(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
3. Oktober 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/077620 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G01N 21/64

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03140

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. März 2002 (20.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 15 752.5 28. März 2001 (28.03.2001) DE
102 00 865.5 11. Januar 2002 (11.01.2002) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GMBH** [DE/DE]; Löbstedter Strasse 105, 07749 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **ERMANTRAUT, Eugen** [DE/DE]; Forstweg 23, 07745 Jena (DE). **KAISER, Thomas** [DE/DE]; Im Dorfe 42, 07751 Bucha (DE). **TUCHSCHEERER, Jens** [DE/DE]; Neugasse 13, 07743 Jena (DE).

(74) Anwalt: **NEUEFEIND, Regina**; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (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, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, GQ, 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*

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:** DEVICE FOR REFERENCING FLUORESCENCE SIGNALS

(54) **Bezeichnung:** VORRICHTUNG ZUR REFERENZIERUNG VON FLUORESZENZSIGNALEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a device for referencing fluorescence signals and/or calibration of fluorescence detection systems, whereby the device comprises an essentially non-fluorescing support, on which are applied polymer layers in several defined regions and with partly varying thicknesses and/or compositions. Said polymer layers are applied to the support such as to fluoresce after corresponding irradiation and the device may thus be used as a fluorescence standard. The invention further relates to a method for the production of said fluorescence standards.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen und/oder zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen, wobei die Vorrichtung einen im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger umfasst, auf dem in mehreren definierten Bereichen Polymerschichten mit zum Teil unterschiedlicher Dicke und/oder Zusammensetzung aufgebracht sind. Diese Polymerschichten sind derartig auf den Träger aufgebracht, dass sie nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren und die Vorrichtung damit als Fluoreszenzeichstandard verwendet werden kann. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von solchen Fluoreszenzeichstandards.

WO 02/077620 A1

Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung, die den Vergleich der Abbildungseigenschaften und Signalempfindlichkeit von Fluoreszenzdetektionssystemen und die testspezifische Referenzierung von Fluoreszenzsignalen ermöglicht, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

Biomedizinische Tests basieren häufig auf dem Nachweis einer Wechselwirkung zwischen einem Molekül bzw. einer Affinitätsmatrix, dessen Identität bzw. deren Beschaffenheit bekannt ist (Sonde), und einem nachzuweisenden, unbekannten Molekül bzw. nachzuweisenden, unbekannten Molekülen (Ziel- bzw. Targetmolekül oder Target).
Bei modernen Tests sind die Sonden, so es sich bei ihnen um Moleküle handelt, häufig in Form einer Substanzbibliothek in bekannter Menge und Position auf Trägern immobilisiert. Solche Vorrichtungen werden auch Sonden-Arrays oder Chips genannt. Ein Sonden-Array umfasst charakteristischerweise mehrere so genannte Array-Elemente, bei denen es sich um die Bereiche eines Sonden-Arrays handelt, in denen eine bestimmte Molekularsonde häufig in mehrfacher Kopie immobilisiert ist. Die Summe aller belegten Array-Elemente bildet damit das Sonden-Array.

Die Immobilisierung von molekularen Sonden in Form einer Substanzbibliothek auf Sonden-Arrays ermöglicht es, eine Probe, die die nachzuweisenden Target-Moleküle enthält, parallel an mehreren Sonden gleichzeitig zu analysieren, was eine systematische Analyse mit hohem Durchsatz bei geringem Zeitaufwand ermöglicht (high throughput screening, D.J. Lockhart, E.A. Winzeler, Genomics, Gene Expression and DNA Arrays, Nature 2000, 405, 827-836). Für die Herstellung der Sonden-Arrays werden die Sonden 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).

Der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen der Sonde und dem Targetmolekül erfolgt prinzipiell folgendermaßen:

Die Sonde bzw. die Sonden werden in vorgegebener Art und Weise an einer bestimmten Matrix in Form eines Sonden-Arrays fixiert. Die Targets werden dann in einer Lösung mit den Sonden in Kontakt gebracht und unter definierten Bedingungen inkubiert. Weisen die Sonde und das Targetmolekül aufgrund von komplementären Eigenschaften eine Affinität zueinander auf, so findet während der Inkubation zwischen der Sonde und dem Target eine spezifische Wechselwirkung statt. Die dabei auftretende Bindung ist deutlich stabiler als die Bindung von Targetmolekülen an Sonden, die für das Targetmolekül nicht spezifisch sind. Zum Entfernen von unspezifisch gebundenen Targetmolekülen wird das System mit entsprechenden Lösungen gewaschen oder erwärmt bzw. entsprechend restriktiv wirkenden Maßnahmen unterworfen.

Der Nachweis der spezifischen Wechselwirkung zwischen einem Target und seiner Sonde kann dann durch eine Vielzahl von Verfahren erfolgen, die in der Regel von der Art des Markers abhängen, der je nach Aufbau des Experiments vor, während oder nach der Wechselwirkung des Targetmoleküls mit dem Sonden-Array in die Targetmoleküle oder in die Sondenmoleküle eingebracht worden ist. Bei solchen Markern kann es sich z.B. um fluoreszierende Gruppen, um radioaktive Markierungen, um Enzyme oder chemolumineszierende Moleküle handeln, wobei die zu verwendende Nachweismethode sich nach der Art des Markers richtet (A. Marshall, J. Hodgson, DNA Chips: An Array of Possibilities, Nature Biotechnology 1998, 16, 27-31; G. Ramsay, DNA Chips: State of the Art, Nature Biotechnology 1998, 16, 40-44).

Abhängig von der auf dem Sonden-Array immobilisierten Substanzbibliothek und der chemischen Natur der Targetmoleküle können anhand dieses Testprinzips

Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Nukleinsäuren, zwischen Proteinen und Proteinen sowie zwischen Nukleinsäuren und Proteinen untersucht werden (zur Übersicht siehe F. Lottspeich, H. Zorbas, 1998, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin).

Als Substanzbibliotheken, die auf Sonden-Arrays oder Chips immobilisiert werden können, kommen dabei Antikörper-Bibliotheken, Rezeptor-Bibliotheken, Peptid-Bibliotheken und Nukleinsäure-Bibliotheken in Frage. Die Nukleinsäure-Bibliotheken nehmen die mit Abstand wichtigste Rolle ein, wobei es sich besonders häufig um DNA-Molekül- oder RNA-Molekül-Bibliotheken handelt. Die Sonden-Array basierte Analyse von Nukleinsäure-Nukleinsäure-Wechselwirkungen folgt dabei den Prinzipien der Nukleinsäure-Hybridisierungstechnik (A. A. Leitch, T. Schwarzacher, D. Jackson, I. J. Leitch, 1994, In vitro-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford).

Üblicherweise erfolgt der Nachweis spezifischer Wechselwirkungen zwischen einer Sonde und einem Target durch fluoreszenzoptische Auswertung, da diese sich durch eine hohe Empfindlichkeit, durch Vielseitigkeit hinsichtlich der verwendbaren Marker und durch die Möglichkeit zur orts- und zeitaufgelösten Detektion der Wechselwirkung mit vergleichsweise geringem Aufwand (vor allem im Vergleich zu massenspektroskopischen Verfahren) sowie durch die Eliminierung der Strahlenbelastung, wie sie bei der Verwendung von radioaktiven Markierungsreagenzien auftritt, auszeichnen. Zusätzlich kann abhängig von den zur Markierung verwendeten Fluorophoren der Anregungs- und Detektionswellenlängenbereich eingestellt werden.

Allerdings werden qualitative und quantitative fluoreszenzoptische Auswertungen in der Praxis durch eine Reihe von Faktoren negativ beeinflusst, die in der Fluoreszenzspektroskopie an sich, in der Art der gewählten Fluoreszenzmarker und in der Art und dem Aufbau der verwendeten Detektionssysteme begründet sind. Zu

diesen Faktoren zählen vor allem unspezifische Hintergrundsignale (Signalrauschen), die durch intrinsische optische Eigenschaften der Fluoreszenzmarker (z.B. Bleichen, Quenching bzw. Fluoreszenzlöschung der verwendeten Farbstoffe), durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Sonde bzw. Targets und deren Lösungen (z.B. Autofluoreszenz), durch Schwankungen im optischen System (z.B. Strahlungsintensität der Lichtquelle und Fremdlicht) und durch Aufbau und Art der verwendeten Detektionssysteme (z.B. Autofluoreszenz der Assemblierungselemente, Fähigkeit der Detektoren zur räumlichen und zeitlichen Auflösung, Streuungen, Reflexionen) zustande kommen.

Zur Beurteilung, ob eine gemessene Fluoreszenzintensität ein Signal darstellt oder lediglich zum Signalrauschen gehört, müssen daher die Störeinflüsse beseitigt bzw. minimiert werden und Vorrichtungen und Methoden eingesetzt werden, die eine Referenzierung der gemessenen Fluoreszenzsignale erlauben. Solche Vorrichtungen werden auch als Fluoreszenzeichstandard bezeichnet.

Aus dem Bemühen, das gerätebedingte Signalrauschen zu minimieren, resultiert der hohe technische Aufwand zum Aufbau hochsensitiver Detektoren, die eine qualitative und quantitative Auswertung von Fluoreszenzsignalen erlauben. Insbesondere für die Auswertung beim high throughput screening von Sonden-Arrays, das eines gewissen Automatisierungsgrads bedarf, sind speziell angepasste Detektionssysteme erforderlich.

Beim fluoreszenzoptischen Auslesen von molekularen Sonden-Arrays mittels Standardepifluoreszenzaufbauten werden z.B. CCD (Charge Coupled Device) basierte Detektoren verwendet, die zur qualitativen Unterscheidung von optischen Effekten (Streuung, Reflexion) die Anregung der Fluorophore im Dunkelfeld (durch Auflicht oder Durchlichtmikroskopie) realisieren (C.E. Hooper et al., Quantitive Photone Imaging in the Life Sciences using intensified CCD Cameras, Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 1990, 337-344). Die Abbildung der

Sonden-Arrays erfolgt dabei entweder in einer Belichtung oder durch Rastern unter Verwendung hochauflösender Optiken. Um auftretende Autofluoreszenz oder systembedingte optische Effekte wie die Beleuchtungshomogenität über den gesamten Sonden-Array zu minimieren bzw. zu gewähren, sind komplizierte Beleuchtungsoptiken und Filtersysteme notwendig.

Konfokale Scanning-Systeme (beschrieben in US 5,304,810) erlauben die Auswertung von Fluoreszenzsignalen aus ausgewählten Ebenen einer Probe. Sie beruhen auf der Selektion der Fluoreszenzsignale entlang der optischen Achse mittels Lochblenden, woraus sich ein hoher Justageaufwand für die Proben sowie die Etablierung eines leistungsfähigen Autofokussystems ergibt. Solche Systeme sind in der technischen Lösung hochkomplex und die erforderlichen Komponenten, zu denen Laser, Lochblenden, (gekühlte) Detektoren (z.B. PMT, Avalanche-Dioden, CCD-Systeme), hochgenaue mechanische Translationselemente und Optiken gehören, müssen mit erheblichem Aufwand integriert und aufeinander optimiert werden (beschrieben in US 5,459,325, US 5,192,980, US 5,834,758).

Es sind also Detektionssysteme bekannt, mit denen die molekulare Wechselwirkung eines mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Targets und einer spezifischen Sonde, wie sie z. B bei Sonden-Array basierten Experimenten auftritt, nachgewiesen werden kann. Trotz des beschriebenen hohen technischen Aufwands, der je nach Art und Aufbau des verwendeten Detektionssystems für die Minimierung des Signalrauschens betrieben wird, kann dies nicht gänzlich beseitigt werden. Daher ist für die qualitative und quantitative Auswertung von gemessenen Fluoreszenzsignalen nach wie vor eine Referenzierung oder Kalibrierung der Experimente und der Detektionsgeräte mittels Fluoreszenzeichstandards notwendig. Eine Kalibrierung von Detektionssystemen mittels Fluoreszenzeichstandards wird durchgeführt, um u.a. Aussagen hinsichtlich der Sensitivität des räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens und der geometrischen Bildfehler, wie z.B. der Bildfeldwölbung des jeweiligen Systems vornehmen zu können.

Die Kalibrierung von Detektionsgeräten hinsichtlich ihres zeitlichen Auflösungsvermögens ist notwendig, da zu Unterscheidung des eigentlichen (häufig langlebigen) Fluoreszenzsignals von (häufig kurzlebigen) Autofluoreszenzsignalen die Messung der Signale über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden muss.

Bei der Verwendung von CCD-Detektoren müssen mit Hilfe von Standards z.B. die Linearität und Sensitivität des Detektors im verwendeten Fluoreszenzwellenlängenbereich, das räumliche und zeitliche Auflösungsvermögen sowie die Bildfeldwölbung (Flatfieldbestimmung) des Detektors bestimmt werden. Konfokale Detektionssysteme müssen hinsichtlich der Bereiche, die angeregt bzw. zur Gesamtintensität beitragen, kalibriert werden.

Eine Kalibrierung von Experimenten mittels Fluoreszenzeichstandards ist notwendig, da die als Marker verwendeten Fluorophore hinsichtlich ihrer Fluoreszenzausbeuten aufgrund der Umgebungsbedingungen, denen sie ausgesetzt sind (z.B. Autofluoreszenz von Lösungskomponenten, pH-Wert, Temperatur, Bestrahlungszeit), beträchtlichen Schwankungen unterworfen sind und die absolute Quantifizierung von z.B. Hybridisierungsausbeuten auf Sonden-Arrays damit nur bedingt möglich ist.

Das Kalibrieren von verschiedenen Fluoreszenzdetektionssystemen mittels Fluoreszenzeichstandards ist auch deswegen sehr wichtig, da nur eine solche Kalibrierung einen Vergleich von Fluoreszenzsignalen von Experimenten, die mit unterschiedlichen Detektionssystemen aber auch Geräten eines Systems gemessen wurden, erlaubt (system- oder geräteübergreifender Vergleich).

Im Stand der Technik sind unterschiedliche Lehren bekannt, die eine Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen bzw. Fluoreszenzsignalen ermöglichen sollen.

Zur Kalibrierung von Fluroeszenzdetektionsgeräten können z.B. Chips, die aus einer fluoreszierenden Plastikschicht bestehen, verwendet werden. Diese Eichstandards haben den Nachteil, dass sie keine Kalibrierung der Detektionssysteme hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens oder hinsichtlich deren dynamischen Eigenschaften über einen weiten Fluoreszenzbereich erlauben. Auch eine Bestimmung der Bildfeldwölbung von z.B. CCD-Detektoren ist mit diesen Standards nicht möglich, da aufgrund der Dicke des Chips eine Homogenisierung des Fluoreszenzsignals durch den Chip stattfindet. Damit ist eine Kalibrierung des Einflusses der geometrischen Verhältnisse auf die Detektion von Fluoreszenzsignalen, der insbesondere bei unterschiedlichen Detektionssystemen und Prinzipien eine entscheidende Rolle haben kann, weder geräte- noch systemübergreifend einstellbar.

Bei der Verwendung von CCD-basierten Fluoreszenzdetektoren und insbesondere bei der Anregung durch aufgeweitete oder strahlgeformte Laser oder multispektrale Beleuchtungssysteme wie z.B. Kaltlichtquellen sind zum Abgleich der Beleuchtungshomogenität bei der Verwendung von z.B. bewegten Streuscheiben aufwändige Berechnungen und Bildmanipulationen zur Definition des Flatfields nötig. Fluoreszenzeichstandards, die eine Definition des Flatfields zur Korrektur der Beleuchtungshomogenität bei solchen direkt abbildenden Systemen ermöglichen, sind aus dem Stand der Technik nicht bekannt.

