



(19)

österreichisches
patentamt

(10)

AT 503 573 A4 2007-11-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 648/2006**

(22) Anmeldetag: **13.04.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.11.2007**

(51) Int. Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01),
G01N 27/00 (2006.01)

(73) Patentanmelder:

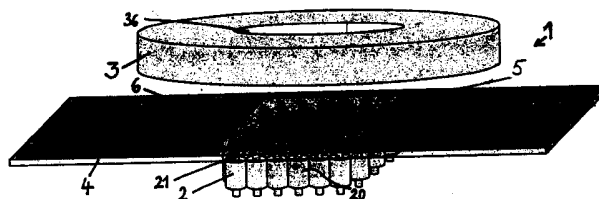
ARC SEIBERSDORF RESEARCH GMBH
A-1010 WIEN (AT)

(54) VORRICHTUNG ZUR STEIGERUNG DER REAKTIONS-, INSBESONDERE DER ANBINDUNGSEFFIZIENZ ZWISCHEN MOLEKÜLEN BZW. MOLEKÜLTEILEN

(57) Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Steigerung der Kontaktfrequenz zwischen zwei miteinander zur Bindung befähigten Reaktionspartnern, vorzugsweise zwischen Analysatormolekül und Analytmolekül, insbesondere zur Steigerung der Bindungseffektivität in Bioanalyse-Arrays mit Hilfe von - mittels beidseitig des Reaktionsfluidfilms angeordneter veränderlich anspeisbarer Elektromagneten (3, 2, 20) -generierten Magnetfelder im fluiden Reaktionsmedium gezielt in Bewegung gesetzten Mikro- oder Nano-Magnetpartikeln (75)

Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass auf einer Seite eines Reaktionsfluidfilms, insbesondere eines Objektträgers (4) mit den Reaktionspartnern (63), der Reaktionsflüssigkeit 70 mit den Reaktionspartnern (73) und vorzugsweise einem, den Mikro-Bioanalysearray (6) abdeckendem, Deckglas (5), in der Nähe eine zweidimensionale Matrix (20) mit einer Mehrzahl von individuell mit Magnetisierstrom zeitabhängig variabler Stärke und/oder Spannung - einem jeweils gewünschten zeitabhängig variablen Magnetisierungsmuster entsprechend - anspeisbaren Miniatur bzw. Milli-Magnetspulen (2) angeordnet ist und

auf der anderen Seite des Reaktionsgefäßes, insbesondere Objektträger (4) mit dem (Mikro-Bioanalysearray (6) in dessen Nähe nur eine, ebenfalls mit variablen Magnetisierstrom anspeisbare Magnetspule (3) positioniert ist, deren Magnetfeld das gesamte Reaktionsgefäß, insbesondere den Mikro-Bioanalysearray (6), durchsetzt



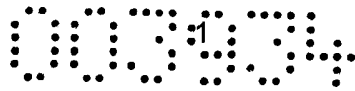
AT 503 573 A4 2007-11-15



Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Steigerung der Kontaktfrequenz zwischen zwei miteinander zur Bindung befähigten Reaktionspartnern, vorzugsweise zwischen Analysatormolekül und Analytmolekül, insbesondere zur Steigerung der Bindungseffektivität in Bioanalyse-Arrays mit Hilfe von - mittels beidseitig des Reaktionsfluidfilms angeordneter veränderlich anspeisbarer Elektromagneten (3, 2, 20) - generierten Magnetfelder im fluiden Reaktionsmedium gezielt in Bewegung gesetzten Mikro- oder Nano-Magnetpartikeln (75)

Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass auf einer Seite eines Reaktionsfluidfilms, insbesondere eines Objektträgers (4) mit den Reaktionspartnern (63), der Reaktionsflüssigkeit 70 mit den Reaktionspartnern (73) und vorzugsweise einem, den Mikro-Bioanalysearray (6) abdeckendem, Deckglas (5), in der Nähe eine zweidimensionale Matrix (20) mit einer Mehrzahl von individuell mit Magnetisierstrom zeitabhängig variabler Stärke und/oder Spannung - einem jeweils gewünschten zeitabhängig variablen Magnetisierungsmuster entsprechend - anspeisbaren Miniatur- bzw. Milli-Magnetspulen (2) angeordnet ist und auf der anderen Seite des Reaktionsgefäßes, insbesondere Objektträger (4) mit dem (Mikro-)Bioanalysearray (6) in dessen Nähe nur eine, ebenfalls mit variablen Magnetisierstrom anspeisbare Magnetspule (3) positioniert ist, deren Magnetfeld das gesamte Reaktionsgefäß, insbesondere den Mikro-Bioanalysearray (6), durchsetzt (Fig. 1)



Die Erfindung befasst sich mit der gezielten Erhöhung der Treffer bzw. Trefferwahrscheinlichkeit zwischen miteinander bindungsfähigen Reaktionspartnern, wodurch einerseits die Menge an Bindungsprodukten erhöht und andererseits die Reaktionszeit wesentlich verkürzt wird.

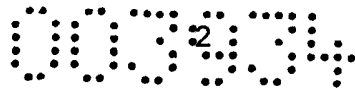
Sie ist insbesondere darauf gerichtet, dass die erforderlichen Hybridisierungszeiten in Bioanalyse-Arrays, wie in z.B. in DNA/RNA-, Protein- oder Immuno-Mikroarrays, bei dadurch gleichzeitig erreichbarer Steigerung der auswertbaren Fluoreszenzsignale verkürzt wird. Dies wird durch Agitation der Hybridisierungs-Lösung mit Hilfe magnetischer Mikro- oder Nanopartikel, welche in kontrollierter Weise durch die Hybridisierungslösung bewegt werden und die Target Moleküle zu den einzelnen Spots, also Bindungsstellen transportieren, erreicht. Der Wirkungsbereich der einzelnen Spots, welcher in herkömmlichen Analyseverfahren diffusions-limitiert ist, wird somit wesentlich vergrößert bzw. erweitert.

Die Erfindung hat den weiteren Vorteil, dass sie in einfacher Weise mit schon vorhandenen Bioanalyse-Array-Systemen kombiniert werden kann, dass sie also ein Nachrüsten schon bestehender Reaktionssysteme, also insbesondere schon vorhandener Bioanalyse-Systeme, ermöglicht.

Als neue Werkzeuge der Molekularbiologie stellen beispielsweise DNA-Microarrays einen echten Technologiesprung beim Nachweis von Genen und Gendefekten, bei der Genexpressions-Analyse und bei der Vertiefung des Verständnisses von Genfunktionen dar.

Ein Mikrobio-Array oder Biochip besteht üblicherweise aus einem, in spezieller Weise chemisch beschichteten, Glas-Objektträger, der bis zu einige Tausend mikroskopisch kleine, unterschiedlich funktionalisierte Punkte, so genannte Spots, enthält. Im Falle der DNA-Microarrays oder DNA-Chips besteht jeder einzelne dieser Spots aus zahlreichen Kopien eines eindeutig bestimmten DNA-Abschnitts bzw. Gens, die als „Fängermoleküle“ oder Sonden für entsprechende, in einer zu analysierenden Probe vorhandene, spezifische DNA oder mRNA-Moleküle, also Targets, fungieren. Die Targetmoleküle werden zuvor mit Fluoreszenzpartikeln markiert, um sie nach erfolgter Bindung an die entsprechenden Chip-Sonden mittels Fluoreszenzscanner detektieren zu können.

