -	A C G	T C A	T G T	C G T	A A C	G	- 5'
8 :	3' -	A C G	A C A	T C T	T G T	A G C	G	- 5'
9 :	3' -	A G G	G C T	T T T	A G C	A C C	A	- 5'
10 :	3' -	A G G	C C T	T A T	G G C	A T C	A	- 5'
11 :	3' -	A G G	T C T	T G T	C G C	A A C	A	- 5'
12 :	3' -	A G G	A C T	T C T	T G C	A G C	A	- 5'
13 :	3' -	A A G	G C C	T T T	A G G	A C C	T	- 5'
14 :	3' -	A A G	C C C	T A T	G G G	A T C	T	- 5'
15 :	3' -	A A G	A C C	T C T	T G G	A G C	T	- 5'
16 :	3' -	A A G	T C C	T G T	C G G	A A C	T	- 5'

10

【0107】

スライドガラス表面上の1個の完全な（正方形）プローブ・アレイは、合計で10×10 = 100個の塗布したプローブを含んでいる。各オリゴヌクレオチド・プローブをプローブ・アレイ上に少なくとも5回塗布した（アレイ構成は図5参照）。プローブは0.2 mm離し、プローブ・アレイ全体で2 mm×2 mmの領域を覆った。このようにして、100枚以上の同一のプローブ・アレイを各スライドガラス上に製造することができた。

20

【0108】

プローブを各オリゴヌクレオチドの0.1 Mリン酸塩バッファ/5%硫酸ナトリウム溶液10 μMとして塗布した。塗布乾燥後、60 で30分間加熱することによりガラス表面のエポキシ基にプローブを結合させた。次いで、スライドガラスを洗浄し、以下の順序でブロックした。

30

【0109】

600 ml 二回蒸留H₂O + 600 μl Triton x 100 中5分間
 600 ml 二回蒸留H₂O + 60 μl 濃塩酸 中2×2分間
 100 mM KCl 溶液中30分間
 二回蒸留H₂O 中1分間洗浄
 ガラス皿上、二回蒸留H₂O 75 ml + 25 ml エチレングリコール + 20 μl 濃塩酸
 中で50 で15分間インキュベート
 二回蒸留H₂O 中1分間洗浄
 圧縮空気で乾燥

40

【0110】

洗浄乾燥後、スライドガラスを3.25 mm×3.25 mmの大きさのピース（以下、「チップ」と呼ぶ）に切断した。各チップ上には、2 mm×2 mmのプローブ・アレイがちょうど1個載っていた。

【0111】

プローブ・アレイのハイブリダイゼーション
 ビオチン標識した16 bp長の相補的オリゴヌクレオチドが、プローブ・アレイの16個の各オリゴヌクレオチド・プローブに対してハイブリダイゼーション・ターゲットとして利用できた。

【0112】

オリゴヌクレオチド・プローブ9に対する相補的ターゲット「9b」は以下の配列を有し

50

、ここでは唯一の例として挙げられる。

5' - ビオチン T C C C G A A A A T C G T G G T - 3'

【0113】

ハイブリダイゼーション反応は6×SSPE-バッファ(52.59g NaCl、8.28g NaH₂PO₄×H₂O、2.22g EDTA×2H₂Oを含む二回蒸留H₂Oの1l溶液。NaOHでpH7.4に調節)/0.1%SDSをターゲット濃度が100nM、10nM、1nM、100pM、10pM、1pMとなるように全量70μlとして行った。各濃度の段階で、プローブ・アレイを有するチップをハイブリダイゼーション溶液に加え、95℃で5分間加熱し、30℃で60分間振とうしインキュベートした。次いで、チップを500μlのハイブリダイゼーション・バッファ(ターゲット含まず)を入れた新しい反応容器に移し、55℃または60℃で10分間振とう洗浄した。次いで、チップをさらに、2×SSC/0.2%SDS(500μl、30℃)、2×SSC(500μl、20℃)および0.2×SSC(500μl、20℃)中10分間振とう洗浄し乾燥した(エッペンドルフ濃縮器)。

10

【0114】

ハイブリダイゼーションの検出(共役体形成および銀染色)

ハイブリダイズし乾燥させたチップをストレプトアビジン-金共役体の6×SSPE/0.1%SDS-バッファ溶液をμl入れた新しい反応容器に移し、30℃で15分間インキュベートした。ストレプトアビジン-金共役体には5nmの金粒子(ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル(British BioCell International)社、EM.STP5)を用いた。共役体は溶液中に500pgストレプトアビジン/μlの濃度で含まれていた。

20

【0115】

共役体形成後、チップを2×SSC/0.2%SDS(500μl、30℃)、2×SSC(500μl、20℃)および0.2×SSC(500μl、20℃)で10分間振とう洗浄し、次いで乾燥した(エッペンドルフ濃縮器)。

【0116】

この方法の別法として、ストレプトアビジン-金共役体の結合をハイブリダイゼーション溶液中で直接に行った。この目的のために、60分間のハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン-金共役体を直接にハイブリダイゼーション溶液に添加し、次いで、30℃で15分間インキュベートした。この後、チップを500μlのハイブリダイゼーション・バッファ(ターゲット含まず)を入れた新しい反応容器に移し、55℃または60℃で10分間振とう洗浄した。この後、チップを、2×SSC/0.2%SDS(500μl、30℃)、2×SSC(500μl、20℃)および0.2×SSC(500μl、20℃)中10分間振とう洗浄し乾燥した(エッペンドルフ濃縮器)。

30

【0117】

銀による増強のため、チップを新しい反応容器に移し、25℃で10分間振とうし約100μlの銀増強溶液(ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル(British BioCell International)社、SEKL15)中でインキュベートした。インキュベーション用溶液は、開始液と増強剤溶液各1滴から製造した。次いで、チップを、0.2×SSC(500μl)中で2分間洗浄し乾燥した(エッペンドルフ濃縮器)。

40

ハイブリダイゼーションおよび検出の2例を、図6aおよび図6bに示す(透過光写真)。

【0118】

実施例4:核酸ハイブリダイゼーションの検出および特異性

CFTR遺伝子については、嚢胞性線維症を引き起こし得る800以上の変異例が文献に記載されている。CFTR遺伝子の変異には3つのタイプがある。

- ・塩基交換(ここでは点変異)
- ・挿入

50

・欠失

【0119】

これら3つの変異タイプすべてについて、銀増強検出で野生型 (p m) を変異 (m m) から識別することができる。プローブおよびターゲットはオガム (O g h a m) 社 (ドイツ、ミュンヘン) によって調製された。

【0120】

プローブ・アレイの調製

アミノ修飾した16~22ヌクレオチド長の10個のオリゴヌクレオチドを、Micro Grid II - Arrayer (バイオロボティクス (B i o R o b o t i c s) 社) を用いて、エポキシ化3D-顕微鏡スライドガラス (75mm x 25mm) (エリプサ (E l i p s a) 社) のガラス表面上の所定部位に塗布し、共有結合により固定した (アレイ要素) 。10個のプローブは5対に分けられ、うち一方は常に野生型であり、他方が変異型である。プローブ対1と2は点変異であり、プローブ対3と4は欠失、プローブ対5/6、7/8および9/10は挿入である。オリゴヌクレオチド配列は以下の通りである：

【0121】

配列は5' - 3' の方向であり3' - NH₂ 修飾がある。

1 :	G A T C T T C G C C T T A C T G	p m
2 :	G A T C T T C A C C T T A C T G	m m
3 :	G A A A C A C C A A A G A T G A T A	p m
4 :	G A A A C A C C G A T G A T A	m m
5 :	C T T C T A A T T A T T T G G T A T G T	p m
6 :	C T T C T A A T T A T T T T G G T A T G T	m m
7 :	G A G T T C T T C T A A T T A T T T G G	p m
8 :	G A G T T C T T C T A A T T A T T T T G G	m m
9 :	T T T T A G A G T T C T T C T A A T T A T	p m
10 :	T T T T A G A G T T C T T C T A A T T A T T	m m

【0122】

プローブ対3 (野生型) と4 (欠失) は嚢胞性線維症をコードする最も頻度の高い変異を含んでいる (全症例の70%) 。

スライドガラス表面上の1個の完全な (正方形) プローブ・アレイは、合計で10 x 10 = 100個の塗布したプローブを含んでいる。10個のオリゴヌクレオチド・プローブをそれぞれプローブ・アレイ上に8~10回塗布した (アレイ構成は図7参照) 。プローブは0.2mm離し、プローブ・アレイ全体で2mm x 2mmの領域を覆った。このようにして、100枚以上の同一のプローブ・アレイを各スライドガラス上に製造することができた。

【0123】

プローブを各オリゴヌクレオチドの0.1Mリン酸塩バッファ/5%硫酸ナトリウム溶液10μMとして塗布した。塗布乾燥後、60℃で30分間加熱することによりガラス表面のエポキシ基にプローブを共有結合させた。次いで、スライドガラスを洗浄し、以下の順序でブロックした。

【0124】

600ml 二回蒸留H₂O + 600μl Triton x 100 中5分間
 600ml 二回蒸留H₂O + 60μl 濃塩酸 中2 x 2分間
 100mM KCl 溶液中30分間
 二回蒸留H₂O 中1分間洗浄
 ガラス皿上、二回蒸留H₂O 75ml + 25ml エチレングリコール + 20μl 濃塩酸
 中で50℃で15分間インキュベート
 二回蒸留H₂O 中1分間洗浄
 圧縮空気で乾燥

10

20

30

40

50

【0125】

洗浄乾燥後、スライドガラスを3.25 mm × 3.25 mmの大きさのピース（以下、「チップ」と呼ぶ）に切断した。各チップ上には、2 mm × 2 mmのプローブ・アレイがちょうど1個載っていた。

【0126】

プローブ・アレイのハイブリダイゼーションおよび共役体形成

ビオチン標識した3個の相補的ターゲットが、10個のオリゴヌクレオチド・プローブと完全一致（pm）ハイブリダイゼーション用に利用できた。ターゲット1はプローブ対1と2を、ターゲット2はプローブ対3と4を、ターゲット3はプローブ対5/6、7/8および9/10をカバーした。これらのターゲットの配列は以下の通りである。

ターゲット1： 5' - ビオチン - CTCAGTAAGGCGAAGATCTT - 3'

ターゲット2： 5' - ビオチン - AATATCATCTTTGGTGTTCCT - 3'

ターゲット3： 5' - ビオチン - GAACATACCAATAATTAGAGAACA
ACTCTAAACA - 3'

【0127】

ハイブリダイゼーション反応は、6 × SSPEバッファ（52.59 g NaCl、8.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 、2.22 g $\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ を二回蒸留 H_2O の1 l水溶液としNaOHでpH7.4に調整したもの）/ 0.1% SDSの全量70 μl で種々のターゲット濃度としたものにおいて行った。この目的のためにプローブ・アレイを有するチップをハイブリダイゼーション溶液に入れ、95 °Cで5分間加熱し、次いで30 °Cで60分間振とうインキュベートした。

【0128】

60分間ハイブリダイゼーションをした後、ストレプトアビジン - 金共役体をハイブリダイゼーション溶液に直接添加し、次に更に15分間30 °Cでインキュベートした。ストレプトアビジン - 金共役体には5 nmの金粒子（ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル（British BioCell International）社、EMSTP5）を用いた。この実験における共役体濃度は500 pg ストレプトアビジン / μl であった。

【0129】

ハイブリダイゼーションおよび共役体形成後、チップを500 μl のハイブリダイゼーション・バッファ（ターゲット含まず）を入れた新しい反応容器に移し、55 °Cで10分間振とう洗浄した。その後、チップを、2 × SSC / 0.2% SDS（500 μl 、30 °C）、2 × SSC（500 μl 、20 °C）および0.2 × SSC（500 μl 、20 °C）中で10分間振とう洗浄し、次いで乾燥した（エッペンドルフ濃縮器）。

【0130】

銀増強

銀による増強のため、チップを新しい反応容器に移し、25 °Cで10分間振とうし約100 μl の銀増強溶液（ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル（British BioCell International）社、SEKL15）中でインキュベートした。インキュベーション用溶液は、開始液と増強剤溶液各1滴を混合することにより製造した。次いで、チップを、0.2 × SSC（500 μl ）中で2分間洗浄し乾燥した（エッペンドルフ濃縮器）。

【0131】

3例のハイブリダイゼーションおよびその検出結果を、図8、9および10に示す（透過光像）。点変異（図8）と欠失（図9）は、野生型（pm）および変異型（mm）と明瞭に区別できるが、これは挿入（図10）には当て嵌まらない。この場合、変異（プローブ10）さえ、野生型（プローブ9）より強い信号を与える。この実験の設計では、ハイブリダイゼーションの検出限界はターゲット濃度10 pMである。

【0132】

10

20

30

40

50

実施例 5 : オリゴヌクレオチド金共役体を用いた方法の有用性の原理の証明

プローブ・アレイの調製

16ヌクレオチド長の16個のアミノ修飾オリゴヌクレオチド(プローブ)をMicro Grid II-Arrayer(バイオロボティクス(BioRobotics)社)を用いて所定部位に塗布し、3D-顕微鏡スライドガラス(75mm×25mm)(エリプサ(Elipso)社)のエポキシ化ガラス表面上に共有結合により固定した(アレイ要素)。オリゴヌクレオチドはいずれも3'修飾がなされており、その配列は以下の通りである:

【0133】

1:	3' -	ATG	GCG	TTT	AGA	ACC	C	- 5'	10
2:	3' -	ATG	CCG	TAT	GGA	ATC	C	- 5'	
3:	3' -	ATG	TCG	TGT	CGA	AAC	C	- 5'	
4:	3' -	ATG	ACG	TCT	TGA	AGC	C	- 5'	
5:	3' -	ACG	GCA	TTT	AGT	ACC	G	- 5'	
6:	3' -	ACG	CCA	TAT	GGT	ATC	G	- 5'	
7:	3' -	ACG	TCA	TGT	CGT	AAC	G	- 5'	
8:	3' -	ACG	ACA	TCT	TGT	AGC	G	- 5'	
9:	3' -	AGG	GCT	TTT	AGC	ACC	A	- 5'	
10:	3' -	AGG	CCT	TAT	GGC	ATC	A	- 5'	
11:	3' -	AGG	TCT	TGT	CGC	AAC	A	- 5'	20
12:	3' -	AGG	ACT	TCT	TGC	AGC	A	- 5'	
13:	3' -	AAG	GCC	TTT	AGG	ACC	T	- 5'	
14:	3' -	AAG	CCC	TAT	GGG	ATC	T	- 5'	
15:	3' -	AAG	ACC	TCT	TGG	AGC	T	- 5'	
16:	3' -	AAG	TCC	TGT	CGG	AAC	T	- 5'	

【0134】

スライドガラス表面上の1個の完全な(正方形)プローブ・アレイは、合計で10×10=100個の塗布したプローブを含んでいた。16個のオリゴヌクレオチド・プローブをそれぞれプローブ・アレイ上に少なくとも5回塗布した(アレイ構成は図11参照)。プローブは0.2mm離し、プローブ・アレイ全体で2mm×2mmの領域を覆った。このようにして、100枚以上の同一のプローブ・アレイを各スライドガラス上に製造することができた。 30

【0135】

プローブを各オリゴヌクレオチドの0.1Mリン酸塩バッファ/5%硫酸ナトリウム溶液10μMとして塗布した。塗布乾燥後、60℃で30分間加熱することによりガラス表面のエポキシ基にプローブを結合させた。次いで、スライドガラスを洗浄し、以下の順序でブロックした。

【0136】

600ml 二回蒸留H₂O + 600μl Triton X-100 中5分間
 600ml 二回蒸留H₂O + 60μl 濃塩酸 中2×2分間 40
 100mM KCl 溶液中30分間
 二回蒸留H₂O 中1分間洗浄
 ガラス皿上、二回蒸留H₂O 75ml + 25ml エチレングリコール + 20μl 濃塩酸
 中で50℃で15分間インキュベート
 二回蒸留H₂O 中1分間洗浄
 圧縮空気で乾燥
 洗浄乾燥後、スライドガラスを3.25mm×3.25mmの大きさのピース(以下、「チップ」と呼ぶ)に切断した。各チップ上には、2mm×2mmのプローブ・アレイがちょうど1個載っていた。

【0137】

MicroGrid II-Arrayer (バイオロボティクス (BioRobotics) 社) を用いて、エポキシ化 3D-顕微鏡スライドガラス (75 mm × 25 mm) (エリプサ (Elipsa) 社) のガラス表面上の所定部位に塗布し、共有結合により固定した (アレイ要素)。10 個のプローブは 5 対に分けられ、うち一方は常に野生型であり、他方が変異型である。プローブ対 1 と 2 は点変異であり、プローブ対 3 と 4 は欠失、プローブ対 5 / 6、7 / 8 および 9 / 10 は挿入である。オリゴヌクレオチド配列は以下の通りである:

【0144】

配列は 5' - 3' の方向であり 3' - NH₂ 修飾がある。

1:	GATCTTCGCCTTACTG	pm	10
2:	GATCTTCACCTTACTG	mm	
3:	GAAACACCAAAGATGATA	pm	
4:	GAAACACC GATGATA	mm	
5:	CTTCTAATTA TTTGGTATGT	pm	
6:	CTTCTAATTA TTTGGTATGT	mm	
7:	GAGTTCCTTCTAATTA TTTGG	pm	
8:	GAGTTCCTTCTAATTA TTTGG	mm	
9:	TTTTAGAGTTCTTCTAATTA T	pm	
10:	TTTTAGAGTTCTTCTAATTA T	mm	20

【0145】

プローブ対 3 (野生型) と 4 (欠失) は嚢胞性線維症をコードする最も頻度の高い変異に対応している (全症例の 70%)。

【0146】

スライドガラス表面上の 1 個の完全な (正方形) プローブ・アレイは、合計で 10 × 10 = 100 個のプローブを含んでいる。オリゴヌクレオチド・プローブをそれぞれプローブ・アレイ上に 8 ~ 10 回塗布した (アレイ構成は図 13 参照)。プローブは 0.2 mm 離し、プローブ・アレイ全体で 2 mm × 2 mm の領域を覆った。このようにして、100 枚以上の同一のプローブ・アレイを各スライドガラス上に製造することができた。

【0147】

プローブを各オリゴヌクレオチドの 0.1 M リン酸塩バッファ / 5% 硫酸ナトリウム溶液 10 μM として塗布した。塗布乾燥後、60 °C で 30 分間加熱することによりガラス表面のエポキシ基にプローブを結合させた。次いで、スライドガラスを洗浄し、以下の順序でブロックした。

【0148】

600 ml 二回蒸留 H₂O + 600 μl Triton X-100 中 5 分間
 600 ml 二回蒸留 H₂O + 60 μl 濃塩酸 中 2 × 2 分間
 100 mM KCl 溶液中 30 分間
 二回蒸留 H₂O 中 1 分間 リンス
 ガラス皿上、二回蒸留 H₂O 75 ml + 25 ml エチレングリコール + 20 μl 濃塩酸
 中で 50 °C で 15 分間 インキュベート
 二回蒸留 H₂O 中 1 分間 リンス
 圧縮空気で乾燥

【0149】

洗浄乾燥後、スライドガラスを 3.25 mm × 3.25 mm の大きさのピース (以下、「チップ」と呼ぶ) に切断した。各チップ上には、2 mm × 2 mm のプローブ・アレイがちょうど 1 個載っていた。

【0150】

プローブ・アレイのハイブリダイゼーションおよび共役体形成
 ビオチン標識した 3 個の相補的ターゲットが、10 個のオリゴヌクレオチド・プローブと完全一致 (pm) ハイブリダイゼーション用に利用できた。ターゲット 1 はプローブ対 1

10

20

30

40

50

と2を、ターゲット2はプローブ対3と4を、ターゲット3はプローブ対5 / 6、7 / 8 および9 / 10をカバーした。これらのターゲットの配列は以下の通りである。

ターゲット1： 5' - ビオチン - CTCAGTAAGGCGAAGATCTT - 3'

ターゲット2： 5' - ビオチン - AATAATCATCTTTGGTGTTCCT - 3'

ターゲット3： 5' - ビオチン - GAACATACCAAAATAATTAGAAGAACTCTAAACA - 3'

【0151】

ハイブリダイゼーション反応は、6 x SSEバッファ (52.59 g NaCl、8.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 、2.22 g $\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ を二回蒸留 H_2O の1 l水溶液としNaOHでpH7.4に調整したもの) / 0.1% SDSの全量70 μl で、3種のターゲットのいずれも100 pM濃度として行った。この目的のためにプローブ・アレイを有するチップをハイブリダイゼーション溶液に入れ、95 で5分間加熱し、次いで30 で60分間振とうしインキュベートした。

【0152】

60分間のハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体を直接にハイブリダイゼーション用溶液に加え、30 でさらに15分間インキュベートした。ストレプトアビジン - 金共役体には5 nmの金粒子 (ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル (British BioCell International) 社、EM.STP5) を用いた。この実験における共役体は、500 pgストレプトアビジン / μl の濃度で用いた。

【0153】

ハイブリダイゼーションおよび共役体形成後、チップを500 μl のハイブリダイゼーション・バッファ (ターゲット含まず) を入れた新しい反応容器に移し、55 で10分間振とう洗浄した。その後、チップを、2 x SSC / 0.2% SDS (500 μl 、30)、2 x SSC (500 μl 、20) および0.2 x SSC (500 μl 、20) 中10分間洗浄し乾燥した (エッペンドルフ濃縮器)。

【0154】

銀増強、検出および評価

銀による増強のため、チップを閉じた反応容器 (図1参照) に固定し、銀増強溶液 (ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル (British BioCell International) 社、SEKL15) を塗布した。インキュベーション用溶液は、開始液と増強剤溶液各1滴を混合することにより製造した。21 で30分間インキュベートし、この間、銀増強の時間経過を毎分1枚の写真撮影で記録した (このための光源としては赤色LEDを使用した)。

【0155】

次いで、写真を、写真評価ソフトウェアIconoClust (クローンディアグ (Clondia) 社) を用いて評価した。

例として、図14aと14bは、銀増強開始後5分と10分のチップ写真を示す。ハイブリダイゼーションはターゲット2を用いて行った。図15はこの反応の時間経過を示す。

【0156】

実施例7：核酸ハイブリダイゼーションの検出および特異性 - 時間経過の測定
 嚢胞性線維症の症状につながり得る800以上のCFTR遺伝子変異が文献上知られている。CFTR遺伝子の変異には3つのタイプがある。

【0157】

- ・塩基交換 (ここでは点変異)
- ・挿入
- ・欠失

これら3つの変異タイプすべてについて、銀増強検出で野生型 (pm) を変異 (mm) から識別できることを確認するため試験を行う。

プローブおよびターゲットはオガム (Ogham) 社 (ドイツ、ミュンヘン所在) から提供を受けた。

【0158】

プローブ・アレイの調製

アミノ修飾した16~22ヌクレオチド長の10個のオリゴヌクレオチド(プローブ)をMicroGrid II-Arrayer(バイオロボティクス(BioRobotics)社)を用いて、エポキシ化3D-顕微鏡スライドガラス(75mm×25mm)(エリプサ(Elipso)社)のガラス表面上の所定部位に塗布し、共有結合により固定した(アレイ要素)。10個のプローブは5対に分けられ、うち一方は常に野生型であり、他方が変異型である。プローブ対1と2は点変異であり、プローブ対3と4は欠失、

10

【0159】

配列は5'-3'の方向であり3'-NH₂修飾がある。

```

1:   G A T C T T C G C C T T A C T G           p m
2:   G A T C T T C A C C T T A C T G           m m
3:   G A A A C A C C A A A G A T G A T A       p m
4:   G A A A C A C C   G A T G A T A           m m
5:   C T T C T A A T T A   T T T G G T A T G T   p m
6:   C T T C T A A T T A T T T T G G T A T G T   m m
7:   G A G T T C T T C T A A T T A   T T T G G   p m
8:   G A G T T C T T C T A A T T A T T T T G G   m m
9:   T T T T A G A G T T C T T C T A A T T A T   p m
10:  T T T T A G A G T T C T T C T A A T T A T T   m m

```

20

【0160】

プローブ対3(野生型)と4(欠失)は、嚢胞性線維症をコードする最も高頻度の変異を含む(全症例の70%)。

スライドガラス表面上の1個の完全な(正方形)プローブ・アレイは、合計で10×10=100個のプローブを含んでいる。10個のオリゴヌクレオチド・プローブをそれぞれプローブ・アレイ上に8~10回塗布した(アレイ構成は図16参照)。プローブ間の間隔は0.2mmとし、プローブ・アレイ全体で2mm×2mmの領域を覆った。このようにして、100枚以上の同一のプローブ・アレイを各スライドガラス上に製造することができた。

30

【0161】

プローブを各オリゴヌクレオチドの0.1Mリン酸塩バッファ/5%硫酸ナトリウム溶液10μMとして塗布した。塗布乾燥後、60℃で30分間加熱することによりガラス表面のエポキシ基にプローブを共有結合させた。次いで、スライドガラスを洗浄し、以下の順序でブロックした。