Weiterhin gibt es Fluoreszenzeichstandards, die auf der Basis von dotierten Gläsern beruhen. Auch diese Standards haben den Nachteil, dass sie keine Kalibrierung der Detektionssysteme hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens bzw. hinsichtlich deren geometrischen Eigenschaften erlauben, da wegen der Dimensionen solcher Standards eine Homogenisierung der Signale durch das Volumen der Glases stattfindet. Konfokale Systeme, bei denen nur bestimmte Bereiche und Schichten entlang der optischen Achse angeregt werden bzw. zur Gesamtintensität beitragen und das Problem von Transmissionsverlusten durch darüberliegende

Strukturschichten besteht, können mit solchen Standards ebenfalls nicht hinsichtlich ihrer geometrischen Eigenschaften kalibriert werden.

In WO 01/06227 ist die Herstellung eines Fluoreszenzeichstandards auf der Basis von Mikro- bzw. Nanopartikeln und deren Anwendung zur Kalibrierung sowohl von Fluoreszenzdetektionssystemen als auch zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen in fluorometrischen Assays beschrieben. Diese Standards eignen sich ebenfalls nicht zur Kalibrierung der Fluoreszenzdetektionssysteme hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens. Damit ist ein geräteübergreifender Vergleich von aus Sonden-Array basierten Experimenten gewonnenen Signalintensitätsdaten nur bedingt möglich.

Um die kurzlebige Untergrundfluoreszenz (z.B. von autofluoreszierenden Lösungsmittelmolekülen) von dem eigentlichen Fluoreszenzsignal zu unterscheiden und das eigentliche Signal referenzieren zu können, können langlebig emittierende Markerstoffe als Standard verwendet werden, deren Signal durch zeitaufgelöste Detektionsmethoden nachgewiesen wird. Dabei handelt es sich häufig um phosphoreszierende Chelate der Seltenerdmetalle (insbesondere die des Europium oder Terpium). Diese Stoffe besitzen aber den Nachteil, dass sie nur mit UV-Lichtquellen angeregt werden können. Darüber hinaus sind die verwendeten Chelate in wässriger Form häufig instabil.

Um eine quantitative Auswertung von molekularen Wechselwirkungen bei Sonden-Array basierten Experimenten durch Fluoreszenzmessung und eine Normierung solcher Signale zu erreichen, werden zur Eichung bzw. Referenzierung die Experimente unter zweifacher Färbung der Sondenmoleküle, z.B. durch kompetative Hybridisierung, durchgeführt (M. Shena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, Science, 1995, 220,467-70 und D. Shalon, S.J. Smith, P.O. Brown, A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color

fluorescent probe for hybridization, Genome Res., 1996, 6, 639-45). Da bei solchen Eichstandards die durch die Referenzmoleküle erhaltenen Signale stets von den konkreten experimentellen Bedingungen abhängig sind, ist ein quantitativer, geräte- oder systemübergreifender Vergleich schwer möglich.

Anhand der Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Fluoreszenzeichstandards wird deutlich, dass ein großer Bedarf an Vorrichtungen besteht, die eine Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens sowie hinsichtlich deren geometrischen und dynamischen Eigenschaften ermöglichen.

Zusätzlich besteht ein großer Bedarf an Vorrichtungen zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen die den system- und geräteübergreifenden Vergleich und/oder den testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen von z.B. Sonden-Array basierten Experimenten ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung hat die Aufgabe, Vorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die eine Referenzierung von Fluoreszenzsignalen hinsichtlich der gemessenen Intensität und/oder eine Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren Sensitivität, deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens und/oder hinsichtlich deren geometrischen und dynamischen Eigenschaften erlauben. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Vorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die leicht einen geräte- und systemübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen aus Experimenten, wobei es sich z.B. um Sonden-Array basierte Experimente handeln kann, ermöglichen. Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Fluoreszenzeichstandards zur Verfügung zu stellen, die einen testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignaldaten erlauben. Schließlich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Vorrichtungen zur Verfügung zu stellen, die eine Referenzierung bzw.

Normierung von Fluoreszenzsignalen unter Berücksichtigung von Bleich- und Fluoreszenzlöschungseffekten erlauben.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Verfahren zur Herstellung von solchen Fluoreszenzeichstandards zur Verfügung zu stellen.

Zur Lösung dieser und weiterer Aufgaben, die sich aus der Beschreibung der Erfindung ergeben, dienen die Merkmale des unabhängigen Patentanspruchs. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen definiert.

Erfindungsgemäß werden die Aufgaben dadurch gelöst, dass auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger in definierten Bereichen mindestens eine Polymerschicht so aufgebracht ist, dass diese Bereiche nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren, wobei einige der aufgebrachten Polymerschichten sich hinsichtlich ihrer Dicke und/oder Zusammensetzung unterscheiden.

Solche erfindungsgemäßen Vorrichtungen, die im Folgenden auch als Fluoreszenzeichstandard bzw. Standard bezeichnet werden, zeigen in den definierten Bereichen nach entsprechender Bestrahlung eine Fluoreszenz, deren Intensität vorbestimmbar und reproduzierbar einstellbar ist. Damit können erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards zur Kalibrierung von verschiedenen Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens, hinsichtlich deren geometrischen und dynamischen Eigenschaften sowie hinsichtlich deren Sensitivität verwendet werden.

Da der Wellenlängenbereich der in den definierten Bereichen eines erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch Änderung der Zusammensetzung der Polymerschichten vorbestimmbar und reproduzierbar einstellbar ist, können die erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards zur Kalibrierung von verschiedenen

Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren dynamischen Eigenschaften verwendet werden.

Die Polymerschichten von erfindungsgemäßen Vorrichtungen werden in definierten Bereichen aufgebracht, deren Form und Größe vorbestimmbar und reproduzierbar eingestellt werden kann. Solche Fluoreszenzeichstandards, die auch als strukturierte Fluoreszenzeichstandards bezeichnet werden, können zur Kalibrierung von unterschiedlichen Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden.

Da die Fluoreszenzeigenschaften der erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards nur von der Dicke und/oder der Zusammensetzung der in den definierten Bereichen aufgebrachten Polymerschichten abhängen und z.B. nicht von Komponenten der Target-Lösungen beeinflusst werden, eignen sich die erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards zur geräte- und detektionsübergreifenden und/oder zur testübergreifenden Bewertung und Referenzierung von Fluoreszenzsignalen, die z.B. bei Sonden-Array basierten Experimenten gemessen werden.

Bei den in den definierten Bereichen von erfindungsgemäßen Vorrichtungen aufgebrachten Polymerschichten kann es sich um eine oder mehrere Polymerschichten handeln, die sich in ihrer Zusammensetzung und/oder Dicke unterscheiden. Die Polymerschichten bestehen aus mindestens einem fluoreszierenden Polymer oder aus einem Polymergemisch, wobei mindestens eine Polymerkomponente des Gemischs fluoreszierend ist. Bevorzugte fluoreszierende Polymere umfassen z.B. Positiv- und/oder Negativ-Photolacke auf Basis von Epoxidharzen wie z.B. SU8 und Novolacke und/oder PMMA und/oder photosensitives Polyimid und/oder Benzocyclobuten. Polymere, die für die Herstellung von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards geeignet sind, d. h. die nach entsprechender Bestrahlung eine Fluoreszenz zeigen, sind auch aus US 6,091,488 oder US 4,482,424 bekannt.

Die Polymerschichten von erfindungsgemäßen Vorrichtungen können neben mindestens einem Polymer zusätzlich fluoreszierende Stoffe enthalten, bei denen es sich nicht um Polymere handelt. Da diese Stoffe in die Polymerschichten eingebettet sind, werden ihre Fluoreszenzeigenschaften von Umgebungsfaktoren (z.B. Komponenten der Target-Lösungen) nicht beeinflusst. Bevorzugt umfassen solche fluoreszierenden Stoffe Chromophore, organische Farbstoffe wie z.B. Azofarbstoffe, Triphenylmethanfarbstoffe, Porphyninenfarbstoffe und/oder anorganische Farbstoffe wie z.B. metallische Farbstoffe und insbesondere Lanthanide. Solche Stoffe umfassen auch Perylen-Derivate, wie sie in H. Langhals, J. Karolin, L. B.-A. Johansson, Spectroscopic properties of new and convenient standards for measuring fluorescence quantum yields, J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1998, 94, 2919-2922 und S. Kalinin, M. Speckbacher, H. Langhals, L. B.-A. Johansson, A new and versatile fluorescence standard for quantum yield determination, Phys. Chem. Chem. Phys., 2001, 3, 172-174 erwähnt werden. Insbesondere kann es sich z. B. um N,N'-bis(1-hexylheptyl)-3,4:9,10-perylenbis(dicarboximid), perlyene-3,4,9,10-tetracarboxyltetramethylester, perlyene-3,4,9,10-tetracarboxyltetranatriumsalz und N^2,N^3-[bis(1-hexylheptyl)-benzo[ghi]perylen-2,3,8,9,11,12-hexacarboxyl-2,3:8,9:11,12-tris(dicarboximid)-N^1,$N^{1'}$-(1,2-ethyl)-[$N^{2'}$-(I-octylnonyl)-perylen-3,4:9,10-bis(dicarboximid) handeln.

Bei erfindungsgemäßen Vorrichtungen kann der Wellenlängenbereich der in den definierten Bereichen nach entsprechender Bestrahlung auftretenden Fluoreszenz durch die Wahl der Zusammensetzung der Polymerschichten eingestellt werden. In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung sind die auf einem nicht fluoreszierenden Träger in definierten Bereichen aufgebrachten Polymerschichten durch eine breitbandige Eigenfluoreszenz gekennzeichnet, so dass sie im sichtbaren Spektralbereich sowie im nahen IR- und UV-Bereich nach schmalbandiger Anregung Fluoreszenzsignale in einem Wellenlängenbereich größerer Anregung zeigen. In einer anderen bevorzugten Ausführung der Erfindung zeigen die Polymerschichten in

den definierten Bereichen eine schmalbandige Eigenfluoreszenz, deren Wellenlängenbereich von der Zusammensetzung der Polymerschichten abhängt.

Bei einer bevorzugten Ausführung der Erfindung bestehen die Polymerschichten nur aus einem Polymer, so dass der Wellenlängenbereich der Fluoreszenz nur von diesem Polymer abhängt. In weiteren bevorzugten Ausführungen der Erfindung bestehen die Polymerschichten aus einem oder mehreren nicht fluoreszierenden Polymeren und/oder einem oder mehreren zusätzlichen fluoreszierenden Stoffen, so dass der Wellenlängenbereich der Fluoreszenz dieser erfindungsgemäßen Vorrichtungen von der Art und der Kombination der Polymere und/oder der fluoreszierenden Stoffe abhängt.

Erfindungsgemäß kann die Intensität der von einer Polymerschicht in einem definierten Bereich nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz auf vielfältige Weise vorbestimmbar eingestellt werden. Die Intensität der in den definierten Bereichen nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz ist erfindungsgemäß durch die Zusammensetzung der Polymerschichten und/oder die Dicke der Polymerschichten einstellbar. Erfindungsgemäß ist unter der Dicke einer Polymerschicht in einem definierten Bereich sowohl die Dicke der einzelnen Polymerschichten in einem Bereich, wenn in einem Bereich mehrere Polymerschichten aufgebracht sind, als auch die Dicke, die sich aus der Summe der Dicke der einzelnen Polymerschichten in einem Bereich ergibt, zu verstehen.

Bei einer bevorzugten Ausführung der Erfindung erfolgt die Einstellung der Intensität in einem definierten Bereich durch das sukzessive Aufbringen von Polymerschichten einheitlicher Zusammensetzung in diesem Bereich. Die in diesem Bereich entstehende Polymerschicht zeigt eine einheitliche Zusammensetzung. Entsprechend können erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards hergestellt werden, die in allen definierten Bereichen Polymerschichten einheitlicher Zusammensetzung, aber unterschiedlicher Schichtdicke tragen. In einer besonders

bevorzugten Ausführung der Erfindung können auf diese Weise Fluoreszenzeichstandards hergestellt werden, bei denen die Intensität der in einem Bereich nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz sich proportional zu der Dicke der in dem jeweiligen Bereich aufgebrachten Polymerschicht verhält.

Die Intensität der Fluoreszenz in den definierten Bereichen von erfindungsgemäßen Eichstandards ist auch durch Änderung der Zusammensetzung der Polymerschichten einstellbar. Unter Zusammensetzung der Polymerschichten wird dabei erfindungsgemäß die Art und Anzahl der Polymerkomponenten in einer Polymerschicht und/oder der zusätzlichen fluoreszierenden Stoffe sowie Menge der Polymerkomponenten und/oder zusätzlichen fluoreszierenden Stoffe pro Flächeneinheit verstanden.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung werden Polymerschichten einheitlicher Dicke in verschiedenen definierten Bereichen aufgebracht, wobei die Polymerschichten sich nur hinsichtlich der Menge der zusätzlichen fluoreszierenden Teilchen pro Flächeneinheit unterscheiden. Auf diese Weise sind erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards herstellbar, bei denen die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz sich bei gleicher Schichtdicke proportional zu der Menge der fluoreszierenden Teilchen in den verschiedenen definierten Bereichen verhält. In einer anderen bevorzugten Ausführung der Erfindung kann damit bei konstanter Konzentration der fluoreszierenden Teilchen im Polymer durch Änderung der Schichtdicke quasi linear die resultierende Intensität eingestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Einstellung der Intensität von erfindungsgemäß hergestellten Fluoreszenzeichstandards besteht darin, während des Herstellungsprozesses die erfindungsgemäßen Polymerschichten physikalischen Behandlungsmethoden wie Bestrahlung und Temperaturbehandlung (Tempern) zu

unterwerfen. Ohne an eine Hypothese gebunden sein zu wollen, wird momentan davon ausgegangen, dass durch diese Behandlungsmethoden der Vernetzungs- bzw. Quervernetzungsgrad der Polymerschichten und entsprechend die Fluoreszenzeigenschaften der Polymerschichten verändert werden. Der Begriff Vernetzungs- bzw. Quervernetzungsgrad ist dem Fachmann geläufig. Für die Einstellung der Intensität von Polymerschichten durch Verfahren zur Veränderung des Vernetzungsgrads, eignen sich insbesondere Polymere, die eine duroplastische Vernetzung aufweisen wie z.B. die erwähnten Photolacke wie SU8.

Erfindungsgemäß können durch das sukzessive Aufbringen von Polymerschichten unterschiedlicher Dicke und/oder unterschiedlicher Zusammensetzung und/oder unterschiedlichen Quervernetzungsgrads in mehreren definierten Bereichen auf ein und dem selben Träger Fluoreszenzeichstandards hergestellt werden, die sich durch eine große Bandbreite sowohl hinsichtlich der Intensitäten als auch der Wellenlängenbereiche der nach entsprechender Bestrahlung auftretenden Fluoreszenz unterscheiden. Solche erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards sind vielfältig zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögens sowie deren dynamischen und geometrischen Eigenschaften einsetzbar. Solche erfindungsgemäßen Vorrichtungen können auch als Fluoreszenzeichstandards verwendet werden, die leicht einen Vergleich von Fluoreszenzsignalen zwischen unterschiedlichen Detektionssystemen, aber auch Geräten eines Systems zulassen.