Die Faktoren Spezifität und Sensitivität spielen in der Bio- bzw. Mikroarrayanalyse eine große Rolle. Während die Spezifität im Wesentlichen von der Auswahl bzw. Sequenzabfolge der DNA-Sonden am Chip abhängig ist und jenen Bedingungen, unter denen man den Andockprozess bzw. Hybridisierung zwischen Targets und Sonden ablaufen lässt, also z.B. die Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers und die Reaktionstemperatur, hängt die Sensitivität im



Wesentlichen von der vorhandenen Menge des jeweiligen Targets, von der Effizienz der Fluoreszenzmarkierung der Targets, bis zu einem gewissen Grad auch von der Menge der am Chip vorhandenen DNA-Sonde sowie von der Effizienz der Bindung zwischen Target und Sonde ab.

Im klassischen Chip-Experiment ist der Transport der Targets zu den Sonden im wässrigen Milieu allein durch die Diffusion gesteuert. In der Praxis wird eine wässrige Pufferlösung mit den fluoreszenz-markierten Targetmolekülen auf den Chip mit den DNA-Sonden aufgebracht und danach wird ein dünnes Glasplättchen bzw. Deckgläschen darüber gelegt. Dadurch wird ein dünner Flüssigkeitsfilm zwischen Chip und Deckgläschen ausgebildet, innerhalb dessen sich die Targetmoleküle durch freie Diffusion bewegen.

Bisher wurden unterschiedliche Versuche zur Steigerung der auswertbaren Signale in DNA-Microarrays mit unterschiedlichen Misch- oder Pumpvorrichtungen unternommen, welche sich in folgende 3 Gruppen einteilen lassen.

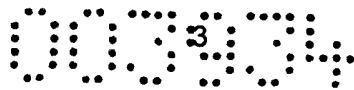
- Mechanische Mischung durch Schütteln und/oder Rotieren des Chips auf einer dafür vorgesehene Einrichtung
- Durchpumpen und Rezirkulieren der Hybridisierungs-Lösung am Chip mittels eines externen Fluidiksystems
- Mischung der Flüssigkeit am Chip selbst

Nachfolgend werden Beispiele zu den genannten, dem Stand der Technik entsprechenden Verfahren beschrieben, um Unterscheidungsmerkmale zur vorliegenden Erfindung herausarbeiten zu können.

Surface Acoustic Waves bzw. akustische Oberflächenwellen werden in einem bereits kommerziell erhältlichen Produkt, mit der Bezeichnung SlideBooster der Firma Advalytix AG, Eugen-Sänger-Straße 53.0, D-85649 Brunnthal, www.advalytix.de, SlideBooster SB400, zur Durchmischung von dünnen Flüssigkeitsfilmen eingesetzt.

Eine aktive Durchmischung von Flüssigkeiten wurde von R. H. Liu R.H. Liu et al. Bubble-induced acoustic micromixing, Lab Chip, 2002, 2, 151-157 vorgestellt. Zur Realisierung der Mischwirkung werden durch Bläschen induzierte, akustische Mikroströmungen verwendet, welche mittels eines piezoelektrischen Schallgebers erzeugt werden. Zur Steigerung der Effizienz sind in der Mischungskammer mikroskopisch kleine, mechanisch gefertigte, Taschen eingebaut, an denen sich Gasbläschen bilden. Diese Modifikation der Mischungskammer stellt einen beachtlichen Mehraufwand bei der Fertigung von Bio-Chips dar und ist hinsichtlich Wiederverwendbarkeit aus Gründen der Kontamination fragwürdig.

Weiters ist eine Mischvorrichtung für Bio-Sensoren, bei der mittels Rührer durch eine mechanische Welle von außen in einer Kammer eine Homogenisierung der Probe



bewirkt wird, in der WO 94/28396 beschrieben. Dabei wird vom Rührer eine wechselseitige Bewegung normal zur Oberfläche des Sensors während der Messung der Signale durchgeführt.

Eine weitere Patenschrift, nämlich GB 876 070 beschreibt ganz allgemein die Durchmischung von Flüssigkeiten mittels rotierender Gitter.