【0162】

600ml二回蒸留H₂O+600μl Triton×100中5分間
600ml二回蒸留H₂O+60μl濃塩酸中2×2分間
100mM KCl溶液中30分間
二回蒸留H₂O中1分間洗浄
ガラス皿上、二回蒸留H₂O75ml+25ml エチレングリコール+20μl濃塩酸
中で50℃で15分間インキュベート
二回蒸留H₂O中1分間洗浄
圧縮空気で乾燥
洗浄乾燥後、スライドガラスを3.25mm×3.25mmの大きさのピース(以下、「チップ」と呼ぶ)に切断した。各チップ上には、2mm×2mmのプローブ・アレイがちょうど1個載っていた。

40

50

【0163】

プローブ・アレイのハイブリダイゼーションおよび共役体形成

ビオチン標識した3個の相補的ターゲットが、10個のオリゴヌクレオチド・プローブと完全一致 (pm) ハイブリダイゼーション用に利用できた。ターゲット1はプローブ対1と2を、ターゲット2はプローブ対3と4を、ターゲット3はプローブ対5/6、7/8および9/10をカバーした。これらのターゲットの配列は以下の通りである。

ターゲット1: 5' - ビオチン - CTCAGTAAGGCGAAGATCTT - 3'

ターゲット2: 5' - ビオチン - AATATCATCTTTGGTGTTCCT - 3'

ターゲット3: 5' - ビオチン - GAACATACCAAATAATTAGAAGA
ACTCTAAACA - 3' 10

【0164】

ハイブリダイゼーション反応は、6xSSPEバッファ(52.59g NaCl、8.28g NaH₂PO₄ × H₂O、2.22g EDTA × 2H₂Oを二回蒸留H₂Oの1l水溶液としNaOHでpH7.4に調整したもの)/0.1%SDSの全量70μlで、3種のターゲットのいずれも100pM濃度として行った。この目的のためにプローブ・アレイを有するチップをハイブリダイゼーション溶液に入れ、95℃で5分間加熱し、次いで30℃で60分間振とうインキュベートした。

【0165】

60分間のハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体を直接にハイブリダイゼーション用溶液に加え、30℃でさらに15分間インキュベートした。ストレプトアビジン - 金共役体には5nmの金粒子(ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル(British BioCell International)社、EM.STP5)を用いた。この実験における共役体は、125pgストレプトアビジン/μlの濃度で用いた。 20

【0166】

ハイブリダイゼーションおよび共役体形成後、チップを500μlのハイブリダイゼーション・バッファ(ターゲット含まず)を入れた新しい反応容器に移し、55℃で10分間振とう洗浄した。その後、チップを、2xSSC/0.2%SDS(500μl、30℃)、2xSSC(500μl、20℃)および0.2xSSC(500μl、20℃) 30
中10分間洗浄し乾燥した(エッペンドルフ濃縮器)。

【0167】

銀増強、検出および評価

銀による増強のため、チップを閉じた反応容器(図1参照)に固定し、銀増強溶液(ブリティッシュ・バイオセル・インターナショナル(British BioCell International)社、SEKL15)を塗布した。インキュベーション用溶液は、開始液と増強剤溶液各1滴を混合することにより製造した。27℃で20分間インキュベートし、この間、銀増強の時間経過を10秒ごとに1枚の写真撮影で記録した(このための光源としては赤色LEDを使用した)。次いで、写真を、写真評価ソフトウェアIconoClust(クローンディアグ(Clondia)社)を用いて評価した。 40

【0168】

結果を図17~20および表2に示す。各プローブについて、各曲線の指数関数的増加領域において直線状回帰線を決定し、これらは各ターゲット濃度に典型的である。これに基づいて未知のターゲット濃度を評価することができる。このための同一の共役体量、同一の固定プローブ濃度、同一の実験パラメータである。

【0169】

【表2】

選択されたプローブ（アレイ要素）およびチップ・バックグラウンドについての線形回帰式。
各回帰線における傾斜を太字印刷で示す（ x ：銀増強開始後の時間（分）、 y ：ターゲット3の濃度
100 nM および 1 nMでのハイブリダイゼーションについて有効な分範囲の信号強度）

プローブ・アレイ要素	ターゲット濃度	時間範囲	方程式 $f(x)$	標準誤差	
バックグラウンド	100 nM	1-20	$y=0.0551+(0.013*x)$	0.971	0.014
バックグラウンド	1 nM	1-20	$y=0.0161+(0.013*x)$	0.984	0.01
プローブ 5 pm	100 nM	4-13	$y=-0.263+(0.0740*x)$	0.993	0.021
プローブ 5 pm	1 nM	4-13	$y=-0.259+(0.0677*x)$	0.989	0.023
プローブ 6 mm	100 nM	4-13	$y=-0.246+(0.0647*x)$	0.991	0.02
プローブ 6 mm	1 nM	4-13	$y=-0.153+(0.0417*x)$	0.969	0.024

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プローブ - ターゲット間相互作用の定性的および / または定量的検出装置を示す図である。

【図 2】

図 3 に示すハイブリダイゼーション結果の時間経過の記録を示すグラフである。

20

【図 3】

ハイブリダイゼーション結果を表示する図であり、

A - ターゲット濃度 10 nMでのハイブリダイゼーション

B - ターゲット濃度 1 nMでのハイブリダイゼーション

C - ターゲット濃度 100 pMでのハイブリダイゼーション

D - ターゲット濃度 10 pMでのハイブリダイゼーション

である。

【図 4】

プローブ・アレイ（356プローブ）に対する *Corynebacterium glutamicum* 由来のゲノムRNAのハイブリダイゼーション検出 - 15分間インキュベーション後のパターンを示す図である。

30

【図 5】

大きさ 2 mm x 2 mm で 10 x 10 = 100 個のプローブを含むアレイアセンブリを示す図であり、数字 1 ~ 16 は、それぞれアレイ上に 5 または 6 回塗布したオリゴヌクレオチド・プローブを表わし、「M」は、固定化したピオチン標識オリゴヌクレオチドを含むマーカ混合物を表わす（なお、アレイ上の + とした場所（1箇所）は使用していない）。

【図 6】

ハイブリダイゼーション、共役体形成および銀増強後のプローブ・アレイ（アレイアセンブリ。図 5 参照）を示す図である。

a) 左図：ターゲット 9 b (100 nM) - 30 でのハイブリダイゼーション；1 洗浄ステップ (60)；ストレプトアビジン - 金共役体形成 (500 pg / μl)；銀増強 (10 分間 25)。

40

特異的プローブ 9 (およびマーカ) の他に、プローブ 13 からの弱い非特異的信号が見られる。

b) 右図：ターゲット 9 b (100 pM) - 30 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体の直接添加 (500 pg / μl)；1 洗浄ステップ (60)；銀増強 (10 分間 25)。

【図 7】

大きさ 2 mm x 2 mm で 10 x 10 = 100 個のプローブを含むアレイアセンブリを示す図であり、数字 1 ~ 10 は、それぞれアレイ上に 8 ~ 10 回塗布したオリゴヌクレオチド

50

・プローブを表わし、「M」は、固定化したビオチン標識オリゴヌクレオチドを含むマーカ混合物を表わす。

【図 8】

ハイブリダイゼーション、共役体形成および銀増強後のプローブ・アレイ（アレイアセンブリ。図 7 参照）を示す図である。

ターゲット 1（100 pM）- 30 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体の直接添加（500 pg / μ l）；1 洗浄ステップ（55 ）；銀増強（10 分間 25 ）。

【図 9】

ハイブリダイゼーション、共役体形成および銀増強後のプローブ・アレイ（アレイアセンブリ。図 1 参照）を示す図である。 10

ターゲット 2（100 pM）- 30 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体の直接添加（500 pg / μ l）；1 洗浄ステップ（55 ）；銀増強（10 分間 25 ）。

【図 10】

ハイブリダイゼーション、共役体形成および銀増強後のプローブ・アレイ（アレイアセンブリ。図 1 参照）を示す図である。

ターゲット 3（100 pM）- 30 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体の直接添加（500 pg / μ l）；1 洗浄ステップ（55 ）；銀増強（10 分間 25 ）。

20

【図 11】

大きさ 2 mm \times 2 mm で 10 \times 10 = 100 個のプローブを含むアレイアセンブリであり、数字 1 ~ 16 は、それぞれアレイ上に 5 または 6 回塗布したオリゴヌクレオチド・プローブを表わし、「M」は、固定化したビオチン標識オリゴヌクレオチドを含むマーカ混合物を表わす（なお、アレイ上の 1 箇所は使用していない）。

【図 12】

ハイブリダイゼーション、共役体形成および銀増強後のプローブ・アレイ（アレイアセンブリ。図 11 参照）を示す図である。

ターゲット 9c（1 nM）- 30 、60 分間ハイブリダイゼーション後、T20 ナノ金（1 : 100 希釈）の添加；さらに 30 30 分間インキュベーション；1 洗浄ステップ（55 ）；銀増強（10 分間 25 ）。

30

プローブ 9（およびマーカ）の特異的強い信号の他に、他のプローブが弱い信号を与える。いくつかのスポットは染み状で不均一である。これはプローブ塗布時のアレイ中の不純物によるものであった。

【図 13】

大きさ 2 mm \times 2 mm で 10 \times 10 = 100 個のプローブを含むアレイアセンブリであり、数字 1 ~ 10 は、それぞれアレイ上に 5 または 6 回塗布したオリゴヌクレオチド・プローブを表わし、「M」は、固定化したビオチン標識オリゴヌクレオチドを含むマーカ混合物を表わす。

【図 14】

ハイブリダイゼーション、共役体形成および銀増強後のプローブ・アレイ（アレイアセンブリ。図 1 参照）を示す図である。 40

ターゲット 2（100 pM）- 30 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体の直接添加（500 pg / μ l）；1 洗浄ステップ（55 ）

a) 左写真：銀増強開始後 5 分。

b) 右写真：銀増強開始後 10 分。

【図 15】

銀増強後の時間経過（図 13 および 14 参照）を示すグラフである。

毎分測定、各測定点は 10 回の繰り返しスポットの平均

p m : 完全一致プローブ（プローブ番号 3）

50

mm : 不一致プローブ (プローブ番号 4)

ターゲット 2 (100 pM) - 30 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体の直接添加 (500 pg / μ l)。

【図 16】

大きさ 2 mm \times 2 mm で 10 \times 10 = 100 個のプローブを含むアレイアセンブリを示す図であり、数字 1 ~ 10 は、それぞれアレイ上に 8 ~ 10 回塗布したオリゴヌクレオチド・プローブを表わし、「M」は、固定化したビオチン標識オリゴヌクレオチドを濃度 10 μ M で含むマーカ混合物を表わす。

ハイブリダイズしたターゲット 3 は、プローブ 5, 7, 9 (それぞれ完全一致) およびプローブ 6, 8, 10 (1 個の欠失でそれぞれ不一致) に相補的であった。

10

【図 17】

ハイブリダイゼーションおよび共役体形成後のプローブ・アレイ (アレイアセンブリ。図 16 参照) を示す図である。

写真は左から右に銀増強開始後 5 分, 10 分, 20 分。

上: ターゲット 3 (1 nM) - ハイブリダイゼーション

下: ターゲット 3 (100 nM) - ハイブリダイゼーション

【図 18】

相異なる 2 種類のターゲット濃度における銀増強後様々な時点での信号強度 (図 17 中の写真参照) を示すグラフである。

【図 19 a】

例としてプローブ 5 と 6 を用いた銀増強の時間経過 (図 16 ~ 18 参照) を示すグラフである。

20

プローブの各測定点は 7 ~ 10 回の繰り返しスポットの平均。

pm : 完全一致プローブ (プローブ番号 5)

mm : 不一致プローブ (プローブ番号 6)

a : ターゲット 3 (1 nM) - 55 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体形成 (125 pg / μ l)。

【図 19 b】

例としてプローブ 5 と 6 を用いた銀増強の時間経過 (図 16 ~ 18 参照) を示すグラフである。

30

プローブの各測定点は 7 ~ 10 回の繰り返しスポットの平均。

pm : 完全一致プローブ (プローブ番号 5)

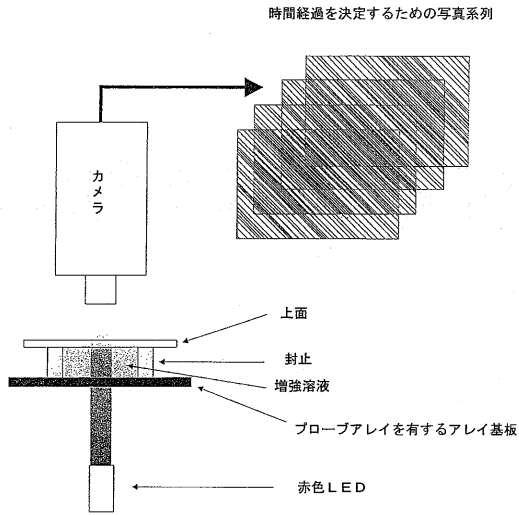
mm : 不一致プローブ (プローブ番号 6)

b : ターゲット 3 (100 nM) - 55 でのハイブリダイゼーション後、ストレプトアビジン - 金共役体形成 (125 pg / μ l)。

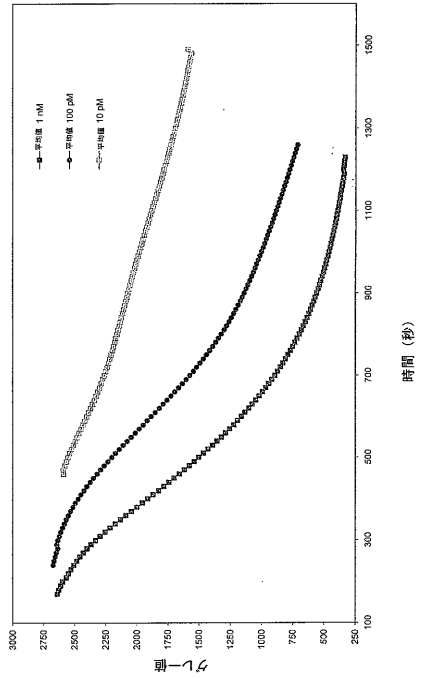
【図 20】

プローブ・アレイ上の 2 つの選択したプローブについてのターゲット 3 (100 nM および 1 nM) によるハイブリダイゼーション後の直線状回帰線 (計算値) を示すグラフであり、銀増強開始後 4 ~ 13 分が有効である。

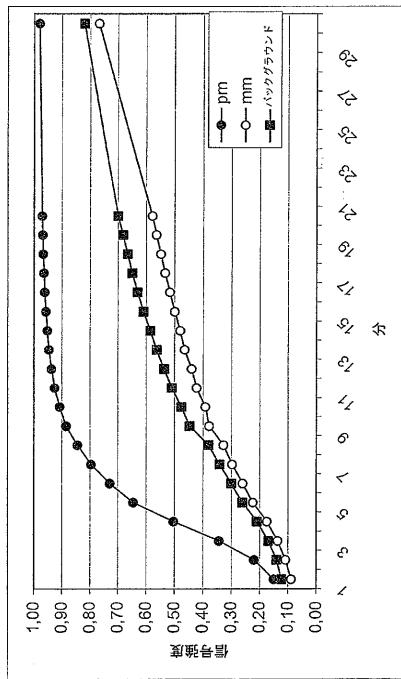
【 図 1 】



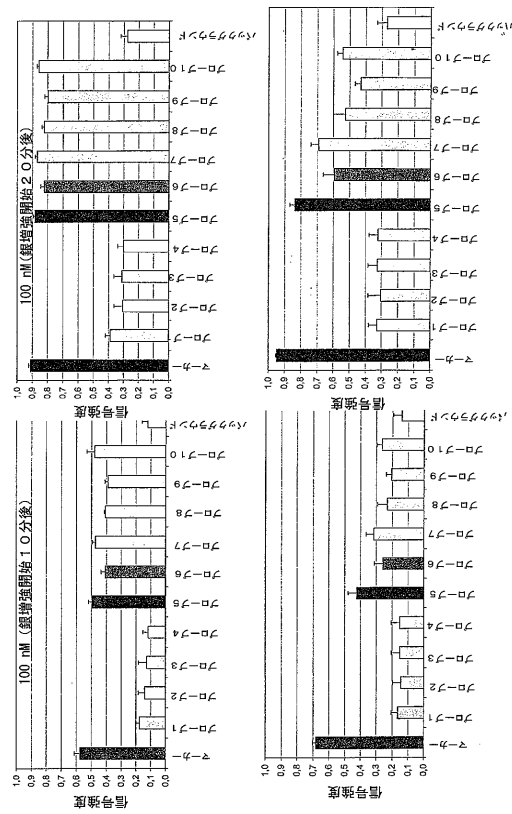
【 図 2 】



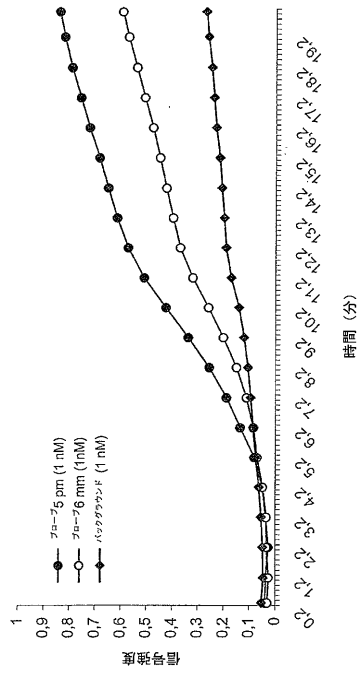
【 図 15 】



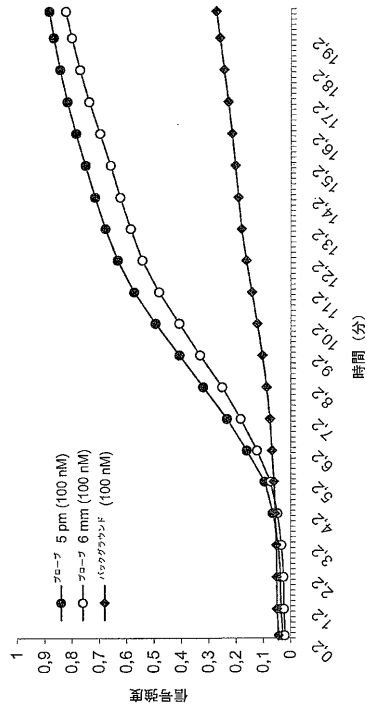
【 図 18 】



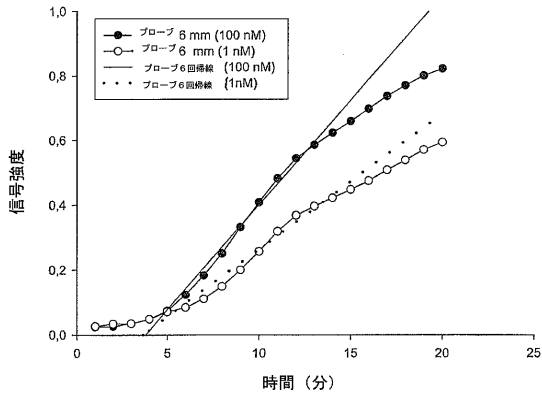
【図 19 a】



【図 19 b】



【図 20】



【国際公開パンフレット】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Januar 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/02810 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68 (74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald Patentanwalts
GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07575
- (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juli 2001 (02.07.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 33 334.6 1. Juli 2000 (01.07.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Löbstedter Strasse 105, 07743 Jena (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BICKEL, Ralf [DE/DE]; Am Kiesbühl 37, 07743 Jena (DE); EHRICHT, Ralf [DE/DE]; Rosenstrasse 8, 07749 Jena (DE); ELLINGER, Thomas [DE/DE]; Ottegard-Mühlmann-Strasse 19, 07743 Jena (DE); ER-MANTRAUT, Eugen [DE/DE]; Mühlstrasse 4, 07745 Jena (DE); KAISER, Thomas [DE/DE]; Talstrasse 73, 07743 Jena (DE); SCHULZ, Torsten [DE/DE]; August-Bebel-Strasse 22, 07743 Jena (DE); WAGNER, Gerd [DE/DE]; Ulrichweg 4, 07745 Jena (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- 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 FOR QUALITATIVE AND/OR QUANTITATIVE DETECTING OF MOLECULAR INTERACTIONS ON PROBE ARRAYS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM QUALITATIVEN UND/ODER QUANTITATIVEN NACHWEIS VON MOLEKULAREN WECHSELWIRKUNGEN AUF SONDEN-ARRAYS

(57) Abstract: The invention relates to a method for qualitatively and/or quantitatively detecting certain molecular targets using probe arrays. The inventive detection method comprises a reaction which delivers a product with a particular solubility product, this solubility product causing the precipitation or the formation of a precipitate of the product on an array element of the probe array on which an interaction has taken place between the probe and the target.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von bestimmten molekularen Targets mit Hilfe von Sonden-Arrays, wobei der Nachweis bei dem erfindungsgemäßen Verfahren durch eine Reaktion erfolgt, die ein Produkt mit einem bestimmtem Löslichkeitsprodukt liefert, das eine Präzipitation bzw. eine Niederschlagsbildung des Produkts auf einem Array-Element des Sonden-Arrays, an dem eine Wechselwirkung zwischen Sonde und Target stattgefunden hat, zur Folge hat.

WO 02/02810 A2

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von molekularen Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von bestimmten molekularen Targets mit Hilfe von Sonden-Arrays.

- 10 Biomedizinische Tests basieren häufig auf der Feststellung der Wechselwirkung zwischen einem Molekül, das in bekannter Menge und Position vorhanden ist (der molekularen Sonde) und dem nachzuweisenden Molekül bzw. den nachzuweisenden Molekülen (dem molekularen Target). Moderne Tests werden in der Regel mit einer Probe parallel an einigen Sonden durchgeführt (D. J. Lockhart, E. A. Winzler; Genomics, gene expression and DNA arrays; Nature 2000, 405, 827-836). Die
- 15 Sonden werden hierbei üblicherweise in vorgegebener Art und Weise auf einer geeigneten, beispielsweise in WO 00/12575 beschriebenen Matrix immobilisiert (siehe z.B. US 5,412,087, WO 98/36827) bzw. synthetisch erzeugt (siehe z.B. US 5,143,854, US 5,658,734, WO 90/03382).
- 20 Der Nachweis einer solchen Wechselwirkung erfolgt üblicherweise folgendermaßen: Die Sonde bzw. die Sonden werden in vorgegebener Art und Weise an einer bestimmten Matrix fixiert. Die Targets werden in einer Lösung mit den Sonden in Kontakt gebracht und unter definierten Bedingungen inkubiert. In Folge der Inkubation findet zwischen Sonde und Target eine spezifische Wechselwirkung statt.
- 25 Die entstehende Bindung ist deutlich stabiler als die Bindung von Molekülen, für die die Sonde unspezifisch ist. Anschließend wird das System mit entsprechenden Lösungen gewaschen, so daß die Moleküle, die nicht spezifisch gebunden sind, entfernt werden.
- 30 Zum Nachweis der Wechselwirkung zwischen Target und Sonde werden heute eine Vielzahl von Verfahren eingesetzt, von denen einige im folgenden beschrieben werden:

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 2 -

E. Lidell und I. Weeks, *Antibody Technology*, BIOS Scientific Publishers Limited, 1995, beschreiben die Markierung eines Targets mit einem Farbstoff bzw. einem Fluoreszenzfarbstoff und dessen Nachweis mit Hilfe eines Photometers bzw. eines Fluoreszenzdetektors. Die fluorezenzoptische Detektion von Targets, die mit einem fluoreszierenden Marker versehen wurden, ist auch in F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998, beschrieben.

In *Nature Biotechnology* 1998, 16, 725-727 wird der Nachweis des Komplexes aus Target und Sonde durch Massenspektrometrie beschrieben. Ferner werden massensensitive Verfahren wie Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt (J. M. Brockman et al., A multistep chemical modification procedure to create DNA Arrays on Gold surfaces for the study of Protein-DNA Interactions with surface plasmon resonance imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 8044-8051). Die US-Patentschrift 5,605,662 offenbart ein Verfahren zum direkten elektrischen Nachweis der Wechselwirkung. In DE 19543232 ist die Markierung des Targets mit Detektionskügelchen beschrieben, deren Anwesenheit nach der Wechselwirkung des Targets mit den Sonden optisch nachgewiesen wird.

Aus EP 0 063 810 ist ein Verfahren bekannt, bei dem auf einem festen porösen Substrat Targets in Form von Antigenen oder Immunglobulinen immobilisiert werden und durch Anwendung bekannter Techniken der Immunologie, insbesondere ELISA auf ihre Identität und Menge hin geprüft werden.