Die Fluoreszenzeigenschaften, wie z.B. die Quantenausbeute der fluoreszierenden Bereiche sind wegen der chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Polymere und zusätzlichen fluoreszierenden Stoffe über die Bestrahlungszeit Änderungen unterworfen, so dass sich die resultierende Intensität nach einer gewissen Zeit der Nutzung verringert (Bleichen, siehe auch Miehler, 1992, Kunststoff-Mikromechanik: Morphologie, Deformations- und Bruchmechanismen., Hanser, München/Wien).

Erfindungsgemäß können die in definierten Bereichen abgelegten Polymerschichten durch geeignete Herstellungsprotokolle (z.B. durch so genannte Temperprotokolle) hinsichtlich ihrer Intensitätsveränderungen über die Zeit derartig optimiert werden, dass diese Veränderungen linear sind und demzufolge die Intensitätsverhältnisse der resultierenden Fluoreszenz der einzelnen definierten Bereiche des strukturierten Standards konstant bleiben.

Solche erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards können für die Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionsgeräten hinsichtlich deren zeitlichen Auflösungsvermögens und zur Normierung von Experimenten hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs verwendet werden. Da bei solchen erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards die Veränderungen der Intensität über die Zeit linear sind, können diese Standards auch für die Normierung von Experimenten auf Detektionsgeräten verwendet werden, deren optische Eigenschaften zeitlichen Änderungen (z.B. Laser- oder Lampenleistung) unterworfen sind.

Als bevorzugte Ausführungsformen können damit auch erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards hergestellt werden, deren Fluoreszenzausbeute über die Bestrahlungsdauer und den Alterungsprozess linear bzw. hinreichend vorbestimmbar beschrieben werden kann. Solche Fluoreszenzeichstandards können z.B. zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen von Experimenten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, verwendet werden. Außerdem erlauben sie den geräte- und systemübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung werden die Polymerschichten in definierten Bereichen unterschiedlicher Form und/oder Größe auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger aufgebracht. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen haben diese definierten Bereiche eine quadratische, rechteckige

und/oder kreisförmige Gestalt, deren Seitenlängen bzw. Durchmesser sich zwischen 500 nm und 5 mm bewegen.

Solche erfindungsgemäßen strukturierten Fluoreszenzeichstandards können zur Kalibrierung von unterschiedlichen Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden. Unter räumlichem Auflösungsvermögen ist dabei erfindungsgemäß die Separierbarkeit zweier abgebildeter fluoreszierender Punkte zu verstehen.

Da erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards hergestellt werden können, deren definierte Bereiche Maßtoleranzen im 10 nm-Bereich aufweisen, können solche Fluoreszenzeichstandards bei mikroskopischen Techniken, wie z.B. der konfokalen 3-D-Mikroskopie als Normierungsinstrument für laterale und axiale Distanzen verwendet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die definierten Bereiche in Array-Form auf dem Träger aufgebracht, d. h. dass mehrere definierte Bereiche gleicher Größe und Form zu einem Array-Element gruppiert sind, wohingegen Bereiche anderer Form und/oder Größe zu anderen Array-Elementen gruppiert sind.

In bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards kann die Dicke der Polymerschichten so eingestellt werden, dass die maximale Dicke der verschiedenen Polymerschichten in einem Bereich deutlich geringer ist als die minimale Fokustiefe handelsüblicher konfokaler Detektionssysteme. Erfindungsgemäß sollten solche Fluoreszenzeichstandards eine bevorzugte Schichtdicke zwischen wenigen Nanometern und maximal 50 Mikrometern aufweisen, bevorzugt sollten die Schichtdicken zwischen einigen nm und 20 µm, zwischen 100 nm und 10 µm, besonders bevorzugt zwischen 200 nm und 5 µm liegen. Unter Fokustiefe ist erfindungsgemäß der Bereich entlang der optischen Achse zu verstehen, in dem eine Detektion von Fluoreszenzsignalen möglich ist.

Dieser Bereich wird bei konventioneller Mikroskopie durch die numerische Apertur und bei konfokaler Scanningmikroskopie durch die Größe der Lochblenden (Pinholes) bestimmt. Solche erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards können zur Kalibrierung von physikalischen Aufbauten und Geräten, zur Erfassung von Fluoreszenzsignalen sowie zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen entsprechend markierte Substanzen und Substanzgruppen verwendet werden.

Die Polymerschichten werden erfindungsgemäß auf im Wesentlichen nicht fluoreszierenden, bevorzugt optisch durchlässigen Trägern aufgebracht. Bei bevorzugten Ausführungen der Vorrichtung bestehen diese Träger aus Glas, besonders bevorzugt aus Quarzglas und Borofloatglas oder aus optisch durchlässigen, nicht fluoreszierenden polymeren Scheiben, besonders bevorzugt aus Polycarbonat, PMMA und/oder Folien. Als Träger eignen sich unter Umständen auch optisch nicht transparente Materialien, die im Wesentlichen keine Eigenfluoreszenz aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung sind die Fluoreszenzeichstandards mit weiteren Trägersystemen verbunden. Diese Trägersysteme bestehen aus ebenfalls im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien. Bevorzugt handelt es sich dabei um optisch durchlässige Materialien wie Glas, besonders bevorzugt um Quarzglas, aber auch um optisch nicht transparente Materialien wie Plastik und/oder Metall, die im Wesentlichen keine Eigenfluoreszenz aufweisen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei diesem Trägersystem um einen handelsüblichen Objektträger, wie er für z. B für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet wird. Auf solchen Trägern können z.B. Zellen oder Gewebeschnitte immobilisiert und durch Abgleich der Signale gegen den erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandard direkt ausgewertet werden.

Eine Integration der erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards kann z.B. auch direkt auf den Trägern erfolgen, auf denen Substanzbibliotheken in Form eines Sonden-Arrays abgelegt sind oder werden. Solche Fluoreszenzeichstandards erlauben eine unmittelbare Referenzierung von Fluoreszenzsignalen und ermöglichen so die Bewertung von testspezifischen Untersuchungen. Zur Anbindung der Substanzbibliotheken kann die Oberfläche der Träger in mindestens den Bereichen, die die Substanzbibliothek enthalten sollen, durch Amino-, Carboxy-, Aldehyd- oder Epoxidgruppen funktionalisiert sein. Weitere funktionelle Gruppen zur Anbindung von Substanzbibliotheken sind dem Fachmann bekannt.

Dabei sind erfindungsgemäß die Träger, auf denen die Fluoreszenzeichstandards bzw. die Substanzbibliotheken in Form von Sonden-Arrays abgelegt werden, so zu wählen, dass sie im Wesentlichen nicht fluoreszierend und, wenn benötigt, optisch durchlässig sind. Bevorzugte Materialien für die Herstellung von solchen Trägern sind Glas, besonders bevorzugt Quarzglas, Borofloatglas und/oder Polymere und/oder Silicium. Es können auch Materialien gewählt werden, die optisch nicht durchlässig sind, aber im Wesentlichen nicht fluoreszierend sind.

Bei der Integration der erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards in Sonden-Arrays können diese Sondenarrays durch Substanzbibliotheken auf Protein-, Peptid- oder Nukleinsäurebasis funktionalisiert sein. Bevorzugt handelt es sich bei den Proteinsubstanzbibliotheken, mit denen die erfindungsgemäßen Fluoreszenzeich-standards funktionalisiert sind, um Antikörperbibliotheken, um Rezeptorbibliotheken, Rezeptor-Ligand-Bibliotheken und/oder Hormonbibliotheken.

Bei den Peptidbibliotheken, mit denen erfindungsgemäß Fluoreszenzeichstandards funktionalisiert sind, handelt es sich üblicherweise um pharmazeutisch oder biologisch aktive Peptide, um Antigenbibliotheken und/oder um Rezeptor-Ligand-Bibliotheken und/oder um Hormonbibliotheken.

Bei den Nukleinsäurebibliotheken, mit denen erfindungsgemäß Fluoreszenzeichstandards funktionalisiert sind, handelt es sich bevorzugt um DNA-Molekül-Bibliotheken und/oder RNA-Molekülbibliotheken. Besonders bevorzugt handelt es sich um mRNA-Bibliotheken, um rRNA-Bibliotheken, um genomische DNA-Bibliotheken und/oder cDNA-Bibliotheken und/oder Plasmide.

In einer bevorzugten Ausführungsform können erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards direkt in die Fluoreszenzdetektionssysteme integriert werden, so dass eine online-Kalibrierung der Geräte möglich ist. Da die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards durch den Herstellungsprozess und durch die Zusammensetzung und Dicke der Polymerschicht sowie die Größe und Form der definierten Bereiche, in denen die Polymerschichten, die nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren, aufgebracht sind, vorbestimmbar einstellbar sind, können die mit verschiedenen Detektionssystemen gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Sonden-Array basierten Experimenten system- und geräteübergreifend direkt miteinander verglichen werden.

Die erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards können auch als universelles externes Werkzeug verwendet werden, um mehrere unterschiedliche Detektionssysteme in der beschriebenen Weise zu kalibrieren.

Erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards können auch in geschlossene Kammersysteme (z.B. PCR- und/oder Hybridisierungskammern) integriert sein.

Erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards können nach Verfahren hergestellt werden, bei denen die nach Bestrahlung fluoreszierenden Schichten gezielt in definierten Bereichen auf erfindungsgemäßen Träger aufgebracht werden. Solche Verfahren sind z.B. aus der Halbleitertechnik bekannt (US 6,091,488). Die Polymerschichten von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards können bevorzugt durch photolithographische Verfahren, durch Spotten, durch

Trockenätzen, durch Ionenimplantation, durch drucktechnische Verfahren, durch Walzen, durch Spritzgießen oder durch Oberflächenprägung auf den Träger aufgebracht werden.

Allgemein können die erfindungsgemäßen Polymerschichten, die auch als funktionelle Polymerschichten bzw. als Funktionsschichten bezeichnet werden, durch chemische und/oder physikalische Methoden zur Beschichtung auf dem Träger aufgebracht werden. Bei chemischen Methoden kann die Aufbringung der Polymerschichten dabei aus der Gasphase (z.B. durch CVD oder Oxidation), aus der Flüssigphase (z.B. durch elektrolytische, elektrochemische und andere nasschemische Verfahren) oder aus der Festphase (z.B. durch Oxidation) erfolgen. Bei physikalischen Methoden kann die Aufbringung aus der Gasphase oder aus dem Plasma (z.B. durch PVD, Sputtern oder Bedampfen), aus der Flüssigphase (z.B. durch Spin-On-Verfahren, durch Lackieren, Spritzen oder Tauchen) oder aus der Festphase (z.B. durch Lamination) erfolgen. Es können auch Kombinationen dieser Verfahren oder nachträgliche Modifikationen wie Ionenimplantation angewandt werden (z.B. PECVD). Die jeweiligen Methoden und entsprechende Ausgestaltungen sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. W. Menz, J. Mohr, Mikrosystemtechnik für Ingenieure, VCH, 1997).

Die erfindungsgemäßen Polymerschichten können durch verschiedene Verfahren strukturiert werden, die dem Fachmann bekannt sind. Dabei kann es sich um biochemische Methoden handeln, wie z.B. die enzymatisch vermittelte selektive Strukturierung (in WO98/08086 beschrieben), aber auch um chemische und/oder mikrotechnische Verfahren. Zu diesen gehören selektives Ätzen der Funktionsschicht gegen eine Maskierung, die selbst gegen den Ätzer unempfindlich ist (z.B. Flüssig- oder Trockenätzen). Ebenfalls anwendbar sind Verfahren, die selektive Eigenschaftsveränderungen durch Strahlung, wie z.B. durch Bestrahlung mit UV oder Lasern bewirken. Dazu zählt die Photolithographie. Andere Methoden umfassen self-assembling layers. Diese Methoden können unter Verwendung einer

Maskierung, aber auch durch „direkt schreibende" Vorrichtungen (Spotten) durchgeführt werden. Drucktechnische Verfahren wie Spotten oder Offsetdruck oder andere Verfahren wie Walzen, Stempeln, Spritzgießen oder Oberflächenpräge-Verfahren können ebenfalls verwendet werden. Unterschiedliche Ausführungsformen der Methoden sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. W. Menz, J. Mohr, Mikrosystemtechnik für Ingenieure, VCH, 1997).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Polymerschichten durch negative oder positive photolithographische Verfahren, besonders bevorzugt durch negative photolithographische Verfahren aufgebracht. Besonders bevorzugt sind negative photolithographische Verfahren, bei denen die Polymerschichten nach Bestrahlung im Entwickler unlöslich werden. Unbelichtete Bereiche bleiben dagegen im Entwickler löslich und können entfernt werden. Solche photolithographische Verfahren zur Strukturübertragung mittels eines Photoresists sind dem Fachmann bekannt. Dabei sind chemische und physikalische Verfahren, die das Aufbringen einer homogenen Funktionsschicht auf dem Träger erlauben, bevorzugt. Besonders bevorzugte Verfahren umfassen CVD-, PVD- und Spin-On-Verfahren.

Die Parameter, durch deren Wahl bei photolithographischen Verfahren (aber auch anderen Verfahren) die Dicke der Polymerschichten eingestellt werden kann, umfassen die Bearbeitungsparameter (Verfahrensparameter) wie die Umlaufgeschwindigkeit, die Dauer des Herstellungsprozesses, die Viskosität des Polymers, die Temperatur und/oder die Luftfeuchtigkeit. Bei der Verwendung von Photopolymeren umfassen die Bearbeitungsparameter auch die Bestrahlungsdosis, die Parameter des Entwicklungsprozesses und den Temperprozess.

Bei photolithographischen Verfahren kann die Form und Größe der definierten Bereiche, in denen die Polymerschichten aufgebracht werden, durch Verwendung einer Maske und/oder Lochmasken, z.B. durch Verwendung einer Maske im 1:1 Maßstab festgelegt werden. Je nach Aussparung der Maske sind damit

erfindungsgemäß verschiedene geometrische Formen und Größen für die definierten Bereiche einstellbar. Ebenfalls können nach diesem Verfahren erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards hergestellt werden, bei denen die in verschiedenen definierten Bereichen abgelegten Polymerschichten eine Array-Form aufweisen. Als Lochmasken wird bevorzugt strukturiertes Chrom auf Glas und/oder Quarz verwendet.

Durch Wiederholen des photolithographischen Verfahrens können erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards hergestellt werden, bei denen in verschiedenen Bereichen Polymerschichten mit unterschiedlicher Zusammensetzung und/oder Dicke aufgebracht sind. Durch Ändern der Temper- und/oder Bestrahlungsprotokolle, die bei photolithographischen Verfahren verwendet werden, kann zudem der Vernetzungsgrad (und damit die Intensität) der Polymerschichten in definierten Bereichen gezielt geändert werden. Durch Ändern der Temperprotokolle kann ebenfalls das Bleichverhalten von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards gezielt eingestellt werden.

