

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 501 110 A1 2006-06-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer:

A 389/2004

(51) Int. Cl.⁸: G01N 48/00 (2006.01),

(22) Anmeldetag:

05.03.2004

G01N 33/543 (2006.01)

(43) Veröffentlicht am:

15.06.2006

(30) Priorität:

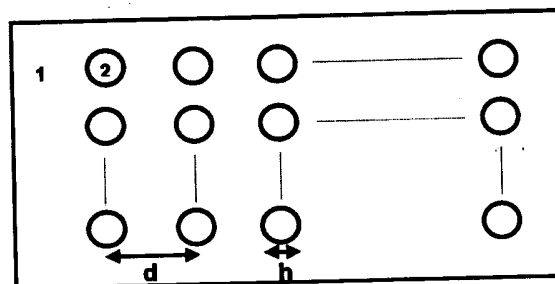
16.09.2003 AT A 1455/03 beansprucht.

(73) Patentanmelder:

UPPER AUSTRIAN RESEARCH GMBH
A-4020 LINZ (AT)

(54) ARRAYS ZUR BINDUNG VON MOLEKÜLEN

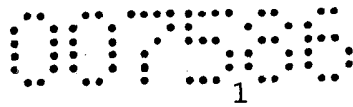
(57) Beschrieben wird eine Anordnung von einzelnen Molekülen, welche auf einem festen Substrat vorliegen, wobei die Dichte der Einzelmoleküle auf dem festen Substrat von 10^4 bis 10^{10} Einzelmolekülen pro cm^2 beträgt, sich bei zumindest 95 %, insbesondere bei zumindest 99 %, der Einzelmoleküle innerhalb eines gewählten Abstandes d von einem (beliebigen) Einzelmolekül keine weiteren Einzelmoleküle befinden oder detektierbar sind.



AT 501 110 A1 2006-06-15

Zusammenfassung:

Beschrieben wird eine Anordnung von einzelnen Molekülen, welche auf einem festen Substrat vorliegen, wobei die Dichte der Einzelmoleküle auf dem festen Substrat von 10^4 bis 10^{10} Einzelmolekülen pro cm^2 beträgt, sich bei zumindest 95 %, insbesondere bei zumindest 99 %, der Einzelmoleküle innerhalb eines gewählten Abstandes d von einem (beliebigen) Einzelmolekül keine weiteren Einzelmoleküle befinden oder detektierbar sind.



Die vorliegende Erfindung betrifft Arrays zur Bindung von Molekülen, die an definierten Stellen einzelne oder wenige Biomoleküle tragen und die mit Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie ausgelesen werden können.

Einzelmolekül-Nachweismethoden, speziell Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie, liefern einen wesentlichen Beitrag zur Analyse von Protein und DNA-Analyten im grundlagenwissenschaftlichen Bereich. Dank der Einzelmolekül-Methoden können jene Eigenschaften von Molekülen festgestellt und untersucht werden, die bei Ensemble-Messungen maskiert oder ausverdünnt werden. Einzelmolekül-Mikroskopie liefert auch einen wesentlichen Beitrag zur Weiterentwicklung von biotechnologischen Methoden, die in der Zukunft für diagnostische oder therapeutische Untersuchung in der Medizin eingesetzt werden sollen.

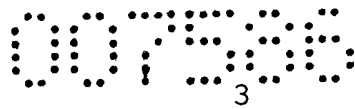
Ein Beispiel für den Einsatz der Einzelmolekül-Methode für diagnostische Zwecke ist DNA-Hybridisierung (Korn et al., 2003). DNA-Hybridisierung mit Hilfe von Microarrays ist eine weit verbreitete Technologie, um Nukleinsäuren im genomischen Maßstab zu untersuchen sowie für die Zwecke der Forschung, Diagnose und Therapie nutzen zu können. Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie bietet aufgrund der hohen Sensitivität die Möglichkeit, die Amplifikation der Proben-DNA zu vermeiden und damit bei Expressions-Analysen Amplifikations-Artefakte und verfälschte Aussagen über die Expressions-Niveaus zu verhindern.

Eine weitere Anwendung der Einzelmolekül-Mikroskopie ist die (Re)-Sequenzierung von z.B. menschlicher DNA (Braslavsky et al., 2003; Levene et al., 2003), um medizinisch wichtige Varianten, etwa SNPs, der Erbinformation zu erhalten. Bei den derzeit angewandten Sequenzier-Methoden muss die Analyt-DNA amplifiziert werden, bevor die Sequenzierungs-Reaktion stattfindet. Durch den Einsatz von Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie würde der Schritt der DNA-Amplifikation entfallen, und dies hätte die Verringerung des Reagenzien-Verbrauches und die erwünschte Kostenreduktion und die Beschleunigung des Sequenzierungs-Prozesses zur Folge.

Für beide Einzelmolekül-Anwendungen, DNA-Hybridisierung und im besonderen Maß DNA-Sequenzierung, sollten die einzelnen zu untersuchenden Moleküle idealerweise optisch isoliert auflösbar sein. Ist etwa der Abstand zweier DNA-Stränge geringer als die optische Auflösung, überlagern sich die Fluoreszenz-Signale von der Sequenzier-Reaktion beider Stränge, und die Sequenz der Stränge kann nicht mehr eindeutig eruiert werden.

Demnach sollten die zu untersuchenden DNA-Moleküle im Idealfall einzeln positioniert auf einem festen Substrat vorliegen. Diese Vorgabe wird in vielen publizierten Studien über Einzelmolekül-Untersuchungen nicht erfüllt. In diesen Studien werden die Moleküle ungerichtet und statistisch zufällig an einer Oberfläche gebunden, und dies hat zur Folge, dass sich auch Molekülgruppen oder Cluster an der Oberfläche ausbilden, die optisch nicht aufgelöst werden können. Um diese Überladung mit Molekülen zu vermeiden, werden verdünnte Molekül-Lösungen eingesetzt, mit dem Nachteil, dass die Dichte an Molekülen auf der Oberfläche sehr gering wird; zu gering, um etwa die relevanten Abschnitte des menschlichen Genom auf diagnostisch indikativen Variationen hin zu untersuchen.

Mit Hilfe eines DNA-Arrays bei dem einzelne DNA-Stränge an definierten Positionen vorliegen, könnten sowohl einzelne DNA-Stränge optisch aufgelöst werden als auch eine hohe Dichte an DNA-Analyten erreicht werden. In diesem Array würden einzelne Moleküle an definierten Stellen vorliegen, sodass um ein Molekül im Radius größer oder gleich der optischen Auflösung kein weiteres Molekül vorliegt. Dieser Einzelmolekül-Array hätte den weiteren Vorteil, dass durch die Kenntnis der genauen Position des Analyten auf dem festen Substrat die Unterscheidung von Signal und Rauschen vereinfacht wird. Die Unterscheidung des Signals vom Hintergrund-Rauschen ist vor allem wichtig, wenn der DNA-Analyt im Verlauf der DNA-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierte Reagenzien prozessiert wird, die den Fluoreszenz-Hintergrund durch unspezifisches Binden an die Oberfläche des festen Substrates verursacht wird.



Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, Anordnungen („Arrays“) zur Verfügung zu stellen, die Einzelmoleküle an definierten, isolierten Positionen tragen und die mit Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie ausgelesen werden können. Insbesondere sollen derartige Einzelmolekül-Arrays die oben erwähnten Voraussetzungen an DNA-Arrays aufweisen und eine Hochdurchsatz-Analyse von Proben ermöglichen.

Demgemäß wird mit der vorliegenden Erfindung eine Anordnung von einzelnen Molekülen zur Verfügung gestellt, welche auf einem festen Substrat vorliegen, wobei die Dichte der Einzelmoleküle auf dem festen Substrat von 10^4 bis 10^{10} Einzelmolekülen pro cm^2 beträgt, sich bei zumindest 95 %, insbesondere bei zumindest 99 %, der Einzelmoleküle innerhalb eines gewählten Abstandes d von einem (beliebigen) Einzelmolekül keine weiteren Einzelmoleküle befinden oder detektierbar sind.

Im Gegensatz zum erfindungsgemäßen Einzelmolekül-Array mit den obig beschriebenen Eigenschaften erfüllen bisher beschriebene Erfindungen und Publikationen zum Thema Anordnungen von wenigen oder einzelnen Molekülen die Forderung nach optischer Auflösung und hoher Array-Dichte nicht.

Die bisherigen Methoden und Ansätze, um Moleküle isoliert auf einem festen Substrat anzuordnen, sind mit unterschiedlichen Nachteilen behaftet, die einen technologischen Einsatz im Rahmen der Untersuchung einzelner Biomoleküle unvorteilhaft erscheinen lässt.

In der WO 89/09406 und WO 98/39688 werden Anordnungen auf Basis der S-Layer Proteine beschrieben, die einen Nanoarray mit einer Periodizität von bis zu 10 nm ausbilden. Die Dichte des Arrays mit den an den S-Layer-Proteinen immobilisierten Biomolekülen ist sehr hoch (bis zu 10^{11} pro cm^2), allerdings ist der Abstand zwischen den einzelnen Molekülen zu klein, um eine optische Auflösung der Signale zu erlauben. Zudem ist die Stabilität der S-Layer zu gering.