Zur Detektion molekularer Wechselwirkungen mit Hilfe von Sonden-Arrays auf festen Oberflächen sind verschiedene technische Ansätze beschrieben. Klassische Systeme beruhen auf dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten spektral selektiv angeregter, mit Fluorophoren markierter Targetmoleküle. Dazu sind verschiedene technische Lösungen bekannt, die sich hinsichtlich ihres optischen Aufbaus und der verwendeten Komponenten unterscheiden. Probleme und Limitationen solcher Aufbauten resultieren aus dem Signalrauschen (dem Hintergrund), das durch Effekte

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 3 -

wie Bleichen und Quenching der verwendeten Farbstoffe, Autofluoreszenz der Medien, Assemblierungselementen und optischen Komponenten sowie Streuungen, Reflexionen und Fremdlicht im optischen Aufbau wesentlich bestimmt wird.

- 5 Daraus resultiert ein hoher technischer Aufwand zum Aufbau hochsensitiver Fluoreszenz-Detektoren zum qualitativen und quantitativen Vergleich von Sonden-Arrays. Insbesondere zum Screening mit mittleren und hohen Durchsätzen sind speziell angepasste Detektionssysteme erforderlich, die einen gewissen Automatisierungsgrad besitzen.
- 10 Zur Optimierung von Standardpifluoreszenz-Aufbauten zum Auslesen molekularer Arrays sind CCD-basierte Detektoren bekannt, die zur Diskriminierung von optischen Effekten wie Streuung und Reflexionen die Anregung der Fluorophore im Dunkelfeld durch Auflicht oder Durchlicht realisieren (siehe z.B. C. E. Hooper et al.,
- 15 "Quantitative Photon Imaging in the Life Sciences Using Intensified CCD Cameras", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence (1990), S. 337-344.). Die Abbildung der Assays erfolgt dabei entweder in einer Belichtung oder durch ein Rastern unter Verwendung von höher auflösender Optik. Die Verwendung von multispektralen Belichtungsquellen ermöglicht einen relativ einfachen Zugang zu
- 20 verschiedenen Fluorophoren durch die Verwendung verschiedener Anregungsfilter(-kombinationen). Nachteilig ist allerdings, daß Autofluoreszenz und systembedingte optische Effekte wie die Beleuchtungshomogenität über dem Assay komplizierte Beleuchtungsoptiken und Filtersysteme erfordern.
- 25 Beispielsweise in US 5,304,810 beschriebene konfokale Scanning-Systeme beruhen auf der Selektion der Fluoreszenzsignale entlang der optischen Achse mittels zweier Pinholes. Daraus ergibt sich ein hoher Justageaufwand der Proben bzw. die Etablierung eines leistungsfähigen Autofokussystems. Solche Systeme sind in der technischen Lösung hochkomplex. Erforderliche Komponenten wie Laser, Pinholes,
- 30 gegebenenfalls gekühlte Detektoren wie z.B. PMT, Avalanche-Dioden oder CCD,

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 4 -

komplexe hochgenaue mechanische Translationselemente und Optiken müssen mit erheblichem Aufwand aufeinander optimiert und integriert werden (siehe z.B. US 5,459,325; US 5,192,980; US 5,834,758). Der Miniaturisierungsgrad und Preis ist durch die Vielzahl und Funktionalität der Komponenten limitiert.

5

Analysen basierend auf Sonden-Arrays werden somit zum derzeitigen Zeitpunkt in der Regel fluoreszenzoptisch ausgelesen (siehe A. Marshall und J. Hodgson, DNA Chips: An array of possibilities, Nature Biotechnology, 16, 1998, 27-31; G. Ramsay, DNA Chips: State of the Art, Nature Biotechnology, 16, Jan. 1998, 40-44).

10 Nachteilig an den vorstehend beschriebenen Detektionsverfahren ist jedoch der hohe Signalthintergrund, der zu einer eingeschränkten Genauigkeit führt, der teilweise erhebliche technische Aufwand sowie die hohen Kosten, die mit den Nachweisverfahren verbunden sind.

15 Es besteht folglich ein Bedarf an hochintegrierten Arrays, mit denen mit relativ geringem technischen Aufwand die Wechselwirkung zwischen Sonden und Targets mit hoher Genauigkeit qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen werden kann.

Die Erhöhung der Selektivität und der Zugang zu alternativen Komponenten
20 motiviert die Etablierung alternativer Imaging-Technologien wie Fluoreszenz-Polarisation und zeitaufgelöste Fluoreszenz für festkörpergebundene Assays. Solche Lösungen insbesondere für hochintegrierte Arrays liegen derzeit jedoch nur konzeptionell vor. Der Effekt der Verdrehung der Polarisationsachse durch polarisiert angeregte Fluorophore wird zur Quantifizierung im Mikrotiter-Format
25 angewandt. Es gibt ferner Ansätze, durch die Verwendung entsprechend modifizierter Polymerfolien als Polarisationsfilter kostengünstige Systeme mit hohem Durchsatz (HTS-Systeme) aufzubauen (siehe I. Gryczynski et al., Polarisation sensing with visual detection“, Anal. Chem. 1999, 71, 1241-1251). Die zur Verfügung stehenden Lichtmengen und Detektoren machen derzeit allerdings
30 eine Umsetzung auf Mikroarrays schwierig. Ein derartiger Aufbau würde die

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 5 -

Integration von Lichtquellen (z.B. Laser, LED, Hochdrucklampen),
Polarisationsfiltern (u.U. beschichtete Polymerfolien) und Detektoren (CCD-,
CMOS-Kamera) erfordern, eine entsprechende Lösung ist bislang nicht bekannt.

- 5 Neuere Entwicklungen nutzen die Fluoreszenz von anorganischen Materialien, wie
zum Beispiel von Lanthaniden (M. Kwiatowski et al., Solid-phase synthesis of
chelate-labelled oligonucleotides: application in triple-color ligase-mediated gene
analysis, Nucleic Acids Research, 1994, 22, 13) und Quantendots (M. P. Bruchez et
al., Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels, Science 1998,
10 281, 2013). Die Ausnutzung der spezifischen Fluoreszenzlebensdauer von
Fluorophoren im ns-Bereich zu deren selektiven Quantifizierung ist sehr aufwändig
und wird trotz der Spezifität in dieser orts aufgelösten Applikation kommerziell nicht
verwendet. Farbstoffe mit langer Emissionsdauer im μ s-Bereich wie Lanthanid-
Gelate erfordert eine Umwandlung der Farbstoffe in eine mobile Phase, so daß eine
15 orts aufgelöste Detektion nicht möglich ist.

- Die Verwendung von Mikropartikeln, die aus ihrer Verwendung in Fernsehrohren
bekannt sind (siehe F. van de Rijke et al., Up-Converting Phosphors: A New
Reporter Technology for Nucleic Acid Microarrays, European EC Meeting on
20 Cytogenetics (2000) Bari, Italien), als biologische Marker hat bezüglich Sensitivität
und Miniaturisierbarkeit des Aufbaus der Detektionstechnik großes Potential, zumal
anregungsseitig Lichtquellen aus der Datenübertragung Verwendung finden (980 nm
Dioden-Laser). Diese Technologie ist jedoch z.Zt. nicht kommerziell zur Detektion
von Target/Sonden-Wechselwirkungen auf Arrays verfügbar. Ein Detektor würde
25 Komponenten zur Lichtemission (z.B. Laser, LED, Hochdrucklampen), ein System
zur Modulierung des Anregungs- und Detektionslichtes (z.B. Chopperscheiben,
elektronische Shutter) und Detektion des zeitverzögerten Signals (z.B. CCD-,
CMOS-Kamera) beinhalten. Als grundsätzlich problematisch erweist sich jedoch in
der Regel die geringe Kompatibilität der Partikel mit biologischen Proben.
30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 6 -

Der Einsatz von Arrays mit immobilisierten Targets auf einem porösen Substrat hat im Gegensatz zum Einsatz von Sonden-Arrays den prinzipiellen Nachteil, daß bei jeder erfolgenden Analyse zunächst ein Array mit dem zu untersuchenden Material erzeugt werden muß, daß dann mit einem Satz bekannter Sonden in Verbindung
5 gebracht wird. Der diagnostische Einsatz ist damit stark eingeschränkt, da Arrays häufig neu hergestellt werden müssen. Da das Material in der Regel biologischer Herkunft ist, sind Unterschiede zwischen Chargen unvermeidlich. Der Einsatz poröser Substrate limitiert die maximal erreichbare Auflösung der erzeugten Arrays, da die aufgebrachte Flüssigkeit sich lateral ausbreiten kann, so sind Größen einzelner
10 Elemente auf porösen Materialien mit heute bekannter Depositionstechnik unterhalb von 200 µm kaum zu realisieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es somit, die vorstehend genannten Probleme des Stands der Technik, die sich insbesondere durch den komplexen
15 Aufbau des Detektionssystems, den hohen Signalhintergrund u.a. durch Bleichen des Signals und die mangelnde Kompatibilität des Assays mit dem Testsystem ergeben, zu überwinden.

Insbesondere ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bzw.
20 eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, mit dem molekulare Wechselwirkungen zwischen Sonden und Targets auf Sonden-Arrays mit hoher Genauigkeit und auf einfache und kostengünstige Weise qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen werden können.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, daß eine hohe dynamische Auflösung bei der Detektion erreicht wird, d.h. der Nachweis schwacher
25 Sonden/Target-Wechselwirkungen neben starken Signalen gewährleistet bleibt.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 7 -

Diese und weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

- 5 Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, daß molekulare Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen (im folgenden als Sonden bezeichnet) und Targetmolekülen (im folgenden als Targets bezeichnet) auf Sondenarrays durch ein einfaches und kostengünstiges Verfahren mit hoher Genauigkeit nachgewiesen werden können. Der Nachweis erfolgt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren durch
- 10 eine Reaktion, die ein Produkt mit einem bestimmtem Löslichkeitsprodukt liefert, das eine Präzipitation bzw. eine Niederschlagsbildung des Produkts auf einem Array-Element des Sonden-Arrays, an dem eine Wechselwirkung zwischen Sonde und Target stattgefunden hat, zur Folge hat.
- 15 Vorzugsweise sind die gebundenen Targets mit einer Markierung versehen, die die Reaktion eines löslichen Substrats zu einem schwerlöslichen Niederschlags auf dem Array-Element katalysiert, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat, bzw. die als Kristallisationskeim für die Umwandlung eines löslichen Substrats zu einem schwerlöslichen Niederschlag auf dem Array-Element
- 20 wirkt, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat.

- Der Einsatz von Sonden-Arrays auf nicht porösen Trägern erlaubt auf diese Weise die simultane qualitative und quantitative Analyse einer Vielzahl von Sonden/Target-Wechselwirkungen, wobei einzelne Sonden-Elemente mit einer Größe von ≤ 1000
- 25 μm , vorzugsweise von $\leq 100 \mu\text{m}$ und besonders bevorzugt $\leq 50 \mu\text{m}$ realisiert werden können.

- In der Immunzytochemie und bei immunologischen Mikrotiterplatten-basierten Tests ist der Einsatz von enzymatischen Markierungen bekannt (siehe E. Lidell und I.
- 30 Weeks, Antibody Technology, BIOS Scientific Publishers Limited, 1995). So

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 8 -

katalysieren beispielsweise Enzyme den Umsatz eines Substrats in ein schwerlösliches, in aller Regel gefärbtes Produkt. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises molekularer Wechselwirkungen auf Arrays besteht im Einsatz von Metallmarkierungen. Hierbei werden kolloidales Gold oder definierte Goldcluster mit den Targets gekoppelt, ggf. über bestimmte Vermittlermoleküle wie Streptavidin, und durch nachfolgende Reaktion mit unedleren Metallen wie z.B. Silber verstärkt.

Die relative Quantifizierung der Konzentration der gebundenen Targets auf einem Sonden-Array durch Nachweis eines Präzipitats bzw. eines Niederschlags erfolgt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren über die Konzentration der mit den Targets gekoppelten Markierungen, die die Reaktion eines löslichen Substrats zu einem schwerlöslichen Niederschlag auf dem Array-Element, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat, katalysieren bzw. als Kristallisationskeim für derartige Reaktionen wirken. Beispielsweise beträgt im Fall von mit Nanogold markierten HPLC-gereinigten Oligonukleotidsonden das Verhältnis von gebundenem Target zu Goldpartikel 1:1. In anderen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann es Vielfaches oder auch einen Bruchteil davon betragen.

Die Konzentration der mit den Targets gekoppelten Markierungen ($c(M)$) steht mit der Konzentration des deponierten Niederschlags ($c(N)$) auf dem Array-Element in folgender Beziehung:

$c(M) = [F \cdot c(N)]/t$, wobei F eine Kurvenfunktion ist, die den zeitlichen Verlauf der Präzipitationsreaktion charakterisiert und t die Zeit ist.

F ist aus dem zeitlichen Verlauf der Reaktion bestimmbar. Falls der zeitliche Verlauf der Niederschlagsbildung als lineare Funktion beschrieben werden kann ($F = \text{konstant}$), ist eine eindeutige Korrelation der gebildeten Niederschlagsmenge mit der Konzentration an gebundenen Targetmolekülen möglich, da dann $c(N)/t$ ein Maß für $c(M)$ und damit auch für die Konzentration der mit den Markierungen gekoppelten

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 9 -

Targets ist. Folglich ist nur bei Kenntnis des zeitlichen Verlaufs der Präzipitationsreaktion eindeutig eine relative Bestimmung der an den jeweiligen Array-Elementen gebundenen Targetkonzentrationen möglich ist.

- 5 Herkömmlicherweise wird nach einer bestimmten Zeit nach der Wechselwirkung der Targets mit dem auf dem Sondenarray angeordneten Sonden sowie nach Beginn der Reaktion, die zu einem Niederschlag auf Array-Elementen führt, an denen eine Wechselwirkung stattgefunden hat, ein Bild aufgenommen und den gemessenen, von dem Grad der Niederschlagsbildung abhängigen Grauwerten Konzentrationen
- 10 zugeordnet. Diese Vorgehensweise führt allerdings für das jeweilige Array-Element nur in einem sehr schmalen Konzentrationsbereich zu zufriedenstellenden Werten - und ist damit auch für die Bewertung der Spezifität von Wechselwirkungen problematisch - , da die Niederschlagsbildung in hohem Maße nichtlinear erfolgt. Insbesondere umfaßt der zeitliche Verlauf der Niederschlagsbildung einen
- 15 exponentiellen Anstieg der Niederschlagsbildung mit der Zeit sowie ein darauffolgendes Sättigungsniveau. Lediglich Grauwerte aus dem Bereich des exponentiellen Anstiegs der Niederschlagsbildung mit der Zeit lassen eine Korrelation mit der Menge an gebundenen Targets zu, während das bei der Niederschlagsbildung auf einem Array-Element nach einer bestimmten, von der
- 20 jeweiligen Sonden/Target-Wechselwirkung abhängigen und damit für jedes Array-Element unterschiedlichen Zeit erreichte Sättigungs-Niveau einer Quantifizierung nach Abschluß der Niederschlagsbildungs-Reaktion entgegensteht. Es ist nicht möglich, die Experimentparameter so zu gestalten, daß zweifelsfrei sichergestellt ist, daß das Sättigungsniveau auf keinem der Array-Elemente erreicht ist, da die
- 25 Reaktionsgeschwindigkeit in starkem Maße von Temperatur, Licht, Salzkonzentration, pH und weiteren Faktoren abhängt.

- Bei Aufnahme lediglich eines Bildes kann folglich nicht gewährleistet werden, daß sich die Niederschlagsbildungs-Reaktionen auf allen Array-Elementen in dem
- 30 exponentiellen Bereich der Abhängigkeit der Niederschlagsbildung von der Zeit

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 10 -

befinden. Somit werden Signalintensitäten, beispielsweise Grauwerte, die von Array-Elementen erhalten werden, bei denen sich die Niederschlagsreaktion bereits im Sättigungsbereich befindet, im Vergleich zu Signalintensitäten von Array-Elementen, die sich noch im exponentiellen Bereich der Niederschlagsbildung befinden, verfälscht dargestellt.

Um die vorstehend beschriebenen Nachteile zu überwinden wird durch die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targets in einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sonden und Targets auf Sonden-Arrays bereitgestellt, das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Herstellung eines Sondenarrays mit an definierten Stellen immobilisierten Sonden;
- b) Wechselwirkung der Targets mit den auf dem Sondenarray angeordneten Sonden;
- 15 c) Durchführung einer Reaktion, die zu einem Niederschlag an Array-Elementen führt, an denen eine Wechselwirkung erfolgt ist;
- d) Detektion des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung an den Array-Elementen in Form von Signalintensitäten;
- 20 e) Bestimmung einer virtuellen Signalintensität für ein Array-Element anhand einer Kurvenfunktion, die die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt.

Zur Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Definitionen verwendet:

- 25 Unter einer molekulare Sonde wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Molekül verstanden, daß zum Nachweis anderer Moleküle durch ein bestimmtes, charakteristisches Bindungsverhalten bzw. eine bestimmte Reaktivität verwandt wird.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 11 -

Unter einem Sonden-Array wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Anordnung von molekularen Sonden auf einer Oberfläche verstanden, wobei die Position einer jeden Sonde separat bestimmt ist.

- 5 Unter einem Array-Element wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein für die Deposition einer molekularen Sonde bestimmtes Areal auf einer Oberfläche verstanden, die Summe aller belegten Array-Elemente ist das Sonden-Array.

- 10 Unter einer Mikrotiterplatte wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Anordnung von Reaktionsgefäßen in einem bestimmten Raster verstanden, die die automatisierte Durchführung einer Vielzahl von biologischen, chemischen und labormedizinischen Tests gestattet.

- 15 Unter einem Target wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung das mit einer molekularen Sonde nachzuweisende Molekül verstanden.

Unter HTS (engl.: high throughput screening) wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine systematische Wirkstoffsuche mit hohem Durchsatz verstanden.

- 20 Unter einem Substrat wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein im Reaktionsmedium gelöst vorliegendes Molekül bzw. eine Kombination von Molekülen verstanden, die mit Hilfe eines Katalysators bzw. eines Kristallisationskeims und eines reduzierenden Agens lokal abgeschieden wird.

- 25 Unter einem Träger wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Festkörper verstanden, auf dem das Sonden-Array aufgebaut ist.

Unter einer Markierung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine mit dem Target gekoppelte Gruppe verstanden, die die Reaktion eines löslichen Substrats zu

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 12 -

einem schwerlöslichen Niederschlags katalysiert bzw. als Kristallisationskeim für die Umwandlung eines löslichen Substrats in einen schwerlöslichen Niederschlag wirkt.

- Unter einer virtuellen Signalintensität wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Wert verstanden, der die Wechselwirkung zwischen Sonde und Target auf einem Array-Element und damit die Menge an gebundenen Targets quantifiziert und anhand einer Kurvenfunktion bestimmt wird, die die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt.
- 10 Wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Bestimmung einer virtuellen Signalintensität für ein Array-Element in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung. Die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit auf einem Array-Element wird erfindungsgemäß vorzugsweise durch eine Kurvenfunktion beschrieben, anhand derer eine virtuelle Signalintensität bestimmt
- 15 wird. Diese virtuelle Signalintensität ist aufgrund der Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung ein unverfälschtes Maß für die Menge an gebundenen Targets.
- Insbesondere können erfindungsgemäß Teilbereiche oder auch der gesamte Bereich des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung als Regressionsgerade beschreiben werden. Die virtuelle Signalintensität wird bei dieser Ausführungsform in Abhängigkeit von der Steigung der Regressionsgerade bestimmt. Diese Steigung ist ein direktes Maß für die Konzentration der gebundenen Targets, d.h. je größer die Steigung der Regressionsgerade ist, desto mehr Targets sind gebunden. Bei
- 25 Betrachtung aller Array-Elemente unter den gleichen Bedingungen ist der über die Zeit resultierende Anstieg der Niederschlagsbildung auf jedem einzelnen Array-Element charakteristisch für die Konzentration und für den jeweiligen Versuch normiert auf die vorherrschenden Bedingungen. Somit ist eine genaue Bestimmung der relativen quantitativen Menge an gebundenen Targets gewährleistet.
- 30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 13 -

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Regressionsgerade im Bereich des exponentiellen Anstiegs der Niederschlagsbildung mit der Zeit auf einem Array-Element ermittelt.

- 5 Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung entspricht die Regressionsgerade einer Tangente an die Kurvenfunktion, mit der die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreiben werden kann, durch den Wendpunkt der Kurvenfunktion. Der Wendpunkt der Kurvenfunktion werden durch Bestimmung des Maximums der 1. Ableitung der Kurvenfunktion ermittelt.

- 10 Bei einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Regressionsgerade ermittelt, in dem die Scheitelpunkte der Kurvenfunktion, mit der die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreiben werden kann, durch eine Gerade verbunden werden. Die Scheitelpunkte der Kurvenfunktion werden durch
15 Bestimmung der Maxima der 2. Ableitung der Kurvenfunktion ermittelt.

- Ferner kann durch Bestimmung einer virtuellen Signalintensität für jedes Array-Element in Abhängigkeit von dem zeitlichen Verlauf der Niederschlagsbildung und anschließende Umwandlung dieser virtuellen Signalintensitäten in ein analoges Bild
20 der dynamische Meßbereich, d.h. der Umfang des Nachweisbereichs vervielfacht werden. Eine Erweiterung der Dynamik der Messung wird dadurch ermöglicht, daß nicht mehr die Farbtiefe des Detektorsystems als bestimmendes Element auftritt, sondern der über die Zeit gemessene Verlauf der Anlagerung des Präzipitats an die
25 der Präzipitationsreaktion ist es möglich, eine virtuelle Signalintensitäts- bzw. Grauwertverteilung zu bestimmen, und hiermit schließlich eine erweiterte Dynamik zu erreichen.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den weiteren Vorteil, daß Detektionssysteme

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 14 -

eingesetzt werden können, die nicht aufwändig und zusätzlich preiswert sind.
Beispielsweise kann eine Kamera mit lediglich 8 bit, d.h. 256 Grauwerten,
Grauwerttiefe verwendet werden, die nach Auswertung und Erstellung einer
virtuellen Abbildung eine reale Tiefenschärfe von 24 bit (16777216 Grauwerte) oder
5 48 bit (33554432 Grauwerte) liefert und damit eine deutlich verbesserte Möglichkeit
der simultanen Detektion von geringen und starken Wechselwirkungen von Targets
mit Sonden auf einem Sonden-Array bietet.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt in der zu
10 untersuchenden Probe ein Referenz-Target mit bekannter Konzentration vor, das mit
mindestens einer Sonde des Sondenarrays wechselwirkt. Die dieser
Sonden/Referenz-Target-Wechselwirkung entsprechende virtuelle Signalintensität,
bestimmt in Abhängigkeit von dem Anstieg der Niederschlagsbildung in
Abhängigkeit von der Zeit, dient als Referenz für die Quantifizierung der übrigen
15 Target-Konzentrationen entsprechend der jeweiligen virtuellen Signalintensitäten,
die durch die Sonden/Target-Wechselwirkungen herbeigeführt werden, relativ zu der
Konzentration der Referenz-Target-Konzentration.

Die zu untersuchenden Targets können in jeder Art von Probe, vorzugsweise in einer
20 biologischen Probe vorliegen. Vorzugsweise werden die Targets vor ihrer Detektion
und Quantifizierung durch das erfindungsgemäße Verfahren isoliert, gereinigt,
kopiert und/oder amplifiziert.

Das im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzte Sondenarray mit an
25 definierten Stellen immobilisierten Sonden wird nach herkömmlich bekannten
Verfahren hergestellt. Ein Sondenarray gemäß der vorliegenden Erfindung umfaßt
einen Träger, der die Bildung von Arrays mit Sonden auf seiner Oberfläche erlaubt.
Ein derartiger Träger kann hergestellt werden aus Materialien, ausgewählt aus der
Gruppe, bestehend aus Glas, Filtern, elektronischen Vorrichtungen, Polymeren,
30 metallischen Materialien und dergleichen sowie Kombinationen dieser Materialien.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 15 -

Vorzugsweise umfaßt der Array definierte Stellen, sog. Array-Elemente, die besonders bevorzugt in einem bestimmten Muster angeordnet sind, wobei jedes Array-Element üblicherweise nur eine Spezies an Sonden beinhaltet.

- 5 Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden zur Detektion des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung an den Array-Elementen die Signalintensitäten mindestens jede Minute, vorzugsweise alle 30 Sekunden, besonders bevorzugt alle 10 Sekunden aufgenommen. Daneben sind aber auch andere Zeitabstände für die Aufnahme der Signalintensitäten denkbar, mit
- 10 der Maßgabe, daß die zeitliche Abhängigkeit der Niederschlagsbildung eindeutig bestimmt werden kann und damit beispielsweise die Steigung der Regressionsgerade im exponentiellen Bereich als Maß für die jeweilige Konzentration an gebundenen Targets abgeleitet werden kann.
- 15 Die virtuelle Signalintensität für ein Array-Elemente wird beispielsweise durch Multiplikation der detektierten Signalintensität zu einem bestimmten Zeitpunkt, vorzugsweise der Signalintensität der letzten Messung, mit der Steigung der für das Array-Element ermittelten Regressionsgerade sowie mit der Meßdauer zu dem bestimmten Zeitpunkt bestimmt. Selbstverständlich ist es bei dieser
- 20 Ausführungsform für eine relative Quantifizierung erforderlich, daß der Zeitpunkt für die Detektion der Signalintensität für alle Array-Elemente identisch ist.