Um erfindungsgemäß hergestellte Fluoreszenzeichstandards mit einem z.B. optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem zu verbinden, können alle Verfahren verwendet werden, die den Eichstandard mit dem Trägersystem verbinden und die Eigenschaften des Fluoreszenzeichstandards nicht negativ beeinflussen. Zur Montage ist es notwendig, die Oberfläche der Standards durch geeignete Verfahren und Vorrichtungen in die Ebene von Probenträgern derart auszurichten, dass eine eindeutige Zuordnung der Lage der fluoreszierenden Schichten in Höhe und örtlicher Lage bezüglich definierter Bereiche des Trägers (z.B. Außenkanten) möglich ist. Dazu sind z.B. temporäres Aufkleben oder Vakuumeinrichtungen geeignet. Bevorzugt wird der Fluoreszenzeichstandard auf dem Trägersystem durch Kleben, durch Lagejustage oder durch ein Vakuumsystem aufgebracht.

Bei der Herstellung solcher erfindungsgemäßer Fluoreszenzeichstandards ist zu berücksichtigen, dass die Methoden zur Assemblierung der Fluoreszenzeichstandards und der Sonden-Arrays die Funktion der Bauelemente nicht negativ beeinflussen. Dementsprechend ist zu gewährleisten, dass z.B. die verwendeten Klebstoffe keine Autofluoreszenz zeigen und durch die verwendeten Bauteile keine wesentlichen Streuungen oder Reflektionen auftreten.

Werden die Fluoreszenzeichstandards z.B. mit Substanzbibliotheken als Sonden-Arrays funktionalisiert, kann der Fluoreszenzeichstandard mit dem Trägersystem, auf dem sich die Substanzbibliotheken befinden, verbunden sein.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform können die Fluoreszenzeichstandards auf Trägern zunächst im Waver-Maßstab gefertigt werden und die entsprechend vereinzelten Fluoreszenzeichstandards dann durch Ablegen von Substanzbibliotheken in Array-Form funktionalisiert werden.

Die erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards lassen sich in unterschiedlicher Art und Weise zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen einsetzen. Durch die Verwendung von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards für gerätespezifische Kalibrierungen lassen sich die Geräteeigenschaften definieren. Zum Beispiel kann die entsprechende Form und Größe der definierten Bereiche, in denen die nach entsprechender Bestrahlung fluoreszierenden Polymerschichten abgelegt sind, zur Bestimmung des räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden. Erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards, die in mehreren definierten geometrischen Bereichen Polymerschichten unterschiedlicher Dicke, aber einheitlicher Zusammensetzung aufweisen, wodurch die nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufene Intensität der Fluoreszenz in den verschiedenen Bereichen sich proportional zur Polymerschichtdicke verhält, erlauben eine Kalibrierung eines entsprechenden Detektionssystems hinsichtlich seiner dynamischen Eigenschaften. Erfindungsgemäß wird unter dynamischen

Eigenschaften der Bereich auswertbarer Fluoreszenzintensitäten bei einer Messung verstanden. Z.B. lässt sich so der Intensitätsbereich festlegen, in dem ein CCD-Detektor linear arbeiten soll. Solche erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards können auch für die Einstellung der Sensitivität des Detektionssystems verwendet werden, d. h. der Festlegung, welche minimalen oder maximalen Fluoreszenzintensitäten ein Detektionssystem noch als Signal werten soll.

Erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards, bei denen die nach entsprechender Bestrahlung in verschiedenen geometrischen Bereichen mit Polymerschichten unterschiedlicher Dicken und/oder Zusammensetzung hervorgerufene Intensität der Fluoreszenz vorbestimmbar und regulierbar abklingt, können benutzt werden, um Rückschlüsse auf das gerätespezifische Bleichen von Fluoreszenzsignalen zu ziehen.

Ferner können erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards zur Kalibrierung der geometrischen Eigenschaften von Detektionssystemen, insbesondere zur Korrektur der Bildfeldwölbung (Flatfieldbestimmung) bei CCD-Detektoren verwendet werden.

Erfindungsgemäß wird unter geometrischen Eigenschaften allgemein die örtliche Auflösung, der Abbildungsmaßstab, die Bildfeldwölbung und andere geometrische Fehler, die aus der optischen Konstruktion resultieren, verstanden.

Da die Fluoreszenzeigenschaften von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards nicht von äußeren Faktoren abhängen und vorbestimmbar und reproduzierbar einstellbar sind, können sie verwendet werden, um verschiedene Geräte des gleichen Detektionsprinzips (geräteübergreifende Kalibrierung) oder Geräte unterschiedlichen Detektionprinzips (systemübergreifende Kalibrierung) zu kalibrieren. Die Kalibrierung kann dabei auf Normwerte, die z.B. in Arbeitsgruppen und Labors verwendet werden, erfolgen, auf die dann Fluoreszenzsignale aus experimentellen Messungen bezogen werden.

Damit sind die Signale, die bei der Auswertung z.B. eines Sonden-Array basierten Experiments mit unterschiedlichen Detektionssystemen erhalten werden, direkt vergleichbar (testübergreifender Vergleich).

Erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards, die eine große Bandbreite hinsichtlich der Wellenlänge und Intensität der nach Bestrahlung der Polymerschichten in den definierten Bereichen hervorgerufenen Fluoreszenz zeigen, können auch für testspezifische Referenzierung von Fluoreszenzsignalen verwendet werden. Dies ist möglich, weil die testspezifischen Signale z.B. auf die Fluoreszenz eines definierten Bereichs bezogen werden können, deren Eigenschaften in dem Bereich des Testsignals liegen. Damit ist eine Normierung der Testsignale möglich. Die unter Verwendung von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards erhaltenen normierten experimentellen Daten sind signifikant der Fehler, welche aus der Verwendung unterschiedlicher Detektoren bzw. verschiedener Einstellungen der Detektoren resultieren, behoben. Sie können daher direkt miteinander verglichen werden. Damit ermöglichen erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards den testübergreifenden und geräteübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalintensitäten, die bei der Durchführung von Sonden-Array basierten Experimenten und Tests erhalten worden sind.

Üblicherweise werden die Einstellungen von Scannern den entsprechenden Messergebnissen angepasst. Sind bei einem Sonden-Array basierten Experiment die resultierenden Fluoreszenzsignale schwach, werden die Laserleistung oder die Sensitivität des Detektors (z.B. die Vorspannung bei Verwendung eines PMT-Systems oder die Integrationszeit bei Verwendung eines CCD-Systems) erhöht. Außerdem unterliegen die Geräte gerätespezifischen Schwankungen. Dies ist insbesondere kritisch, wenn Ergebnisse aus unterschiedlichen Zeiträumen verglichen werden sollen, da z.B. bei Laserscannern die Leistung der eingesetzten Laser sich dramatisch ändern kann. Ein Vergleich von Fluoreszenzintensitätssignalen, die zwar bei der Durchführung von gleichartigen Sonden-Array-basierten Experimenten, aber

zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurden, ist mit erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards problemlos möglich („time to time"-Vergleich), da über das Bleichverhalten des Standards die altersbedingten Geräteschwankungen normiert werden können. Damit können mit Hilfe von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards Detektionssysteme auch hinsichtlich ihrer Alterungseigenschaften, wie z.B. der Änderung der Lampenleistungen kalibriert werden.

Sollen die Fluoreszenzsignale, die bei der Durchführung von verschiedenen Sonden-Array basierten Experimenten gemessen wurden, miteinander verglichen werden, stellen für die Bewertung der Ergebnisse insbesondere die Inhomogenität der biochemischen und fluidischen Prozesse in der Probe sowie die Schwierigkeiten bei der Spoterkennung während der Auswertung ein erhebliches Problem dar. Diese Probleme erschweren den qualitativen Vergleich verschiedener Sonden-Arrays. Erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards erlauben eine erhebliche Einschränkung der Fehler und qualitative Vergleiche von Ergebnissen, die bei der Durchführung von Experimenten mit verschiedenen Sonden-Arrays an demselben Gerät, durchgeführt wurden, werden möglich („test to test"-Vergleich).

Da mit dem dargestellten Fluoreszenzeichstandard auch unterschiedliche Detektionssysteme kalibriert werden können, können die Ergebnisse von Sonden-Array basierten Experimenten geräte- und system- und damit auch laborübergreifend analysiert werden.

Vorrichtungen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger in einem oder mehreren definierten Bereichen Polymerschichten, die hinsichtlich ihrer Schichtdicke und Zusammensetzung einheitlich sind, aufgebracht sind, können ebenfalls zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen verwendet werden. Solche Vorrichtungen eignen sich insbesondere, wenn sie über mehrere definierte Bereiche verfügen, zur geräte- und

systemübergreifenden Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens.

Die Polymerschichten solcher Vorrichtungen können erfindungsgemäß die gleiche Zusammensetzung wie oben ausgeführt aufweisen, d. h. sie können fluoreszierende Polymere, Polymergemische mit mindestens einem fluoreszierenden Polymer und/oder zusätzliche fluoreszierende Stoffe enthalten.

Bei diesen Vorrichtungen sind die Intensität und der Wellenlängenbereich der in den Bereichen nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz gleichermaßen durch die Wahl der Zusammensetzung der Polymerschichten, der Schichtdicke und durch Veränderungen des Quervernetzungsgrads vorbestimmbar und reproduzierbar einstellbar. Auch alle anderen Eigenschaften wie Bleichverhalten, Größe und Form der definierten Bereiche sind auf die oben beschriebene Art und Weise einstellbar. Ebenso können solche Vorrichtungen durch alle oben dargestellten Verfahren hergestellt werden.

Solche Vorrichtungen können generell zur qualitativen und quantitativen Referenzierung von Fluoreszenzsignalen, besonders bevorzugt zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen aus Sonden-Array basierten Tests und/oder zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen verwendet werden.

Besonders bevorzugt können sie zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren räumlichen Auflösungsvermögens verwendet werden. Da die in einem oder mehreren definierten Bereichen aufgebrachten Polymerschichten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Schichtdicke einheitlich sind, eignen sie sich nicht zur Kalibrierung der dynamischen Eigenschaften von Fluoreszenzdetektionssystemen. Auch eine Kalibrierung von Detektionssystemen über den Vergleich der Verhältnisse von unterschiedlichen

Intensitäten, die nach Bestrahlung von unterschiedlichen Bereichen auftreten, ist mit diesen Vorrichtungen nicht möglich.

Solche Vorrichtungen können aber z.B. zum Abgleich von experimentell ermittelten Fluoreszenzsignaldaten auf Normwerte verwendet werden und erlauben so, den geräte- und systemübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen. Diese Vorrichtungen erlauben auch die Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich deren Sensitivität und deren gerätespezifischen Bleichverhaltens bei denen durch die Zusammensetzung und Dicke der Polymerschichten festgelegten Intensitäten und Wellenlängenbereichen.

Im Folgenden sind Beispiele dargestellt, die besonders bevorzugte Ausführungsformen bzw. Verwendungen von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards darstellen. Die Beispiele sind in keiner Weise einschränkend zu deuten.

Beispiel 1

Photolithographische Herstellung eines erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards im Wafermaßstab (Abbildung 1):

Im Beispiel wird gezeigt, wie ein erfindungsgemäßer universeller Fluoreszenzeichstandard auf polymerer Basis durch negative Photolithographie hergestellt wird. Dabei wird ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzeichstandard hergestellt, der in unterschiedlichen Bereichen gleicher Form und Größe Polymerschichten unterschiedlicher Dicke, aber im Wesentlichen gleicher Zusammensetzung trägt. Damit sind die Intensitäten der in den Bereichen nach entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz proportional zur Schichtdicke.

Als Träger werden Materialien, die im gewünschten Fluoreszenzspektrum eine hohe Transparenz und geringe Eigenfluoreszenz zeigen, benutzt. Im vorliegenden Fall wurde Borofloatglas40 der Firma Schott (BF 40, Durchmesser:100 mm, Dicke: 0,7 mm) als Trägermaterial gewählt. Das eigentliche Funktionsmaterial (dies sind die Polymerschichten) sollte dagegen eine starke Eigenfluoreszenz aufweisen. Im gewählten Ausführungsbeispiel wurde als Polymer SU8-10, gelöst in PGMEA (organisches Lösungsmittel der Firma Sigma), gewählt, das die genannten Eigenschaften erfüllt. SU8-10 ist ein negatives, epoxy-basiertes Photopolymer, das bei UV-Bestrahlung unter 365nm polymerisiert (US 4,882,245). Die Eigenfluoreszenz und die Photostrukturierbarkeit haben den großen Vorteil, dass das gewählte Polymer durch photolithographische Verfahren strukturiert werden kann.

Zu Beginn des Herstellungsprozesses wurde das Trägermaterial getempert (180°C, 20 min). Dadurch wurden etwaige Adsorbate (oft H_2O) entfernt, die eine gute Haftung der SU8 Polymerschicht auf dem Substrat behindern. Um dies zu verstärken, wurde die Oberfläche des Substrats mit 3-Glycydoxypropyltrimethoxysilan modifiziert.

Auf das Substrat wurde dann eine erste Schicht mit einer Dicke entsprechend der gewünschten Fluoreszenz bzw. der gesuchten Sensitivität aufgebracht (siehe Abbildung 1). Dafür wurde das Spin-On-Verfahren verwendet, wobei durch Wahl der Parameter (Dauer: 30s, Umdrehungsgeschwindigkeit: 5000 rpm, Beschleunigung: 100 rpm/s für 10 s und 1000 rpm/s für 20 s, Grad der Verdünnung mit PGMEA) die gewünschte Dicke bzw. die Fluoreszenz eingestellt wurde. Dadurch wurde das Polymer homogen auf dem Substrat verteilt und das Lösungsmittel ausgetrieben. Die nachfolgende Temperung oberhalb des Glaspunktes (95°C, 15 min, so genanntes Pre-Bake) formiert und homogenisiert die Schicht.

Die Polymerschichten wurden danach mittels üblicher Mikrophotolithographie strukturiert. Dazu wurde durch Bestrahlung des Photopolymers mit UV-Licht (15 min bei ca. 300-450 nm mit 15 mW/cm^2, so genanntes Exposure) seine Löslichkeit im Entwickler (in diesem Fall PGMEA) verändert. SU8-10 zeigt ein Tonwert-negatives Verhalten, d. h. die UV-belichteten Bereiche polymerisieren und unbelichtete Bereiche bleiben im Entwickler lösbar. Die Bestrahlung erfolgte durch Maskenprojektion mittels Lithographiemasken, die entsprechende dünne Chrom-Strukturen auf Quarz aufwiesen. Diese Quarz-Maske besaß die gewünschte laterale Geometrie des Standards, die im Maßstab 1:1 in das Polymer abgebildet wurde. Die kleinsten Strukturen in der Maske bestimmten daher auch die kleinsten Strukturen des Standards bzw. des zu detektierenden kleinsten Auflösungstests auf dem Standard.

Nachfolgend wurde durch einen Temperschritt die Vernetzung der belichteten Bereiche vervollständigt (95° C, 15 min, so genanntes Post-Exposure-Bake). Die unbelichteten Bereiche blieben vom Entwickler noch unberührt. Diese o.g. Prozedur (Spin-On, Pre-Bake, Exposure, so genanntes Post-Exposure-Bake) wurde nun mehrfach wiederholt, wobei die zuvor belichteten (und somit vernetzten) Bereiche in nachfolgenden Belichtungsschritten durch entsprechenden Masken unbelichtet blieben. Im Beispiel wurden aufeinander folgend die Belackung, Belichtung und Temperung drei Mal durchgeführt (Abbildung 1). Die drei Schichten hatten dabei bezüglich des Polymers die folgende Zusammensetzung:

1. Schicht: SU8-10 (Fa. MicroChem Inc.) gelöst in PGMEA (Fa. Sigma) 50% w/w
2. Schicht: SU8-10 (Fa. MicroChem Inc.) gelöst in PGMEA (Fa. Sigma) 33% w/w
3. Schicht: SU8-10 (Fa. MicroChem Inc.) gelöst in PGMEA (Fa. Sigma) 20% w/w

Das Photopolymer SU8-10 wurde in unterschiedlichen Gewichtsverhältnissen in PGMEA gelöst. Dadurch haben die Lösungen unterschiedliche Viskositäten, wodurch Polymerschichten mit unterschiedlicher Dicke herstellbar sind. Das

Lösungsmittel wird später weitestgehend ausgetrieben (zu mehr als 95%), so dass die Polymerschichten eine im Wesentlichen gleiche Zusammensetzung aufweisen.