Das grenzflächennahe Mischen einer zu untersuchenden Flüssigkeit in Sensor-Vorrichtungen wird in der WO 00/09991 A1 beschrieben. Hier erfolgt das Durchmischen mittels Bewegung von magnetischen Kügelchen oder mittels beweglicher Netze, wobei im ersteren Fall die magnetischen Kügelchen in einer Flüssigkeit abwechselnd zwischen zwei Elektromagneten nach oben und nach unten gezogen werden.

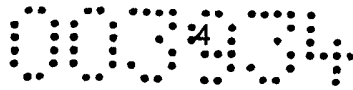
Speziell die Durchmischung von dünnen Flüssigkeitsschichten, welche eine Suspension beweglicher magnetischer Partikel beinhalten, wird in der EP 0 240 862 A1 beschrieben. Die Vorrichtung umfasst ebenfalls Magnetsysteme. Die dort beschriebene Anordnung stellt einen Spalt für die Aufnahme des Flüssigkeitsfilms mit den permanent-magnetischen Partikeln zur Verfügung.

In einem weiteren Patent, nämlich WO 97/02357 A1 ist eine Mischvorrichtung für den Einsatz bei DNA Chips in Erwägung gezogen. Dort werden eine akustische Mischung und eine magnetische Mischung, welche durch Wechselströme in Elektromagneten bewirkt wird, erwähnt.

Aus der US 6,806,050 B2 ist ein elektromagnetischer Chip bzw. Bio-Chip bekannt, welcher eine Matrix von individuell anspeisbaren Micro-Elektromagneteneinheiten umfasst und an dessen Oberfläche Sonder-Moleküle immobilisiert sind. Mittels der Magneteneinheiten werden an kleine Magnetpartikel gebundene Moleküle im Wesentlichen in der Ebene des Bio-Chips bewegt und es wird auf diese Weise eine Erhöhung der Zahl der Bindungen erreicht.

Die neu entwickelte Vorrichtung gemäß der Erfindung beruht auf der Vergrößerung des Wirkungsbereichs der einzelnen Bindungsstellen, also z.B. DNA-Spots, durch Beimengung magnetischer Mikro- oder Nanopartikel zur Hybridisierungs-Lösung, welche mittels eines extern erzeugten Magnetfeldes bewegt werden und wobei z.B. die DNA Targets an die Sonden der einzelnen Spots wesentlich gezielter heranzuführbar sind. Es werden von den bzw. mittels der magnetischen Partikel die DNA-Targets in einer Mikroströmung mitgeführt und auf diese Weise transportiert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Steigerung der Kontaktfrequenz bzw. -häufigkeit zwischen zwei miteinander zur Bindung befähigten Reaktionspartnern, vorzugsweise zwischen Analysator-Molekül bzw. -Molekülteil und Analyt-Molekül bzw. -Molekülteil, insbesondere zur Steigerung der Bindungseffektivität und zur Reduktion der für einen Nachweis erforderlichen Bindungszeiten in Bioanalyse-



Arrays gemäß dem Oberbegriff des Anspruches 1, welche die im kennzeichnenden Teil dieses Anspruches genannten Merkmale aufweist.

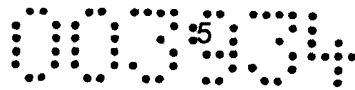
Insbesondere die Kombination der matrixförmigen Anordnung der Mikro- bzw. Milli-Magnetspulen mit nur einer gegenüberliegenden zentralen Magnetspule gestattet eine gezielte, präzise Bewegung der magnetischen Partikel innerhalb der Reaktionsflüssigkeit, also insbesondere des Hybridisierungs-Flüssigkeitsfilms und somit im Konkreten ein kontrolliertes Heranführen von Target-DNA an die immobilisierten Sonden auf dem DNA-Bio-Chip.