- Voraussetzung für eine relative Quantifizierung der Konzentration der gebundenen Targets auf einem Sonden-Array durch Nachweis eines Präzipitats nach dem
- 25 erfindungsgemäßen Verfahren ist ferner, daß die Targets mit Markierungen versehen sind, die die Reaktion eines löslichen Substrats zu einem schwerlöslichen Niederschlag auf dem Array-Element, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat, katalysieren, bzw. als Kristallisationskeim für derartige Reaktionen wirken.

30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 16 -

Dabei können bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Targets direkt mit derartigen Markierungen versehen sein.

Alternativ wird auf eine direkte Markierung der Targets verzichtet und die

5 Markierung erfolgt über Sandwich-Hybridisierung oder Sandwich-Reaktionen mit der mit dem Target wechselwirkenden Sonde und einer markierten Verbindung.

Beispiele für eine derartige Vorgehensweise sind:

- 10 - Sandwich-Hybridisierung mit einem zur Targetsequenz komplementären markierten Oligonukleotid.
- Sandwich-Hybridisierung von in Kettenform mit der Targetsequenz hybridisierenden markierten Oligonukleotiden: Unter in Kettenform mit der Targetsequenz hybridisierenden markierten Oligonukleotiden wird im Rahmen
15 der vorliegenden Erfindung ein Satz von markierten Oligonukleotiden verstanden, von denen mindestens eines Komplementarität sowohl zur Targetsequenz als auch zu einem weiteren Oligonukleotid aufweist. Die anderen Oligonukleotide sind selbstkomplementär bzw. wechselseitig zueinander komplementär, so daß während der Hybridisierung eine Kette von an der
20 Targetsequenz gebundenen markierten Oligonukleotiden entsteht.
- Sandwich-Hybridisierung mit einem zur Targetsequenz komplementären Oligonukleotid, das mit einer vielfach markierten Struktur, beispielsweise einem Dendrimer, beschrieben z.B. in WO 99/10362, gekoppelt ist.

25

Eine weitere bevorzugte Möglichkeit der Kopplung der Targets mit einer Markierung stellt das synthetische oder enzymatische Anfügen eines homopolymeren Bereichs, beispielsweise einer polyA-Sequenz, an die Targets unter Bildung einer fortlaufenden Sequenz dar, wie es beispielsweise in US 6,103,474 beschrieben ist.

30 Bei dieser Ausführungsform erfolgt die Markierung vorzugsweise über Sandwich-

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 17 -

Hybridisierung mit einem zur Homopolymer-Sequenz komplementären markierten Oligonukleotid mit den vorstehend beschriebenen Variationen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt
5 eine Signalamplifikation durch Amplifikation von Teilen der an die Targets angefügten Homopolymersequenz bei gleichzeitigem Einbau von markierten Basen, insbesondere bevorzugt über einen RCA-Mechanismus durch Verwendung eines zirkulären einzelsträngigen Templates, das Komplementarität zur Homopolymersequenz aufweist.

10 Die nachfolgende Tabelle 1 gibt, ohne den Anspruch zu erheben, vollständig zu sein, einen Überblick über eine Reihe von in Frage kommenden Reaktionen, die geeignet sind, um zu einem Niederschlag an Array-Elementen zu führen, an denen eine Wechselwirkung zwischen Target und Sonde erfolgt ist:

15

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 18 -

Tabelle 1

Katalysator bzw. Kristallisationskeim	Substrat
Meerrettichperoxidase	DAB (3,3'-Diaminobenzidin) 4-CN (4-Chlor-1-Napthol) AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) HYR (p-Phenyldiamin-HCl und Pyrocatechol) TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) Naphthol/Pyronin
Alkalische Phosphatase	Bromchlorindoylphosphat (BCIP) und Nitrotetrazoliumblau (NBT)
Glucoseoxidase	t-NBT und m-PMS (Nitrotetrazoliumblauschlorid und Phenazinmethosulfat)
Goldpartikel	Silbernitrat Silbertartrat

- Die Markierung von biologischen Proben mit Enzymen bzw. Gold, insbesondere nanokristallinem Gold ist hinlänglich beschrieben (siehe u.a. F. Lottspeich und H. Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998; E. Lidell und I. Weeks, Antibody Technology, BIOS Scientific Publishers Limited, 1995).
- 10 Weitere Möglichkeiten für den Nachweis der Sonde/Target-Wechselwirkungen über unlösliche Präzipitate bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sind beschreiben in: Immunogold-Silver Staining, Principles, Methods and Applications, Hrsg.: M.A.Hayat, 1995, CRC Press; Eur J Immunogenet 1991 Feb-Apr;18(1-2):33-55
HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes.
- 15 Erlich H, Bugawan T, Begovich AB, Scharf S, Griffith R, Saiki R, Higuchi R, Walsh

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 19 -

- PS. Department of Human Genetics, Cetus Corp., Emeryville, California 94608; Mol Cell Probes 1993 Jun;7(3):199-207 A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of *Listeria monocytogenes*. Bsat N, Batt CA. Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853.
- 5 Immunogenetics 1990;32(4):231-41 Erratum in: Immunogenetics 1991;34(6):413 Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes. Bugawan TL, Begovich AB, Erlich HA. Department of Human Genetics, Cetus Corporation, Emeryville, CA 94608. Hum Immunol 1992 Dec;35(4):215-22 Generic HLA-DRB1 gene oligotyping by a
- 10 nonradioactive reverse dot-blot methodology. Eliaou JF, Palmade F, Avinens O, Edouard E, Ballaguer P, Nicolas JC, Clot J. Laboratory of Immunology, Saint Eloi Hospital, CHU Montpellier, France. J Immunol Methods 1984 Nov 30;74(2):353-60 Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining. Moeremans M, Dancels G,
- 15 Van Dijk A, Langanger G, De Mey J. Histochemistry 1987;86(6):609-15 Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy. Cremers AF, Jansen in de Wal N, Wiegant J, Dirks RW, Weisbeek P, van der Ploeg M, Landegent JE.
- 20
- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind u.a. folgende Varianten für den Nachweis der Sonde/Target-Wechselwirkungen über unlösliche Präzipitate denkbar.
- Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Targets mit
- 25 einem Katalysator, vor einem Enzym versehen, das die Umwandlung eines löslichen Substrats in ein unlösliches Produkt katalysiert. Die Reaktion, die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führt, ist in diesem Fall die Umwandlung eines löslichen Substrats in ein unlösliches Produkt in Gegenwart eines mit den Targets gekoppelten Katalysators, vorzugsweise Enzyms. Das Enzym wird
- 30 vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Meerrettichperoxidase,

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 20 -

- alkalischer Phosphatase und Glucoseoxidase. Das lösliche Substrat wird vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 3,3'-Diaminobenzidin, 4-Chlor-1-naphthol, 3-Amino-9-ethylcarbazol, p-Phenylendiamin-HCl/Pyrocatechol, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Naphthol/Pyronin, Bromchlorindoylphosphat,
- 5 Nitrotetraazoliumblau und Phenazinmethosulfat. Beispielsweise wird ein farbloser löslicher Wasserstoffdonor, z.B. 3,3'-Diaminobenzidin, in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in ein unlösliches farbiges Produkt umgewandelt. Das Enzym Meerrettichperoxidase überträgt Wasserstoffionen aus den Donoren auf Wasserstoffperoxid unter Bildung von Wasser.
- 10 Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Reaktion, die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führt, die Bildung eines metallischen Niederschlags ist. Besonders bevorzugt ist die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führende Reaktion die
- 15 chemische Reduktion einer Silberverbindung, vorzugsweise Silbernitrat, Silberlactat, Silberacetat oder Silbertartrat, zu elementarem Silber. Als Reduktionsmittel wird vorzugsweise Formaldehyd und/oder Hydrochinon eingesetzt.
- Besonders bevorzugt erfolgt die Ausfällung der metallischen Verbindung in
- 20 Gegenwart von mit den Targets gekoppelten Metallclustern bzw. kolloidalen Metallpartikeln, insbesondere Goldclustern oder kolloidalen Goldpartikeln. D.h. in diesem Fall stellen die Metallcluster bzw. kolloidalen Metallpartikel die mit den Targets gekoppelten Markierungen dar. Beispielsweise wird Silbernitrat in elementares Silber umgesetzt, wobei sich Silberionen aus der Lösung an Gold als
- 25 Kristallisationskeim anlagern und in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines Reduktionsmittels wie z.B. Formaldehyd) reduziert werden. Hierbei entsteht ein unlöslicher Niederschlag elementaren Silbers.
- Bei einer alternativen Ausführungsform erfolgt die Ausfällung der metallischen
- 30 Verbindung in Gegenwart von mit den Targets gekoppelten Polyanionen. Wenn es

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 21 -

- sich beim Target selbst nicht um ein Poly-Anion handelt, dann besteht die Möglichkeit ein solches zur Keimbildung einzusetzen. Das mit einem Poly-Anion markierte Target wird beispielweise einer Silbernitratlösung ausgesetzt. Dabei lagern sich die Silber-Kationen am Poly-Anion selektiv an. Danach werden mit einem
- 5 Reduktionsmittel Silberionen in elementares Silber umgewandelt.

- Die Kopplung der Enzyme bzw. Katalysatoren bzw. Metallcluster bzw. kolloidalen Metallpartikel bzw. Polyanionen an die Targets kann direkt oder über an die Targets gekoppelte Ankermoleküle erfolgen. Grundsätzlich besteht keine Notwendigkeit, das
- 10 Target direkt mit den oben beschriebenen Markierungen zu versehen. Es besteht auch die Möglichkeit, über geeignete Ankermoleküle, z.B. Streptavidin, die an das Target gekoppelt werden, eine nachfolgende Ankopplung der Markierung zu erreichen.

- 15 Ein Konjugat bestehend aus dem jeweiligen Katalysator bzw. Kristallisationskeim und einem spezifischen Bindungspartner für das Ankermolekül erlaubt ebenfalls die Durchführung der oben beschriebenen Prozeduren. Die Reaktion, die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führt, ist dann die Bindung eines spezifischen Bindungspartners an ein an das Target gekoppeltes Ankermolekül
- 20 darstellt.

- Derartige Bindungspartner/Ankermolekül-Paare werden vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Biotin/Avidin bzw. Streptavidin bzw. Anti-Biotin-Antikörper, Digoxigenin/Antidigoxigenin-Immunglobulin, FITC/Anti-FITC-
- 25 Immunglobulin und DNP/Anti-DNP-Immunglobulin.

In jeder der vorstehend beschriebenen Ausführungsformen wird katalytisch ein lösliches Substrat in ein unlösliches und ausfallendes Produkt umgesetzt. Aufgrund der Nähe zur Oberfläche wird das Produkt unmittelbar an der Oberfläche

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 22 -

abgeschieden und bildet einen festen, für diverse Wäschen unempfindlichen Niederschlag.

5 Ferner ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung möglich, daß die Markierungen, insbesondere die Enzyme bzw. Metallcluster bzw. kolloidalen Metallpartikel bzw. Polyanionen, an die Targets vor, während oder nach der Wechselwirkung mit den Sonden gekoppelt werden.

10 Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Wechselwirkung zwischen dem Target und der Sonde eine Hybridisierung zwischen zwei Nukleotidsequenzen. Die Hybridisierung der Targets mit den auf einem Sonden-Array angeordneten Sonden findet nach einem der bekannten Standardprotokolle statt (siehe u.a. Lottspeich und Zorbas, 1998). Die entstandenen Hybride können durch kovalente Bindung, beispielsweise über
15 Psoralen-Interkalation und nachfolgendes "Cross-Linking", oder wie in US 4,599,303 beschrieben, durch nichtkovalente Bindung, beispielsweise durch Bindung von Interkalatoren, stabilisiert werden.

20 Im Anschluß an die Hybridisierung der Targets mit den auf einem Sonden-Array angeordneten Sonden bzw. der Markierung der hybridisierten Targets erfolgt üblicherweise ein Waschschriff, mit dem unspezifisch und dadurch schwächer gebundene Komponenten entfernt werden.

25 Alternativ ist die Wechselwirkung zwischen dem Target und der Sonde eine Reaktion zwischen einer Antigenstruktur und dem entsprechenden Antikörper oder einem hypervariablen Abschnitt davon oder eine Reaktion zwischen einem Rezeptor und einem entsprechenden Liganden ist.

30 Die Bindung oder Erkennung der Targets durch spezifische Sonden ist üblicherweise ein spontane nicht-kovalente Reaktion unter optimalen Bedingungen. Davon umfaßt

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 23 -

- sind ebenfalls nicht-kovalente chemische Bindungen. Die Zusammensetzung des Mediums sowie weitere chemische und physikalische Faktoren beeinflussen die Geschwindigkeit und Stärke der Bindung. So erniedrigen beispielsweise bei der Nukleinsäure-Erkennung eine niedrigere Stringenz und höhere Temperaturen die Rate und Stärke der Bindung zwischen zwei nicht perfekt komplementären Strängen. Die Optimierung der Bindungsbedingungen ist für Antigen/Antikörper- oder Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen ebenfalls erforderlich, die Bindungsbedingungen sind aber üblicherweise weniger spezifisch.
- 5
- 10 Der Nachweis der Gegenwart eines Niederschlags auf einem Array-Element erfolgt bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung durch Reflexion, Absorption oder Diffusion eines Lichtstrahls, vorzugsweise eines Laserstrahls oder einer Leuchtdiode, durch den Niederschlag. Aufgrund seiner granularen Form modifiziert der Niederschlag die Reflexion eines Lichtstrahls. Ferner führt der Niederschlag zu einer starken Lichtdiffusion die durch herkömmliche Detektorvorrichtungen aufgezeichnet werden kann. Falls der Niederschlag wie beispielsweise der Silberniederschlag als dunkle Oberfläche erscheint, kann auch die Absorption von Licht detektiert und aufgezeichnet werden. Die Auflösung der Detektion hängt dann von der Anzahl der Pixel der Kamera ab.
- 15
- 20 Beispielsweise kann der Nachweis der durch die spezifische Reaktion verstärkten Bereiche mittels eines sehr einfachen optischen Aufbaus im Durchlicht (Kontrast durch Abschattung) bzw. Auflicht (Kontrast durch Reflexion) erfolgen. Die detektierte Intensität des abgeschatteten Bereiches ist direkt proportional zur Belegungsdichte mit Markierungen wie beispielsweise Gold-Partikeln und dem Keimbildungszustand der Partikel.
- 25

Bei Verwendung eines Niederschlags, der elektrisch leitfähig ist oder dessen Dielektrizitätskonstante sich von der Umgebung unterscheidet, ist der Nachweis der

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 24 -

Reaktion bei einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung auch elektrisch möglich.

- Die elektrischen Messungen können über Leitfähigkeitsmessungen mittels
- 5 Mikroelektrodenarray-Anordnungen oder über eine Anordnung von Mikrokapazitätssensoren oder über Potentialmessungen mittels Feld-Effekt-Transistoren-Arrays (FET-Arrays) erfolgen. Bei Leitfähigkeitsmessungen mittels Mikroelektroden wird die Änderung des elektrischen Widerstandes zwischen zwei Elektroden bei einer Abscheidungsreaktion verfolgt (E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan,
- 10 G. Ben-Yoseph, Nature, 775, vol 391, 1998). Bei Dielektrizitätsmessungen mit Mikrokapazitätssensoren wird die Änderung der Kapazität zweier zueinander angeordneten Elektroden gemessen (M. Madou, Fundamentals of Microfabrication, CRC Press, Boca Raton, 1997). Bei Potentialmessungen mittels FET-Arrays wird die
- 15 Änderung des Potentials auf den Sensoroberflächen gemessen (M. Madou, Fundamentals of Microfabrication, CRC Press, Boca Raton, 1997).

- Bei Verwendung eines Substrates, das radioaktiv ist, oder radioaktiv markiert ist, kann der Nachweis der Gegenwart eines Niederschlags auf einem Array-Element durch Autoradiographie, Fluorographie und/oder indirekte Autoradiographie
- 20 erfolgen. So wird bei der Autoradiographie eine mit strahlendem Präzipitat bedeckte Fläche direkt mit einem Röntgenfilm in Kontakt gebracht. Bei der Fluorographie wird eine mit strahlendem Präzipitat bedeckte Fläche mit fluoreszierenden Chemikalien wie z.B. Natrium-silylylat überschichtet, die die radioaktive Strahlungsenergie in Fluoreszenz umwandeln. Bei der indirekten Autoradiographie
- 25 mit Verstärkungsfolien (intensifier screens) wird eine mit β -strahlendem Präzipitat bedeckte Fläche auf eine Verstärkerfolie gelegt, die die Strahlung in blaues Licht umwandelt. (siehe F. Lottspeich, H. Zorbas, siehe oben). Auf Radioaktivität basierende Detektionsverfahren sind jedoch aufgrund der gesundheitlichen Risiken und der deswegen zu erfüllenden Sicherheitsvorschriften häufig unerwünscht.
- 30

Bei weiteren alternativen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung erfolgt der Nachweis der Gegenwart eines Niederschlags auf einem Array-Element durch Rasterelektronenmikroskopie, Elektronensonden-Mikroanalyse (EPMA), magnetooptische Kerr-Mikroskopie, magnetic force-Mikroskopie (MFM), atomic force-Mikroskopie (AFM), Messung des Mirage-Effekts, Rastertunnelmikroskopie (STM) und/oder Ultraschall-Reflexions-Tomographie.

Nahezu unabhängig von der Art des Substrates ist der Nachweis der Reaktion mittels SEM und/oder EPMA. Bei der Rasterelektronen-Mikroskopie (scanning electron microscopy (SEM)) tastet ein fokussierter Elektronenstrahl die Probe ab (J. Goldstein et al. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Plenum, New York, 1981). Bei der electron probe microanalysis (EPMA) werden die Sekundärprozesse, die durch einen fokussierten Elektronenstrahl ausgelöst werden, zur ortsaufgelösten Analyse genutzt (J. Goldstein et al. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Plenum, New York, 1981).

Bei Verwendung eines Substrates, das magnetisch ist, oder mit Magnetpartikeln markiert ist, kann der Nachweis der Reaktion durch Magnetooptische Kerr-Mikroskopie oder MFM erfolgen. Bei der Magnetooptischen Kerr-Mikroskopie wird die Drehung der Polarisationssebene des Lichtes durch magnetische Felder (Kerr- und Faradayeffekt) ausgenutzt (A. Hubert, R. Schäfer, Magnetic Domains, Springer, 1998).

Die Änderung der optischen Dichte durch das Substrat auf der Oberfläche infolge der Reaktion kann mittels des Mirage-Effektes detektiert werden. Beim Mirage-Effekt wird die lokale Erwärmung einer Oberfläche durch Absorption eines gebündelten Laserstrahls über die damit verbundene Brechungsindexänderung gemessen. Durch das Abrastern der Oberfläche erhält man ein Bild von den lokalen Oberflächenabsorptionseigenschaften (A. Mandelis, Progress in Photothermal and Photoacoustic Science and Technology, Volume 1, Elsevier, New York 1992). Ein

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 26 -

weiteres thermisches ortsaufgelöstes Verfahren zum Nachweis der Wechselwirkungsreaktion durch das Substrat ist eine Array-Anordnung von Mikrothermophiles, die die Kristallisations- bzw. Abscheidungsenthalpien der Substratabscheidungen messen (J.M. Köhler, M. Zieren, *Thermochemica acta*, 25, 5 vol 310, 1998).

Ebenfalls geeignet zum Nachweis der Reaktion mittels Substrat sind STM und AFM. Beim atomic force microscope (AFM) tastet eine Mikro- oder Nanospitze die Oberflächen ab, wodurch die Oberflächentopographie vermessen wird (E. Braun, Y. 10 Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature*, 775, vol 391, 1998). Das magnetic force microscope MFM detektiert über eine Nanospitze lokale magnetische Suszeptibilitätsunterschiede (A. Hubert, R. Schäfer, *Magnetic Domains*, Springer, 1998). Beim scanning tunneling microscope STM wird über eine Nanospitze der Tunnelstrom gemessen, um die Nanooberflächentopographie zu ermitteln (O. Marti, 15 M. Amrein, *STM and SFM in biology*, Academic Press Inc., San Diego, 1993)

Exotischere Verfahren wie die Ultraschall-Reflexions-Tomographie können ebenfalls zur Anwendung kommen. Bei den Tomografien handelt es sich um Verfahren, bei denen scheinbar ein 3-dimensionales Bild zusammengetragen 20 wird (F. Natterer, *Mathematische Methoden der Computer-Tomographie*, Westdt. Vlg., Wiesbaden, 1997). Im Falle der Ultraschall-Reflexions-Tomographie wird die Messung der Ultraschall-Reflexion ausgenutzt, um das Tomogramm zu erzeugen (V. Fleischer, F. Bergner, *DGZfP NDT Conference Dresden 1997*).

25 Bei einer speziellen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, daß die folgenden Schritte umfaßt:

- Detektion des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung an den Array-Elementen durch Aufnahme von Bildern durch eine Kamera;

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 27 -

- Umwandlung der in den Bildern enthaltenen analogen Information in digitale Form;
- Berechnung einer virtuellen Signalintensität für jedes Array-Element anhand einer Kurvenfunktion, die die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt;
- 5 - Umwandlung der virtuellen Signalintensitäten in ein künstliches Bild, das die virtuellen Signalintensitäten aller Array-Elemente darstellt.

10 Unter einem Bild wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Gruppe von Pixeln verstanden, die eine Veranschaulichung der gemessenen Signalintensitäten für einen Sonden-Array darstellt und die direkt beispielsweise an einen Bildschirm oder einen Drucker zur Aufzeichnung übermittelt werden kann.

15 Unter einem künstlichen Bild wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Gruppe von Pixeln verstanden, die eine Veranschaulichung von erfindungsgemäß bestimmten virtuellen Signalintensitäten für einen Sonden-Array darstellt und die ebenfalls beispielsweise auf einem Bildschirm oder einen Drucker dargestellt werden kann.

20 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung des vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend:

- a) ein Array-Substrat mit Sonden-Array,
- 25 b) eine Reaktionskammer,
- c) eine Vorrichtung zur Detektion eines Niederschlags auf einem Array-Element, an dem eine Wechselwirkung zwischen Targets und Sonden stattgefunden hat, und
- d) einen Computer, der programmiert ist, um:
 - die von der Detektionsvorrichtung aufgenommenen Signalintensitäten zu
 - 30 sammeln;

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 28 -

- die Verarbeitung der sukzessive aufgenommenen Signalintensitäten derart zu gewährleisten, daß der zeitliche Verlauf der Niederschlagsbildung mit der Zeit auf einem Array-Element bestimmt wird und eine virtuelle Signalintensität anhand einer Kurvenfunktion bestimmt wird, die die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt; und
- 5 - ggf. die Umwandlung der virtuellen Signalintensitäten in ein analoges Bild zu gewährleisten.

Die Detektionsvorrichtung ist vorzugsweise eine Kamera, insbesondere eine CCD- oder CMOS-Kamera oder ähnliche Kameras, die üblicherweise den gesamten Bereich des Sonden-Arrays aufzeichnet.

Wie bereits vorstehend erwähnt, läßt sich durch zeitanfögelöste Detektion während des Verstärkungsprozesses durch die Ablagerung eines Niederschlags, wie beispielsweise elementarem Silber auf als Kristallisationskeimen wirkenden Goldpartikeln, und die Berechnung der relativen Belegungsdichten aus dem Zeitverhalten nach dem erfindungsgemäßen Verfahren die dynamische Auflösung der Meßdaten selbst bei Verwendung einer 8 bit-Detektionstechnik extrem erhöhen. Der Aufbau einer hierzu nötigen Vorrichtung unterscheidet sich durch die mechanische Aufnahme einer Reaktionskammer und eine modifizierte Akquisitions-Software. Die Software ist dadurch gekennzeichnet, daß sie die Verarbeitung der sukzessive aufgenommenen Aufnahmen gestattet. Hierzu werden die über den einzelnen Sondenarray-Elementen ermittelten Grauwerte zu jedem Zeitpunkt ermittelt. Für alle Array-Elemente wird die virtuelle Signalintensität in Abhängigkeit der Niederschlagsbildung von der Zeit berechnet. Ausgehend von diesem Wert werden beispielsweise die Grauwerte der letzten Messung mit dem Produkt aus Rate und Meßdauer in Beziehung gesetzt und damit eine Spreizung des Meßbereichs erreicht. Somit ist selbst bei Verwendung von kostengünstigen 8 bit -Kameras eine ausgezeichnete Auflösung von schwachen neben starken Sonden/Target-

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 29 -

Wechselwirkungen sowie eine genaue Quantifizierung der gebundenen Targets gewährleistet.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die erfindungsgemäße Vorrichtung
5 zusätzlich eine Lichtquelle, die besonders bevorzugt ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus einem Laser, einer Licht-emittierenden Diode (LED) und einer Hochdrucklampe.