Die WO 02/061126 stellt einen Array von Biomolekülen vor, in dem einzelne Moleküle an kugelförmige Gebilden gebunden sind,

die als Abstandshalter zwischen den Molekülen fungieren. Dadurch kann der gemittelte Molekül-Abstand über die optische Auflösung eingestellt werden. Allerdings ist die Besetzung der kugelförmigen Abstandshalter mit den zu untersuchenden Biomolekülen ungerichtet und zufällig, und dies führt entweder zu unerwünschten Doppel- oder Mehrfachbesetzungen pro Bead, oder bei einer Untermarkierung zu einer zu geringen Array-Dichte. Zudem ist die optische Auflösung zweier Moleküle auf benachbarten kugelförmigen Gebilde nur dann gegeben, wenn die Moleküle am Mittelpunkt der Gebilde gebunden sind. Da die genaue Position des Moleküls auf dem kugelförmigen Gebilde nicht definiert ist, können benachbarte Moleküle zu nahe sein und optisch nicht aufgelöst werden.

In der österreichischen Patentanmeldung A 1455/2003, deren Inhalt ausdrücklich in die vorliegende Anmeldung aufgenommen wird, werden ebenso wie in der WO 02/061126 kugelförmige Gebilde als Abstandshalter zwischen den Molekülen eingesetzt, wobei letztgenannter Nachteil der optischen Auflösbarkeit gemäß der WO 02/061126 durch den Einsatz des Übertragungsprinzips der österreichischen Patentanmeldung A 1455/2003 nicht auftritt. Bei der Übertragung werden an der Kontaktstelle zwischen kugelförmigen Gebilden und dem festen Substrat Moleküle vom ersten auf letzteres abgesetzt, und somit ist der Abstand zwischen den Kontaktstellen und den Molekülen definiert und einstellbar. Allerdings ist mit dieser Methode die Anforderung auf Herstellung eines Arrays von einzelnen Molekülen bei gleichzeitig hoher Dichte mit experimentellem Aufwand zu erreichen.

Bruckbauer (Bruckbauer et al., 2003) beschreibt eine Anordnung von einzelnen Molekülen, die durch Absetzen einer Pipette auf das Substrat aufgebracht werden, wobei der Absetzungsprozess gekoppelt ist mit einem optischen Detektorsystem. Der Herstellungsprozess dieser Methode ist seriell und sehr langsam und daher für eine Anwendung im größeren Maßstab nicht geeignet. Zudem setzt die Methode voraus, dass das Biomolekül fluoreszenzmarkiert sein muss, und dies schränkt die Auswahl der zu arrayenden Moleküle ein.

Ein Array von einzelnen Biomolekülen bzw. von Gruppierungen von Biomolekülen wird auch durch Stempeln, d.h. durch die Übertragung der Moleküle von der Oberfläche eines nanostrukturierten elastischen Stempels auf die Oberfläche eines festes Substrates erreicht (Renaultt et al., 2003). Ebenso wie bei den anderen angeführten Erfindungen ist auch bei diesem Ansatz nicht gewährleistet, dass nur einzelne Moleküle an den definierten Positionen gebunden sind.

Ein Array von einzelnen Molekülen, die in kleinen optisch adressierbaren Reaktionsräumen, sogenannten Zero-Mode-Waveguides, lokalisiert sind, wurde vorgestellt (Levene et al., 2003). Wie bei den anderen Methoden ist die Belegung der Reaktionsräumen mit Molekülen statistisch.

WO 02/18266 beschreibt, wie mittels Scanning Tunneling Microscopy (STM) einzelne anorganische Atome und Moleküle auf einer Oberfläche positionsgenau angeordnet werden können. Die Arrays sollen als Speichermedien mit hoher Informationsdichte eingesetzt werden und sind aus diesem Grund nicht von biotechnologischem Interesse.

Die vorliegende Erfindung vermeidet die geschilderten Nachteile des Standes der Technik und beschreibt eine Anordnung von einzelnen Molekülen auf einem festen Substrat, wobei die Position der einzelnen Moleküle vorab bekannt ist und der Abstand, d , zwischen den einzelnen Molekülen größer ist als die optische Auflösung. Die Position der einzelnen Molekülen ist frei bestimmbar, ebenso der Abstand zwischen den Molekülen.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Abstand, d , zwischen den einzelnen Molekülen am festen Substrat von 0,1 bis 100 μm , insbesondere 0,5 bis 10 μm .

Vorzugsweise liegen die Dichten des Arrays der vorliegenden Erfindung bei 10^5 bis 10^9 , insbesondere von 10^6 bis 10^8 einzelnen Molekülen pro cm^2 .

Die Abstände und die hohen Dichten der Anordnung der vorliegenden Erfindung gestatten das effiziente Auslesen von einzelnen Molekülen mit optischen Methoden, insbesondere mit Einzelmolekül-Fluoreszenz-Methoden, wie dem Single Dye Tracing-Scan gemäss der WO 00/25113 A.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemässe Anordnung aus zwei Komponenten aufgebaut, einer Oberfläche mit nanoskopischen Inseln und einem Adaptor, der auf dieser Insel gebunden ist. Die erste Komponente ist ein festes Substrat mit nanostrukturierter Oberfläche (Fig.1). Die Nanostrukturierung besteht in Form von Inseln mit nanoskopischen Dimensionen (Fig.1, 2), die auf dem festen Substrat aufgebracht sind (Fig.1;1) und sich von der umgebenden, chemisch unveränderten Oberfläche durch ihre unterschiedliche chemische Zusammensetzung unterscheiden. Das Material, aus dem die Inseln zusammengesetzt sind, muss mit der festen Oberfläche, auf der es aufgebracht wird, in einer Weise wechselwirken können, dass die Insel fest und dauerhaft mit der festen Oberfläche verbunden bleibt. Auch müssen die Inseln nach dem Aufbringen auf die Oberfläche lokalisiert bleiben und dürfen sich in ihrer Ausdehnung (abgesehen von geringfügigem atomaren Abdiffundieren und leichten thermischen Effekten) nicht verändern. Die räumliche Ausdehnung der Inseln muss daher nach der Absetzung auf der Oberfläche konstant bleiben, insbesondere auch in den Messprozessen während der anschließenden Anwendung. Das Inselmaterial wird auch abhängig vom anzuwendenden Lösungsmittel gewählt; das Material sollte im gewählten Lösungsmittel inert sein, beispielsweise gegen Oxidation.

Das Material, aus dem die nanoskopischen Inseln bestehen, wird so gewählt, dass die Inseln Adaptoren-spezifisch sind, d.h. dass die Adaptoren spezifisch an die Inseln binden, nicht jedoch an die feste Oberfläche bzw. an das Substrat zwischen den Inseln. Die Größe der Inseln ist durch den Prozess der Herstellung einstellbar und die Ausdehnung kann brauchbarer Weise 1 bis 100 nm betragen. Die Größe der Inseln wird erfindungsgemäss bevorzugt an die verwendeten Adaptoren „maßgeschneidert“, so dass gewährleistet werden kann, dass ein Adaptormolekül eine Insel ganz abdeckt. Kleinere Inseln haben jedoch den

Nachteil, dass ihre Form bzw. die Konstanz ihrer räumlichen Ausdehnung nur schwer zu gewährleisten ist, da sich bei derartigen allzu kleinen Inseln die Eigenschaften des jeweiligen Materials zum Teil dramatisch verändern können. Allzu große Inseln (d.h. allzu große Adaptoren) sind im Hinblick auf ihre exakte Lokalisierbarkeit im Detektionsexperiment nachteilig. Daher haben sich erfindungsgemäß nanoskopische Inseln mit einer räumlichen Ausdehnung (Durchmesser auf dem festen Substrat) von 3 bis 70 nm, bevorzugt von 5 bis 50 nm, insbesondere von 10 bis 30 nm, besonders bewährt.

Das Material, aus dem die erfindungsgemäßen nanoskopischen Inseln bestehen, ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Metallen, anorganischen oder organischen Materialien, insbesondere Metalloxiden, kurzkettigen organischen Molekülen, organischen Polymeren und Silanreagentien. Bevorzugte Metalle sind dabei erfindungsgemäß vor allem Gold und Silber, aber auch Kupfer, Zink, Blei, Palladium und Platin. Prinzipiell werden edlere Metalle gegenüber anderen wegen ihrer Inertheit hinsichtlich Oxidation, insbesondere an Luftsauerstoff oder Wasser, bevorzugt (Metalle, die gegenüber Wasser und/oder Luftsauerstoff oxidationsbeständig sind). Bevorzugte anorganische Materialien sind Metalloxide insbesondere Kupferoxid, Tantaloxid, Titanoxid, und Halbleiterstrukturen insbesondere Quantum Dots aus CdSe, ZnSe oder InGaAs. Bevorzugte kurzkettige organische Moleküle sind 16-Mercaptohexadecansäure und 16-Hydroxyhexadecansäurehydroxamsäure; bevorzugte organische Polymere sind Poly-L-Lysin, Poly-L-Glutamat oder Biotin-Polyethylen-Glykol-Poly-L-Lysin; bevorzugte Silanreagentien sind Mercaptomethyl-dimethylethoxysilan, 3-Mercaptopropyltriethoxysilan, 16-Bromo-hexadecan-trichlorsilan, 3-Aminopropyl-triethoxysilan und 3-Glycidoxypropyl trimethoxysilan.