Danach wurde die Polymerstruktur durch Eintauchen in PGMEA (Fa. Sigma) entwickelt und nochmals getempert (120° C, 30 min, so genannter Hard-Bake). Infolgedessen entstanden stufenförmige geometrische Strukturen (Abbildung 1). Die Stufenhöhen korrespondieren dann mit einer entsprechenden Fluoreszenz-Intensität, die lateralen Geometrien mit dem Auflösungsvermögen.

Beispiel 2:

Beispiele für erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards

In Abbildung 2A ist ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzeichstandard in Array-Form gezeigt, der auf Borofloatglas (Firma Schott) mikrolithographisch gemäß des Verfahrens aus Beispiel 1 hergestellt wurde. Der Standard besteht aus 9 Array-Elementen, die alle fluoreszierende Polymerschichten in quadratischer Form enthalten. Die Quadrate der 9 Array-Elemente verfügen über 3 Intensitätsstufen, welche aus 3 verschiedenen Dicken resultieren. Durch verschiedene Strukturgrößen und Abstände werden verschiedene Integrationsdichten von molekularen Arrays simuliert. Die Standards wurden im Wafermaßstab erzeugt und in Chips vereinzelt.

Der Standard eignet sich, um eine Bestimmung des räumlichen Auflösungsvermögens, der geometrischen Fehler, der abbildenden optischen sowie elektromechanischen und informationstechnischen Systeme als auch der Sensitivität des jeweiligen Geräts zum Zeitpunkt der Messung vorzunehmen. Zusätzlich kann der Standard zur geräteübergreifenden Bewertung der Fluoreszenzsignale von Sonden-Array basierten Experimenten verwendet werden. Dazu wurde der beschriebene Fluoreszenzstandard in verschiedenen Readersystemen ausgelesen, als 16bit-*.tif

Bilder exportiert und mittels einer speziellen Software (IconoClust der Firma Clondiag) analysiert. Die unterschiedlich großen fluoreszierenden Strukturen auf dem Fluoreszenzeichstandard können verwendet werden, um geometrische Abweichungen der verschiedenen Detektionssysteme zu korrigieren. So lässt sich beispielsweise die Bildfeldwölbung eines optischen Systems zur Fluoreszenzdetektion anhand des dargestellten Fluoreszenzeichstandards durch geeignete Bildverarbeitungsprozesse analysieren und durch entsprechende Einstellung der optischen oder informationstechnischen Elemente beheben.

Es ist fernerhin möglich, die Einstellungen der Detektionssysteme z.B. hinsichtlich der Laser- oder Lampenleistung, der Integrationszeit pro Spot/Subarray oder der Signalverstärkung/Einstellung des Detektors auf einen bestimmten Wert der resultierenden Fluoreszenz des Standards abzustimmen. Damit kann z.B. der Langzeitdrift eines Detektionsapparats, welcher durch Alterungsprozesse der verwendeten Laser, Lampen oder Detektoren hervorgerufen werden kann, bestimmt werden.

Unterschiedliche Fluoreszenzsysteme können also mittels des Fluoreszenzeichstandards hinsichtlich ihrer leistungsbestimmenden Parameter kalibriert werden. Entsprechend können die Fluoreszenzsignale, die bei der Auswertung eines Sonden-Array basierten Experiments mit verschiedenen Detektionssystemen gemessen werden, direkt miteinander verglichen werden.

In Abbildung 2B ist ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzeichstandard in Array-Form gezeigt, der auf Borofloatglas (Firma Schott) durch Spotten hergestellt wurde. Zunächst wurden fluoreszierende Standards auf verschiedenen Trägern erzeugt, indem Polymergemische SU8 (MCC Inc.) und Novolack (AZ 1514 Clariant) im Massenverhältnis 1:2, 1:3, 1:5 hergestellt und auf die Glassubstrate aufgebracht wurden. Dazu wurden Objektträger gereinigt und mittels eines Nadelspotters (Microgrid 2 /Biorobotics) mit den Polymergemischen unter Benutzung einer

ungeschlitzten Spotternadel (Solidpins/Biorobotics) bespottet. Alternativ wurden die Polymergemische mit einem piezogetriebenen Dispenserkopf (Durchmesser 100 µm, beheizte Düse der Firma microdrop) aufgebracht. Dabei wurde die Dispenserdüse geheizt (55°C).

Anschließend wurde folgende Behandlung der Proben vorgenommen.

Pre-Bake: 95°C, 15min
Exposure: 1min, 15mW/cm^2, Flutbelichtung
Post-Bake: 95°C, 15min
Hard-Bake: 120°C, 60min

Der so hergestellte Standard besteht aus kreisförmigen Bereichen (Spots) einheitlicher Dimensionen, deren Polymerschichten sich sowohl hinsichtlich der Dicke als auch der Zusammensetzung unterscheiden. Daher verfügt der Standard über ein breites Spektrum an Intensitäten und Wellenlängenbereichen der in den Spots hervorrufbaren Fluoreszenz. Der Standard kann in gleicher Weise wie der in Abbildung 4A eingesetzt werden.

Beispiel 3:

Integration von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards in Trägersysteme.

In Abbildung 3 ist gezeigt, wie ein erfindungsgemäßer Fluoreszenzeichstandard auf einem Objektträger durch Kleben aufgebracht ist. Als Kleber wurde Polydimethylsiloxan (Sylgard® der Firma Dow) verwendet. Solche Standards können als externes Werkzeug zur Kalibrierung von unterschiedlichen Detektionssystemen verwendet werden.

Beispiel 4:

Einstellung der Intensität und des Bleichverhaltens bei erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards - Verwendung von erfindungsgemäßen Fluoreszenzeichstandards über mehrere Messungen hinweg.

Im Beispiel ist gezeigt, dass bei der mikrolithographischen Herstellung von Fluoreszenzeichstandards mit Polymerschichten in drei unterschiedlichen Dicken (d1, d2, d3) ein Temperprotokoll so gewählt werden kann, dass die Intensität der in den definierten Bereichen nach mehrfacher Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz linear abklingt.

Abbildung 4A zeigt das Bleichverhalten der drei Schichten ohne thermische Behandlung. Es handelt sich um ein nicht-lineares Bleichverhalten. Abbildung 4B zeigt das Bleichverhalten der drei Schichten nach thermischer Behandlung. Es handelt sich um ein lineares Bleichverhalten. Zur Linearisierung des zeitlichen Verlaufs der Änderung der resultierenden Fluoreszenzintensitäten wurden die Proben während des Herstellungsprozesses einer thermischen Behandlung von zwei Stunden bei 180°C im Ofen unterzogen und anschließend für ca. 40 Minuten bei einer Wellenlänge zwischen 520 und 600 nm mit 40 mW/cm^2 bestrahlt. Dabei ändert sich das Intensitätsverhalten dergestalt, dass sich das Dickenverhältnis nicht mehr direkt proportional zu dem resultierenden Intensitätsverhältnis verhält, allerdings sind die Intensitätsverhältnisse der verschieden dicken Strukturen nun bei Bestrahlung konstant (siehe Abbildung 4C).

Man erkennt, dass durch Ändern des Temperprotokolls Fluoreszenzeichstandards herstellbar sind, die über ein wesentlich weniger ausgeprägtes und wesentlich konstanteres Bleichverhalten verfügen. Die Messungen erfolgten mit einem konfokalen Biochip-Sanner Scanarray 4000 (Packard) bei 100% Laserleistung und 85% PMT-gain.

Solche langzeitstabilen Fluoreszenzeichstandards können hervorragend zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich ihrer alterungsbedingten Eigenschaften verwendet werden, da die Intensitäten der drei Schichtdicken sich gleichermaßen verändern und damit das Verhältnis der Intensitäten der verschieden dicken Schichten konstant bleibt (siehe Abbildung 4C).

Beispiel 5:

Referenzierung von Fluoreszenzsignalen

Es wurden Fluoreszenzeichstandards wie in Beispiel 1 hergestellt, bei denen in den definierten Bereichen Polymerschichten mit unterschiedlicher Dicke aufgebracht sind.

Aus Abbildung 5 wird deutlich, dass mit diesen Standards die Referenzierung von Messungen in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen möglich sind (Cy3 und Cy5 absorbieren bei unterschiedlichen Wellenlängen) und die gemessenen Intensitäten sich proportional zur Schichtdicke (d1, d2, d3) verhalten. Dieser Fluoreszenzstandard kann daher wegen seines breitbandigen Fluoreszenzverhaltens in verschiedenen Wellenlängenbereichen zur Kalibrierung von Readersystemen verwendet werden. Mit solchen Fluoreszenzeichstandards, die über eine breitbandige Eigenfluoreszenz verfügen, ist zudem eine Referenzierung von Fluoreszenzsignalen in verschiedenen Wellenlängenbereichen möglich. Darüber hinaus können mit solchen Standards Laserscanner hinsichtlich ihrer Sensitivität kalibriert werden. Die Messungen erfolgten mit einem konfokalen Biochip-Sanner Scanarray 4000 (Packard) bei 100% Laserleistung und 85% PMT-gain.

Beispiel 6:

Standardisierung von Sonden-Array basierten Experimenten.

Zur Standardisierung von Sonden-Array basierten Experimenten wurden erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards verwendet, die ebenfalls ein Sonden-Array aufwiesen. Der Fluoreszenzeichstandard kann dann beim Auslesevorgang vor oder nach der Durchführung der biochemischen Wechselwirkungsreaktion jeweils mitberücksichtigt werden (siehe Abbildung 6A)

Es wurden erfindungsgemäße Fluoreszenzeichstandards auf epoxidierten Objektträgern (Firma QMT) durch Ultraschallbohrung und Einkleben aufgebracht, die in den definierten Bereichen Polymerschichten mit gleicher Polymerdicke aber unterschiedlichem Gehalt bezüglich der Polymerkomponenten aufwiesen. Damit zeigen diese Bereiche nach entsprechender Bestrahlung unterschiedliche Intensitäten. Auf den Träger wurde dann eine Reihe von PCR-Produkten (aceA, acs, amiB, ampG, argC, atpA, creB, icdA, napH, rpoA, rpoH, rpoS) durch Spotting (Firma BioRobotics Microgrid II) aufgebracht. Speziell aufgereinigte und mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 oder Cy5 der Firma Amersham) markierte spezifische cDNA wurde durch Hybridisierung an den PCR-Spots immobilisiert. Anschließend wurden die Proben mittels eines konfokalen Laserscanners (Affymetrix, Packard) ausgelesen und die Ergebnisse mittels einer speziellen Software (IconoClust der Firma Clondiag) analysiert. Dabei erfolgte die Bewertung der Ergebnisse unter Referenzierung auf die verschiedenen Intensitäten der unterschiedlichen Bereiche des Fluoreszenzeichstandards.

Die drei Balken einer cDNA stehen für die Referenzierung der Signaldaten der Hybridisierung auf drei verschiedene Bereiche des Standards, die unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Dazu wurden die Ergebnisse auf die verschiedenen Intensitätsstufen normiert und unter Berücksichtigung des Gehalts der

Polymerschichten auf eine Stufe gerechnet. Die Graphik (Abbildung 6B) zeigt, dass eine solche Rückrechnung zulässig ist, da für jede cDNA gleiche Ergebnisse erhalten werden, unabhängig davon, auf welchen Bereich die Messung der cDNA bezogen wird. Somit ist es bei bekanntem Gehalt der Polymerschichten zulässig, jeden Bereich zur Referenzierung zu verwenden, was die Universalität des Standards erhört. Die Messungen erfolgten mit einem konfokalen Biochip-Sanner Scanarray 4000 (Packard) bei 100% Laserleistung und 85% PMT-gain.

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1
Herstellung eines erfindungsgemäßen Fluoreszenzstandards durch mehrstufige Photolithographie (Negativprozess).

Abb. 2A
Erfindungsgemäßer Fluoreszenzstandard in Array-Form, mikrolithographisch hergestellt auf Borofloatglas.

Abb. 2B
Erfindungsgemäßer Fluoreszenzstandard in Array-Form, hergestellt durch Spotten auf Borofloatglas.

Abb. 3
Fluoreszenzeichstandard auf Objektträger.

Abb. 4A
Veränderungen der resultierenden Luminiszenzintensitäten durch Einwirkung von Strahlung im sichtbaren Bereich (Bleichen oder Bleaching). Die Intensität ist als Grauwert angegeben.

Abb. 4B

Änderung der Fluoreszenzintensität über die Anzahl der Messungen in einem Weißlicht/CCD System nach Durchführung eines angepassten Temperprotokolls. Die Intensität ist als Grauwert angegeben.

Abb. 4C

Durch angepasste Temperprotokolle ist es möglich, das Bleichverhalten der polymeren Schichten so anzugleichen, dass Veränderungen der Fluoreszenzausbeute über die Anzahl durchgeführter Messungen keinen Einfluss auf die resultierenden Intensitätsverhältnisse hat. Die obere Linie gibt das d3/d2-Verhältnis, die untere Linie das d2/d1-Verhältnis aus Abbildung 4A an.

Abb. 5

Messergebnisse eines Scans für verschiedene Farbstoffe. Die Intensität ist als Grauwert angegeben. Diese Standards sind geeignet zur Normierung von Ergebnissen in verschiedenen Wellenlängenbereichen.

Abb. 6A

Inverser Scan eines gespotteten Sonden-Arrays. Im oberen Teil erkennt man den Fluoreszenzeichstandard (1). Darunter befindet sich der Sonden-Array (2). Es handelt sich um gespottete PCR-Produkte nach Hybridisierung mit Cy3/Cy5 markierter cDNA.

Abb. 6B

Es wurden verschiedene PCR-Produkte gespottet und mit cDNA hybridisiert. Die Ergebnisse wurden auf die verschiedenen Intensitätsstufen von verschiedenen Bereichen normiert (jeweils die drei Balken) und unter Berücksichtigung des Gehalts der Stoffe in den Polymerschichten auf eine Stufe gerechnet. Die Grafik zeigt, dass

eine solche Rückrechnung zulässig ist. Es ist also bei bekanntem Gehalt egal, welcher Bereich zur Normierung benutzt wird.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenz-Signalen, **dadurch gekennzeichnet**, dass auf einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger in definierten Bereichen mindestens eine nach entsprechender Bestrahlung fluoreszierende Polymerschicht aufgebracht ist und dass mindestens zwei der Polymerschichten sich hinsichtlich ihrer Dicke und/oder Zusammensetzung unterscheiden.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Polymerschichten ein oder mehrere Polymere enthalten, wobei mindestens eines der Polymere nach entsprechender Bestrahlung fluoresziert.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Polymere Postiv- und/oder Negativ-Photolacke, insbesondere auf Basis von Epoxidharzen wie SU8 und/oder Novolacke und/oder PMMA und/oder photosensitives Polyimid und/oder Benzocyclobuten umfassen.

4. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Polymerschichten neben mindestens einem Polymer zusätzlich fluoreszierende Stoffe enthalten.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die fluoreszierenden Stoffe organische Farbstoffe, insbesondere Azofarbstoffe, Triphenylmethanfarbstoffe, Porphyninenfarbstoffe

und/oder anorganische Farbstoffe, insbesondere metallische Farbstoffe und/oder Lanthanide und/oder Perylen-Derivate umfassen.

6. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Schichtdicke und/oder der Zusammensetzung der Polymerschichten einstellbar ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz proportional zu der Dicke der in den Bereichen aufgebrachten Polymerschichten einstellbar ist.

8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist.

9. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Anregungswellenlängenbereich der Polymerschichten durch die Wahl der Polymere und/oder der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist.

10. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der Polymere und/oder durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist.

11. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist.

12. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die maximale Dicke der Polymerschichten in mindestens einem der Bereiche deutlich kleiner als die minimale Fokustiefe der zur Fluoreszenz-Messung verwendeten Detektionssysteme ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die maximale Dicke der Polymerschichten zwischen wenigen Nanometern und maximal 50 µm liegt, bevorzugt zwischen 100 nm und 10 µm, besonders bevorzugt zwischen 200 nm und 5 µm liegt.

14. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die definierten Bereiche sich in Form und/oder Größe unterscheiden.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die definierten Bereiche die Form von Quadraten und/oder Rechtecken mit Seitenlängen zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen.

16. Vorrichtung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die definierten Bereiche die Form von Kreisen mit Durchmessern zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen.

17. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die definierten Bereiche in Array-Form auf dem Träger aufgebracht sind.

18. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Träger aus im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, metallisiertes Glas, Silizium, Metall und/oder Kunststoffe handelt.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Träger aus optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, besonders bevorzugt um Quarzglas und/oder Borofloat-Glas und/oder Kunsstoffe, besonders bevorzugt um PMMA und/oder um Polycarbonat handelt.

20. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens ein Fluoreszenzeichstandard mit einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, metallisiertem Glas, Silizium, Metall, und/oder Kunststoffen besteht.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens ein Fluoreszenzeichstandard mit einem optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, besonders bevorzugt aus Quarzglas und/oder Borofloat-Glas und/oder aus Kunststoffen, besonders bevorzugt aus PMMA und/oder aus Polycarbonat besteht.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Trägersystem um einen üblichen Objektträger handelt.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Träger oder Trägersystem um einen Sonden-Array handelt, auf dem bevorzugt mindestens eine Substanzbibliothek immobilisiert ist.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Peptiden und/oder Proteinen, bevorzugt in Form von Antikörpern, Rezeptoren, Rezeptor-Ligand-Molekülen, Hormonen oder biologisch aktiven Peptiden immobilisiert sind.

25. Vorrichtung nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Nukleinsäuremolekülen, bevorzugt in Form von DNA-Molekülen und/oder RNA-Molekülen, besonders bevorzugt in Form von genomischer DNA, mRNA, cDNA und/oder rRNA immobilisiert sind.

26. Vorrichtung nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Träger-System oder Objektträger Zellen, Gewebeschnitte, pharmazeutisch wirksame Verbindungen und/oder Plasmide immobilisiert sind.

27. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26,
dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerschichten durch mikrotechnische Verfahren, bevorzugt durch photolitographische Verfahren, durch Trockenätzen

und/oder durch Ionenimplantation, und/oder durch drucktechnische Verfahren, bevorzugt durch Spotten, durch Offsetdruck und/oder durch Walzen, durch Spritzgießen oder durch Oberflächenprägung auf den Träger aufgebracht und/oder strukturiert werden.

28. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Polymerschichten durch positive oder negative photolithographische Verfahren auf den Träger aufgebracht und/oder strukturiert werden.

29. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Polymerschichten als homogene Schichten durch mikrotechnische Verfahren, bevorzugt durch CVD-, PVD- , besonders bevorzugt durch Spin-On-Verfahren auf den Träger aufgebracht werden.

30. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 29,
dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der Polymerschichten in Abhängigkeit von den Verfahrensparametern, besonders bevorzugt in Abhängigkeit von der Viskosität des Polymers, von der Temperatur, von der Luftfeuchtigkeit oder von der Umlaufgeschwindigkeit, bei photolithographischen Verfahren besonders bevorzugt in Abhängigkeit von der Bestrahlungs-Dosis, dem Entwicklungsprozess und dem Temperverfahren eingestellt werden kann.

31. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 30,
dadurch gekennzeichnet, dass die geometrische Form der bei entsprechender Bestrahlung fluoreszierenden Bereiche durch entsprechende Aussparungen in einer Maske, bevorzugt in einer Lochmaske auf Basis von strukturiertem Chrom auf Quarz definiert wird.

32. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 31,
dadurch gekennzeichnet, dass das Vernetzungsverhalten der Polymerschichten durch Temper- und/oder Bestrahlungsprotokolle einstellbar ist.

33. Verfahren zum Herstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 32,
dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung mit einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden, bevorzugt optisch durchlässigen Trägersystem durch Kleben, durch Lagejustage und/oder durch ein Vakuumsystem verbunden wird.

34. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 zur Kalibrierung, bevorzugt zur on-line Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen hinsichtlich ihrer Sensitivität, ihres räumlichen und/oder zeitlichen Auflösungsvermögens und/oder hinsichtlich ihrer geometrischen und/oder dynamischen und/oder alterungsbedingten Eigenschaften.

35. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 34 zur Laserleistungsmessung und/oder –steuerung und/oder zur Lampenleistungsmessung und/oder zum Integrationszeitabgleich und/oder zur Auflösungsanpassung.

36. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 34 zur Flatfieldbestimmung und/oder zur Linearisierung von CCD-Readersystemen.

37. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 zur Referenzierung und/oder zum system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen, wobei es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Sonden-Array basierten Interaktionsstudien handelt.

38. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 37 zum system- und/oder geräteübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten.

39. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 37 zur Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten zur Definition absoluter Ergebnisse oder zur Definition relativer, auf die Fluoreszenz polymerer Schichten bezogener Ergebnisse.

40. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 37 bis 39, wobei es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Protein-Protein-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von Antikörper-Antigen- und/oder Rezeptor-Ligand-Interaktionsstudien, und/oder von Nukleinsäure-Nukleinsäure-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von DNA-RNA- und/oder DNA-DNA- und/oder RNA-RNA- Interaktionsstudien und/oder von Protein-Nukleinsäure-Interaktionsstudien handelt.

41. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 zum system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von zellulären Lokalisationsexperimenten und Gewebeschnitten, die durch Fluoreszenz-Mikroskopie auswertbar sind.

42. Verwendung einer Vorrichtung, umfassend einen im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Träger, auf dem in einem oder mehreren definierten Bereichen eine hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Dicke einheitliche Polymerschicht so aufgebracht ist, dass dieser Bereich oder diese Bereiche nach entsprechender Bestrahlung fluoreszieren, zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen und/oder Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen und/oder zum system- und

geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen.

43. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 42, wobei die Polymerschichten ein oder mehrere Polymere, von denen mindestens ein Polymer nach entsprechender Bestrahlung fluoresziert, bevorzugt Postiv- und/oder Negativ-Photolacke, insbesondere auf Basis von Epoxidharzen wie SU8 und/oder Novolacke und/oder PMMA und/oder photosensitives Polyimid und/oder Benzocyclobuten umfassen.

44. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 oder 43, wobei die Polymerschichten mindestens ein Polymer und zusätzliche fluoreszierende Stoffe, bei denen es sich nicht um Polymere handelt, bevorzugt organische Farbstoffe, insbesondere Azofarbstoffe, Triphenylmethanfarbstoffe, Porphyninenfarbstoffe und/oder anorganische Farbstoffe, insbesondere metallische Farbstoffe und/oder Lanthanide und/oder Perylen-Derivate enthalten.

45. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 44, wobei die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Schichtdicke und/oder der Zusammensetzung der Polymerschichten einstellbar ist.

46. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 45, wobei die Intensität der in den Bereichen bei entsprechender Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist.

47. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 46, wobei der Anregungswellenlängenbereich der Polymerschichten durch die Wahl der Polymere und/oder der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist.

48. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 47, wobei das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der Polymere und/oder durch die Wahl der Art und/oder Menge und/oder Zusammensetzung der zugegebenen fluoreszierenden Stoffe einstellbar ist.

49. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 48, wobei das Bleichverhalten der in den Bereichen nach entsprechender längerer Bestrahlung hervorgerufenen Fluoreszenz durch physikalische Behandlungsmethoden während der Herstellung, bevorzugt durch Bestrahlung und/oder Temperaturbehandlung einstellbar ist.

50. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 49, wobei die maximale Dicke der Polymerschicht deutlich kleiner als die minimale Fokustiefe der zur Fluoreszenz-Messung verwendeten Detektionssysteme ist.

51. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 50, wobei die maximale Dicke der Polymerschicht zwischen wenigen Nanometern und maximal 50 µm liegt, bevorzugt zwischen 100 nm und 10 µm, besonders bevorzugt zwischen 200 nm und 5 µm liegt.

52. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 51, wobei die definierten Bereiche sich in Form und/oder Größe unterscheiden.

53. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 52, wobei die definierten Bereiche die Form von Quadraten und/oder Rechtecken mit Seitenlängen zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen.

54. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 52, wobei die definierten Bereiche die Form von Kreisen mit Durchmessern zwischen einigen Nanometern und 5 mm, besonders bevorzugt zwischen 100 nm und 1 mm aufweisen.

55. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 54, wobei die definierten Bereiche in Array-Form auf den Träger aufgebracht sind.

56. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 55, wobei der Träger aus im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, metallisiertes Glas, Silizium, Metall, und/oder Kunststoffe handelt.

57. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 56, wobei der Träger aus optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Materialien besteht, bei denen es sich bevorzugt um Glas, besonders bevorzugt um Quarzglas und/oder Borofloat-Glas und/oder Kunsstoffe, besonders bevorzugt um PMMA und/oder um Polycarbonat handelt.

58. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 57, wobei der Fluoreszenzeichstandard mit einem im Wesentlichen nicht fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, metallisiertem Glas, Silizium, Metall, und/oder Kunststoffen besteht.

59. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 58, wobei der Fluoreszenzeichstandard mit einem optisch durchlässigen, im Wesentlichen nicht

fluoreszierenden Trägersystem verbunden ist, wobei das Trägersystem bevorzugt aus Glas, besonders bevorzugt aus Quarzglas und/oder Borofloat-Glas und/oder aus Kunststoffen, besonders bevorzugt aus PMMA und/oder aus Polycarbonat besteht.

60. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 59, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem Trägersystem um einen üblichen Objektträger handelt.

61. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 60, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem Träger oder Trägersystem um einen Sonden-Array handelt, auf dem bevorzugt mindestens eine Substanzbibliothek immobilisiert ist.

62. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 61, **dadurch gekennzeichnet**, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Peptiden und/oder Proteinen, bevorzugt in Form von Antikörpern, Rezeptoren, Rezeptor-Ligand-Molekülen, Hormonen oder biologisch aktiven Peptiden immobilisiert sind.

63. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 61, **dadurch gekennzeichnet**, dass auf dem Sonden-Array Substanzbibliotheken in Form von Nukleinsäuremolekülen, bevorzugt in Form von DNA-Molekülen und/oder RNA-Molekülen, besonders bevorzugt in Form von genomischer DNA, mRNA, cDNA und/oder rRNA immobilisiert sind.

64. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 59 oder 60, **dadurch gekennzeichnet**, dass auf dem Träger-System oder Objektträger Zellen, Gewebeschnitte, pharmazeutisch wirksame Verbindungen und/oder Plasmide immobilisiert sind.

65. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64 zur Kalibrierung von Fluoreszenzdetektionssystemen, wobei die Detektionssysteme hinsichtlich ihres räumlichen Auflösungsvermögens, ihrer Sensitivität, ihrer geometrischen und/oder ihrer alterungsbedingten Eigenschaften kalibriert werden.

66. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64, wobei die Detektionssysteme hinsichtlich der Laserleistung und/oder –steuerung und/oder Lampenleistung und/oder Auflösungsanpassung kalibriert werden.

67. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 65 oder 66, wobei die Kalibrierung der Fluoreszenzdetektionssysteme on-line erfolgt.

68. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64, wobei die Referenzierung den system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen, bei denen es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Sonden-Array basierten Interaktionsstudien handelt, umfasst.

69. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 68, wobei der system- und/oder geräteübergreifenden Vergleich von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten erfolgt.

70. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 68, wobei die Referenzierung die Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen durch Normierung der experimentellen Ergebnisse auf resultierende Intensitäten der Polymerschichten zur Definition absoluter Ergebnisse oder zur Definition relativer, auf die Fluoreszenz polymerer Schichten bezogener Ergebnisse umfasst.

71. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 68 bis 70, wobei es sich bevorzugt um Fluoreszenzsignale von Protein-Protein-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von Antikörper-Antigen- und/oder Rezeptor-Ligand-Interaktionsstudien, und/oder von Nukleinsäure-Nukleinsäure-Interaktionsstudien, besonders bevorzugt von DNA-RNA- und/oder DNA-DNA- und/oder RNA-RNA- Interaktionsstudien und/oder von Protein-Nukleinsäure-Interaktionsstudien handelt.

72. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 42 bis 64, wobei es sich um einen system- und geräteübergreifenden und/oder testübergreifenden Vergleich von zellulären Lokalisationsexperimenten und Gewebeschnitten, die durch Fluoreszenz-Mikroskopie auswertbar sind, handelt.