Die Komponenten eines beispielhaften Aufbaus einer erfindungsgemäßen
10 Vorrichtung zum optisch Nachweis einer Niederschlagsbildung bestehen aus einer leistungsschwachen (500mcd) Lichtquelle, z.B. einer LED, zur homogenen Beleuchtung und einem Detektor, z.B. einer CCD-Kamera. Aufgrund des Verstärkungseffekts über die katalytische Abscheidung des Substrates, insbesondere bei der Verwendung eines Gold/Silbersystems, sind die Änderungen der optischen
15 Eigenschaften der Oberfläche derart ausgeprägt, daß ein einfacher Flachbettscanner, ein Diascanner oder ein vergleichbares Gerät zur Detektion des Niederschlags ausreicht.

Typische Detektionszeiten liegen deutlich unter 1s, während vergleichbare sensitive
20 CCD-Systeme zur Detektion von Fluoreszenz etwa 10 s bis 80 s benötigen, so daß preiswerte Consumer-Kameras Verwendung finden können, deren Signalübertragung der Videonorm entspricht.

Das Miniaturisierungspotential eines solchen Aufbaus ist sehr hoch, das gesamte
25 System kann als autonomes Handgerät für den Feldeinsatz konzipiert werden. Ferner kann die erfindungsgemäße Vorrichtung bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform als hochintegrierte autonome Einheit realisiert werden. Damit sind hochsensitive Anwendungen von Microarrays wie z.B. medizinische Diagnostik, Forensik, bakterielles Screening usw. auch unabhängig von medizinischen bzw.
30 biologischen Laboratorien vom Laien schnell durchführbar.

Im folgenden ist eine potentielle Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Gewebetypisierung in der Transplantationsmedizin beschrieben. Die Analyse der Struktur, Expression und Vererbung immunologisch relevanter Gene für

5 Transplantation und Autoimmunität ist von besonderem Interesse, da sowohl für die spezifische Antigenerkennung (Histokompatibilitätsantigene, T-Lymphozytenrezeptor) als auch für die Effektormechanismen (Antikörper, Fc-Rezeptoren) hochgradig polymorphe Systeme existieren und diese komplexen genetischen Regulationsmechanismen unterliegen. Neben den schwachen tragen

10 insbesondere die starken Transplantationsantigene zu beispielsweise einer Transplantatabstoßung bei. Diese starken Antigene werden als Haupthistokompatibilitätsantigene bezeichnet und sind genetisch innerhalb des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodiert. Der MHC, der bisher ausschließlich bei Vertebraten nachgewiesen wurde, wird beim Menschen als HLA

15 (Humanes Leukozyten Antigen) bezeichnet. Der HLA-Komplex ist auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 6 lokalisiert (6p21.1 – 6p21.3) und umfaßt einen Bereich von ca. 3500 Kilobasen. Sehr grob lassen sich die HLA-Moleküle in zwei Klassen (Klasse I und Klasse II) unterteilen, die sich dann in weitere Subgruppierungen aufteilen. Die jeweiligen Genorte für die HLA-Produkte, welche

20 in ihrer Summation für die entsprechenden immunologischen Eigenschaften des Organismus verantwortlich sind, treten durch die Prozesse der Vererbung in sehr zahlreichen Allelvariationen, deren bekannte Anzahl stetig zunimmt, auf. Die Zahl der möglichen Alleltypisierungen des HLA-Systems, die an einem Organismus durch serologische und molekularbiologische Analyse exakt

25 vorgenommen werden können, ermöglicht je nach medizinischer Relevanz der zu transplantierenden Zellspezies, eine beliebige Tiefe. Je tiefer die Typisierung und je größer die nachfolgende Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger ist, desto weniger sind Probleme wie Gewebeunverträglichkeiten und Transplantatabstoßung zu erwarten. Neben verschiedenen Transplantationen spielen

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 31 -

aber auch Transfusionen, Krankheitsassoziationen und der forensische Bereich zur eindeutigen Personenidentifizierung eine Rolle.

- In den Ausführungsbeispielen sind ein Prinzipnachweise für die Nachweisgrenze und
- 5 Beispiele für Expressionsmonitoring dargestellt. Die verwendeten proprietären Prinzipien lassen sich jedoch auch für weitere Anwendungen benutzen. Neben den quantitativen Analysen, wie z.B. dem Expressionsmonitoring von Organismen lassen sich auch zahlreiche qualitative Analysen durchführen.
- 10 Z.B. treten die jeweiligen Genorte für die HLA-Produkte, welche in ihren Summation für die entsprechenden immunologischen Eigenschaften des Organismus verantwortlich sind, durch die Prozesse der Vererbung in sehr zahlreichen Allelvariationen, deren bekannte Anzahl stetig zunimmt, auf. Die Zahl der möglichen Alleltypisierungen des HLA-Systems, die an einem Organismus durch serologische
- 15 und molekularbiologische Analyse exakt vorgenommen werden können, ermöglicht je nach medizinischer Relevanz der zu transplantierenden Zellspezies, eine beliebige Tiefe. Je tiefer die Typisierung und je größer die nachfolgende Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger ist, desto weniger sind Probleme wie Gewebeunverträglichkeiten und Transplantatabstoßung zu erwarten. Seit der
- 20 Entdeckung der MHC-Moleküle hat man zahlreiche Verfahren zur Charakterisierung des Polymorphismus dieser Moleküle und ihrer Gene entwickelt und eingesetzt. Eine grundsätzliche Differenz besteht zwischen biochemischen, zellulären und serologischen einerseits und den molekularbiologischen Techniken auf der anderen Seite. Erstere analysieren durch z.B. den Einsatz von spezifischen Antikörpern
- 25 ausschließlich die Expressionsprodukte während die zweite Gruppe durch z.B. die Techniken der Hybridisierung und Amplifikation von Nukleinsäuren Sequenzunterschiede im Bereich kodierender und nichtkodierender Sequenzen nachweist (Bidwell J., 1994 Advances in DNA-based HLA-typing methods. Immunol Today, 15(7):303-7). Durch die beschriebene Erfindung wäre es gegeben,
- 30 daß nach einer Isolierung, entsprechenden Markierung und gegebenenfalls

- Amplifikation für das Hervorheben diagnostisch relevanter Allelstrukturen zu einem Sequenzhintergrund der genomischen DNA eines Individuums, eine massiv-parallele Hybridisierung gegen ein Sondenarray (DNA-Chip) aller bekannter Allelvarianten mit dem Ziel der tiefst-möglichen HLA-Typisierung erfolgen würde. Dabei wird, durch den beschriebenen Hybridisierungsnachweis und die Signalverstärkung in Kombination mit einem einfachen Detektor verglichen mit anderen Verfahren, in einer minimalen Diagnostikzeit eine maximale genomische Typisierung unter Verwendung bekannter allelspezifischer Sonden in einem äußerst günstigen ökonomischen Rahmen zugänglich.
- 10 Ein weiteres mögliches Anwendungsfeld liegt im Pharma- und Diagnostikbereich. Bei der Metabolisierung von körpereigenen und körperfremden Substanzen (z.B. Pharmaka) im Organismus spielen eine Reihe von genetischen Polymorphismen, Mutationen, Deletionen etc. mit diesbezüglich funktionalen Effekten auf der
- 15 Proteinebene eine wesentliche Rolle. Individuelle genotypische Verteilungen in diesen DNA-Sequenzen führen phänotypisch z.B. zu Korrelationen mit bestimmten Krankheitsbildern (so zum Beispiel bei dem Gen für p53 und dem Mamakarzinom sowie mitochondrialer Genvariationen der Gene D-loop, 16-S-rRNA, ND3-5, CytB, tRNA^{Trp}, tRNA^{Leu} und dem Lungen- und Blasenkarzinom (Fliess MS et. al (2000)
- 20 Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science. 17;287(5460):2017-9.) oder unterschiedlicher Wirkung von Xenobiotika auf den Organismus. Letzteres ist z.B. detailliert an Cytochrom P 450 Genen (CYP2D6, CYP2C19, CYP2A6, CYP2C9, CYP2E1), Gluthathion-S-Transferase Genen (GSTM1, GSTT1), dem N-Acetyltransferase Gen (NAT2), dem Apolipoprotein E
- 25 Gen (ApoE) u.v.a.m. demonstriert worden. Die Ergebnisse all dieser Untersuchungen zusammengefasst erlauben die Erstellung eines Arrays mit DNA Sonden, welche die Sequenzunterschiede parallel detektieren. Im Zusammenhang mit dem beschriebenen Hybridisierungs- und Verstärkungsnachweis und einem einfachen optischen Aufbau sind so qualitative Genotypisierungen schnell und kostengünstig realisierbar. Diese

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 33 -

sind als Muster sowohl beim Individuen-spezifischen Einsatz von Pharmaka als auch als Marker zur Personenidentifikation und bei der Diagnostik relevant.

Die folgenden Beispiele und Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung und sollen nicht in einschränkender Weise ausgelegt werden.

Beispiele

Beispiel 1: Nachweis der Hybridisierung von Nukleinsäuren (quantitative Analyse)

10

Vorbereitung des Trägers

Auf mit einer epoxidierten Glasfläche der Größe 3 x 3 mm („Sondenarray“) wurde an einer definierten Stelle („Arrayelement“) ein aminomodifiziertes Oligonukleotid mit einer Länge von 20 Nukleotiden der Sequenz

15

5'-NH₂-CCTCTGCAGACTACTATTAC-3' kovalent immobilisiert. Dazu wurden 0,1 µl einer 5 µM Lösung des Oligonukleotides in 0,5 M Phosphatpuffer auf der Glasfläche abgelegt und schließlich bei 37°C eingetrocknet. Die kovalente Verknüpfung der abgelegten Oligonukleotide mit den Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche erfolgte durch 30-minütiges Backen der Sondenarrays bei 60°C.

20

Anschließend wurden die Sondenarrays kräftig mit destilliertem Wasser gespült und danach 30 min in 100 mM KCl gewaschen. Nach weiterem kurzen Spülen in 100 mM KCl und anschließend destilliertem Wasser wurden die Sondenarrays 10min bei 37°C getrocknet.

25

Hybridisierung des komplementären Oligonukleotides

Für die Hybridisierung wurde ein komplementäres Biotin-markiertes 20 bp langes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Bio-GTAATAGTAGTCTGCAGAGG-3' eingesetzt. Die Reaktion wurde in den folgenden Konzentrationsabstufungen in einem Puffer (0,25 M NaPO₄, 4,5% SDS, 1 mM EDTA in 1xSSC) in einem Gesamtvolumen von

30

je 50 µl aufgenommen: 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM, 1 fM.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 34 -

- Je Konzentrationsstufe wurde ein vorbereitetes Sondenarray in die Hybridisierungslösung gegeben. Der so erhaltene Hybridisierungsansatz wurde 5 min bei 95°C und danach 60 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die
- 5 Sondenarrays unter Schütteln je 10 min in 2xSSC+0,2%SDS, 2xSSC und 0,2xSSC (Maniatis et al., 1989) gewaschen und mit Druckluft trockengeblasen.

Nachweis der Hybridisierung

- Ein Streptavidin-Goldkonjugat wurde in einer 1:50 Verdünnung in 6xSSPE(52,5 g NaCl, 26,4 g NaH₂PO₄ x H₂O, 2,22 g NaOH aufgefüllt mit H₂O auf 1
- 10 Gesamtvolumen) + 0,005% Triton-Lösung auf den Sondenarray gegeben und 15 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Sondenarrays unter Schütteln je 10 min in 2xSSC(17,5 g NaCl, 8,8g NaCitrat in 1 l H₂O, mit 10 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt) + 0,2% SDS (Natriumdodecylsulfat), 2xSSC und 0,2xSSC gewaschen
- 15 und mit Druckluft trockengeblasen. Alternativ zu dem Goldkonjugat des Streptavidins wurden auch direkt mit Goldpartikeln modifizierte Targets eingesetzt.

- Die nachfolgende Verstärkung der nunmehr auf dem Sondenarray immobilisierten Goldpartikel erfolgte mit 0,1% Silbernitratlösung in 3% Natriumkarbonat und 0.02%
- 20 Formaldehydlösung. Das Gemisch wurde kurz vor der Reaktion frisch angesetzt. Innerhalb der 15-minütigen Inkubation wurde bei 22°C und rotem Licht die Reaktion beobachtet und kontinuierlich mit der in Abbildung 1 dargestellten Vorrichtung aufgezeichnet.
- 25 Die Nachweisgrenze wurde mit < 10 pM gefunden.

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Hybridisierung dargestellt:

- A - Hybridisierung des in einer Konzentration von 10 nM vorliegenden Targets,
B - Hybridisierung des in einer Konzentration von 1 nM vorliegenden Targets,

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 35 -

C - Hybridisierung des in einer Konzentration von 100 pM vorliegenden Targets und
D - Hybridisierung des in einer Konzentration von 10 pM vorliegenden Targets.

- 5 Beispiel 2: Prinzipnachweis zum Einsatz des Verfahrens im Expression Profiling -
Nachweis der Hybridisierung von genomischer RNA aus *Corynebacterium*
glutamicum gegen ein Sondenarray von 356 Sonden

10 DNA-Arrays werden häufig dazu verwendet, den globalen physiologischen Zustand
von Zellen zu messen (expression profiling). Dazu wird RNA aus den
entsprechenden Zellen isoliert, mit einer geeigneten Methode markiert und gegen ein
Sonden-Array mit komplementären Sonden hybridisiert. Im folgenden
Anwendungsbeispiel wurde das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von
zellulären mRNAs aus *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt.

15

Herstellung der Sonden-Arrays

- Auf mit einem standardisierten und epoxidierten mikroskopischen Objektträger der
Firma CLONDIAG Chip Technologies (Jena, Deutschland), der als Arraysubstrat
dient, wurde ein Sondenarray von 356 verschiedenen aminomodifizierten
20 Oligonukleotiden von 25 bzw. 30 Basen Länge und c-DNAs unterschiedlicher Länge
erzeugt. Alle Oligonukleotide waren komplementär zu Teilsequenzen der *aceA*- und
icd-Gene. Die Sondenarrays wurden durch Arraying mit dem Micro-Grid I Arrayer
der Firma Biorobotics Ltd. (Großbritannien) nach Herstellerangaben erzeugt, indem
die aminomodifizierten DNAs in einer Endkonzentration von 5 μ M in 0,5 M
25 Phosphatpuffer auf den Objektträger aufgebracht und schließlich eingetrocknet
wurden. Die kovalente Verknüpfung der abgelegten Oligonukleotide mit den
Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche erfolgte durch 30-minütiges Backen der
Objektträger bei 60°C. Anschließend wurden die Slides kräftig mit destilliertem
Wasser gespült und danach 30 min in 100 mM KCl gewaschen. Nach weiterem

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 36 -

kurzen Spülen zunächst in 100 mM KCl und anschließend in destilliertem Wasser wurden die Sondenarrays 10 min bei 37°C getrocknet.

Vorbereitung der Gesamt-RNA aus *Corynebacterium glutamicum*

- 5 Gesamt-RNA aus *Corynebacterium glutamicum* wurde mittels des Fast RNA Kits (Fa. Bio 101) nach Herstellerangaben gewonnen. 50 µg RNA wurden mittels Biotin Chem Link (Boehringer Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben bei 85°C für 30 Minuten biotinyliert. Die RNA wurde anschließend über Microcon-30-Säulen (Fa. Millipore) nach Herstellerangaben eingeeengt und anschließend mehrmals mit entionisiertem, RNase-freiem Wasser gewaschen. Das Eluat wurde im Vakuum auf 5
- 10 µl eingeeengt.

Hybridisierung der RNA

- Die biotinylierte RNA wurde in 100 µl Hybridisierungspuffer (0,25 M NaPO₄, 4,5% SDS, 1 mM EDTA in 1xSSC) aufgenommen und für 3 Minuten bei 65°C denaturiert. Die mit DNA belegte Fläche des Objektträgers wurde mit einer Hybridisierungskammer (Hybrislip, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gedeckelt. Das Slide wurde auf einem Thermoschüttler mit Mikrotiterplattenaufsatz (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf 50°C vortemperiert. Anschließend wurde die
- 20 denaturierte Hybridisierungslösung eingefüllt und die Hybridisierungskammer nach Herstellerangaben verschlossen. Die Inkubation wurde für 60 min bei 50°C fortgesetzt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung abgenommen, die Hybridisierungskammer entfernt und die Slides unter Schütteln 10 min bei 30°C in 2xSSC+0,2%SDS und jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSC und
- 25 0,2xSSC (Maniatis et al., 1989) gewaschen und mit Druckluft trockengeblasen.

Nachweis der Hybridisierung

- Ein Streptavidin-Goldkonjugat (EM.STP5, Fa. British BioCell International) wurde in einer 1:50 Verdünnung in 6xSSPE+0,005%Triton (Maniatis et al., 1989) auf das
- 30 Slide gegeben und 15 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 37 -

Sondenarrays unter Schütteln je 10 min in 2xSSC+0,2%SDS, 2xSSC und 0,2xSSC gewaschen und mit Druckluft getrocknet.

- Die nachfolgende Verstärkung der nunmehr auf dem Sondenarray immobilisierten Goldpartikel erfolgte mit dem LM/EM Silver Enhancing Kit (SEKL15, British BioCell International). Gemäß den Angaben der Hersteller wurden je 2 Tropfen der Initiator- und der Enhancer-Lösung vermischt und davon je 15µl auf die Sondenarrayoberfläche pipettiert. Innerhalb der 15-minütigen Inkubation wurde bei 22°C und rotem Licht die Reaktion beobachtet und kontinuierlich mit der in Abbildung 1 dargestellten Vorrichtung aufgezeichnet. Das resultierende Muster kann auch nach 15minütiger Inkubation abschließend betrachtet werden (siehe Abbildung 4).

Beispiel 3: Nachweis und Spezifität der Hybridisierung von Nukleinsäuren

15

Herstellung der Sondenarrays

- Auf einer epoxidierten 3D-Objektträger (75 mm x 25 mm)-Glasoberfläche (Fa. Elipsa) wurden mit einem MicroGrid II-Arrayer (Fa. BioRobotics) 16 aminomodifizierte Oligonukleotide (Sonden) mit einer Länge von jeweils 16 Nukleotiden an definierten Stellen abgelegt und kovalent immobilisiert (Arrayelemente). Die Sequenzen der Oligonukleotide waren folgende (jeweils mit einer 3'-NH₂-Modifikation):

- 1: 3'- ATG GCG TTT AGA ACC C -5'
 25
 2: 3'- ATG CCG TAT GGA ATC C -5'
 3: 3'- ATG TCG TGT CGA AAC C -5'
 4: 3'- ATG ACG TCT TGA AGC C -5'

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 38 -

5: 3'- ACG GCA TTT AGT ACC G -5'

6: 3'- ACG CCA TAT GGT ATC G -5'

5 7: 3'- ACG TCA TGT CGT AAC G -5'

8: 3'- ACG ACA TCT TGT AGC G -5'

9: 3'- AGG GCT TTT AGC ACC A -5'

10: 3'- AGG CCT TAT GGC ATC A -5'

10 11: 3'- AGG TCT TGT CGC AAC A -5'

12: 3'- AGG ACT TCT TGC AGC A -5'

13: 3'- AAG GCC TTT AGG ACC T -5'

14: 3'- AAG CCC TAT GGG ATC T -5'

15: 3'- AAG ACC TCT TGG AGC T -5'

15 16: 3'- AAG TCC TGT CGG AAC T -5'

- Ein einzelnes komplettes (quadratisches) Sondenarray auf der Objektträger-Oberfläche bestand aus insgesamt $10 \times 10 = 100$ abgelegten Sonden. Jede der 16 Oligonukleotid-Sonden wurde dabei in mindestens 5-facher Wiederholung auf dem
- 20 Sondenarray abgelegt (Array-Aufbau: siehe Abb. 5). Die Sonden hatten einen Abstand von 0,2 mm, das gesamte Sondenarray bedeckte eine Fläche von 2 mm x 2 mm. Insgesamt konnten auf diese Weise pro Objektträger über 100 identische Sondenarrays erzeugt werden.
- 25 Das Ablegen der Sonden erfolgte aus einer jeweils 10 μM -Lösung der Oligonukleotide in 0,1M Phosphatpuffer/5%-Natriumsulfat. Nach dem Ablegen und Eintrocknen wurden die Sonden durch 30-minütiges Backen bei 60 °C kovalent mit den Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche verknüpft. Anschließend erfolgte ein Wasch- und Blockierungsprozess der Objektträger in folgender Reihenfolge:
- 30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 39 -

- 5 min in 600 ml H₂O bidest + 600 µl Triton x100
 2 x 2 min in 600 ml H₂O bidest + 60 µl HCL (konz.)
 30 min in 100 mM KCl-Lösung
 1 min in H₂O bidest spülen
- 5
 15 min bei 50°C in Glasschale in 75 ml H₂O bidest + 25 ml Ethylenglykol +20 µl
 HCl (konz.) inkubieren
 1 min in H₂O bidest spülen
 mit Druckluft trocknen
- 10
 Nach Beendigung der Waschschrirte und Trocknen der Objektträger wurden diese in
 3,25 mm x 3,25 mm große Glasstücke (nachfolgend „Chips“ genannt) zerschnitten.
 Auf jedem der Chips befand sich genau ein Sondenarray der Größe 2 mm x 2 mm.
- 15 Hybridisierung der Sondenarrays
 Für die Hybridisierung der Sondenarrays standen für alle 16 Oligonukleotid-Sonden
 die komplementären Biotin-markierten 16 bp langen Oligonukleotide als Targets zur
 Verfügung. Als Beispiel sei hier nur das zur Oligonukleotid-Sonde 9 komplementäre
 Target „9b“ mit folgender Sequenz angeführt:
- 20
 5'-Biotin TCC CGA AAA TCG TGG T -3'
- Die Hybridisierungs-Reaktion wurde in 6x SSPE-Puffer (52,59 g NaCl, 8,28 g
 NaH₂PO₄ x H₂O, 2,22 g EDTA x 2H₂O in 1 l H₂O bidest, auf pH 7,4 mit NaOH
- 25 eingestellt)/0,1 % SDS in einem Gesamtvolumen von 70 µl mit den Target-
 Konzentrationsstufen 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM durchgeführt. Je
 Konzentrationsstufe wurde ein Chip mit dem Sondenarray in die
 Hybridisierungslösung gegeben, 5 min bei 95 °C erhitzt, dann 60 min bei 30 °C unter
 Schütteln inkubiert. Danach wurde der Chip in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl
- 30 Hybridisierungspuffer (ohne Target) überführt und 10 min bei 55 °C bzw. 60 °C

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 40 -

unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurden die Chips dann noch je 10 min in 2x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30 °C), 2x SSC (500 µl bei 20 °C) und 0,2x SSC (500 µl bei 20 °C) unter Schütteln gewaschen und dann getrocknet (Eppendorf-Concentrator).

5

Nachweis der Hybridisierung (Konjugation und Silberanfärbung)

Die hybridisierten und getrockneten Chips wurden in ein neues Reaktionsgefäß mit µl einer Streptavidin-Goldkonjugat-Lösung in 6 x SSPE/0,1 % SDS-Puffer überführt und dort 15 min bei 30 °C inkubiert. Als Streptavidin-Goldkonjugat wurden

10 Goldpartikel der Größe 5 nm verwendet (British Biocell International, EM.STP5).

Das Konjugat lag im Versuch in einer Konzentration von 500 pg Streptavidin/µl vor.

Nach der Konjugation wurden die Chips je 10 min in 2x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30 °C), 2x SSC (500 µl bei 20 °C) und 0,2x SSC (500 µl bei 20 °C) unter Schütteln

15 gewaschen und dann getrocknet (Eppendorf-Concentrator).

Alternativ zu dieser Vorgehensweise wurde die Streptavidin-Goldkonjugat-Kopplung auch direkt in der Hybridisierungslösung durchgeführt. Hierzu wurde nach der 60-minütigen Hybridisierung das Streptavidin-Goldkonjugat direkt in die

20 Hybridisierungslösung hinzugegeben und dann weitere 15 min bei 30 °C inkubiert.

Danach wurde der Chip in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl

Hybridisierungspuffer (ohne Target) überführt und 10 min bei 55 °C bzw. 60 °C

unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurden die Chips dann noch je 10 min in

25 2x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30 °C), 2x SSC (500 µl bei 20 °C) und 0,2x SSC (500

µl bei 20 °C) unter Schütteln gewaschen und dann getrocknet (Eppendorf-

Concentrator).

Zur Silberverstärkung wurden die Chips in ein neues Reaktionsgefäß überführt und

unter Schütteln für 10 min bei 25 °C in ca. 100 µl einer Silberentwicklungslösung

30 (British Biocell International, SEKL15) inkubiert. Die Inkubationslösung wurde

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 41 -

durch Mischen von je einem Tropfen Initiator- und Enhancer-Lösung hergestellt. Anschließend wurde der Chip 2 min in 500 µl 0,2 x SSC gewaschen und getrocknet (Eppendorf-Concentrator).