Bevorzugter Weise werden die Materialien, aus denen die Inseln aufgebaut werden, auch aufgrund ihrer Eignung in bestimmten Aufbringungsverfahren ausgewählt. Materialien, deren prinzipielle Eignung in einem oder mehreren der Aufbringungsverfahren („Spotting“) im Stand der Technik bekannt sind, gelten daher jedenfalls als bevorzugt.

Gemäss dieser bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung besteht die zweite Komponente aus Adaptoren, welche Einzelmoleküle, z.B. Biomoleküle, etwa einzelne DNA-Stränge, an die Inseln binden. Ein erfindungsgemäß zu verwendender Adapter (Fig.2; 3), besitzt zwei funktionelle Teile. (i) Der erste Teil (Fig.2; 4), welcher mit den Inseln nicht aber an die Bereiche zwischen den Inseln interagiert, bewirkt, dass die Adaptoren nur an die Inseln nicht aber an die Bereiche zwischen den Inseln bindet. (ii) Der zweite Teil (Fig.2; 5) hat eine Bindungsfähigkeit, mittels welcher ein bestimmtes Einzelmolekül, insbesondere ein Biomolekül, (Fig.2; 6) an den Adapter, und damit an die Inseln an der Oberfläche des festen Substrates gebunden wird. Wesentlich ist, dass an den Adapter nur spezifische (Bio-)Moleküle gebunden werden, also der Adapter eine spezifische Bindungsstelle für ein spezifisches Molekül aufweist, welches dann nur an den Adapter, nicht jedoch an die feste Oberfläche oder das Inselmaterial bindet. Die Adaptoren können dabei bevorzugter Weise mit einer einzigen Bindungsspezifität ausgestattet sein, in anderen Fällen kann die Aufgabenstellung auch das Vorsehen mehrerer, voneinander verschiedener oder mehrerer gleicher spezifischer Bindungsstellen (z.B 2, 3 oder 4 Stellen; jedenfalls immer nur eine von vornherein festgelegte, bestimmte Anzahl) im Adaptormolekül bedingen. Ein weiteres Merkmal der Adaptoren ist, dass die beiden Teile auf unterschiedlichen Seiten des Adapters angeordnet sind, sodass der Adapter mit der einen Seite (Fig. 2; 4) auf die Insel bindet, während die Bindungsfähigkeit der anderen Adapter-Seite (Fig. 2; 5) für Einzelmoleküle, insbesondere Biomoleküle, nicht beeinträchtigt wird. Ein drittes Merkmal der Adaptoren ist, dass ihre (entlang der Normale zur festen Oberfläche) projizierte 2-dimensionale Größe mindestens die Größe der Inseln erreicht, bzw. jene auch übersteigen kann. Dies stellt sicher, dass pro Insel nur ein Adapter mit einem Biomolekül gebunden hat. Wären die Adaptoren viel kleiner als die Inseln, könnten mehrere Adaptoren und Biomoleküle an eine einzige Insel binden, und es wäre der Einzelmolekül-Array nicht mehr gewährleistet, so dass diese Ausführungsformen in der Regel nur verschlechterte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen.

Vorzugsweise werden bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Anordnung die bereits im Stand der Technik etablierten und bewährten Verfahren angewendet. Demgemäß sind daher die folgenden Methoden zum Aufbringen der nanoskopische Inseln auf die Oberfläche des festen Substrates bevorzugt: Mit der Dip-Pen-Nanolithographie (DPN) (Lee et al., 2002) wird eine mit Molekülen benetzte Atomic-Force-Microscopie-Spitze über dem Substrat positioniert, und durch Absetzen der Spitze werden die Moleküle auf der Oberfläche deponiert. Mit Scanning Tunneling Microscopie (STM) wird eine etwa mit Gold beschichtete AFM-Spitze über die zu strukturierende Oberfläche gehalten, und durch Anlegen einer Spannung zwischen AFM-Spitze und Substrat wird ein Teil des Metalls von der AFM Spitze auf die Substratoberfläche übertragen (Kolb et al., 1997; Mamin et al., 1990). Mit der Electron Beam Lithographie (EBL) wird eine sensitive Lack-Schicht auf einer Oberfläche mit einem Elektronenstrahl beschrieben (Chen and Pepin, 2001; Chen et al., 1998) um Reliefstrukturen zu erhalten, die nach Goldbedampfung und Lift-off die entsprechende Inseln auf dem Substrat ergeben. Mit dem Mikro Contact Printen (μ CP) (Bernard et al., 1998; Whitesides et al., 2001) werden auf das Substrat Moleküle durch Stempeln mit einem elastischem Polymer-Replika übertragen.

Vorzugsweise ist die feste Oberfläche eine Glas-, Kunststoff-, Membran-, Metall, oder Metalloxid-Oberfläche, die vorzugsweise plan, glatt und undurchlässig (z.B. für das Lösungsmittel oder einen Probenpuffer) ist.

Gemäss der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung bestehen die Inseln aus Metall, Metalloxid, organischen oder anorganischen Polymeren, sowie Gruppierungen von organischen oder anorganischen Verbindungen.

Vorzugsweise sind die Adaptoren metallischer, anorganischer, organischer, oder biochemischer Natur. Für einen metallischen Adapter werden gemäss einer bevorzugten Ausführungsform Gold- oder Silber-Cluster- oder Nanogold(oder -silber)-Derivate (Boisset et al., 1994), insbesondere solche mit nur einer

Funktionalität eingesetzt, an welche ein einzelner DNA-Strang gebunden wird.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform werden als organische Adaptoren Dendrons, auch „molekular Wedges“ genannt, eingesetzt. Die Spitze der Dendronkerns besteht aus einer einzigen Funktionalität, an die eine Biomolekül gekoppelt ist, während die Peripherie des Dendrons, d.h. das andere Ende des Dendrons, aus einer Vielzahl an gleichen Funktionalitäten besteht, die an die Insel binden (Bell et al., 2003). Die WO97/39041 sowie Zhang (Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2001) beschreiben die ungerichtete Bindung von Dendrimeren auf Oberflächen, ohne dass die Positionierung der Dendrons durch ein Ordnungsprinzip geleitet werden würde.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform werden als biochemische Adaptoren, DNA-Dendrimere oder bevorzugt Proteine verwendet. Proteine eignen sich aus zweierlei Gründen für den Einsatz als Adaptoren. Proteine oder definierte Protein-Multimere haben eine maximale Ausdehnung von bis zu 100 nm und haben damit eine vergleichbare Grösse wie die nanostrukturierten Inseln sodass eine Mehrfachbelegung der Inseln mit mehreren Adaptoren erschwert wird. Der Einsatz von Proteinen als Adaptoren ist bevorzugt, da bei Kenntnis ihrer dreidimensionalen Struktur durch Mutagenese-Methoden gezielt im Proteingerüst Veränderungen vorgenommen werden können, damit in weiterer Folge ein einzelnes Biomolekül gerichtet an den Adapter gekoppelt wird ohne die Interaktion des Adapters mit den Inseln zu stören.

Vorzugsweise erfolgt die Bindung der Adaptoren oder der einzelnen Moleküle an die Adaptoren an die Inseln durch kovalente Kopplung, elektrostatische Interaktion, Liganden-Komplexe, biomolekulare Erkennung, Chemisorption oder Kombinationen davon. Für die kovalente Kopplung werden bevorzugt folgende Funktionalitäten eingesetzt: NH_2 -, SH-, OH-, COOH -, Cl-, Br-, I-, Isothiocyanat-, Isocyanat-, NHS-Ester-, Sulfonyl-Chlorid-, Aldehyd-, Epoxid-, Carbonat-, Imidoester-, Anhydrid-, Maleimid-, Acryloyl-, Aziridin-, Pyridyl-Disulfid-, Diazoalkan-, Carbonyl-Diimidazol-, Carbodiimid-, Disuccinimidyl Carbonat-, Hydrazine-, Diazonium-, Aryl-Azid-, Benzophenon-, Diazirin-

Gruppen oder Kombinationen davon eingesetzt. Für die biomolekulare Erkennung werden bevorzugt die Biotin-Streptavidin, Antikörper-Antigen, DNA-DNA-Interaktion, Zucker-Lectin oder Kombinationen davon eingesetzt.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Anordnung von einzelnen Molekülen, welches durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln auf der Oberfläche eines festen Substrates durch eine Oberflächenstrukturierungsmethode, insbesondere mit STM, DPN, EBL, Ionenstrahl-Lithographie, oder Micro Contact Printen
- Aufbringen von Adapter auf die nanoskopischen Inseln,
- Kopplung von Einzelmolekülen an die Adaptern, die an den nanoskopischen Inseln gebunden sind,
- Absättigen von eventuell vorhandenen unbelegten Inseln durch Varianten von Adaptern, die keine Moleküle tragen.

Alternativ dazu kann dieses erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer Anordnung von einzelnen Molekülen auch durch folgende Schritte erreicht werden:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln auf der Oberfläche eines festen Substrates durch eine Oberflächenstrukturierungsmethode, insbesondere mit STM, DPN, EBL oder Ionenstrahl-Lithographie, oder Micro Contact Printen
- Kopplung von Molekülen an Adaptern in Lösung,
- Abscheiden der ungekoppelten Adaptern bzw. ungekoppelten Molekülen durch Reinigungsschritte,
- Aufbringen der mit einzelnen Molekülen gekoppelten Adaptern auf das mit nanoskopischen Inseln strukturierte feste Substrat.

In einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Erfindung wird die Herstellung einer Anordnung von Einzelmolekülen durch folgende Schritte erreicht:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln, vorzugsweise Gold-Dots, auf der Oberfläche eines festen Substrates aus Glas durch Scanning Tunneling Mikroskopie,

- Aufbringen von Adaptoren, insbesondere Dendrons, auf die Inseln, insbesondere die Gold-Dots, wobei ein Dendron an der Peripherie nichtaktivierte Disulfidgruppen trägt, welche an eine Insel, insbesondere ein Gold-Dot, binden, und der Dendronkern eine einzelne Funktionalität, insbesondere eine N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität, trägt, die mit der Amin-Funktionalität eines Einzelmoleküls, insbesondere eines modifizierten DNA-Oligonukleotides, koppeln kann,
- Kopplung der Einzelmoleküle an die Adaptoren, insbesondere durch Reaktion der Amin-Funktionalität der DNA-Oligonukleotide an die N-Hydroxy-Funktionalität der Dendrons, welche an die nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots, gebunden haben,
- Entfernen jener Adaptoren und Einzelmoleküle, die nicht an die nanoskopischen Inseln gebunden haben, insbesondere durch Waschen.

In einer anderen, besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Erfindung wird die Herstellung einer Anordnung von Einzelmolekülen durch folgende Schritte erreicht:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots, auf der Oberfläche des festen Substrates aus Glas durch Scanning Tunneling Mikroskopie,
- Kopplung der Einzelmoleküle an Adaptoren in Lösung, insbesondere durch Reaktion der Amin-Funktionalität der DNA-Oligonukleotide, an die einzelne Funktionalität des Dendronkerns, insbesondere eine N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität,
- Aufreinigen der Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, insbesondere von Dendron-DNA-Konjugaten, und Entfernen der nicht gekoppelten Einzelmoleküle oder nicht gekoppelten Adaptoren durch Aufreinigungsmethoden, insbesondere Gelpermeations-Chromatographie,
- Aufbringen der Adapter-Einzelmolekül-Konjugate auf die nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots, wobei ein Dendron an der Peripherie nichtaktivierte Disulfidgruppen trägt, welche an eine nanoskopische Insel binden,
- Entfernen jener Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, die nicht an die nanoskopischen Inseln gebunden haben, insbesondere durch Waschen.

Die Erfindungen betrifft auch Anordnungen, die nach den erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.

Die Auslesung der erfindungsgemäßen Anordnung von isolierten Molekülen erfolgt durch Methoden der Einzelmolekül-Mikroskopie und Einzelmolekülfluoreszenz-Mikroskopie, insbesondere mit der Methode gemäß der WO 00/25113 A.

Das Auslesen der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Signale wird durch das Vorhandensein von metallischen Inseln nicht negativ gestört, sondern die Häufigkeit der Detektion von Fluoreszenz-Photonen wird durch die Nähe des spezifisch gebundenen Fluorophores zur nanoskopischen metallischen Inseln überraschender Weise sogar noch verstärkt (Enderlein, 2000; Geddes and Lakowicz, 2002; Geddes et al., 2003a; Geddes et al., 2003b; Lakowicz, 2001; Lakowicz et al., 2002).

Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen Anordnungen zur Untersuchung von Biomolekülen, insbesondere von Oligonukleotiden, DNA, mRNA, cDNA, Proteinen, Antikörpern, Antigenen, Liganden, Toxinen eingesetzt und zu deren Nachweis und Untersuchung mittels Detektionsverfahren verwendet werden.

Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen Anordnungen zur Bindung von anderen Biomolekülen, insbesondere von Oligonukleotiden, DNA, mRNA, cDNA, Proteinen, Antikörpern, Antigenen, Liganden, Toxinen, Viren, Bakterien, Zellen oder Kombinationen davon, eingesetzt und zu deren Nachweis und Untersuchung mittels Detektionsverfahren verwendet werden.

Im Folgenden werden nunmehr bevorzugte Realisierungen der erfindungsgemäßen Anordnungen anhand der in den Zeichnungsfiguren schematisch skizzierten Ausführungen beschrieben, auf welche die Erfindung selbstverständlich nicht eingeschränkt ist.

Es zeigen:

Fig. 1. Schematische Darstellung einer Anordnung von nanoskopischen Inseln (2), die auf einem festen Substrat (1) aufgebracht sind. Der mittlere Abstand zwischen den nanoskopischen Inseln, d , und der Durchmesser der nanoskopischen Inseln, h ,

ist durch die Oberflächenstrukturierungsmethode frei wählbar. Die Anordnung besteht aus beliebig vielen nanoskopischen Inseln.

Fig. 2. Schematische Darstellung einer Anordnung von einzelnen Molekülen in Seitenansicht. Ein Einzelmolekül (6) ist an einen Adapter (3) über eine Funktionalität (5) gebunden. Der Adapter (3) bindet mit seiner anderen Seite (4) an eine nanoskopische Insel (2), die auf die Oberfläche eines festen Trägers (1) gebunden ist. Der mittlere Abstand zwischen zwei nanoskopischen Inseln, den Adaptoren und damit zwischen den Einzelmolekülen ist gegeben durch d . Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur zwei nanoskopische Inseln mit den Adaptoren eingezeichnet; die Anordnung besteht aus einer beliebigen Anzahl von Inseln, Adaptoren und Molekülen.

Fig. 3. Figur zu Beispiel 1. Bindung von kugelförmigen Adaptoren auf nanoskopische Goldinseln. Für die Herstellung der Anordnungen können vorzugsweise feste Substrate verwendet werden, die durch eine Oberflächenstrukturierungsmethode mit einem regelmässigen Gitter bestehend aus nanoskopischen Inseln versehen worden sind (Fig. 1). Die nanoskopischen Inseln (Fig. 1: 2) bestehen bevorzugt aus Metall wie Gold oder Silber und werden durch die direkte Ablagerung des Metalls etwa mit STM in regelmässigen Abständen auf das feste Substrat (Fig. 1: 1) vorzugsweise ein elektrisch leitendes Substrat wie Indium-Zinnoxid-Glas aufgebracht. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die nanoskopischen Inseln aus Metall im Rahmen eines elektrostrahlolithographischen Prozesses auf dem Substrat abgesetzt. Der Durchmesser der nanoskopischen Inseln, h , ist vom speziellen Verwendungszweck abhängig und liegt vorzugsweise im Bereich 5 bis 50 nm (Fig 1). Die vertikale Höhe der nanoskopischen Inseln ist abhängig von der Art der Oberflächenstrukturierungsmethode und kann bei STM 1-5 nm betragen, bei EBL im Bereich von 3 - 5 nm. Die nanoskopischen Inseln sind räumlich voneinander getrennt und der mittlere Abstand zwischen zwei Inseln, d , ist durch die Oberflächenstrukturierungsmethode frei wählbar und liegt über dem Beugungslimit der optischen Mikroskopie.

Wie in Fig. 2 skizziert werden nach der Oberflächenstrukturierung des Substrates die nanoskopischen Inseln mit Adaptoren belegt. Die Adaptoren (Fig. 2: 3) sind das Bindeglied zwischen den nanoskopischen Inseln (Fig. 2: 2) und den Ziel-Molekülen (Fig. 2: 6), die in der Anordnung auf das Substrat (Fig. 2: 1) gekoppelt werden. Entsprechend ihrer Funktion besitzen die Adaptoren sowohl eine Funktionalität (Fig. 2: 5), mit der sie die Ziel-Moleküle binden können, als auch eine Gruppe von weiteren funktionellen Einheiten (Fig. 2: 4), mit der die Adaptoren auf den nanostrukturierten Inseln (Fig. 2: 2) binden können. Die chemische Natur der Funktionalitäten der Adaptoren und jene der Interaktion zwischen Adapter und Molekül, und zwischen Adapter und nanoskopischen Insel kann kovalent oder nichtkovalent sein und ist hochspezifisch, d.h. die Adaptoren können nur an die nanoskopischen Inseln binden nicht aber an die Bereiche des Substrates zwischen den nanoskopischen Inseln; weiters können die Moleküle nur an den Adaptoren nicht aber an den nanoskopischen Inseln oder in den Bereichen zwischen den Inseln binden.

Die Adaptoren können aufgebaut sein aus organischen, anorganischen oder biochemischen Polymeren sowie Metallen. In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Adaptoren aus einem organischen Polymer, etwa den keilförmigen Dendronen, die aufgebaut sind aus Dihydroxybenzylalkohol-Einheiten oder aus anderen Grundgerüst-Einheiten. Die Kopplung der Dendronen an die nanoskopischen Inseln aus Gold kann z.B. auf der stabilen Thiol-Gold-Wechselwirkung beruhen wenn Dendrons mit einer Vielzahl von Thiol oder Disulfidgruppen eingesetzt werden. Das Koppeln der Adaptoren an die nanoskopischen Inseln kann erreicht werden durch die Zugabe einer Lösung von Adaptoren zu dem Substrat, gefolgt von Waschschritten, um überschüssige Adaptoren vom Substrat zu entfernen, die nicht an die nanoskopischen Inseln gebunden haben. In einem weiteren Schritt werden die einzelnen Moleküle an die Substrat-gebundenen Dendrone gekoppelt. So können die Moleküle eine einzelne Amin-Funktionalität tragen, die an die einzelne Funktionalität der Dendronen unter Einsatz von z.B. N-Hydroxysuccinimid-Chemie binden kann. Überschüssige und nicht an Adapter gekoppelte Moleküle können durch verschiedenste im Stand der Technik be-

kannte Methoden, insbesondere durch Waschen mit geeigneten Reinigungsflüssigkeiten, entfernt werden.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform bestehen die Adaptoren aus einem anorganischen Polymer, etwa Glas, und haben kugelförmige Gestalt. In diesem Fall kann die Kopplung der kugelförmigen Adaptoren an die nanoskopischen Inseln dadurch erfolgen, dass Gold-Inseln mit thiolhaltigen Reagentien wie N-(6-(Biotinamidohexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide (Biotin-HPDP) modifiziert werden und diese mit Streptavidin-beschichteten Adaptoren belegt werden. Die Streptavidin-beschichteten Adaptoren können vor oder nach der Verankerung am festen Substrat mit einer Lösung von Molekülen in Kontakt gebracht werden, damit einzelne Moleküle an den Goldinseln zu liegen kommen.