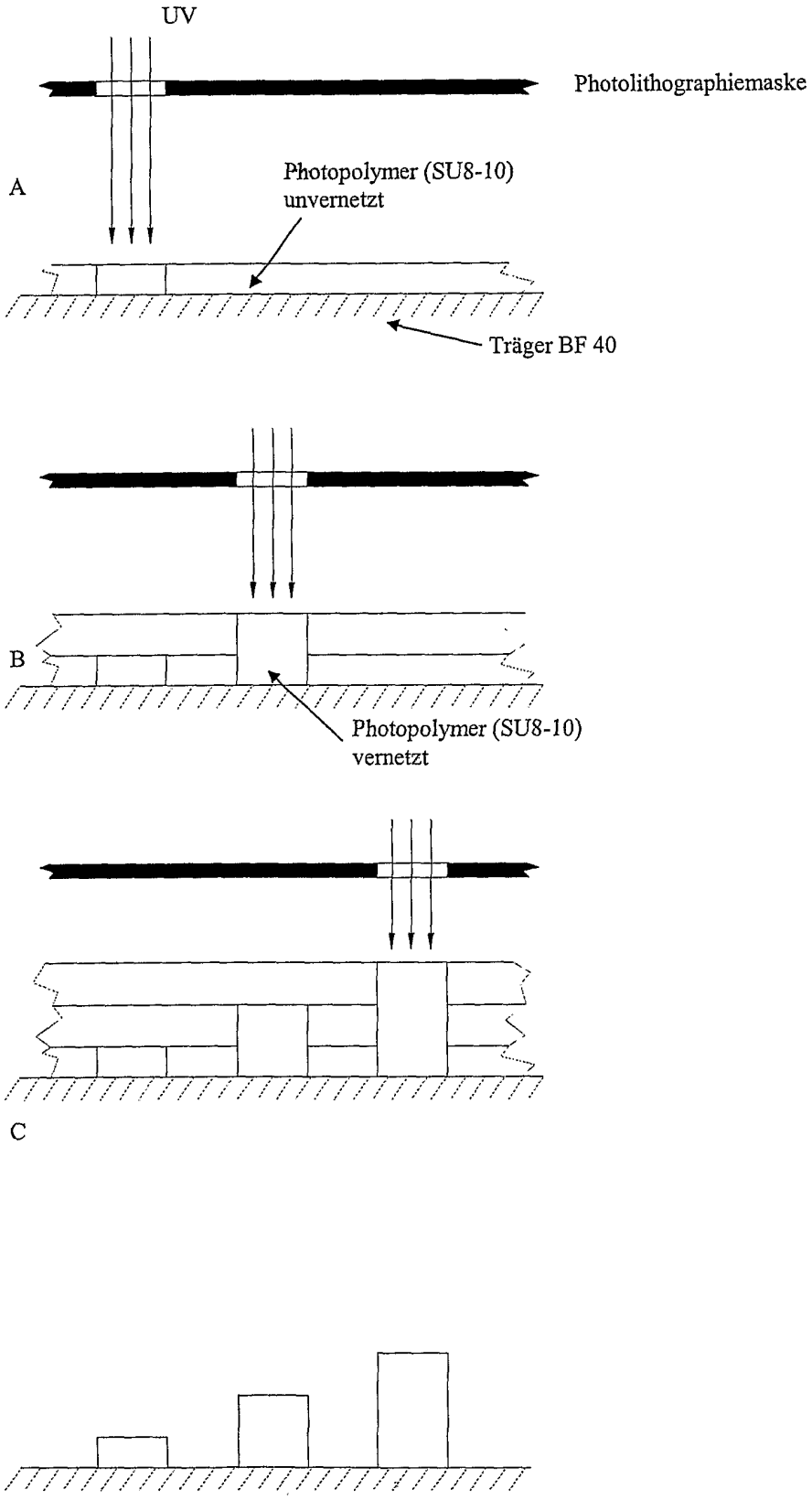

UV
Photolithographiemaske
A
Photopolymer (SU8-10)
unvernetzt
Träger BF 40
B
Photopolymer (SU8-10)
vernetzt
C

Abb. 1

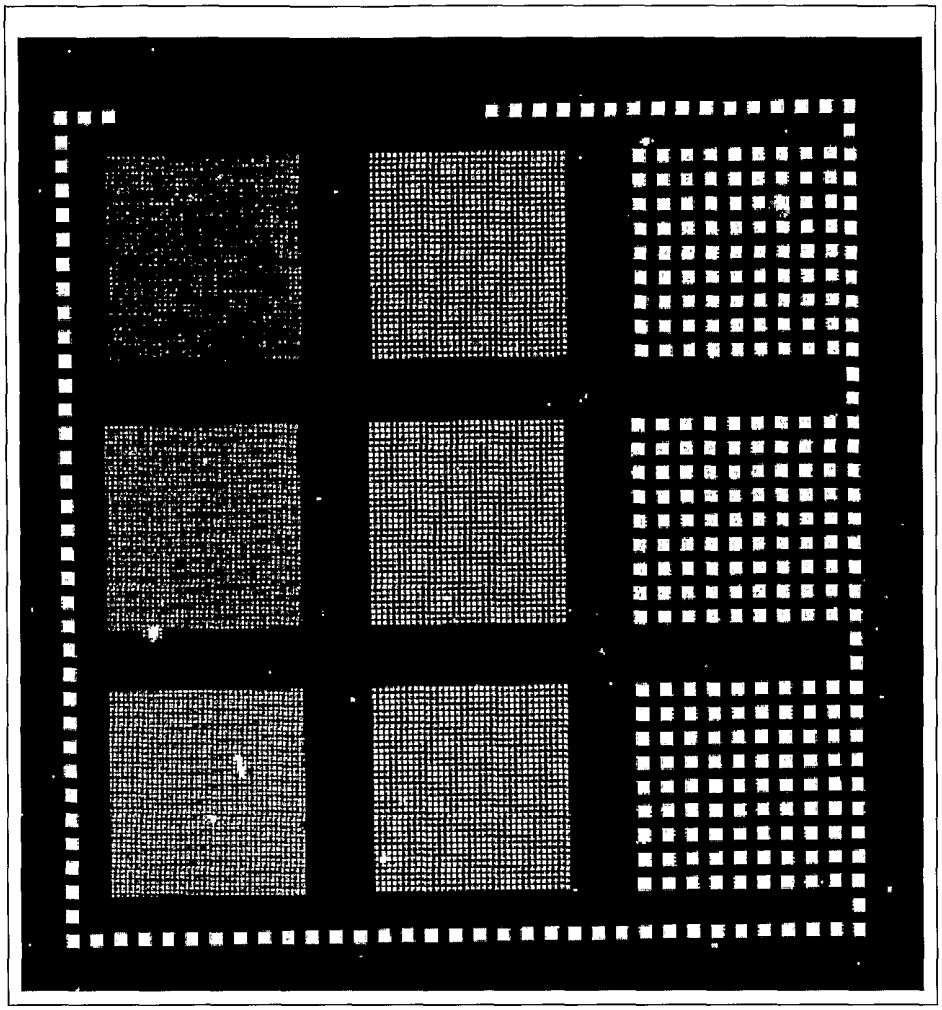


Abb. 2A

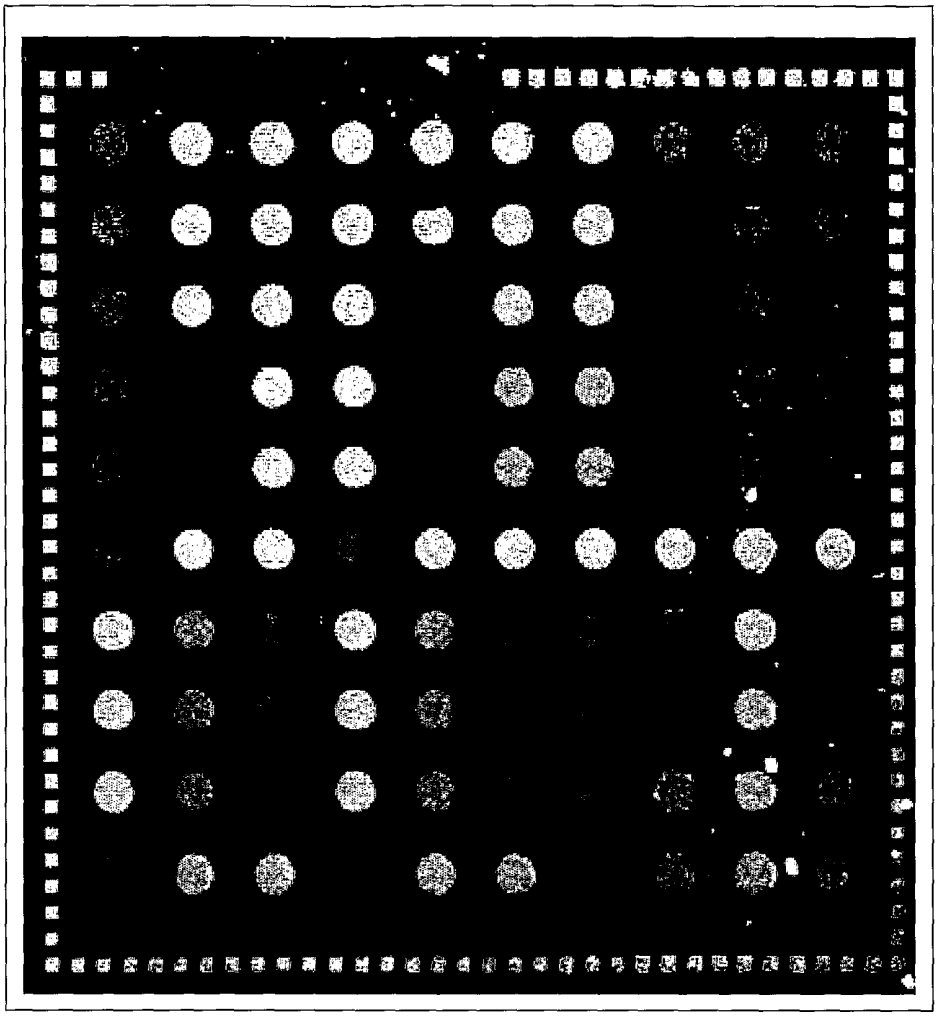


Abb 2B

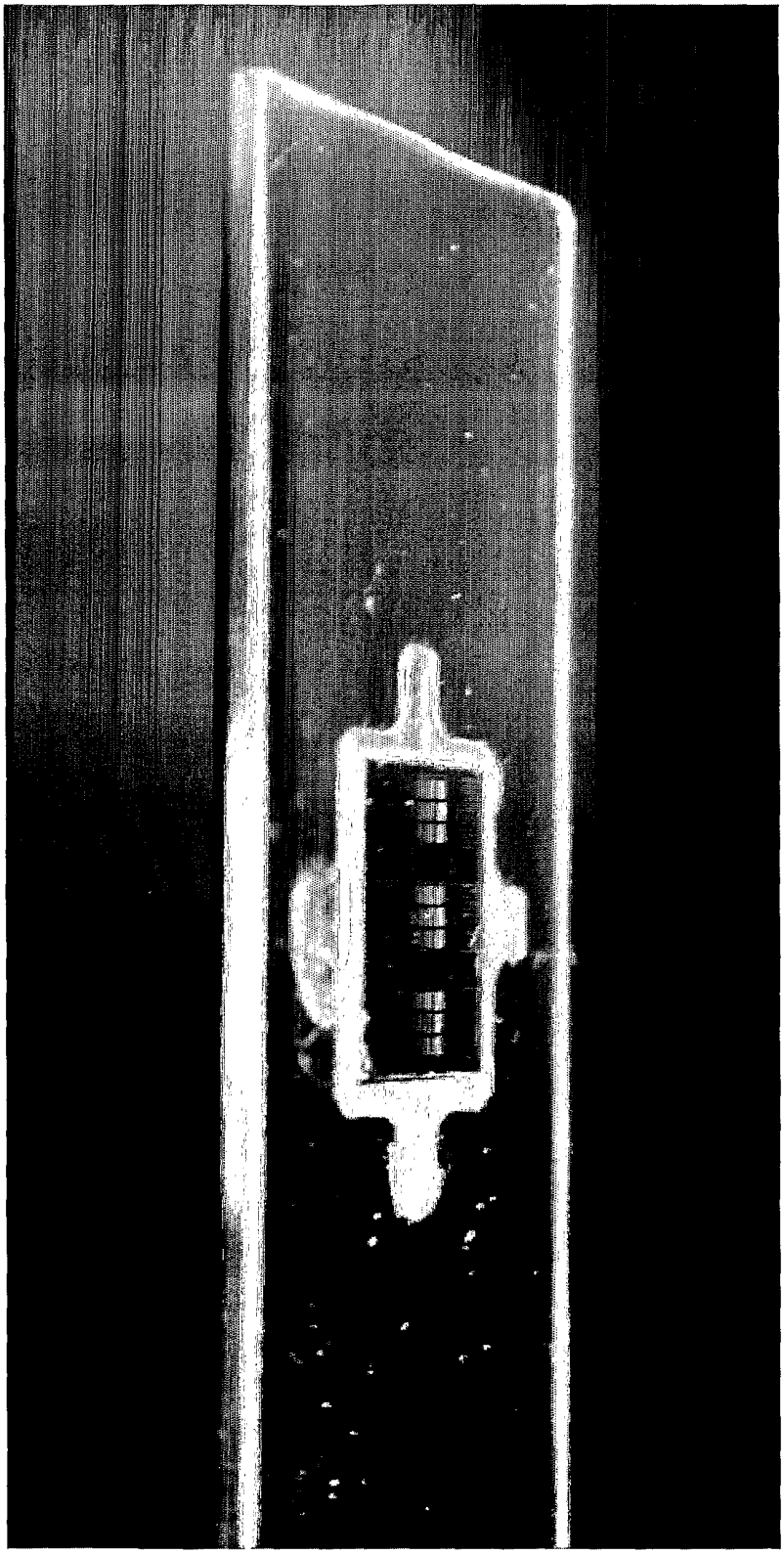


Abb.3

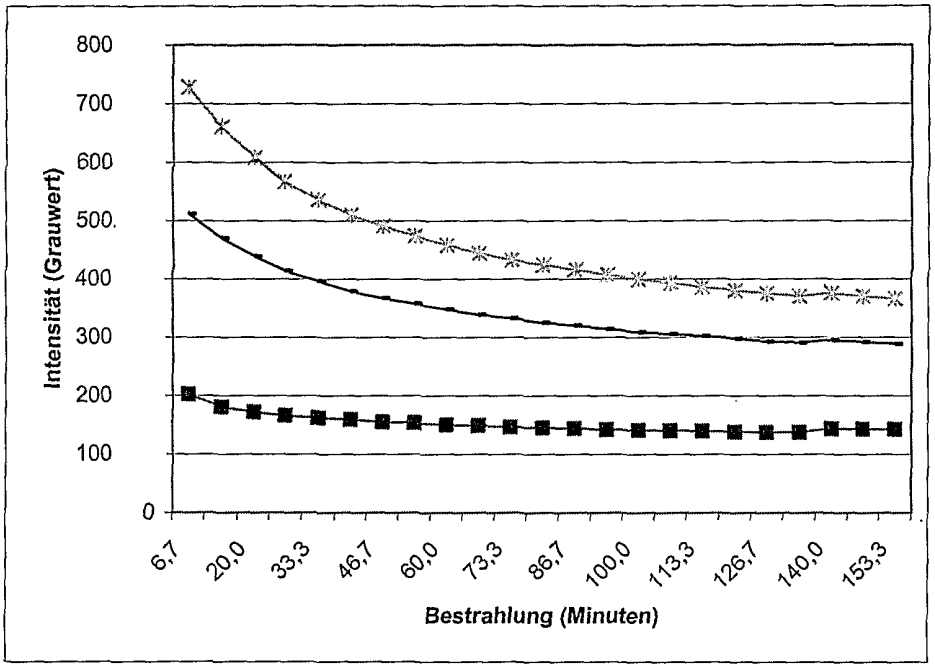

800
700
600
500
400
300
200
100
0
Intensität (Grauwert)
6,7
20,0
33,3
46,7
60,0
73,3
86,7
100,0
113,3
126,7
140,0
153,3
Bestrahlung (Minuten)