- 5 Die Ergebnisse zweier - exemplarisch ausgewählter - Hybridisierungen und deren Nachweis sind in Abbildung 6a und 6b dargestellt (Durchlicht-Aufnahmen).

Beispiel 4: Nachweis und Spezifität der Hybridisierung von Nukleinsäuren

10

Für das CFTR-Gen sind mehr als 800 Mutationen in der Literatur beschrieben, die zum Krankheitsbild der Cystischen Fibrose führen können. Im CFTR-Gen treten drei Typen von Mutationen auf:

- 15 - Basenaustausch (hier: Punktmutationen)
- Insertionen
- Deletionen

- Für alle drei Mutationsformen sollte getestet werden, ob der jeweilige Wildtyp (pm)
20 von der Mutation (mm) mittels Silberverstärkungsdetektion unterscheidbar ist. Sonden und Targets wurden von der Fa. Ogham (Münster, Deutschland) bereitgestellt.

Herstellung der Sondenarrays

- 25 Auf einer epoxidierten 3D-Objektträger (75 mm x 25 mm)-Glasoberfläche (Fa. Elipsa) wurden mit einem MicroGrid II-Arrayer (Fa. BioRobotics) 10 aminomodifizierte Oligonukleotide (Sonden) mit einer Länge von 16 bis 22 Nukleotiden an definierten Stellen abgelegt und kovalent immobilisiert (Arrayelemente). Die 10 Sonden gliedern sich in 5 Paare, wobei die erste jeweils den
30 Wildtyp und die zweite die Mutation darstellt. Das Sondenpaar 1 und 2 stellt eine

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 42 -

Punktmutation dar, das Paar 3 und 4 eine Deletion und die Paare 5/6, 7/8, 9/10 Insertionen. Die Sequenzen der Oligonukleotide waren folgende:

Sequenz in 5' – 3'-Richtung mit 3'-NH₂-Modifikation:

5			
	1:	GATCTTCGCCTTACTG	pm
	2:	GATCTTCACCTTACTG	mm
	3:	GAAACACCAAAGATGATA	pm
10	4:	GAAACACC GATGATA	mm
	5:	CTTCTAATTA TTTGGTATGT	pm
	6:	CTTCTAATTATTTGGTATGT	mm
15	7:	GAGTTCTTCTAATTA TTTGG	pm
	8:	GAGTTCTTCTAATTATTTGG	mm
	9:	TTTAGAGTTCTTCTAATTA T	pm
	10:	TTTAGAGTTCTTCTAATTATT	mm
20			

Das Sondenpaar 3 (Wildtyp) und 4 (Deletion) beinhaltet die häufigste Mutation (70% aller Fälle), die für cystische Fibrose kodiert.

Ein einzelnes komplettes (quadratisches) Sondenarray auf der Objektträger-
 25 Oberfläche bestand aus insgesamt 10 x 10 = 100 abgelegten Sonden. Jede der 10 Oligonukleotid-Sonden wurde dabei in 8- bis 10-facher Wiederholung auf dem Sondenarray abgelegt (Array-Aufbau: siehe Abbildung 7). Die Sonden hatten einen Abstand von 0,2 mm, das gesamte Sondenarray bedeckte eine Fläche von 2 mm x 2 mm. Insgesamt konnten auf diese Weise pro Objektträger über 100 identische
 30 Sondenarrays erzeugt werden.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 43 -

Das Ablegen der Sonden erfolgte aus einer jeweils 10 µM-Lösung der Oligonukleotide in 0,1 M Phosphatpuffer/5%-Natriumsulfat. Nach dem Ablegen und Eintrocknen wurden die Sonden durch 30-minütiges Backen bei 60 °C kovalent mit

5 den Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche verknüpft. Anschließend erfolgte ein Wasch- und Blockierungsprozess der Objektträger in folgender Reihenfolge:

- 5 min in 600 ml H₂O bidest + 600 µl Triton x100
 2 x 2 min in 600 ml H₂O bidest + 60 µl HCL (konz.)
- 10 30 min in 100 mM KCl-Lösung
 1 min in H₂O bidest spülen
- 15 min bei 50°C in Glasschale in 75 ml H₂O bidest + 25 ml Ethylenglykol +20 µl HCl (konz.) inkubieren
- 15 1 min in H₂O bidest spülen
 mit Druckluft trocknen

- Nach Beendigung der Waschschritte und Trocknen der Objektträger wurden diese in 3,25 mm x 3,25 mm große Glasstücke (nachfolgend „Chips“ genannt) zerschnitten.
- 20 Auf jedem der Chips befand sich genau ein Sondenarray der Größe 2 mm x 2 mm.

Hybridisierung und Konjugation der Sondenarrays

- Für die Hybridisierung der Sondenarrays standen für die 10 Oligonukleotid-Sonden 3 zu den Perfect match (pm)-Sonden komplementäre Biotin-markierte Targets zur
- 25 Verfügung. Dabei deckte Target 1 das Sondenpaar 1 und 2, Target 2 das Paar 3 und 4 und Target 3 die Sondenpaare 5/6, 7/8 und 9/10 ab. Die Sequenzen der Targets lauteten:

- Target 1: 5'-Biotin- CTCAGTAAGGCGAAGATCTT-3'
- 30 Target 2: 5'-Biotin- AATATCATCTTTGGTGTTCCT-3'

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 44 -

Target 3: 5'-Biotin- GAACATACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACA-
3'

Die Hybridisierungs-Reaktion wurde in 6 x SSPE-Puffer (52,59 g NaCl, 8,28 g
5 NaH₂PO₄ x H₂O, 2,22 g EDTA x 2H₂O in 1 l H₂O bidest, auf pH 7,4 mit NaOH
eingestellt)/0,1 % SDS in einem Gesamtvolumen von 70 µl mit verschiedenen
Target-Konzentrationsstufen durchgeführt. Hierbei wurde ein Chip mit dem
Sondenarray in die Hybridisierungslösung gegeben, 5 min bei 95 °C erhitzt, dann 60
min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert.

10 Nach der 60-minütigen Hybridisierung wurde ein Streptavidin-Goldkonjugat direkt
in die Hybridisierungslösung hinzugegeben und dann weitere 15 min bei 30 °C
inkubiert. Als Streptavidin-Goldkonjugat wurden Goldpartikel der Größe 5 nm
verwendet (British Biocell International, EM.STP5). Das Konjugat lag im Versuch in
15 einer Konzentration von 500 pg Streptavidin/µl vor.

Nach der Hybridisierung und Konjugation wurde der Chip in ein neues
Reaktionsgefäß mit 500 µl Hybridisierungspuffer (ohne Target) überführt und 10
min bei 55 °C unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurden die Chips dann
20 noch je 10 min in 2x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30 °C), 2x SSC (500 µl bei 20 °C)
und 0,2x SSC (500 µl bei 20 °C) unter Schütteln gewaschen und dann getrocknet
(Eppendorf-Concentrator).

Silberverstärkung

25 Zur Silberverstärkung wurden die Chips in ein neues Reaktionsgefäß überführt und
unter Schütteln für 10 min bei 25 °C in ca. 100 µl einer Silberentwicklungslösung
(British Biocell International, SEKL15) inkubiert. Die Inkubationslösung wurde
durch Mischen von je einem Tropfen Initiator- und Enhancer-Lösung hergestellt.
Anschließend wurde der Chip 2 min in 500 µl 0,2x SSC gewaschen und getrocknet
30 (Eppendorf-Concentrator).

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 45 -

Die Ergebnisse von drei Hybridisierungen und deren Nachweis sind in den Abb. 8, 9 und 10 dargestellt (Durchlicht-Aufnahmen). Während sowohl bei der Punktmutation (Abb. 8) und der Deletion (Abb. 9) eine deutliche Diskriminierung zwischen Wildtyp (pm) und Mutation (mm) erkennbar ist, trifft dies für die Insertion (Abb. 10) nicht zu. Hier zeigt bei dem Sondenpaar 9/10 der mm (Sonde 10) sogar ein stärkeres Signal als der Wildtyp (Sonde 9). Die Nachweisgrenze der Hybridisierung in diesem Versuchsaufbau lag bei einer Targetkonzentration von 10 pM.

10

Beispiel 5: Prinzipnachweis zum Einsatz des Verfahrens mit einem Oligonukleotid-Gold-Konjugat

Herstellung der Sondenarrays

15 Auf einer epoxidierten 3D-Objektträger (75 mm x 25 mm)-Glasoberfläche (Fa. Elipsa) wurden mit einem MicroGrid II-Arrayer (Fa. BioRobotics) 16 aminomodifizierte Oligonukleotide (Sonden) mit einer Länge von jeweils 16 Nucleotiden an definierten Stellen abgelegt und kovalent immobilisiert (Arrayelemente). Die Sequenzen der Oligonukleotide (jeweils mit 3'-NH₂-
20 Modifikation) waren wie folgt:

1: 3'- ATG GCG TTT AGA ACC C -5'

2: 3'- ATG CCG TAT GGA ATC C -5'

25 3: 3'- ATG TCG TGT CGA AAC C -5'

4: 3'- ATG ACG TCT TGA AGC C -5'

5: 3'- ACG GCA TTT AGT ACC G -5'

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 46 -

- 6: 3'- ACG CCA TAT GGT ATC G -5'
- 7: 3'- ACG TCA TGT CGT AAC G -5'
- 8: 3'- ACG ACA TCT TGT AGC G -5'
- 5 9: 3'- AGG GCT TTT AGC ACC A -5'
- 10: 3'- AGG CCT TAT GGC ATC A -5'
- 11: 3'- AGG TCT TGT CGC AAC A -5'
- 12: 3'- AGG ACT TCT TGC AGC A -5'
- 10 13: 3'- AAG GCC TTT AGG ACC T -5'
- 14: 3'- AAG CCC TAT GGG ATC T -5'
- 15: 3'- AAG ACC TCT TGG AGC T -5'
- 16: 3'- AAG TCC TGT CGG AAC T -5'

- 15 Ein einzelnes komplettes (quadratisches) Sondenarray auf der Objektträger-Oberfläche bestand aus insgesamt $10 \times 10 = 100$ abgelegten Sonden. Jede der 16 Oligonukleotid-Sonden wurde dabei in mindestens 5-facher Wiederholung auf dem Sondenarray abgelegt (Array-Aufbau: siehe Abbildung 11). Die Sonden hatten einen Abstand von 0,2 mm, das gesamte Sondenarray bedeckte eine Fläche von 2 mm x 2
- 20 mm. Insgesamt konnten auf diese Weise pro Objektträger über 100 identische Sondenarrays erzeugt werden.

- Das Ablegen der Sonden erfolgte aus einer jeweils 10 µM-Lösung der Oligonukleotide in 0,1 M Phosphatpuffer/5%-Natriumsulfat. Nach dem Ablegen und
- 25 Eintrocknen wurden die Sonden durch 30-minütiges Backen bei 60°C kovalent mit den Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche verknüpft. Anschließend erfolgte ein Wasch- und Blockierungsprozess der Objektträger in folgender Reihenfolge:

- 5 min in 600 ml H₂O bidest + 600 µl Triton x100
- 30 2 x 2 min in 600 ml H₂O bidest + 60 µl HCL (konz.)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 47 -

30 min in 100 mM KCl-Lösung
1 min in H₂O bidest spülen

- 15 min bei 50°C in Glasschale in 75 ml H₂O bidest + 25 ml Ethylenglykol +20 µl
5 HCl (konz.) inkubieren
1 min in H₂O bidest spülen
mit Druckluft trocknen

- Nach Beendigung der Waschschriffe und Trocknen der Objektträger wurden diese in
10 3,25 mm x 3,25 mm große Glasstücke (nachfolgend „Chips“ genannt) zerschnitten.
Auf jedem der Chips befand sich genau ein Sondenarray der Größe 2 mm x 2 mm.

Herstellung des Oligonukleotid-Gold-Konjugates

- Zur Herstellung eines Oligonukleotid-Gold-Konjugates wurden 5,4 nmol eines
15 modifizierten Oligonukleotides (in 80 µl H₂O bidest gelöst) mit der Sequenz 5'-
Thiol-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' („T20-Thiol“) mit 6 nmol Monomaleimido-
Nanogold (Fa. Nanoprobes) gemischt und 24 h bei 4 °C inkubiert. Das Nanogold
wurde in 20 µl Isopropanol und 180 µl H₂O bidest gelöst.

20 Hybridisierung und Konjugation der Sondenarrays

- Für die Hybridisierung der Sondenarrays standen für alle 16 Oligonukleotid-Sonden
die komplementären 36 bp langen Oligonukleotide als Targets zur Verfügung, die als
Modifikation am 3'-Ende einen polyA-Schwanz aufwiesen. Als Beispiel sei hier nur
das zur Oligonukleotid-Sonde 9 komplementäre Target "9c" mit folgender Sequenz
25 angeführt:

5'-TCCCGAAAATCGTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

- Die Hybridisierungs-Reaktion wurde in 6x SSPE-Puffer (52,59 g NaCl, 8,28 g
30 NaH₂PO₄ x H₂O, 2,22 g EDTA x 2H₂O in 1 l H₂O bidest, auf pH 7,4 mit NaOH

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 48 -

eingestellt)/0,1 % SDS in einem Gesamtvolumen von 70 µl mit verschiedenen Target-Konzentrationsstufen durchgeführt. Je Konzentrationsstufe wurde ein Chip mit dem Sondenarray in die Hybridisierungslösung gegeben, 5 min bei 95 °C erhitzt, dann 60 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das T20-Nanogold-Konjugat in verschiedenen Verdünnungsstufen in die Hybridisierungslösung hinzugegeben und weitere 30 min bei 30 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Chip in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Hybridisierungspuffer (ohne Target und T20-Nanogold) überführt und 10 min bei 55 °C bzw. 60 °C unter Schütteln gewaschen. Abschließend wurden die Chips dann noch je 10 min in 2x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30 °C), 2x SSC (500 µl bei 20 °C) und 0,2x SSC (500 µl bei 20 °C) unter Schütteln gewaschen und dann getrocknet (Eppendorf-Concentrator).

15 Silberverstärkung

Zur Silberverstärkung wurden die Chips in ein neues Reaktionsgefäß überführt und unter Schütteln für 10 min bei 25 °C in ca. 100 µl einer Silberentwicklungslösung (British Biocell International, SEKL15) inkubiert. Die Inkubationslösung wurde durch Mischen von je einem Tropfen Initiator- und Enhancer-Lösung hergestellt. Anschließend wurde der Chip 2 min in 500 µl 0,2x SSC gewaschen und getrocknet (Eppendorf-Concentrator).

Beispiel 6: Nachweis und Spezifität der Hybridisierung von Nukleinsäuren

Für das CFTR-Gen sind mehr als 800 Mutationen in der Literatur beschrieben, die zum Krankheitsbild der Cystischen Fibrose führen können. Im CFTR-Gen treten drei Typen von Mutationen auf:

30 - Basenaustausch (hier: Punktmutationen)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 49 -

- Insertionen
- Deletionen

Für alle 3 Mutationsformen sollte getestet werden, ob der jeweilige Wildtyp (pm)
5 von der Mutation (mm) mittels Silberverstärkungsdetektion unterscheidbar ist.

Sonden und Targets wurden von der Fa. Ogham bereitgestellt.

Herstellung der Sondenarrays

10 Auf einer epoxidierten 3D-Objektträger (75 mm x 25 mm)-Glasoberfläche (Fa.
Elipsa) wurden mit einem MicroGrid II-Arrayer (Fa. BioRobotics) 10
aminomodifizierte Oligonukleotide (Sonden) mit einer Länge von 16 bis 22
Nukleotiden an definierten Stellen abgelegt und kovalent immobilisiert
(Arrayelemente). Die 10 Sonden gliedern sich in 5 Paare, wobei die erste jeweils den
15 Wildtyp und die zweite die Mutation darstellt. Das Sondenpaar 1 und 2 stellt eine
Punktmutation dar, das Paar 3 und 4 eine Deletion und die Paare 5/6, 7/8, 9/10
Insertionen. Die Sequenzen der Oligonukleotide waren folgende:

Sequenz in 5' – 3'-Richtung mit 3'-NH₂-Modifikation:

20

1:	GATCTTCGCCCTACTG	pm
2:	GATCTTCACCTTACTG	mm
3:	GAAACACCAAAGATGATA	pm
25 4:	GAAACACC GATGATA	mm
5:	CTTCTAATTA TTTGGIATGT	pm
6:	CTTCTAATTATTTGGIATGT	mm
30 7:	GAGTTCCTTAATTA TTTGG	pm

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 50 -

8: GAGTTCTTCTAATTATTTGG mm

9: TTTTAGAGTTCTTCTAATTA T pm

10: TTTTAGAGTTCTTCTAATTATT mm

5

Das Sondenpaar 3 (Wildtyp) und 4 (Deletion) beinhaltet die häufigste Mutation (70% aller Fälle), die für Cystische Fibrose kodiert.

- Ein einzelnes komplettes (quadratisches) Sondenarray auf der Objektträger-Oberfläche bestand aus insgesamt $10 \times 10 = 100$ abgelegten Sonden. Jede der 10 Oligonukleotid-Sonden wurde dabei in 8- bis 10-facher Wiederholung auf dem Sondenarray abgelegt (Array-Aufbau: siehe Abbildung 13). Die Sonden hatten einen Abstand von 0,2 mm, das gesamte Sondenarray bedeckte eine Fläche von 2 mm x 2 mm. Insgesamt konnten auf diese Weise pro Objektträger über 100 identische Sondenarrays erzeugt werden.

- Das Ablegen der Sonden erfolgte aus einer jeweils 10 µM-Lösung der Oligonukleotide in 0,1 M Phosphatpuffer/5%-Natriumsulfat. Nach dem Ablegen und Eintrocknen wurden die Sonden durch 30-minütiges Backen bei 60 °C kovalent mit den Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche verknüpft. Anschließend erfolgte ein Wasch- und Blockierungsprozess der Objektträger in folgender Reihenfolge:

- 5 min in 600 ml H₂O bidest + 600 µl Triton x100
 2 x 2 min in 600 ml H₂O bidest + 60 µl HCL (konz.)
 25 30 min in 100 mM KCl-Lösung
 1 min in H₂O bidest spülen
- 15 min bei 50°C in Glasschale in 75 ml H₂O bidest + 25 ml Ethylenglykol +20 µl HCl (konz.) inkubieren
 30 1 min in H₂O bidest spülen

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 51 -

mit Druckluft trocknen

Nach Beendigung der Waschschriffe und Trocknen der Objektträger wurden diese in 3,25 mm x 3,25 mm große Glasstücke (nachfolgend „Chips“ genannt) zerschnitten.

- 5 Auf jedem der Chips befand sich genau ein Sondenarray der Größe 2 mm x 2 mm.

Hybridisierung und Konjugation der Sondenarrays

Für die Hybridisierung der Sondenarrays standen für die 10 Oligonukleotid-Sonden 3 zu den Perfect match (pm)-Sonden komplementäre Biotin-markierte Targets zur

- 10 Verfügung. Dabei deckte Target 1 das Sondenpaar 1 und 2, Target 2 das Paar 3 und 4 und Target 3 die Sondenpaare 5/6, 7/8 und 9/10 ab. Die Sequenzen der Targets lauteten:

Target 1: 5'-Biotin- CTCAGTAAGCGAAGATCTT-3'

- 15 Target 2: 5'-Biotin- AATATCATCTTTGGTGTTTCCT-3'

Target 3: 5'-Biotin- GAACATACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACA-3'

- 20 Die Hybridisierungs-Reaktion wurde in 6x SSPE-Puffer (52,59 g NaCl, 8,28 g NaH₂PO₄ x H₂O, 2,22 g EDTA x 2H₂O in 1 l H₂O bidest, auf pH 7,4 mit NaOH eingestellt)/0,1 % SDS in einem Gesamtvolumen von 70 µl mit allen drei Targets in einer 100 pM-Konzentration durchgeführt. Hierbei wurde ein Chip mit dem Sondenarray in die Hybridisierungslösung gegeben, 5 min bei 95 °C erhitzt, dann 60 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert.

- 25 Nach der 60-minütigen Hybridisierung wurde ein Streptavidin-Goldkonjugat direkt in die Hybridisierungslösung hinzugegeben und dann weitere 15 min bei 30 °C inkubiert. Als Streptavidin-Goldkonjugat wurden Goldpartikel der Größe 5 nm verwendet (British Biocell International, EM.STP5). Das Konjugat lag im Versuch in einer Konzentration von 500 pg Streptavidin/µl vor.

30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 52 -

Nach der Hybridisierung und Konjugation wurde der Chip in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Hybridisierungspuffer (ohne Target) überführt und 10 min bei 55 °C unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurden die Chips dann noch je 10 min in 2x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30 °C), 2x SSC (500 µl bei 20 °C) und 0,2x SSC (500 µl bei 20 °C) unter Schütteln gewaschen und dann getrocknet (Eppendorf-Concentrator).

Silberverstärkung, Detektion und Auswertung

Zur Silberverstärkung wurden die Chips in einer abgeschlossenen Reaktionskammer (siehe Abbildung 1) fixiert und mit einer Silberentwicklungslösung (British Biocell International, SEKL15) überschichtet. Die Inkubationslösung wurde durch Mischen von je einem Tropfen Initiator- und Enhancer-Lösung hergestellt. Während der 30-minütigen Inkubation bei 21 °C wurde der zeitliche Verlauf der Silberverstärkung durch ein Foto pro Minute dokumentiert (als Lichtquelle diente eine rote LED).

Die Bilder wurden anschließend mit der Bildauswertungs-Software IconoClust (Fa. Clondiag) ausgewertet.

Als Beispiel sind in Abb. 14a und 14b die Chip-Fotos 5 bzw. 10 min nach Beginn der Silberverstärkung dargestellt (hybridisiert wurde mit dem Target 2). Abb. 15 zeigt den zeitlichen Verlauf dieser Reaktion.

Beispiel 7: Nachweis und Spezifität der Hybridisierung von Nukleinsäuren - Zeitreihenmessung

Für das CFTR-Gen sind mehr als 800 Mutationen in der Literatur beschrieben, die zum Krankheitsbild der Cystischen Fibrose führen können. Im CFTR-Gen treten drei Typen von Mutationen auf:

- Basenaustausch (hier: Punktmutationen)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 53 -

- Insertionen

- Deletionen

Für alle 3 Mutationsformen sollte getestet werden, ob der jeweilige Wildtyp (pm) von der Mutation (mm) mittels Silberverstärkungsdetektion unterscheidbar ist.

5 Sonden und Targets wurden von der Fa. Ogham (Münster) bereitgestellt.

Herstellung der Sondenarrays

Auf einer epoxidierten 3D-Objekträger (75 mm x 25 mm)-Glasoberfläche (Fa. Elipsa) wurden mit einem MicroGrid II-Arrayer (Fa. BioRobotics) 10 aminomodifizierte Oligonukleotide (Sonden) mit einer Länge von 16 bis 22 Nucleotiden an definierten Stellen abgelegt und kovalent immobilisiert (Arrayelemente). Die 10 Sonden gliedern sich in 5 Paare, wobei die erste jeweils den Wildtyp und die zweite die Mutation darstellt. Das Sondenpaar 1 und 2 stellt eine Punktmutation dar, das Paar 3 und 4 eine Deletion und die Paare 5/6, 7/8, 9/10

15 Insertionen. Die Sequenzen der Oligonukleotide waren folgende:

Sequenz in 5' – 3'-Richtung mit 3'-NH₂-Modifikation:

1:	GATCTTCGCCTTACTG	pm
20 2:	GATCTTCACCTTACTG	mm
3:	GAAACACCAAAGATGATA	pm
4:	GAAACACC GATGATA	mm
25 5:	CTTCTAATTA TTTGGTATGT	pm
6:	CTTCTAATTATTTGGTATGT	mm
7:	GAGTTCTTCTAATTA TTTGG	pm
8:	GAGTTCTTCTAATTATTTGG	mm
30		

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 54 -

9: TTTTAGAGTTCITCTAATTA T pm
 10: TTTTAGAGTTCITCTAATTATT mm

Das Sondenpaar 3 (Wildtyp) und 4 (Deletion) beinhaltet die häufigste Mutation (70% aller Fälle), die für Cystische Fibrose kodiert.

Ein einzelnes komplettes (quadratisches) Sondenarray auf der Objektträger-Oberfläche bestand aus insgesamt $10 \times 10 = 100$ abgelegten Sonden. Jede der 10 Oligonukleotid-Sonden wurde dabei in 8- bis 10-facher Wiederholung auf dem Sondenarray abgelegt (Array-Aufbau: siehe Abb. 16). Die Sonden hatten einen Abstand von 0,2 mm, das gesamte Sondenarray bedeckte eine Fläche von 2 mm x 2 mm. Insgesamt konnten auf diese Weise pro Objektträger über 100 identische Sondenarrays erzeugt werden.