Die spezielle Anordnung der Mikro- bzw. Milli-Spulen und die "Muster" zu deren Anspeisung mit Magnetisierungsstrom verhindern ein Anhäufen der magnetischen Partikel und stellt somit einen wesentlichen Vorteil gegenüber den bisher bekannten, oben genannten, auf der Bewegung magnetischer Partikel beruhender, Mischvorrichtungen dar. Die Verwendung magnetischer Felder ermöglicht außerdem die einfache Kombination mit einer Probenkammer, in welcher die Feuchte und Temperatur kontrolliert wird, so dass ein hoher Grad an Systemintegration ermöglicht wird.

Die matrix-artige bzw. array-förmige Anordnung der Milli-Magnetspulen mit oder ohne Magnetkerne(n), z.B. unterhalb des DNA-Chips und nur einer Magnet-Spule oberhalb des DNA-Chips ermöglicht eine ganz gezielte Bewegung der magnetischen Partikel.

So dient die einzelne Magnetspule oberhalb des Chips dazu, die magnetischen Partikel zu einer Aufwärtsbewegung zu veranlassen. Wenn diese Spule durch Abschalten des Stromes nicht mehr magnetisch ist, beginnen die Magnetpartikel wieder abzusinken. Ein Absinken in der gleichen Bahn wie die Anhebungsbahn wird dadurch verhindert, dass die Mikro-Magnetspulen der Mikro-Magnet-Matrix unterhalb des Chips, z.B. wellenartig, magnetisiert werden und somit die Magnetpartikel während ihres Absinkens seitwärts verschoben werden und somit letztlich eine Art Schrägströmung in der Reaktionsflüssigkeit induziert wird, durch welche die Target-Moleküle mehr bewegt und dadurch auch mehr Sonden-Molekülen zugeführt werden.

Es werden also mittels des erfindungsgemäß vorgesehenen Aufbaus die Partikel jeweils lateral in Richtung des Zentrums der entsprechend beschalteten Mikro-Magnet-Matrix bewegt. Durch Variation der Dauer und der relativen Stärke der Impulse von jeweils benachbarten Mikro-Magnetspulen und der oberhalb des Chips angeordneten Magnetspule lassen sich nach Belieben flexible Bewegungsmuster programmieren, um einen gezielten lateralen und vertikalen Transport der in dem Hybridisierungs-Flüssigkeitsfilm gelösten Target-Moleküle zu ermöglichen.



Die erfindungsgemäß vorgesehene Anordnung gestattet im Gegensatz zu den eingangs erwähnten Anordnungen gemäß dem Stand der Technik, welche sich mit der ungerichteten oder höchstens in einer Richtung erfolgenden Durchmischung von Flüssigkeitsfilmen befassen, eine vorprogrammierte, ganz gezielte Bewegung der eingesetzten Mikro-Magnetpartikel. Im Gegensatz zu den erwähnten Patenten Veröffentlichungen kann mit der erfindungsgemäßen Einrichtung insbesondere das Verklumpen und das Ansammeln der Magnetpartikel verhindert werden.

Außerdem bietet die Erfindung den Vorteil, dass sie problemlos mit schon etablierten, bestehenden Bioanalyse-Arrays kombinierbar ist und weiters, dass bei Integration der Magnetspulen in einen entsprechenden Träger die Temperatur an der Grenzfläche zum Bio-Chip präzise eingestellt werden kann, was durch einen später noch zu erörternden integrierten Kühl/Heizkreislauf ermöglicht wird.

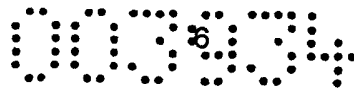
Die Vorrichtung gemäß der Erfindung unterscheidet sich dadurch insbesondere von einer Anordnung, welche ausschließlich auf mögliche Prozessschritte in einem integrierten Mikrofluidik-Biochip abzielt und für eine Nachrüstung schon existierender DNA-Mikro-Arrays nicht geeignet ist.