Die Grösse der Adaptoren ist frei wählbar und ist dem Durchmesser der nanoskopischen Inseln angepasst, sodass pro nanoskopischer Insel nur ein Adaptor binden kann. Für die Herstellung einer Anordnung mit einzelnen Molekülen können gleichzeitig verschiedene Arten von Adaptoren eingesetzt werden; vorzugsweise wird eine Anordnung nur mit einer Art von Adaptor realisiert.

Beispiel

Zur Demonstration, dass Moleküle an nanoskopischen Inseln gebunden werden können, wurden fluoreszenz-markierte Nanopartikel über molekulare Erkennung (Streptavidin-Biotin) an Gold-Inseln auf einem festen Substrat gekoppelt. Als Nanopartikel wurden gelb-fluoreszierende Beads (Em/Ext: 505/515 nm) (Molecular Probes) mit einem Durchmesser von 40 nm und einer Neutravidin beschichteten Oberfläche eingesetzt. Als Substrat mit nanoskopische Inseln wurde auf einem Silizium-Substrat mittels Elektro Beam Lithographie Gold-Insel mit einem Durchmesser von 50 nm deponiert. Die Oberfläche der Gold-Inseln wurde in der Folge mit N-(6-(Biotinamidohexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide (Biotin-HDPD) (Pierce) modifiziert. An die biotinylierte Goldinseln wurden Neutravidin-beschichtete Nanopartikel gebunden. Dazu wurde eine Suspension von 3.6×10^9 Partikeln/ml in PBS auf das modifizierte Substrat

aufgebracht, und für 30 min inkubiert. Überschüssige Beads wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt und spezifisch gebundenen Beads wurde mit einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgelesen. Die Auslesung erfolgt mit Fluoreszenzmikroskop mit einer Quecksilberdampflampe (Zeiss, fluo arc HBO 100) und einem Objektiv (Zeiss, Axiovert PNF 100x/1,4 Öl). Folgender Filter wurde eingesetzt. FITC Anregungsfilter: HQ480/40x, Dichroitischer Strahlteiler: Q505LP- Emissionsfilter: HQ535/50m.

Referenzen

- Bell, S. A., McLean, M. E., Oh, S. K., Tichy, S. E., Zhang, W., Corn, R. M., Crooks, R. M., and Simanek, E. E. (2003). Synthesis and characterization of covalently linked single-stranded DNA oligonucleotide-dendron conjugates. *Bioconjug Chem* 14, 488-493.
- Bernard, A., Delamarche, E., Schmid, H., Michel, B., Bosshard, H. R., and Biebuyck, H. (1998). Printing patterns of proteins. *Langmuir* 14, 2225-2229.
- Boisset, N., Penczek, P., Pochon, F., Frank, J., and Lamy, J. (1994). Three-dimensional reconstruction of human alpha 2-macroglobulin and refinement of the localization of thiol ester bonds with monomaleimido nanogold. *Ann N Y Acad Sci* 737, 229-244.
- Braslavsky, I., Hebert, B., Kartalov, E., and Quake, S. R. (2003). Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3960-3964.
- Bruckbauer, A., Zhou, D., Ying, L., Korchev, Y. E., Abell, C., and Klenerman, D. (2003). Multicomponent submicron features of biomolecules created by voltage controlled deposition from a nanopipet. *J Am Chem Soc* 125, 9834-9839.
- Chen, Y., and Pepin, A. (2001). Nanofabrication: conventional and nonconventional methods. *Electrophoresis* 22, 187-207.
- Chen, Y., Vieu, C., and Launois, H. (1998). High resolution X-ray lithography and electron-beam lithography: Limits and perspectives. *Condens Matter News* 6, 22-30.

- Enderlein, J. (2000). A theoretical investigation of single-molecule fluorescence detection on thin metallic layers. *Biophys J* 78, 2151-2158.
- Geddes, C. D., and Lakowicz, J. R. (2002). Metal-enhanced fluorescence. *J Fluoresc* 12, 121-129.
- Geddes, C. D., Parfenov, A., Gryczynski, I., and Lakowicz, J. R. (2003a). Luminescent blinking from silver nanostructures. *J Phys Chem B* 107, 9989-9993.
- Geddes, C. D., Parfenov, A., Roll, D., Fang, J. Y., and Lakowicz, J. R. (2003b). Electrochemical and laser deposition of silver for use in metal-enhanced fluorescence. *Langmuir* 19, 6236-6241.
- Kolb, D. M., Ullmann, R., and Will, T. (1997). Nanofabrication of small copper clusters on gold(111) electrodes by a scanning tunneling microscope. *Science* 275, 1097-1099.
- Korn, K., Gardellin, P., Liao, B., Amacker, M., Bergstrom, A., Bjorkman, H., Camacho, A., Dorhofer, S., Dorre, K., Enstrom, J., et al. (2003). Gene expression analysis using single molecule detection. *Nucleic Acids Res* 31, e89.
- Lakowicz, J. R. (2001). Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications. *Anal Biochem* 298, 1-24.
- Lakowicz, J. R., Shen, Y., D'Auria, S., Malicka, J., Fang, J., Gryczynski, Z., and Gryczynski, I. (2002). Radiative decay engineering. 2. Effects of Silver Island films on fluorescence intensity, lifetimes, and resonance energy transfer. *Anal Biochem* 301, 261-277.
- Lee, K. B., Park, S. J., Mirkin, C. A., Smith, J. C., and Mrksich, M. (2002). Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science* 295, 1702-1705.
- Levene, M. J., Korlach, J., Turner, S. W., Foquet, M., Craighead, H. G., and Webb, W. W. (2003). Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science* 299, 682-686.

Mamin, H. J., Guenther, P. H., and Rugar, D. (1990). Atomic emission from a gold scanning-tunneling-microscope tip. *Phys Rev Lett* 65, 2418-2421.

Renault, J. P., Bernard, A., Bietsch, A., Michel, B., Bossard, H. R., Delamarche, E., Kreiter, M., Hecht, B., and Wild, U. P. (2003). Fabricating arrays of single protein molecules on glass using microcontact printing. *J Phys Chem B* 107, 703-711.

Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X., and Ingber, D. E. (2001). Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng* 3, 335-373.

Zhang, L., Huo, F. W., Wang, Z. Q., Wu, L. X., Zhang, X., Hopener, S., Chi, L. F., Fuchs, H., Zhao, J. W., Niu, L., and Dong, S. J. (2000). Investigation into self-assembled monolayers of a polyether dendron thiol: Chemisorption, kinetics, and patterned surface. *Langmuir* 16, 3813-3817.

Zhang, L., Zou, B., Dong, B., Huo, F., Zhang, X., Chi, L., and Jiang, L. (2001). Self-assembled monolayers of new dendron-thiols: manipulation of the patterned surface and wetting properties. *Chem Commun*, 1906-1907.

Patentansprüche

1. Anordnung von einzelnen Molekülen, welche auf einem festen Substrat vorliegen, wobei die Dichte der Einzelmoleküle auf dem festen Substrat von 10^4 bis 10^{10} Einzelmolekülen pro cm^2 beträgt, sich bei zumindest 95 %, insbesondere bei zumindest 99 %, der Einzelmoleküle innerhalb eines gewählten Abstandes d von einem (beliebigen) Einzelmolekül keine weiteren Einzelmoleküle befinden oder detektierbar sind.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand d 0,1 bis 100 μm , insbesondere 0,5 bis 10 μm , beträgt.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Einzelmoleküle vorzugsweise ausgewählt sind aus der Klasse bestehend aus Nukleinsäuren, insbesondere RNA und DNA, sowie Oligopeptiden und Polypeptiden, insbesondere Antikörpern, oder organischen Molekülen.
4. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das feste Substrat eine Glas-, Kunststoff-, Membran-, Metall-, oder Metalloxid-Oberfläche ist.
5. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das feste Substrat eine Oberfläche mit nanoskopischen Inseln besitzt.
6. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die nanoskopischen Inseln aus einem Metall, organischem oder anorganischem Material bestehen.
7. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die nanoskopischen Inseln eine Größe von 1 bis 100 nm, bevorzugt von 3 bis 70 nm, besonders bevorzugt von 5 bis 50 nm, insbesondere 10 bis 30 nm, haben.
8. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand, d , zwischen den einzelnen



nanoskopischen Inseln 0,1 bis 100 μm , insbesondere 0,5 bis 10 μm , beträgt.

9. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die nanoskopischen Inseln durch Elektronenstrahl-Lithographie oder Ionenstrahl-Lithographie geschrieben, oder durch Contact Printen mit weichen Stempeln, Atomkraft-Mikroskopie oder Scanning Tunneling Mikroskopie deponiert werden.

10. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass an den einzelnen nanoskopischen Inseln der festen Oberfläche einzelne Adaptoren gebunden sind.

11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Adaptoren dermaßen aufgebaut sind, dass ein Adapter an einer Seite des Adapters eine Bindungsstelle zueiner nanoskopischen Insel der Oberfläche und an der anderen Seite des Adapters eine Bindungsstelle zu einem einzelnen Molekül oder 2, 3 oder 4 voneinander verschiedene Bindungsstellen für verschiedene einzelne Moleküle aufweist.

12. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Adaptoren aus anorganischen oder organischen Polymeren, insbesondere Dendrons, oder Biopolymeren, insbesondere Proteinen oder DNA-Dendrimeren, bestehen.

13. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Adaptoren an die nanoskopischen Inseln der Oberfläche des festen Substrates über eine kovalente Kopplung, insbesondere über NH_2 -, SH -, OH -, COOH -, Cl -, Br -, I -, Isothiocyanat-, Isocyanat-, NHS-Ester-, Sulfonyl-Chlorid-, Aldehyd-, Epoxid-, Carbonat-, Imidoester-, Anhydrid-, Maleimid-, Acryloyl-, Aziridin-, Pyridyl-Disulfid-, Diazoalkan-, Carbonyl-Diimidazol-, Carbodiimid-, Disuccinimidyl Carbonat-, Hydrazine-, Diazonium-, Aryl-Azid-, Benzophenon-, Diazirin-Gruppen oder Kombinationen davon, elektrostatische Interaktion, Liganden-Komplexe, biomolekulare Erkennung, insbesondere über Biotin-Streptavidin, Antikörper-Antigen, DNA-DNA-

Interaktion, Zucker-Lectin oder Kombinationen davon, Chemisorption oder Kombinationen davon gebunden sind.

14. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass an einen Adapter ein Einzelmolekül gekoppelt ist, sodass pro Strukturelement auf der Oberfläche des festen Substrates nur ein Einzelmolekül gebunden ist.

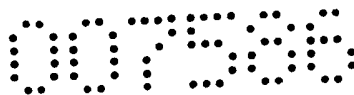
15. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass für die Kopplung der Einzelmoleküle an die Adapter kovalente Kopplung, insbesondere über NH_2 -, SH -, OH -, COOH -, Cl -, Br -, I -, Isothiocyanat-, Isocyanat-, NHS-Ester-, Sulfonyl-Chlorid-, Aldehyd-, Epoxid-, Carbonat-, Imidoester-, Anhydrid-, Maleimid-, Acryloyl-, Aziridin-, Pyridyl-Disulfid-, Diazoalkan-, Carbonyl-Diimidazol-, Carbodiimid-, Disuccinimidyld Carbonat-, Hydrazine-, Diazonium-, Aryl-Azid-, Benzophenon-, Diazirin-Gruppen oder Kombinationen davon, Liganden-Komplexe, biomolekulare Erkennung, insbesondere über Biotin-Streptavidin, Antikörper-Antigen, DNA-DNA-Interaktion, oder Kombinationen davon, oder Kombinationen davon gebunden sind.

16. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung zur Bindung von Einzelmolekülen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln auf der Oberfläche eines festen Substrates durch eine Oberflächenstrukturierungsmethode, insbesondere Scanning Tunneling Microscopie (STM), Dip Pen Nanolithographie (DPN), Electro Beam Lithographie (EBL), Ionenstrahl-Lithographie (IL) oder Mikro-Contact-Printen (μCP),
- Aufbringen von Adaptern auf die nanoskopischen Inseln,
- Kopplung von Einzelmolekülen an die Adaptern, die an den nanoskopischen Inseln gebunden sind,
- Absättigen von eventuell vorhandenen unbelegten Inseln durch Varianten von Adaptern, die keine Moleküle tragen.

17. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung zur Bindung von Einzelmolekülen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln auf der Oberfläche eines festen Substrates durch einen Oberflächenstrukturierungsmethode, insbesondere Scanning Tunneling Microscopy,



Dip Pen Nanolithography, Electro Beam Lithography, Ionenstrahl-Lithographie oder Mikro-Contact-Printen,

- Kopplung von Molekülen an Adaptoren in Lösung,
- Abscheiden der ungekoppelten Adaptoren bzw. ungekoppelten Molekülen durch Reinigungsschritte,
- Aufbringen der mit einzelnen Molekülen gekoppelten Adaptoren auf das mit nanoskopischen Inseln strukturierte feste Substrat.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass als feste Oberfläche eine Glas-, Kunststoff-, Membran-, Metall-, oder Metalloxid-Oberfläche eingesetzt wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass zur Herstellung einer Anordnung von Einzelmolekülen, folgende Schritte eingesetzt werden:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots auf der Oberfläche des festen Substrates aus Glas durch Scanning Tunneling Mikroskopie,
- Aufbringen der Adaptoren, insbesondere Dendrons, auf die Inseln, wobei ein Dendron an der Peripherie nichtaktivierte Disulfidgruppen trägt, welche an die nanoskopische Insel, insbesondere an ein Gold-Dot, binden, und der Dendronkern eine einzelne Funktionalität, insbesondere N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität, trägt, die mit der 5'-Amin-Funktionalität eines Einzelmoleküls, insbesondere eines modifizierten DNA-Oligonukleotides, koppeln kann,
- Kopplung der Einzelmoleküle an die Adapter, insbesondere durch Reaktion der Amin-Funktionalität der DNA-Oligonukleotide an die N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität der Dendrons, welche an die nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots, gebunden haben,
- Entfernen jener Adapter und Einzelmoleküle, die nicht an die nanoskopischen Inseln gebunden haben, insbesondere durch Waschen.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur Herstellung einer Anordnung von Einzelmolekülen, folgende Schritte eingesetzt werden:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots auf der Oberfläche des festen Substrates aus Glas durch Scanning Tunneling Mikroskopie,
- Kopplung der Einzelmoleküle an die Adapter in Lösung, insbesondere durch Reaktion der Amin-Funktionalität der DNA-Oligonukleotide an die einzelne Funktionalität des Dendronkerns, insbesondere eine N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität,
- Aufreinigen der Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, insbesondere Dendron-DNA, und Entfernen der nicht gekoppelten Einzelmoleküle oder nicht gekoppelten Adaptoren durch Aufreinigungsmethoden, insbesondere Gelpermeations-Chromatographie,
- Aufbringen der Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, insbesondere Dendron-DNA, auf die nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots, wobei ein Dendron an der Peripherie nichtaktivierte Disulfidgruppen trägt, welche an die Insel binden, Entfernen jener Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, die nicht an die nanoskopischen Inseln gebunden haben, insbesondere durch Waschen.

21. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20.

22. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 im Rahmen einer ultrasensitiven Fluoreszenz-Mikroskopie-Untersuchung, insbesondere der „Single Dye Tracing“ (SDT) Methode zur Visualisierung einzelner Fluoreszenz-markierter Moleküle.

23. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 mit ultrasensitiver Fluoreszenz-Mikroskopie, wobei durch die räumliche Nähe der Inseln aus Metall das Fluoreszenz-Signal der einzelnen Insel-gekoppelten Moleküle verstärkt wird im Vergleich zu jenen Moleküle, die gegebenenfalls in den Bereichen zwischen den Inseln unspezifisch angelagert sind.

24. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Untersuchung von Biomolekülen, insbesondere zur Bindung von Antigenen, Liganden, Proteinen, DNA, mRNA, Toxinen oder Kombinationen davon.

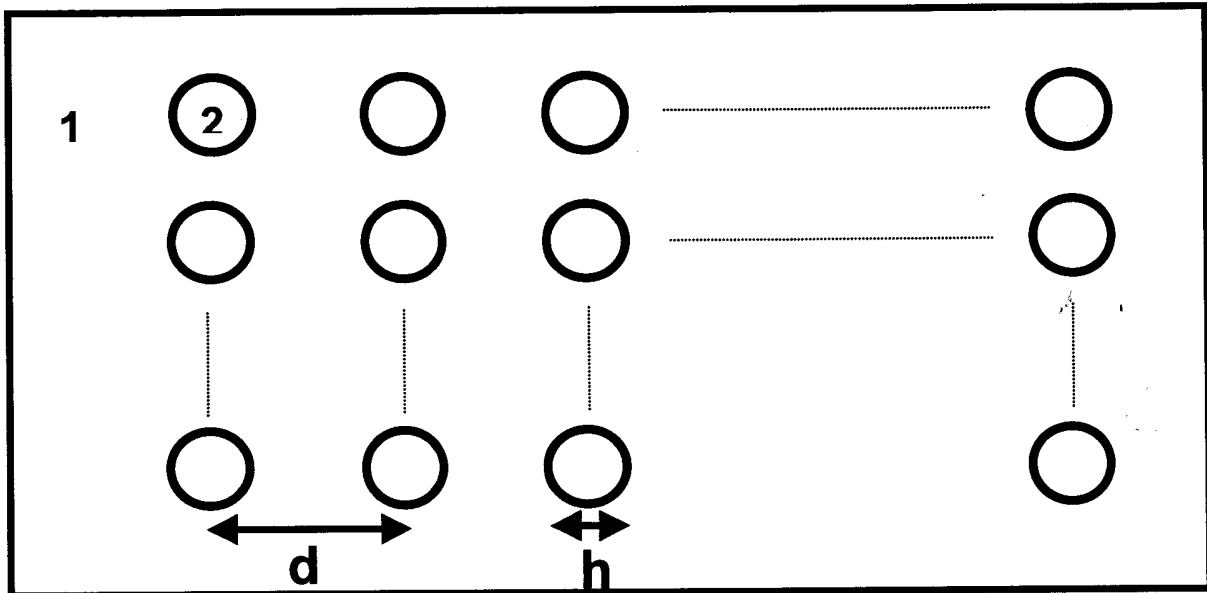
25. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Untersuchung von cDNA von Zellen, wobei fluoreszenzmarkierte cDNSs an die Anordnung von verschiedenen Oligonukleotiden binden, und die Bindung für jede gebundene cDNS-Art ausgelesen werden kann.

26. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Untersuchung der Proteine von Zellen, wobei fluoreszenzmarkierte Proteine an die Anordnung von verschiedenen Antikörpern binden und die Bindung für jede gebundene Protein-Art ausgelesen werden kann.

007586

1/3

Fig. 1



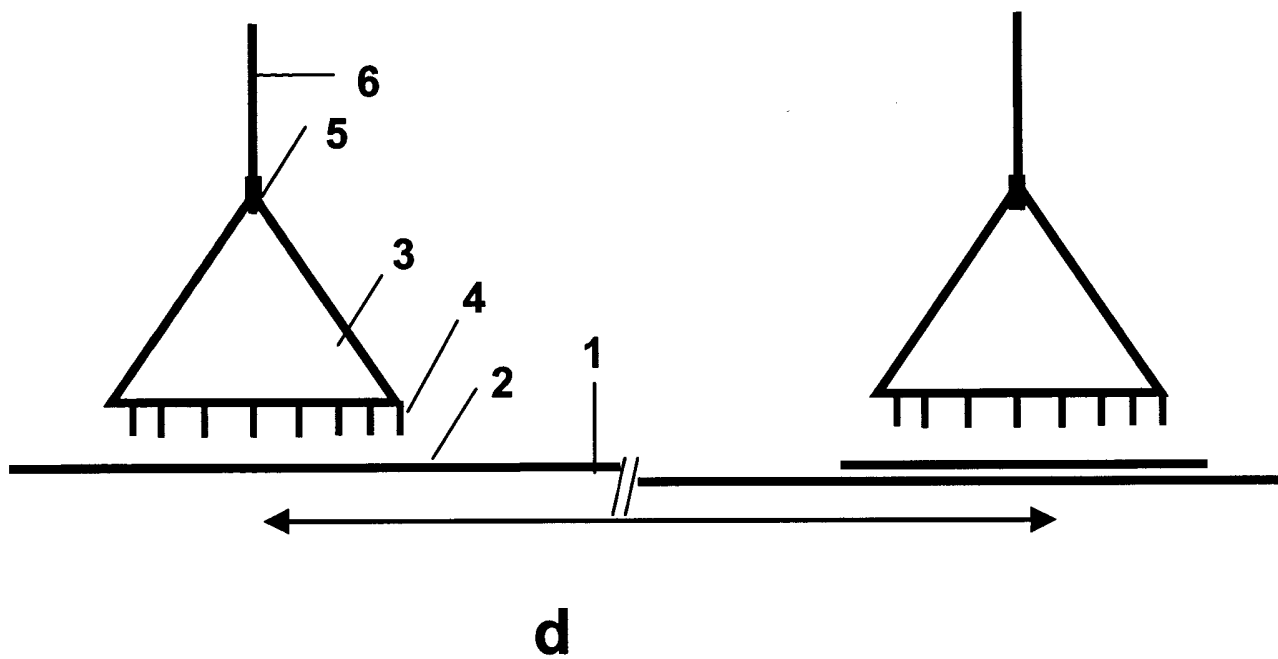
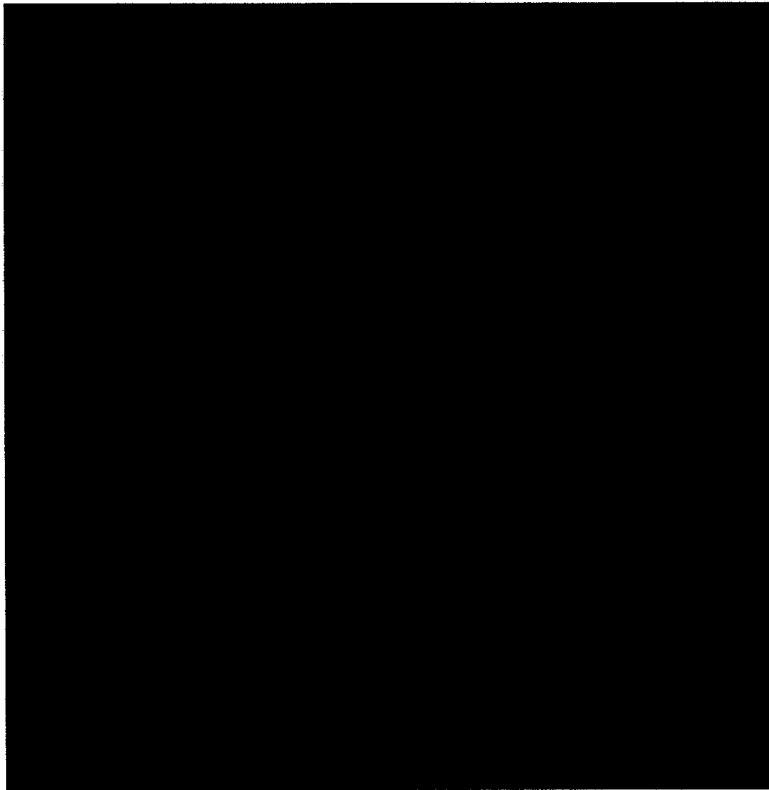


Fig 2

007586
3/3

Fig 3





mf

R 42846

20

4B, A389/2204, G01N

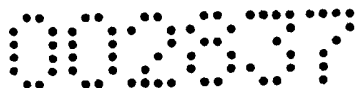
(Neue) Patentansprüche

1. Anordnung zur Bindung von einzelnen Molekülen, welche auf einem festen Substrat, das eine Oberfläche mit nanoskopischen Inseln besitzt, vorliegen, wobei die Dichte der Einzelmoleküle auf dem festen Substrat von 10^4 bis 10^{10} Einzelmolekülen pro cm^2 beträgt, sich bei zumindest 95 %, insbesondere bei zumindest 99 %, der Einzelmoleküle innerhalb eines gewählten Radius d von einem (beliebigen) Einzelmolekül keine weiteren Einzelmoleküle befinden oder detektierbar sind, und an den einzelnen nanoskopischen Inseln der festen Oberfläche einzelne Adaptoren gebunden sind, wobei die projizierte 2-dimensionale Größe der Adaptoren mindestens die Größe der Inseln erreicht.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Radius d 0,1 bis 100 μm , insbesondere 0,5 bis 10 μm , beträgt.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Einzelmoleküle vorzugsweise ausgewählt sind aus der Klasse bestehend aus Nukleinsäuren, insbesondere RNA und DNA, sowie Oligopeptiden und Polypeptiden, insbesondere Antikörpern, oder organischen Molekülen.
4. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das feste Substrat eine Glas-, Kunststoff-, Membran-, Metall-, oder Metalloxid-Oberfläche ist.
5. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die nanoskopischen Inseln aus einem Metall bestehen.
6. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die nanoskopischen Inseln aus einem organischem oder anorganischem Material bestehen.
7. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die nanoskopischen Inseln eine Größe von 1 bis 100 nm, bevorzugt von 3 bis 70 nm, besonders bevorzugt von 5 bis 50 nm, insbesondere 10 bis 30 nm, haben.

NACHGEREICHT



8. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Radius d , zwischen den einzelnen nanoskopischen Inseln 0,1 bis 100 μm , insbesondere 0,5 bis 10 μm , beträgt.
9. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die nanoskopischen Inseln durch Elektronenstrahl-Lithographie oder Ionenstrahl-Lithographie geschrieben, oder durch Contact Printen mit weichen Stempeln, Atomkraft-Mikroskopie oder Scanning Tunneling Mikroskopie deponiert werden.
10. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Adaptern dermaßen aufgebaut sind, dass ein Adapter an einer Seite des Adapters eine Bindungsstelle zu einer nanoskopischen Insel der Oberfläche und an der anderen Seite des Adapters eine Bindungsstelle zu einem einzelnen Molekül aufweist.
11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Adapter an einer Seite des Adapters eine Bindungsstelle zu einer nanoskopischen Insel der Oberfläche und an der anderen Seite des Adapters eine Bindungsstelle zu 2, 3 oder 4 voneinander verschiedenen Bindungsstellen für verschiedene einzelne Moleküle aufweist.
12. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Adaptern aus anorganischen oder organischen Polymeren, insbesondere Dendrons, oder Biopolymeren, insbesondere Proteinen oder DNA-Dendrimeren, bestehen.
13. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Adaptern an die nanoskopischen Inseln der Oberfläche des festen Substrates über eine kovalente Kopplung, insbesondere über NH_2 -, SH -, OH -, COOH -, Cl -, Br -, I -, Isothiocyanat-, Isocyanat-, NHS-Ester-, Sulfonyl-Chlorid-, Aldehyd-, Epoxid-, Carbonat-, Imidoester-, Anhydrid-, Maleimid-, Acryloyl-, Aziridin-, Pyridyl-Disulfid-, Diazoalkan-, Carboxyl-Diimidazol-, Carbodiimid-, Disuccinimidyl Carbonat-, Hy-



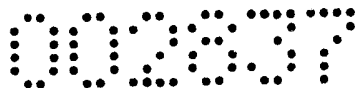
drazine-, Diazonium-, Aryl-Azid-, Benzophenon-, Diazirin-Gruppen oder Kombinationen davon, elektrostatische Interaktion, Liganden-Komplexe, biomolekulare Erkennung, insbesondere über Biotin-Streptavidin, Antikörper-Antigen, DNA-DNA-Interaktion, Zucker-Lectin oder Kombinationen davon, Chemisorption oder Kombinationen davon gebunden sind.

14. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass an einen Adapter ein Einzelmolekül gekoppelt ist, sodass pro Strukturelement auf der Oberfläche des festen Substrates nur ein Einzelmolekül gebunden ist.

15. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass für die Kopplung der Einzelmoleküle an die Adapter kovalente Kopplung, insbesondere über NH_2 -, SH -, OH -, COOH -, Cl -, Br -, I -, Isothiocyanat-, Isocyanat-, NHS-Ester-, Sulfonyl-Chlorid-, Aldehyd-, Epoxid-, Carbonat-, Imidoester-, Anhydrid-, Maleimid-, Acryloyl-, Aziridin-, Pyridyl-Disulfid-, Diazoalkan-, Carbonyl-Diimidazol-, Carbodiimid-, Disuccinimidyld Carbonat-, Hydrazine-, Diazonium-, Aryl-Azid-, Benzophenon-, Diazirin-Gruppen oder Kombinationen davon, Liganden-Komplexe, biomolekulare Erkennung, insbesondere über Biotin-Streptavidin, Antikörper-Antigen, DNA-DNA-Interaktion, oder Kombinationen davon, oder Kombinationen davon gebunden sind.

16. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung zur Bindung von Einzelmolekülen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln auf der Oberfläche eines festen Substrates durch eine Oberflächenstrukturierungsmethode, insbesondere Scanning Tunneling Microscopie (STM), Dip Pen Nanolithographie (DPN), Electro Beam Lithographie (EBL), Ionenstrahl-Lithographie (IL) oder Mikro-Contact-Printen (μCP),
- Aufbringen von Adaptern auf die nanoskopischen Inseln,
- Kopplung von Einzelmolekülen an die Adaptern, die an den nanoskopischen Inseln gebunden sind und deren projizierte 2-dimensionale Größe mindestens die Größe der Inseln erreicht,
- Absättigen von eventuell vorhandenen unbelegten Inseln durch Varianten von Adaptern, die keine Moleküle tragen.



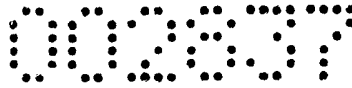
17. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung zur Bindung von Einzelmolekülen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln auf der Oberfläche eines festen Substrates durch einen Oberflächenstrukturierungsmethode, insbesondere Scanning Tunneling Microscopy, Dip Pen Nanolithography, Electro Beam Lithography, Ionenstrahl-Lithographie oder Mikro-Contact-Printen,
- Kopplung von Molekülen an Adaptoren, deren projizierte 2-dimensionale Größe mindestens die Größe der Inseln erreicht, in Lösung,
- Abscheiden der ungekoppelten Adaptoren bzw. ungekoppelten Molekülen durch Reinigungsschritte,
- Aufbringen der mit einzelnen Molekülen gekoppelten Adaptoren auf das mit nanoskopischen Inseln strukturierte feste Substrat.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass als feste Oberfläche eine Glas-, Kunststoff-, Membran-, Metall-, oder Metalloxid-Oberfläche eingesetzt wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass zur Herstellung einer Anordnung von Einzelmolekülen, folgende Schritte eingesetzt werden:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots auf der Oberfläche des festen Substrates aus Glas durch Scanning Tunneling Mikroskopie,
- Aufbringen der Adaptoren, insbesondere Dendrons, auf die Inseln, wobei ein Dendron an der Peripherie nichtaktivierte Disulfidgruppen trägt, welche an die nanoskopische Insel, insbesondere an ein Gold-Dot, binden, und der Dendronkern eine einzelne Funktionalität, insbesondere N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität, trägt, die mit der 5'-Amin-Funktionalität eines Einzelmoleküls, insbesondere eines modifizierten DNA-Oligonukleotides, koppeln kann,
- Kopplung der Einzelmoleküle an die Adapter, insbesondere durch Reaktion der Amin-Funktionalität der DNA-Oligonukleotide an die N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität der Dendrons, welche an die nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots, gebunden haben,



R 42846

24

4B, A389/2204, G01N

- Entfernen jener Adapter und Einzelmoleküle, die nicht an die nanoskopischen Inseln gebunden haben, insbesondere durch Waschen.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur Herstellung einer Anordnung von Einzelmolekülen, folgende Schritte eingesetzt werden:

- Aufbringen von nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots auf der Oberfläche des festen Substrates aus Glas durch Scanning Tunneling Mikroskopie,
- Kopplung der Einzelmoleküle an die Adapter in Lösung, insbesondere durch Reaktion der Amin-Funktionalität der DNA-Oligonukleotide an die einzelne Funktionalität des Dendronkerns, insbesondere eine N-Hydroxy-Succinimid-Funktionalität,
- Aufreinigen der Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, insbesondere Dendron-DNA, und Entfernen der nicht gekoppelten Einzelmoleküle oder nicht gekoppelten Adaptoren durch Aufreinigungsmethoden, insbesondere Gelpermeations-Chromatographie,
- Aufbringen der Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, insbesondere Dendron-DNA, auf die nanoskopischen Inseln, insbesondere Gold-Dots, wobei ein Dendron an der Peripherie nichtaktivierte Disulfidgruppen trägt, welche an die Insel binden, Entfernen jener Adapter-Einzelmolekül-Konjugate, die nicht an die nanoskopischen Inseln gebunden haben, insbesondere durch Waschen.

21. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20.

22. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 bei einer ultrasensitiven Fluoreszenz-Mikroskopie-Untersuchung, insbesondere der „Single Dye Tracing“ (SDT) Methode zur Visualisierung einzelner Fluoreszenz-markierter Moleküle.

23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass durch die räumliche Nähe der Inseln aus Metall das Fluoreszenz-Signal der einzelnen Insel-gekoppelten Moleküle verstärkt wird im Vergleich zu jenen Molekülen, die gegebenenfalls in den Bereichen zwischen den Inseln unspezifisch angelagert

NACHGEREICHT

002837

R 42846

25

4B, A389/2204, G01N

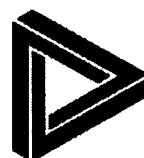
sind.

24. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Untersuchung von Biomolekülen, insbesondere zur Bindung von Antigenen, Liganden, Proteinen, DNA, mRNA, Toxinen oder Kombinationen davon.

25. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Untersuchung von cDNA von Zellen, wobei fluoreszenzmarkierte cDNSs an die Anordnung von verschiedenen Oligonukleotiden binden, und die Bindung für jede gebundene cDNS-Art ausgelesen werden kann.

26. Verwendung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Untersuchung der Proteine von Zellen, wobei fluoreszenzmarkierte Proteine an die Anordnung von verschiedenen Antikörpern binden und die Bindung für jede gebundene Protein-Art ausgelesen werden kann.

NACHGEREICHT



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : G01N 48/00 (2006.01); G01N 33/543 (2006.01)		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): G01N		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI,EPODOC, Pubmed, Embase, Internet		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 5. März 2004 eingereichten Ansprüchen 1-26 erstellt.		
Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO 2003/038033 A2 (Northwestern University) 8. Mai 2003 (08.05.2003) <i>*Ansprüche*</i>	1-26
	--	
X	DE 19957928 A1 (Hummel H.) 28. Juni 2001 (28.06.2001) <i>*Ansprüche*</i>	1-26
	--	
X	Chan, W.C.W. et al. "Quantum Dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection". Science, 1998, vol. 281, 25, Seiten 2016-2018, <i>*Ganzes Dokument*</i>	1-26
	--	
X	EP1186659 A1 (Matsushita Electric, Ltd.) 13. März 2002 (13.03.2002) <i>*Ansprüche*</i>	1-26
	--	
X	WO 2002/102504 A2 (Imperial College Innovations Ltd.) 27. Dezember 2002 (27.12.2002) <i>*Ansprüche*</i>	1-26
	--	
X	US005472881 A (Beebe et al.) 5. Dezember 1995 (05.12.1995) <i>*Ansprüche*</i>	1-26
	--	
Datum der Beendigung der Recherche: 27. April 2004		☒ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Dr. GÖRNER
¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO02/61126 A2 (Solexa Ltd) 8. August 2002 (08.08.2002) *Ansprüche* -----	1-26