Das Ablegen der Sonden erfolgte aus einer jeweils 10 μ M-Lösung der Oligonukleotide in 0,1 M Phosphatpuffer/5%-Natriumsulfat. Nach dem Ablegen und Eintrocknen wurden die Sonden durch 30-minütiges Backen bei 60 °C kovalent mit den Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche verknüpft. Anschließend erfolgte ein Wasch- und Blockierungsprozess der Objektträger in folgender Reihenfolge:

5 min in 600 ml H₂O bidest + 600 μ l Triton x 100
 2 x 2 min in 600 ml H₂O bidest + 60 μ l HCL (konz.)
 30 min in 100 mM KCl-Lösung
 1 min in H₂O bidest spülen

15 min bei 50°C in Glasschale in 75 ml H₂O bidest + 25 ml Ethylenglykol +20 μ l HCl (konz.) inkubieren
 1 min in H₂O bidest spülen
 mit Druckluft trocknen

30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 55 -

Nach Beendigung der Waschschrirte und Trocknen der Objektträger wurden diese in 3,25 mm x 3,25 mm große Glasstücke (nachfolgend „Chips“ genannt) zerschnitten. Auf jedem der Chips befand sich genau ein Sondenarray der Größe 2 mm x 2 mm.

5 Hybridisierung und Konjugation der Sondenarrays

Für die Hybridisierung der Sondenarrays standen für die 10 Oligonukleotid-Sonden 3 zu den Perfect match (pm)-Sonden komplementäre Biotin-markierte Targets zur Verfügung. Dabei deckte Target 1 das Sondenpaar 1 und 2, Target 2 das Paar 3 und 4 und Target 3 die Sondenpaare 5/6, 7/8 und 9/10 ab. Die Sequenzen der Targets

10 lauten:

Target 1: 5'-Biotin- CTCAGTAAGCGAAGATCTT-3'

Target 2: 5'-Biotin- AATATCATCTTTGGTGTTCCT-3'

Target 3: 5'-Biotin- GAACATACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACA-

15 3'

Die Hybridisierungs-Reaktion wurde in 6x SSPE-Puffer (52,59 g NaCl, 8,28 g NaH₂PO₄ x H₂O, 2,22 g EDTA x 2H₂O in 1 l H₂O bidest, auf pH 7,4 mit NaOH eingestellt)/0,1 % SDS in einem Gesamtvolumen von 70 µl mit dem Target 3 in einer 20 100 nM- und 1 nM-Konzentration durchgeführt. Hierbei wurde ein Chip mit dem Sondenarray in die Hybridisierungslösung gegeben, 5 min bei 95 °C erhitzt, dann 60 min bei 55 °C unter Schütteln inkubiert.

Anschließend wurden die hybridisierten Chips je 10 min in 2 x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30°C), 2 x SSC (500 µl bei 20°C) und 0,2 x SSC (500 µl bei 20°C) unter 25 Schütteln gewaschen. In einem neuen Reaktionsgefäß schloss sich eine 15 minütige Inkubation (bei 30°C) mit einem Streptavidin-Goldkonjugat an. Als Streptavidin-Goldkonjugat wurden Goldpartikel der Größe 5 nm verwendet (British Biocell International, EM.STP5). Das Konjugat lag im Versuch in einer Konzentration von 30 125 pg Streptavidin/µl vor.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 56 -

Nach der Konjugation wurde der Chip in ein neues Reaktionsgefäß überführt und je 10 min in 2 x SSC/0,2 % SDS (500 µl bei 30°C), 2 x SSC (500 µl bei 20°C) und 0,2 x SSC (500 µl bei 20°C) unter Schütteln gewaschen und dann getrocknet (Eppendorf-Concentrator).

5

Silberverstärkung, Detektion und Auswertung

Zur Silberverstärkung wurden die Chips in einer abgeschlossenen Reaktionskammer (siehe hierzu Abbildung 1) fixiert und mit einer Silberentwicklungslösung (British Biocell International, SEKL15) überschichtet. Die Inkubationslösung wurde durch Mischen von je einem Tropfen Initiator- und Enhancer-Lösung hergestellt. Während der 20-minütigen Inkubation bei 27 °C wurde der zeitliche Verlauf der Silberverstärkung durch ein Fotoserie (alle 10 s ein Bild) dokumentiert (als Lichtquelle diente eine rote LED). Die Bilder wurden anschließend mit der Bildauswertungs-Software IconoClust (Fa. Clondiag) ausgewertet.

15

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17 bis 20 sowie Tabelle 2 dargestellt. Aus dem Vergleich der für die jeweilige Sonde bei einem Target bestimmter Konzentration typischen linearen Regressionsgeraden, die im Bereich des exponentiellen Anstiegs der Kurve ermittelt werden, läßt sich eine unbekannte Target-Konzentration abschätzen. Voraussetzung hierfür sind gleiche Mengen eingesetzten Konjugates, gleiche Konzentration der immobilisierten Sonden sowie gleiche Versuchstemperatur.

20

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 57 -

Tabelle 2: Lineare Regressionsgleichungen für ausgewählte Sonden (Array-Elemente) sowie den Chip-Hintergrund. Der Anstieg der jeweiligen Regressionsgeraden ist fett gedruckt (x: Zeit in Minuten nach Beginn der Silberverstärkung, y: Signalintensität im gültigen Minutenbereich, Hybridisierung mit Target 3 in den Konzentrationen 100 nM und 1 nM).

Sondenarray-Element	Target-Konzentration	Bereich Minuten	Gleichung f(x)	R ²	Standard-Fehler
Hintergrund	100 nM	1-20	y= 0,0551+(0,013 * x)	0,971	0,014
Hintergrund	1 nM	1-20	y= 0,0161+(0,013 * x)	0,984	0,01
Sonde 5 pM	100 nM	4-13	y= -0,263+(0,0740 * x)	0,993	0,021
Sonde 5 pM	1 nM	4-13	y= -0,259+(0,0677 * x)	0,989	0,023
Sonde 6 pM	100 nM	4-13	y= -0,246+(0,0647 * x)	0,991	0,02
Sonde 6 pM	1 nM	4-13	y= -0,153+(0,0417 * x)	0,969	0,024

Abbildungen

10 Abbildung 1: Vorrichtung zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Sonden und Targets.

Abbildung 2: Wiedergabe des zeitlichen Verlaufs der in Abbildung 3 dargestellten Hybridisierungsergebnisse.

15

Abbildung 3: Darstellung der Ergebnisse der Hybridisierung.

A - Hybridisierung des in einer Konzentration von 10 nM vorliegenden Targets,
 B - Hybridisierung des in einer Konzentration von 1 nM vorliegenden Targets,
 20 C - Hybridisierung des in einer Konzentration von 100 pM vorliegenden Targets und
 D - Hybridisierung des in einer Konzentration von 10 pM vorliegenden Targets.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 58 -

Abbildung 4: Nachweis der Hybridisierung von genomischer RNA aus *Corynebacterium glutamicum* gegen ein Sondenarray von 356 Sonden - resultierendes Muster nach 15minütiger Inkubation.

- 5 Abbildung 5: Aufbau eines Arrays der Größe 2 mm x 2 mm in einem 10 x 10 = 100 Sondenarray.

Die Zahlen 1-16 stehen jeweils für eine Oligonukleotid-Sonde, die in 5- bzw. 6-facher Wiederholung auf dem array abgelegt ist; „M“ steht für ein Markengemisch (enthält u.a. ein immobilisiertes Biotin-markiertes Oligonukleotid); 1 Position auf + dem Array ist nicht belegt.

Abbildung 6: Sondenarray nach erfolgter Hybridisierung, Konjugation und Silberverstärkung (zum Arrayaufbau vgl. Abb. 5).

- 15 a) linkes Bild: Target 9b (100 nM)-Hybridisierung bei 30 °C; 1. Waschschrift bei 60 °C; Streptavidin-Goldkonjugat (500 pg/μl); Silberverstärkung: 10 min bei 25 °C

20 Außer der spezifischen Sonde 9 (und den Marken) ist noch ein schwach unspezifisches Signal der Sonde 13 erkennbar.

- b) rechtes Bild: Target 9b (100 pM)-Hybridisierung bei 30 °C mit anschließender direkter Streptavidin-Goldkonjugat Zugabe (500 pg/μl); 1. Waschschrift bei 60 °C, Silberverstärkung: 10 min bei 25 °C.

25 Abbildung 7: Aufbau eines Arrays der Größe 2 mm x 2 mm in einem 10 x 10 = 100 Sondenarray.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 59 -

Die Zahlen 1-10 stehen jeweils für eine Oligonukleotid-Sonde, die in 8- bis 10-facher Wiederholung auf dem Array abgelegt ist; „M“ steht für ein Markengemisch (enthält u.a. ein immobilisiertes Biotin-markiertes Oligonukleotid).

- 5 Abbildung 8: Sondenarray nach erfolgter Hybridisierung, Konjugation und Silberverstärkung (zum Arrayaufbau vgl. Abb. 7).

Target 1 (100 pM)-Hybridisierung bei 30 °C mit anschließender direkter Streptavidin-Goldkonjugat Zugabe (500 pg/μl); 1. Waschschrift bei 55 °C, Silberverstärkung: 10 min bei 25 °C.

Abbildung 9: Sondenarray nach erfolgter Hybridisierung, Konjugation und Silberverstärkung (zum Arrayaufbau vgl. Abb. 1).

- 15 Target 2 (100 pM)-Hybridisierung bei 30 °C mit anschließender direkter Streptavidin-Goldkonjugat Zugabe (500 pg/μl); 1. Waschschrift bei 55 °C, Silberverstärkung: 10 min bei 25 °C.

- 20 Abbildung 10: Sondenarray nach erfolgter Hybridisierung, Konjugation und Silberverstärkung (zum Arrayaufbau vgl. Abb. 1).

Target 3 (100 pM)-Hybridisierung bei 30 °C mit anschließender direkter Streptavidin-Goldkonjugat Zugabe (500 pg/μl); 1. Waschschrift bei 55°C, Silberverstärkung: 10 min bei 25°C.

- 25 Abbildung 11: Aufbau eines Arrays der Größe 2 mm x 2 mm in einem 10 x 10 = 100 Sondenarray.

- 30 Die Zahlen 1-16 stehen jeweils für eine Oligonukleotid-Sonde, die in 5- bzw. 6-facher Wiederholung auf dem Array abgelegt ist; „M“ steht für ein Markengemisch

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 60 -

(enthält u.a. ein immobilisiertes Biotin-markiertes Oligonukleotid); 1 Position auf dem Array ist nicht belegt.

Abbildung 12: Sondenarray nach erfolgter Hybridisierung, Konjugation und Silberverstärkung von Beispiel 5 (zum Arrayaufbau vgl. Abb. 11).

Target 9c (1 nM)- 60 min Hybridisierung bei 30 °C; dann Zugabe von T20-Nanogold (1:100 Verdünnung) und weitere Inkubation für 30 min bei 30 °C, 1. Waschschrift bei 55 °C; Silberverstärkung: 10 min bei 25 °C.

10 Außer dem starken spezifischen Signal der Sonde 9 (und den Marken) liefern auch die übrigen Sonden ein schwaches Signal; die teilweise verlaufenen und inhomogenen Spots kamen durch beim Ablegen der Sonden durch Verunreinigung der Nadel des Arrayers zustande.

15 Abbildung 13: Aufbau eines Arrays der Größe 2 mm x 2 mm in einem 10 x 10 = 100 Sondenarray

20 Die Zahlen 1-10 stehen jeweils für eine Oligonukleotid-Sonde, die in 8- bis 10-facher Wiederholung auf dem Array abgelegt ist; „M“ steht für ein Markengemisch (enthält u.a. ein immobilisiertes Biotin-markiertes Oligonukleotid).

Abbildung 14: Sondenarray nach erfolgter Hybridisierung und Konjugation (zum Arrayaufbau vgl. Abb. 1).

25 Target 2 (100 pM)-Hybridisierung bei 30 °C mit anschließender direkter Streptavidin-Goldkonjugat Zugabe (500 pg/μl); 1. Waschschrift bei 55 °C
a) linkes Bild: 5 min nach Beginn Silberverstärkung
b) rechtes Bild: 10 min nach Beginn Silberverstärkung

30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 61 -

Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Silberverstärkung (vgl. hierzu Abbildungen 13 und 14).

Minütliche Messung, jeder Meßpunkt ist ein Mittelwert aus 10 Spot-Wiederholungen

5 pm: Perfect match-Sonde (Sonden-Nr. 3)

mm: Mismatch-Sonde (Sonden-Nr. 4)

Target 2 (100 pM)-Hybridisierung bei 30 °C mit anschließender direkter Streptavidin-Goldkonjugat Zugabe (500 pg/ μ l)

10

Abbildung 16: Aufbau eines Arrays der Größe 2 mm x 2 mm in einem 10 x 10 = 100 Sondenarray

15 Die Zahlen 1-10 stehen jeweils für eine Oligonukleotid-Sonde, die in 8- bis 10-facher Wiederholung auf dem array abgelegt ist; „M“ steht für ein Markengemisch (enthält u.a. ein immobilisiertes Biotin-markiertes Oligonukleotid in der Konzentration 10 μ M).

Das hybridisierte Target 3 war komplementär zu den Sonden 5, 7, 9 (jeweils perfect match) und den Sonden 6, 8, 10 (jeweils mismatch mit einer Insertion).

20

Abbildung 17: Sondenarray nach erfolgter Hybridisierung und Konjugation (zum Arrayaufbau vgl. Abb. 16)

25 Die Bilder sind von links nach rechts jeweils 5 min, 10 min und 20 min nach Beginn der Silberverstärkung aufgenommen

oben: Target 3 (1 nM)-Hybridisierung

unten: Target 3 (100 nM)-Hybridisierung

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 62 -

Abbildung 18: Signalintensitäten nach unterschiedlich langer Silberverstärkung bei 2 verschiedenen Targetkonzentrationen (vgl. mit Bildern aus Abbildung 17)

Abbildung 19 a (oben) und b(unten): Zeitlicher Verlauf der Silberverstärkung am
5 Beispiel der Sonden 5 und 6 (vgl. hierzu Abb. 16 bis 18)

Jeder Sonden-Meßpunkt ist ein Mittelwert aus 7 bis 10 Spot-Wiederholungen.

pm: Perfect match-Sonde (Sonden-Nr. 5)

10 mm: Mismatch-Sonde (Sonden-Nr. 6)

a: Target 3 (1 nM): Hybridisierung bei 55 °C ; Streptavidin-Goldkonjugat (125
pg/ μ l)

b: Target 3 (100 nM): Hybridisierung bei 55 °C ; Streptavidin-Goldkonjugat (125
pg/ μ l)

15

Abbildung 20: Ermittelte lineare Regressionsgeraden nach Hybridisierung mit Target
3 (100 nM und 1 nM) für zwei ausgewählte Sonden des Sondenarrays, gültig für den
Bereich von 4 bis 13 Minuten nach Beginn der Silberverstärkung.

20

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 63 -

Ansprüche

1. Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targets aus
5 einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sonden und Targets auf
Sonden-Arrays, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Herstellung eines Sondenarrays mit an definierten Stellen immobilisierten Sonden;
 - b) Wechselwirkung der Targets mit den auf dem Sondenarray angeordneten Sonden;
 - c) Durchführung einer Reaktion, die zu einem Niederschlag an Array-Elementen
10 führt, an denen eine Wechselwirkung erfolgt ist;
 - d) Detektion des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung an den Array-
Elementen in Form von Signalintensitäten;
 - e) Bestimmung einer virtuellen Signalintensität für ein Array-Element anhand einer
Kurvenfunktion, die die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt.
- 15
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß die virtuelle Signalintensität für ein Array-Element in
Abhängigkeit von der Steigung einer Regressionsgerade, die die
Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt, bestimmt wird.
- 20
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die Regressionsgerade im Bereich des exponentiellen
Anstiegs der Niederschlagsbildung mit der Zeit auf dem Array-Element ermittelt
wird.
- 25
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3,
dadurch gekennzeichnet, daß die virtuelle Signalintensität für ein Array-Element
durch Multiplikation der detektierten Signalintensität zu einem bestimmten
Zeitpunkt, vorzugsweise der Signalintensität der letzten Messung, mit der Steigung

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 64 -

der für das Array-Element ermittelten Regressionsgerade sowie mit der Meßdauer zu dem bestimmten Zeitpunkt bestimmt wird.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
5 **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Probe ein Referenz-Target mit bekannter Konzentration vorliegt, das mit mindestens einer Sonde des Sondenarrays wechselwirkt.
6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
10 **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Detektion des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung an den Array-Elementen die Signalintensitäten mindestens jede Minute, vorzugsweise alle 30 Sekunden, besonders bevorzugt alle 10 Sekunden aufgenommen werden.
- 15 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion, die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führt, die Umwandlung eines löslichen Substrats in ein unlösliches Produkt in Gegenwart eines mit den Targets gekoppelten Katalysators ist.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß der Katalysator ein Enzym ist.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8,
dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym ausgewählt wird aus der Gruppe,
25 bestehend aus Meerettichperoxidase, alkalischer Phosphatase und Glucoseoxidase.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, daß das lösliche Substrat ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus 3,3'-Diaminobenzidin, 4-Chlor-1-naphthol, 3-Amino-9-
30 ethylcarbazol, p-Phenyldiamin-HCl/Pyrocatechol, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin,

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 65 -

Naphthol/Pyronin, Bromchlorindoylphosphat, Nitrotetraazoliumblau und Phenazinmethosulfat.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
5 **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktion, die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führt, die Umwandlung eines löslichen Substrats in einen metallischen Niederschlag ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
10 **dadurch gekennzeichnet**, daß die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führende Reaktion die chemische Reduktion einer Silberverbindung, vorzugsweise Silbernitrat, Silberlactat, Silberacetat oder Silbertartrat, zu elementarem Silber ist.
- 15 13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, daß das Reduktionsmittel ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Formaldehyd und Hydrochinon.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,
20 **dadurch gekennzeichnet**, daß die Umwandlung eines löslichen Substrats in einen metallischen Niederschlag in Gegenwart von mit den Targets gekoppelten Metallclustern bzw. kolloidalen Metallpartikeln erfolgt.
15. Verfahren nach Anspruch 14,
25 **dadurch gekennzeichnet**, daß die Umwandlung eines löslichen Substrats in einen metallischen Niederschlag in Gegenwart von Goldclustern oder kolloidalen Goldpartikeln erfolgt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 66 -

dadurch gekennzeichnet, daß die die Umwandlung eines löslichen Substrats in einen metallischen Niederschlag in Gegenwart von mit den Targets gekoppelten Polyanionen erfolgt.

- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 16,
dadurch gekennzeichnet, daß die Katalysatoren bzw. Metallcluster bzw. kolloidalen Metallpartikel bzw. Polyanionen an die Targets vor, während oder nach der Wechselwirkung mit den Sonden gekoppelt werden.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der Enzyme bzw. Metallcluster bzw. kolloidalen Metallpartikel bzw. Polyanionen an die Targets direkt oder über an die Targets gekoppelte Ankermoleküle erfolgt.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, daß das Ankermolekül ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Streptavidin oder einem Antikörper.
- 20 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion, die zur Bildung eines Niederschlags an den Array-Elementen führt, die Bindung eines spezifischen Bindungspartners an ein an das Target gekoppeltes Ankermolekül darstellt.
- 25 21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungspartner/Ankermolekül-Paare ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus Biotin/Avidin bzw. Streptavidin bzw. Anti-Biotin-Antikörper, Digoxigenin/Antidigoxigenin-Immunglobulin, FITC/Anti-FITC-Immunglobulin und DNP/Anti-DNP-Immunglobulin.
- 30 22. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 67 -

dadurch gekennzeichnet, daß die Targets direkt mit einer Markierung versehen werden.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21,
- 5 **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Markierung der Targets über Sandwich-Reaktionen bzw. Sandwich-Hybridisierungen mit der mit den Targets wechselwirkenden Sonden und einer markierten Verbindung erfolgt.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21,
- 10 **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Markierung der Targets durch Anflügen einer homopolymeren Nukleotid-Sequenz an die Targets unter Bildung einer fortlaufenden Sequenz und anschließende Sandwich-Hybridisierung mit einem zur homopolymeren Nukleotid-Sequenz komplementären markierten Oligonukleotid erfolgt.
- 15 25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Wechselwirkung zwischen dem Target und der Sonde eine Hybridisierung zwischen zwei Nukleotidsequenzen ist.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24,
- 20 **dadurch gekennzeichnet**, daß die Wechselwirkung zwischen dem Target und der Sonde eine Reaktion zwischen einer Antigenstruktur und dem entsprechenden Antikörper oder einem hypervariablen Abschnitt davon ist.
27. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
- 25 **dadurch gekennzeichnet**, daß die Wechselwirkung zwischen dem Target und der Sonde eine Reaktion zwischen einem Rezeptor und einem entsprechenden Liganden ist.

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 68 -

28. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Gegenwart eines Niederschlags auf
einem Array-Element durch Reflexion, Absorption oder Diffusion eines Lichtstrahls,
vorzugsweise eines Laserstrahls oder einer Leuchtdiode, durch den Niederschlag
5 erfolgt.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27,
dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Gegenwart eines Niederschlags auf
einem Array-Element elektrisch erfolgt.
10
30. Verfahren nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet, daß der elektrische Nachweis über
Leitfähigkeitsmessungen, Kapazitätsmessungen oder Potentialmessungen erfolgt.
- 15 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27,
dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Gegenwart eines Niederschlags auf
einem Array-Element durch Autoradiographie, Fluorographie und/oder indirekte
Autoradiographie erfolgt.
- 20 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27,
dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Gegenwart eines Niederschlags auf
einem Array-Element durch Rasterelektronenmikroskopie, Elektronensonden-
Mikroanalyse (EPMA), magnetooptische Kerr-Mikroskopie, magnetic force-
Mikroskopie (MFM), atomic force-Mikroskopie (AFM), Messung des Mirage-
25 Effekts, Rastertunnelmikroskopie (STM) und/oder Ultraschall-Reflexions-
Tomographie erfolgt.
33. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, umfassend die folgenden
Schritte:

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 69 -

- Detektion des zeitlichen Verlaufs der Niederschlagsbildung an den Array-Elementen durch Aufnahme von Bildern durch eine Kamera;
 - Umwandlung der in den Bildern enthaltenen analogen Information in digitale Form;
 - 5 - Berechnung einer virtuellen Signalintensität für jedes Array-Element anhand einer Kurvenfunktion, die die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt;
 - Umwandlung der virtuellen Signalintensitäten in ein künstliches Bild, das die virtuellen Signalintensitäten aller Array-Elemente darstellt.
- 10
34. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 33, umfassend:
- a) ein Array-Substrat mit Sonden-Array,
 - b) eine Reaktionskammer,
 - 15 c) eine Vorrichtung zur Detektion eines Niederschlags auf einem Array-Element, an dem eine Wechselwirkung zwischen Targets und Sonden stattgefunden hat, und
 - d) einen Computer, der programmiert ist, um:
 - die von der Detektionsvorrichtung aufgenommenen Signalintensitäten zu sammeln;
 - 20 - die Verarbeitung der sukzessive aufgenommenen Signalintensitäten derart zu gewährleisten, daß der zeitliche Verlauf der Niederschlagsbildung mit der Zeit auf einem Array-Element bestimmt wird und eine virtuelle Signalintensität anhand einer Kurvenfunktion bestimmt wird, die die Niederschlagsbildung als Funktion der Zeit beschreibt; und
 - 25 - ggf. die Umwandlung der virtuellen Signalintensitäten in ein analoges Bild zu gewährleisten.
35. Vorrichtung nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionsvorrichtung eine Kamera ist.
- 30

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

- 70 -

36. Vorrichtung nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet, daß die Kamera eine CCD- oder CMOS-Kamera ist.
37. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 34 bis 36,
5 **dadurch gekennzeichnet**, daß die Vorrichtung zusätzlich eine Lichtquelle umfaßt.
38. Vorrichtung nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle ausgewählt wird aus der Gruppe,
bestehend aus einem Laser, einer Licht-emittierenden Diode (LED) und einer
10 Hochdrucklampe.
39. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 24 bis 38,
dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung als hochintegrierte autonome Einheit
vorliegt.
15