Zum Nachweis der Wirkungsweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung wurden Hybridisierungs-Experimente auf gleichartigen DNA-Bio-Chips mit Unterstützung durch die erfindungsgemäße Vorrichtung und parallel dazu auf konventionelle Art durchgeführt. Hierbei waren konstante Temperaturverhältnisse (65 °C), Hybridisierungszeiten (25 min.) und Auswerteverfahren in den jeweiligen Experimenten sichergestellt; es zeigten sich beim Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung über sämtliche Experimente ein mittlerer Signalgewinn von etwa 150 % $\text{Signalgewinn} = ((\text{Vorrichtungssignale} - \text{Referenzsignale}) / \text{Referenzsignale}) \cdot 100$ gegenüber dem entsprechenden Ergebnissen bei herkömmlicher Hybridisierung.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist eine Ansteuerungseinrichtung für die Mikro-Magnetspulen einerseits und die Einzel-Magnetspule andererseits gemäß Anspruch 2 vorgesehen, mittels welcher jede einzelne Mikro-Magnetspule individuell ansteuerbar ist und mittels welcher jedes zeitabhängige Magnetisierungs-Muster auf die Magnet-Matrixfläche aufprägbar ist.

Insbesondere im Sinne einer ungestörten, optischen Kontrolle ist eine Ausführungsform der Einzelmagnetspule der erfindungsgemäßen Vorrichtung ohne Kern, also mit freigelassener mittlerer Ausnehmung, gemäß Anspruch 3 günstig, wodurch eine freie Sicht auf das Reaktionsgeschehen, insbesondere auf den Bioanalyse-Chip bzw. -Array ermöglicht ist.

Zur Erhöhung der Effektivität der Anordnung der Mikro-Magnetspulen in der Magnetspulen-Matrix dienen die Merkmale des Anspruchs 4.



Weiters ist eine Anordnung der Analyse-Vorrichtung in einer Art klimatisierter Kammer gemäß Anspruch 5, insbesondere im Hinblick auf genau einzuhaltende stabile Umgebungsbedingungen bevorzugt.

Der Anspruch 6 betrifft eine konkrete Anordnung der Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Schließlich hat der Anspruch 7 eine bevorzugte Ausführungsvariante der Vorrichtung mit einer Aufnahmekammer für das Reaktionsgefäß, insbesondere für den Bio-Analysearray-Mikrochip, zum Gegenstand.

Anhand der Zeichnung wird die Erfindung näher erläutert:

Es zeigen die Fig. 1 die grundsätzliche Anordnung der wesentlichen Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die Fig. 2 schematisch die Vorgänge während der Magnetisierung auf dem Objektträger, die Fig. 3 schematisch die Steuerung der neuen Vorrichtung, die Fig. 4 ein Beispiel für eine reale Ausführungsform der neuen Vorrichtung, die Fig. 5 schematisch ein Diagramm des Weges, welchen ein Magnetpartikel innerhalb der Probeflüssigkeit zurücklegt, die Fig. 6a ein Diagramm, welches die Signalsteigerung bei Einsatz der neuen Vorrichtung im Vergleich zeigt und die Fig. 6b ein Diagramm, in welchem die Signalsteigerung in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit ebenfalls im Vergleich zum Stand der Technik dargestellt ist:

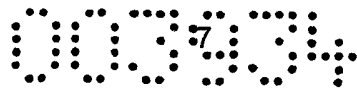
In der Schrägrissdarstellung der Fig. 1 ist der prinzipielle Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 für eine magnet-induzierte Intensivierung der Kontakte zwischen zwei Reaktions-, insbesondere Bindungspartnern, wie z.B. Target-Molekül und Sonden-Molekül gezeigt.