Abb. 4A

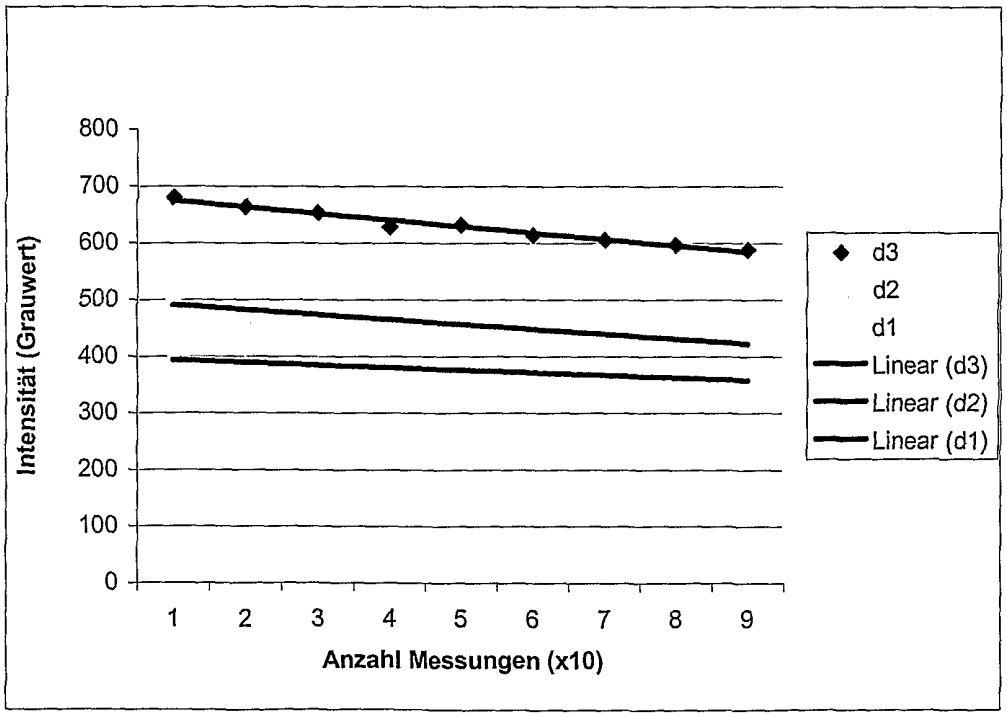

800
700
600
500
400
300
200
100
0
Intensität (Grauwert)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Anzahl Messungen (x10)
d3
d2
d1
Linear (d3)
Linear (d2)
Linear (d1)

Abb. 4B

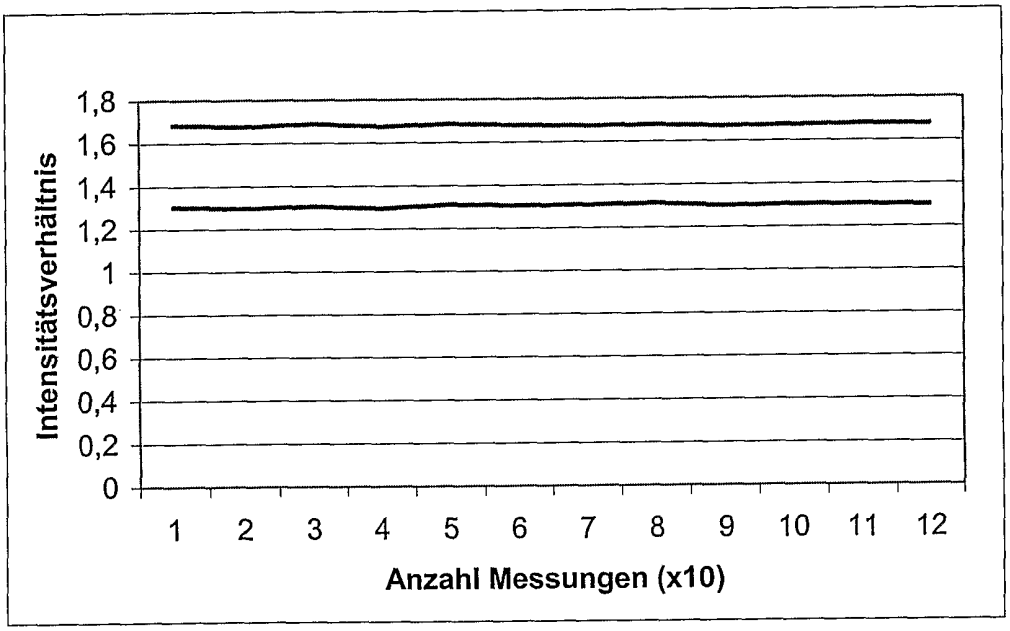

Intensitätsverhältnis
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Anzahl Messungen (x10)

Abb. 4C

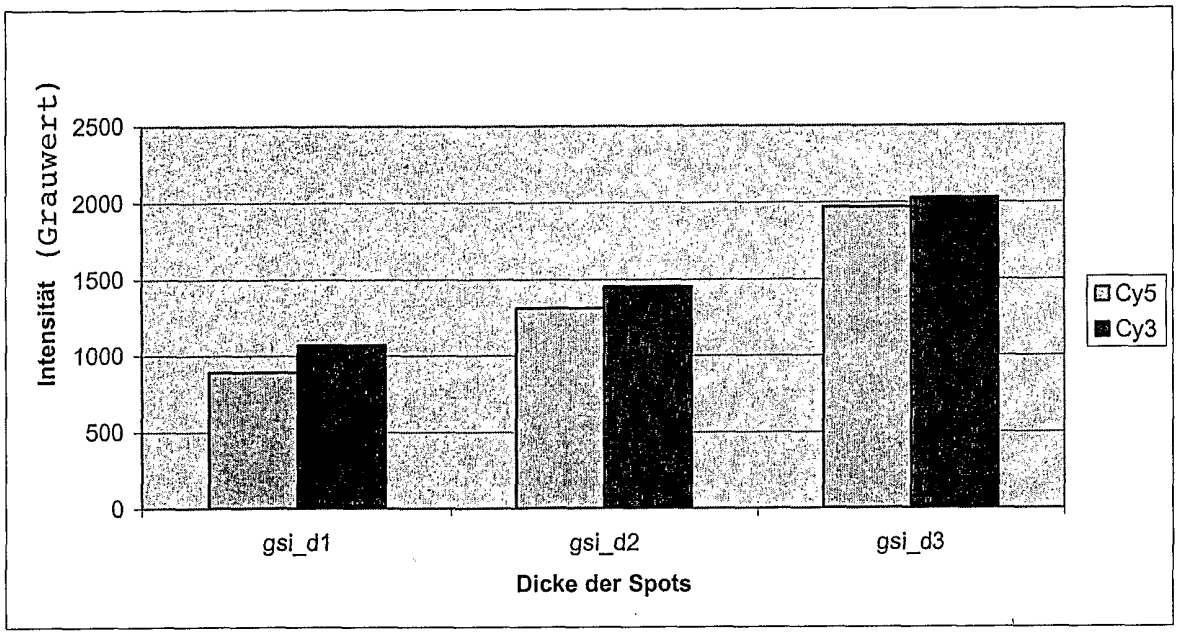

Intensität (Grauwert)
2500
2000
1500
1000
500
0
gsi_d1
gsi_d2
gsi_d3
Dicke der Spots
Cy5
Cy3

Abb. 5

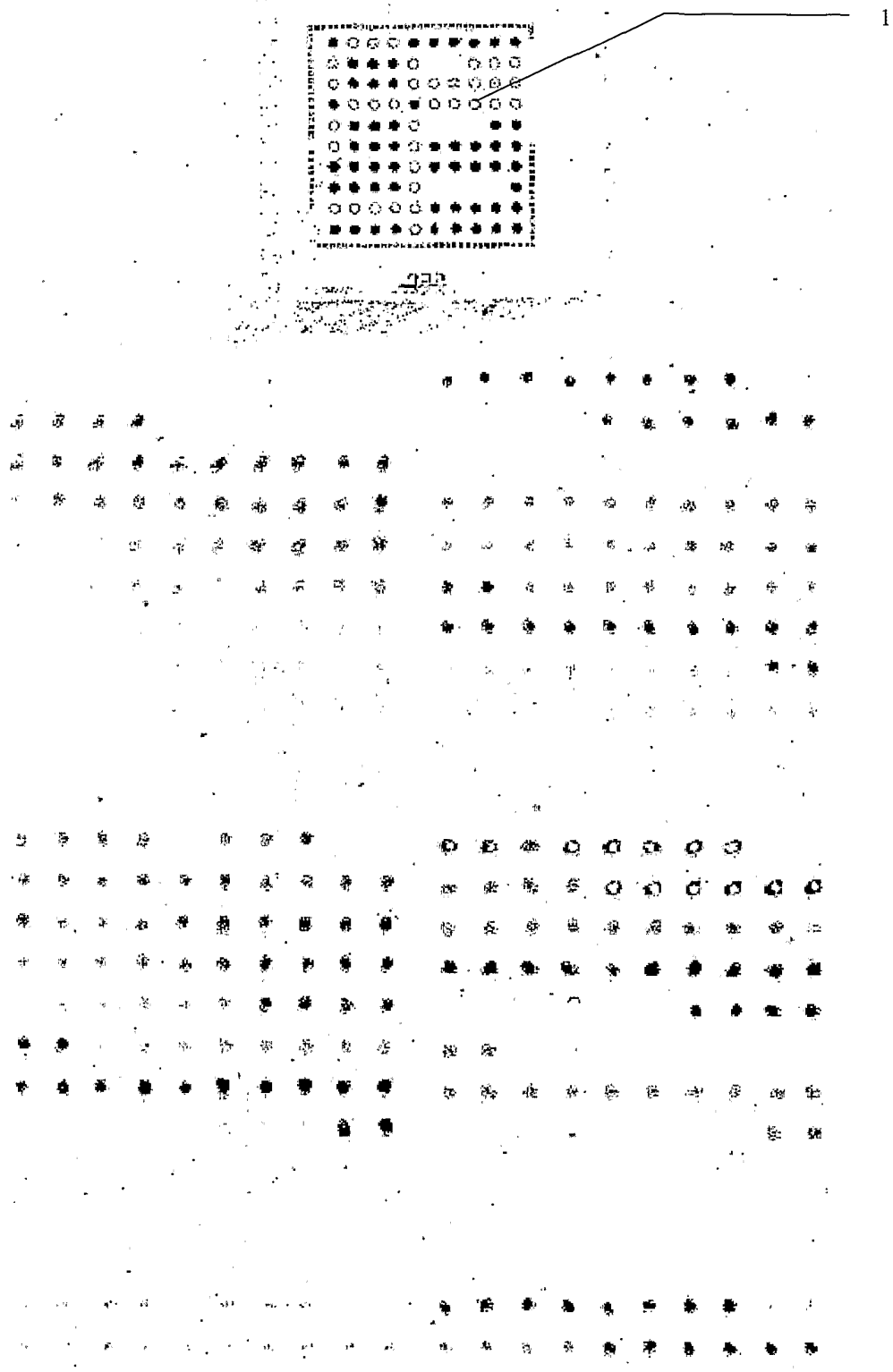


Abb. 6A

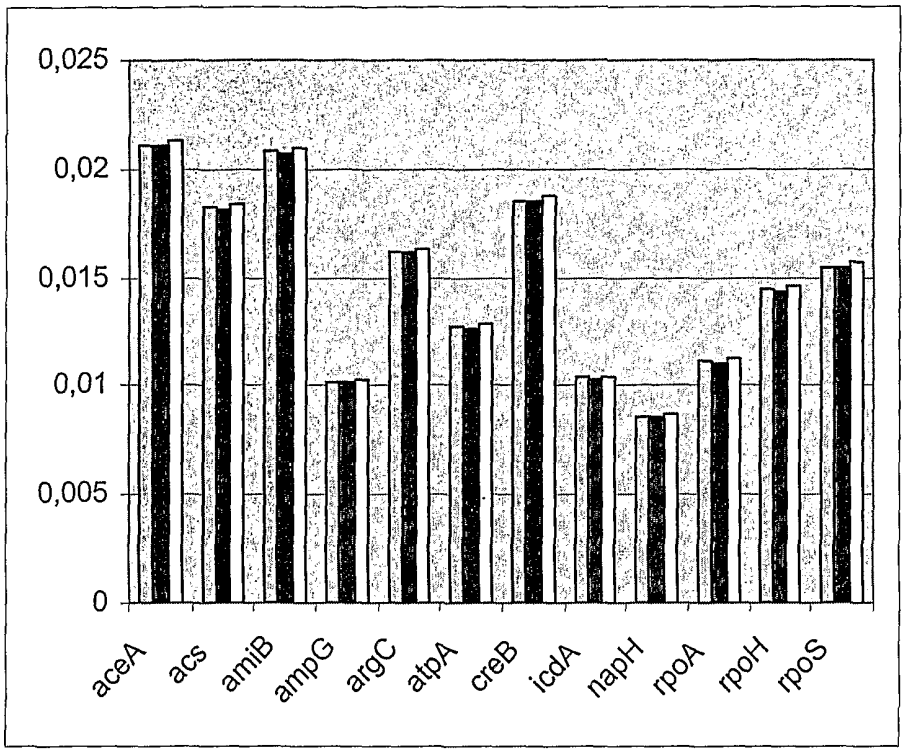

0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
aceA
acs
amiB
ampG
argC
atpA
creB
icdA
napH
rpoA
rpoH
rpoS

Abb. 6B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/03140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N21/64

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 G01N

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)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, INSPEC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 49537 A (GHAUHARALI RICK IFTEKAR ;HOFSTRAAT JOHANNES WILLEM (NL); AKZO NOBE) 5 November 1998 (1998-11-05) page 4, line 10 -page 5, line 7 page 11, line 3 - line 16 ---	1,3,4,6, 10, 18-22, 27,29, 42,45, 48,56-60
A	WO 01 06227 A (PRESENS PREC SENSING GMBH ;KLIMANT INGO (DE)) 25 January 2001 (2001-01-25) cited in the application page 1, line 6 - line 29 page 5, line 18 -page 6, line 5 claims 1,23 --- -/--	1,4,5, 24,42, 44,62

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

[X] 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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 August 2002	12/08/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Krametz, E

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

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 838 435 A (SANDISON DAVID R) 17 November 1998 (1998-11-17) column 2, line 25 - line 44 column 3, line 28 - line 52	1,42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/03140

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9849537	A	05-11-1998	EP	0874231 A1	28-10-1998
			WO	9849537 A1	05-11-1998
			EP	0977981 A1	09-02-2000
			US	6259524 B1	10-07-2001
WO 0106227	A	25-01-2001	DE	19933104 A1	18-01-2001
			AU	6274900 A	05-02-2001
			WO	0106227 A2	25-01-2001
			EP	1196780 A2	17-04-2002
US 5838435	A	17-11-1998	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03140

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N21/64

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

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

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 49537 A (GHAUHARALI RICK IFTEKAR ;HOFSTRAAT JOHANNES WILLEM (NL); AKZO NOBE) 5. November 1998 (1998-11-05) Seite 4, Zeile 10 -Seite 5, Zeile 7 Seite 11, Zeile 3 - Zeile 16 ---	1,3,4,6, 10, 18-22, 27,29, 42,45, 48,56-60
A	WO 01 06227 A (PRESENS PREC SENSING GMBH ;KLIMANT INGO (DE)) 25. Januar 2001 (2001-01-25) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 6 - Zeile 29 Seite 5, Zeile 18 -Seite 6, Zeile 5 Ansprüche 1,23 --- -/--	1,4,5, 24,42, 44,62

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	*Absendedatum des internationalen Recherchenberichts*
2. August 2002	12/08/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Krametz, E

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 838 435 A (SANDISON DAVID R) 17. November 1998 (1998-11-17) Spalte 2, Zeile 25 - Zeile 44 Spalte 3, Zeile 28 - Zeile 52	1,42

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/03140

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9849537	A	05-11-1998	EP	0874231 A1	28-10-1998
			WO	9849537 A1	05-11-1998
			EP	0977981 A1	09-02-2000
			US	6259524 B1	10-07-2001
WO 0106227	A	25-01-2001	DE	19933104 A1	18-01-2001
			AU	6274900 A	05-02-2001
			WO	0106227 A2	25-01-2001
			EP	1196780 A2	17-04-2002
US 5838435	A	17-11-1998	KEINE		