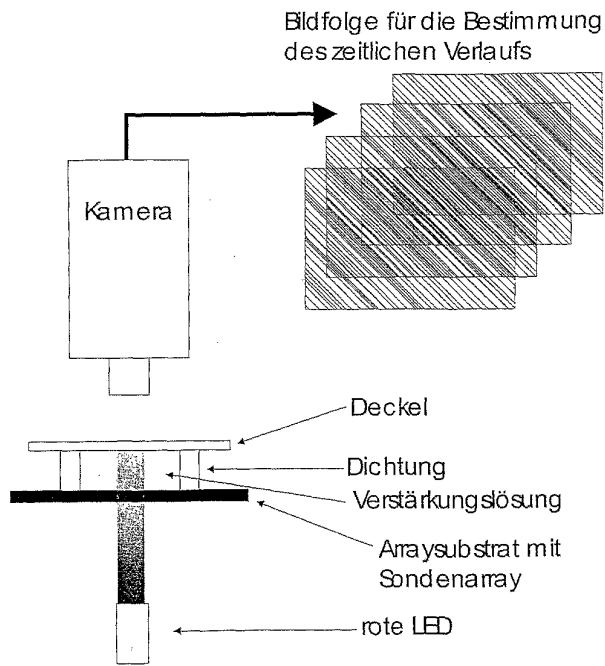


Abb. 1

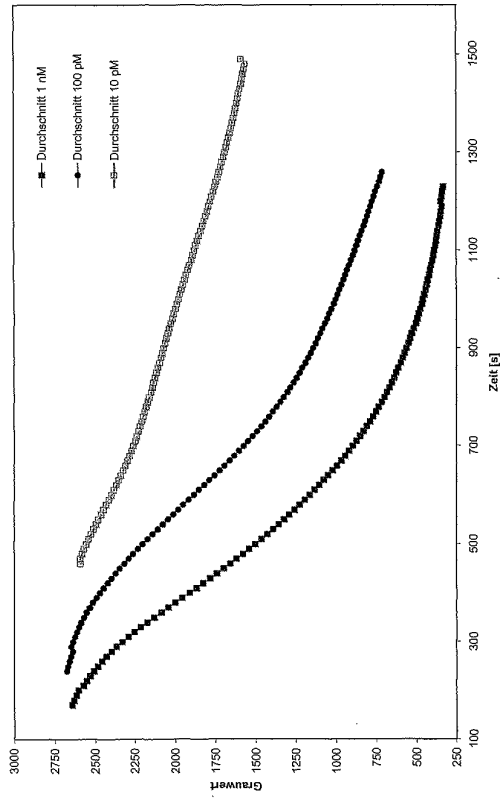


Abb. 2

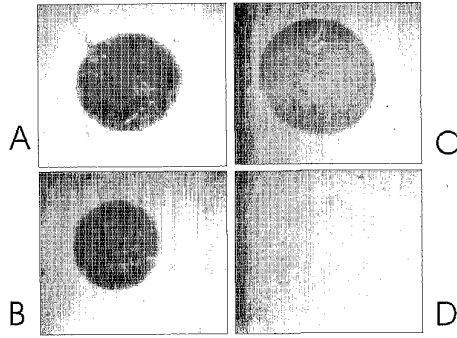


Abbildung 3

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

4/21

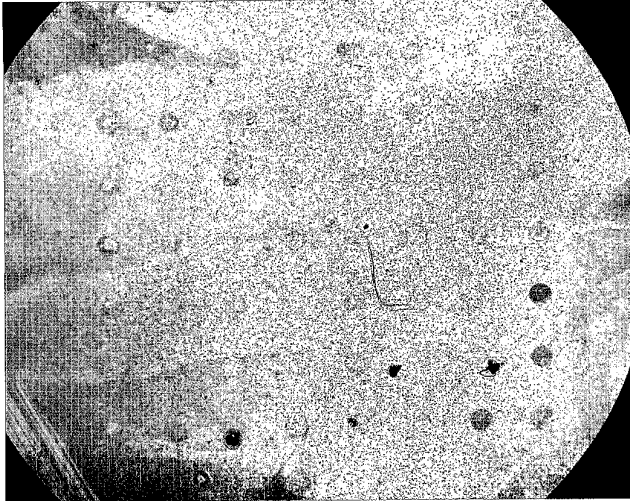


Abbildung 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

M	10	11	12	13	14	15	16		M
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	15	15	15	15	16	16	16	16	16
13	13	13	13	13	14	14	14	14	14
11	11	11	11	11	12	12	12	12	12
9	9	9	9	9	10	10	10	10	10
7	7	7	7	7	8	8	8	8	8
5	5	5	5	5	6	6	6	6	6
3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
M	1	1	1	1	2	2	2	2	M

Abb. 5

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

6/21

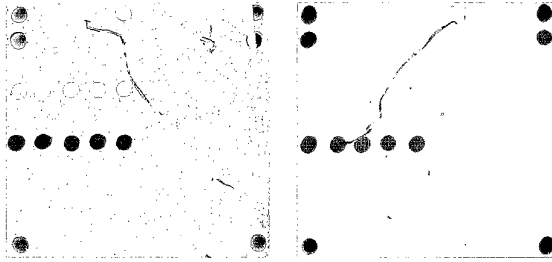


Abbildung 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

7/21

M	10	10	10	10	10	10	10	10	M
M	9	9	9	9	9	9	9	9	9
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
M	1	1	1	1	1	1	1	1	M

Abb. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

8/21

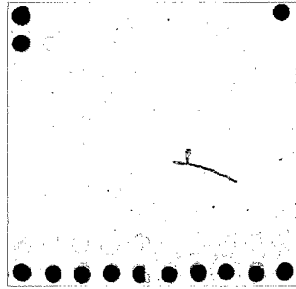


Abbildung 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

9/21.

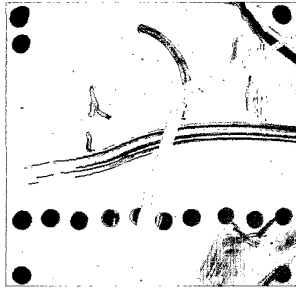


Abbildung 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

10/21

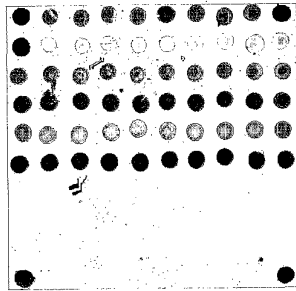


Abbildung 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

11/21

M	10	11	12	13	14	15	16		M
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	15	15	15	15	16	16	16	16	16
13	13	13	13	13	14	14	14	14	14
11	11	11	11	11	12	12	12	12	12
9	9	9	9	9	10	10	10	10	10
7	7	7	7	7	8	8	8	8	8
5	5	5	5	5	6	6	6	6	6
3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
M	1	1	1	1	2	2	2	2	M

Abb.11

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

12/11

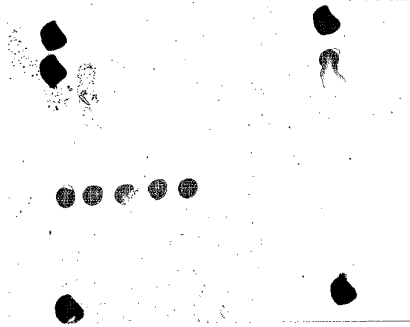


Abbildung 12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

13/21

M	10	10	10	10	10	10	10	10	M
M	9	9	9	9	9	9	9	9	9
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
M	1	1	1	1	1	1	1	1	M

Abb.13

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

14/21

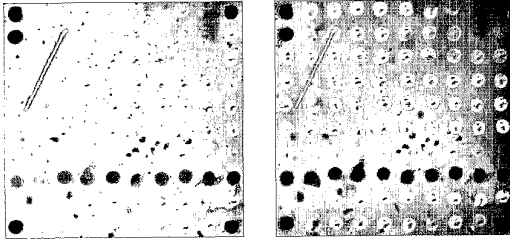


Abbildung 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

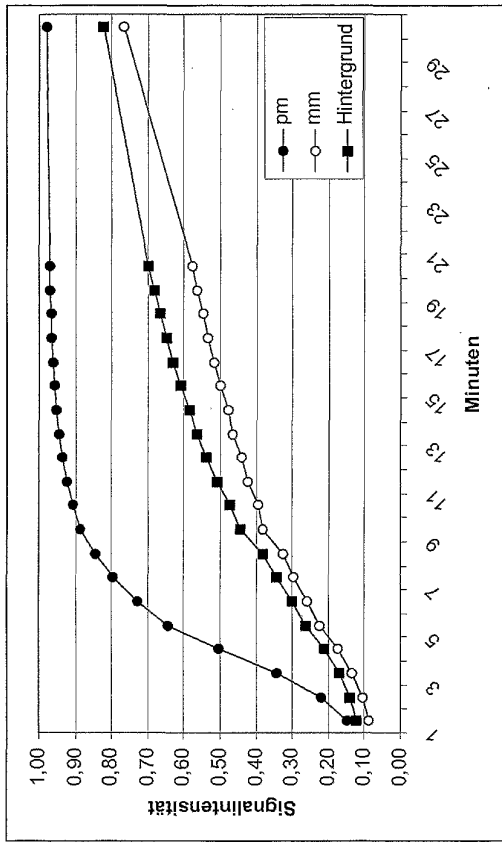


Abb. 15

M	10	10	10	10	10	10	10	10	M
M	9	9	9	9	9	9	9	9	9
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
M	1	1	1	1	1	1	1	1	M

Abb. 16

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

17/21

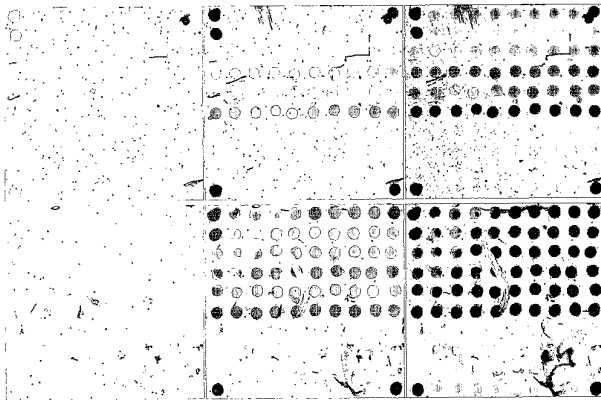


Abbildung 17

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/02810

PCT/EP01/07575

18/21

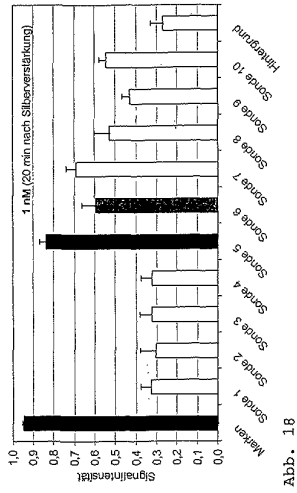
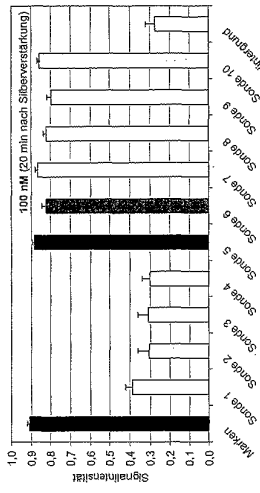
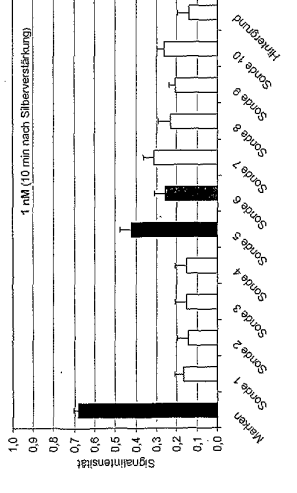
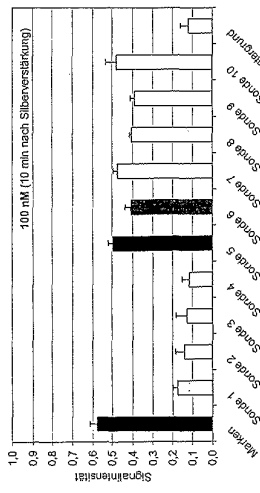


Fig. 1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

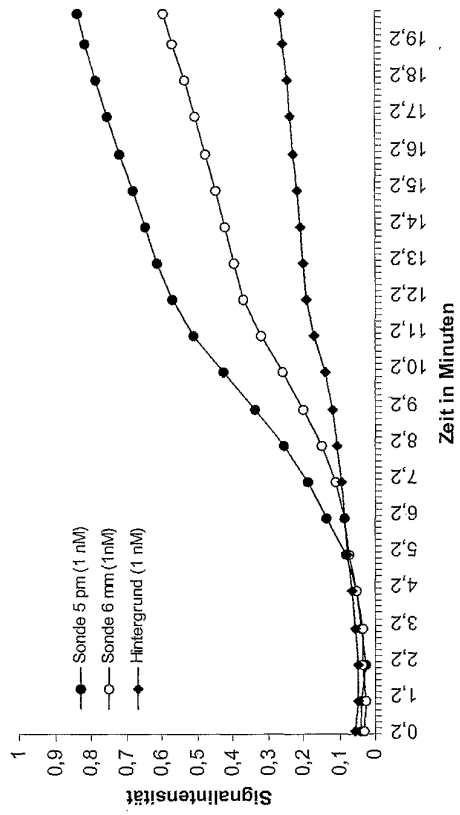


Abb. 19a

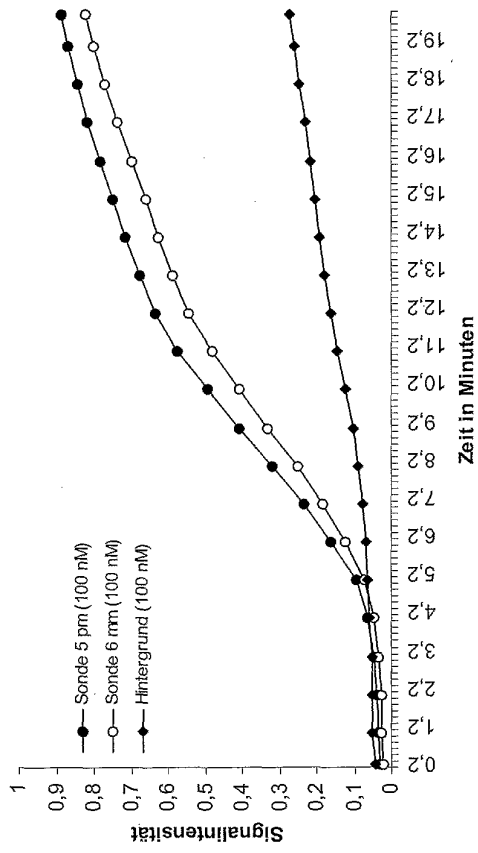


Abb. 19b

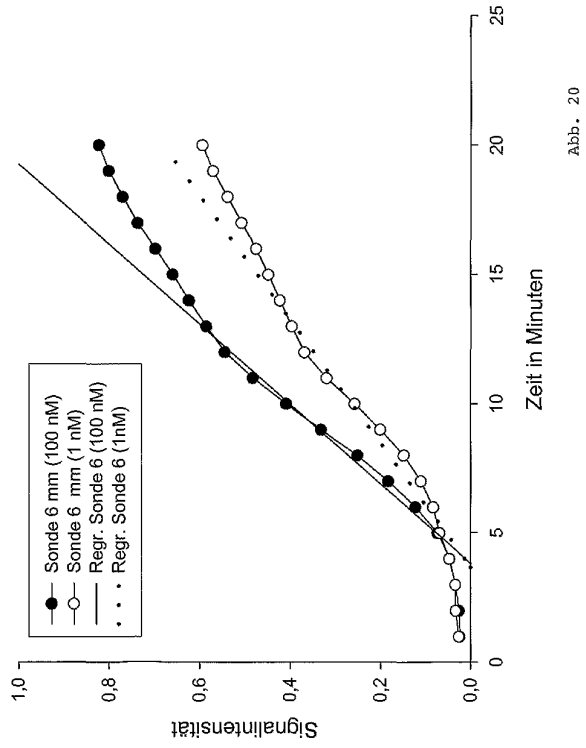


Abb. 20

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Januar 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/002810 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07575
- (22) Internationales Anmeldedatum:
2. Juli 2001 (02.07.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 33 334.6 1. Juli 2000 (01.07.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Lösseidler Strasse 105, 07743 Jena (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BICKEL, Ralf [DE/DE]; Am Kieshügel 37, 07743 Jena (DE); EHRICHT, Ralf [DE/DE]; Rosenstrasse 8, 07749 Jena (DE); ELLINGER, Thomas [DE/DE]; Steubenstrasse 6, 07743 Jena (DE); ERMANTRÄUT, Eugen [DE/DE]; Forstweg 23, 07745 Jena (DE); KAISER, Thomas [DE/DE]; Talstrasse 73, 07743 Jena (DE); SCHULZ, Torsten [DE/DE]; Augusti-Bebel-Strasse 22, 07743 Jena (DE); WAGNER, Gerd [DE/DE]; Ulrichweg 4, 07745 Jena (DE).
- (74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald Patentanwalts GmbH, Ulisenhof, Ulisenstrasse 3, 80335 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EG, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 19. September 2002
- 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 FOR QUALITATIVE AND/OR QUANTITATIVE DETECTING OF MOLECULAR INTERACTIONS ON PROBE ARRAYS

A3 (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM QUALITATIVEN UND/ODER QUANTITATIVEN NACHWEIS VON MOLEKULAREN WICHTIGKEITSWIRKUNGEN AUF SONDEN-ARRAYS

(57) Abstract: The invention relates to a method for qualitatively and/or quantitatively detecting certain molecular targets using probe arrays. The inventive detection method comprises a reaction which delivers a product with a particular solubility product, this solubility product causing the precipitation or the formation of a precipitate of the product on an array element of the probe array on which an interaction has taken place between the probe and the target.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von bestimmten molekularen Targets mit Hilfe von Sonden-Arrays, wobei der Nachweis bei dem erfindungsgemäßen Verfahren durch eine Reaktion erfolgt, die ein Produkt mit einem bestimmtem Löslichkeitsprodukt liefert, das eine Präzipitation bzw. eine Niederschlagsbildung des Produkts auf einem Array-Element des Sonden-Arrays, an dem eine Wechselwirkung zwischen Sonde und Target stattgefunden hat, zur Folge hat.

WO 02/002810 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/07575
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 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) IPC 7 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) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WD 96 09532 A (ABBOTT LAB) 28 March 1996 (1996-03-28) page 1, line 7 - line 13 page 4, line 18 - line 24 page 5, line 6 -page 6, line 5 page 19, line 32 -page 29, line 20 claims 1-15; figures 3-12; examples 4-8 ---	1-39
X	EP 0 267 521 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 18 May 1988 (1988-05-18) page 2, line 29 - line 44 page 3, line 1 -page 4, line 4 claims 1-8; figure 3; examples 1-5 --- -/--	1-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed **I* 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2002		Date of mailing of the international search report 18/07/2002
Name and mailing address of the ISA 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		Authorized officer van Klompenburg, W

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/07575

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 04740 A (UNIV NORTHWESTERN ;MIRKIN CHAD A (US); MUCIC ROBERT C (US); ELGHAN) 5 February 1998 (1998-02-05) page 39, line 26 - line 35; figures 7,8,13,14 -----	1-39

2

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/07575

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9609532	A	28-03-1996	US 5599668 A	04-02-1997
			AU 3636295 A	09-04-1996
			CA 2197321 A1	28-03-1996
			EP 0783683 A1	16-07-1997
			JP 10506190 T	16-06-1998
			WO 9609532 A1	28-03-1996
			US 5843651 A	01-12-1998
EP 0267521	A	18-05-1988	AU 593151 B2	01-02-1990
			AU 8063387 A	19-05-1988
			DK 590587 A	13-06-1988
			EP 0267521 A2	18-05-1988
			FI 874961 A	13-05-1988
			IE 873036 L	12-05-1988
			JP 63135861 A	08-06-1988
			NZ 222479 A	29-05-1989
			ZA 8708464 A	09-05-1988
			WO 9804740	A
EP 0918885 A1	02-06-1999			
JP 2000516460 T	12-12-2000			
WO 9804740 A1	05-02-1998			
US 6361944 B1	26-03-2002			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/07575
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q		
Rechercheerte 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) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 09532 A (ABBOTT LAB) 28. März 1996 (1996-03-28) Seite 1, Zeile 7 - Zeile 13 Seite 4, Zeile 18 - Zeile 24 Seite 5, Zeile 6 - Seite 6, Zeile 5 Seite 19, Zeile 32 - Seite 29, Zeile 20 Ansprüche 1-15; Abbildungen 3-12; Beispiele 4-8	1-39
X	EP 0 267 521 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 18. Mai 1988 (1988-05-18) Seite 2, Zeile 29 - Zeile 44 Seite 3, Zeile 1 - Seite 4, Zeile 4 Ansprüche 1-8; Abbildung 3; Beispiele 1-5	1-39
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/>
	Siehe Anhang Patentfamilie	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
12. Juli 2002		18/07/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P. B. 5618 Patentaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3440, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Befullmächtigter Bediensteter van Klompenburg, W

2

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/07575

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Befr. Anspruch Nr.
A	WO 98 04740 A (UNIV NORTHWESTERN ;MIRKIN CHAD A (US); MUCIC ROBERT C (US); ELGHAN) 5. Februar 1998 (1998-02-05) Seite 39, Zeile 26 - Zeile 35; Abbildungen 7,8,13,14 -----	1-39

2

Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07575

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9609532	A	28-03-1996	US 5599668 A 04-02-1997
			AU 3636295 A 09-04-1996
			CA 2197321 A1 28-03-1996
			EP 0783683 A1 16-07-1997
			JP 10506190 T 16-06-1998
			WO 9609532 A1 28-03-1996
			US 5843651 A 01-12-1998
EP 0267521	A	18-05-1988	AU 593151 B2 01-02-1990
			AU 8063387 A 19-05-1988
			DK 590587 A 13-06-1988
			EP 0267521 A2 18-05-1988
			FI 874961 A 13-05-1988
			IE 873036 L 12-05-1988
			JP 63135861 A 08-06-1988
			NZ 222479 A 29-05-1989
			ZA 8708464 A 09-05-1988
			WO 9804740
EP 0918885 A1 02-06-1999			
JP 2000516460 T 12-12-2000			
WO 9804740 A1 05-02-1998			
US 6361944 B1 26-03-2002			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 エーリヒト、ラルフ

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 9 イエナ ローゼンシュトラッセ 8

(72) 発明者 エリンガー、トーマス

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 3 イエナ シュトイベンシュトラッセ 6

(72) 発明者 エルマントラウト、オイゲン

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 5 イエナ フォルストヴェーク 2 3

(72) 発明者 カイザー、トーマス

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 3 イエナ タルシュトラッセ 7 3

(72) 発明者 シュルツ、トルステン

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 3 イエナ アウグスト - ベーベル - シュトラッセ 2 2

(72) 発明者 ヴァーグナー、ゲルト

ドイツ連邦共和国 0 7 7 4 5 イエナ ウルリッヒヴェーク 4

F ターム(参考) 2G047 AA12 BA03 BC14 DA02 EA08 FA01 GH07 GH09

2G059 AA05 BB08 CC16 EE02 GG02 KK04

4B029 AA07 FA12

4B063 QA13 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QS34 QX02

专利名称(译)	用于定量和/或定量检测探针阵列上的分子相互作用的方法		
公开(公告)号	JP2004501667A	公开(公告)日	2004-01-22
申请号	JP2002507054	申请日	2001-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	至Klong鹿ING芯片野吕熙门吉斯的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	Kurondiagu芯片Tehinorogizu有限公司		
[标]发明人	ビッケルラルフ エーリヒトラルフ エリンガートーマス エルマントラウトオイゲン カイザートーマス シュルツトルステン ヴァーグナーゲルト		
发明人	ビッケル、ラルフ エーリヒト、ラルフ エリンガー、トーマス エルマントラウト、オイゲン カイザー、トーマス シュルツ、トルステン ヴァーグナー、ゲルト		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12Q1/68 C12Q1/6837 G01N21/47 G01N29/06 G01N33/566 G01N37/00 G01N29/20		
CPC分类号	C12Q1/6837		
FI分类号	C12Q1/68.A C12M1/00.A G01N21/47.Z G01N29/20.501 G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G047/AA12 2G047/BA03 2G047/BC14 2G047/DA02 2G047/EA08 2G047/FA01 2G047/GH07 2G047/ /GH09 2G059/AA05 2G059/BB08 2G059/CC16 2G059/EE02 2G059/GG02 2G059/KK04 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/ /QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	10033334 2000-07-01 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用探针阵列定性和/或定量检测某个分子靶的方法。本发明的检测方法包括产生具有特定溶解度产物的产物的反应。溶解度产物导致产物在探针阵列的阵列元件上沉淀或沉淀形成，其中发生探针 - 靶相互作用。

触媒または結晶核	基質
ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ	DAB (3,3'-ジアミノベンジジン) 4-CN (4-クロロ -1-ナフトール) AEC (3-アミノ -9- エチルカルバゾール) HYR (p-フェニレンジアミン -HClとピロカテコール) TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) ナフトール / ビロニン
アルカリホスファターゼ	ブロムクロルインドイルホスフェート (BCIP) および ニトロテトラゾリウムブルー (NBT)
グルコースオキシダーゼ	t-NBTおよび m-PMS (ニトロテトラゾリウムブルークロライド および フェナジシメトスルフェート)
金箔子	硝酸銀 酒石酸銀