Auf dem Objektträger 4 aus Glas ist unterhalb des Deckgläschens 5 der Bioanalyse-Array 6 mit in regelmäßig aufgetragenen feinen Spots mit den Sonden-Molekülen bzw. der Bio-Chip 6 angeordnet. Zwischen Objektträger 4 und Deckgläschen 5 befindet sich die Reaktions-, insbesondere Hybridisierungsflüssigkeit mit den Target-Molekülen und den für die Agitation der Flüssigkeit vorgesehenen Mikro-Magnetpartikel.

In der Fig. 1 oberhalb dieser Anordnung ist der hier flachringartige bzw. toriodförmige Einzelmagnetspule 3 ohne Kern, also mit freier zentraler Öffnung 36 angeordnet, durch welche die Durchsicht auf die Reaktion auf dem Objektträger 4 bzw. unterhalb des Deckgläschens 5 freigehalten ist.

Unterhalb des Bio-Chips 6 und seinem Nahbereich ist unterhalb des Objektträgers 4 eine große Anzahl von individuell mit Magnetisierungsstrom versorgbaren Mikro-Magnetspulen 2 mit Spulenkernen 21, vorzugsweise in einer Sechseck-Matrix 20 angeordnet.

Die schematische Darstellung der Fig. 2 zeigt - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - wie sich zwischen dem Objektträger 4 mit den Spots mit



den Sonden-Molekülen 63 des Bio-Chips 6 die Reaktionsflüssigkeit 70 befindet, und wie sich in derselben - von den vorher erläuterten Elektro-Magneten 2 bzw. 20, 3 und deren variablen Magnetfeldern beaufschlagten, die hier kreisrund dargestellten Magnetpartikel 75 etwa in den durch Pfeile symbolisierten Bewegungsrichtungen bewegen und die durch Sternchen symbolisierten - Fluoreszenzfarbstoff 72 beaufschlagten Target-Moleküle 73 mit den immobilisierten Sonden-Molekülen 63 in Kontakt bringen und dort wesentlich öfter binden, als dies z.B. durch Diffusion erreichbar wäre.

Die in der Fig. 3 - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - sehr schematisch dargestellten Steuerungs-Einrichtung 8 dient zur individuellen Anspeisung der Mikro-Magnetspulen 2 der Mikro-Magnetmatrix 20 mit variablen Magnetisierungsströmen sowie zur ebenfalls variablen Anspeisung der Einzel-Magnetspule 3 mit Strom.

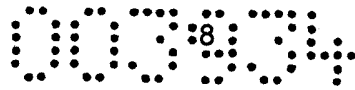
Die Zentral-Steuerungseinheit (PC-Control) 81 ist mit einer Steuereinheit, z.B. D/A-card 82 verbunden, welche einerseits mit der Stromversorgungseinheit (Power-Supply 1) 83 für die Mikro-Magnetspulen-Matrix 20 und andererseits mit der Stromversorgungseinheit (Power Supply 2) 84 für die Einzel-Magnetspule 3 verbunden ist.

Die Stromversorgungseinheit (Power Supply 1) 83 ist mit einer - selbst direkt mit der D/A-Card 82 verbundenen Relaismatrix-Einheit 85 verbunden, von den aus die zeitabhängig variable individuelle Stromversorgung jeder einzelnen mit derselben verbundenen einzelnen Mikromagnetspule 2 der Magnetmatrix 20 gemäß einem von der Zentral-Steuereinheit 81 gelieferten Programm erfolgt.

Vorgesehen ist weiters auch eine Kontrolle der Temperatur an der Probe. Diese erfolgt mittels einer direkt mit der Zentral-Steuereinheit 81 verbundenen Temperatur-Kontrolleinheit (Thermocontrol) 86, welche von hier nicht gezeigten Thermosensoren, welche im Probereich bzw. in Nähe der Magnete 2, 20 und 3 angeordnet sind, mit den aktuellen Temperaturdaten versorgt werden.

Die Fig. 4 zeigt - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - jeweils in Schnittansichten von der Seite und von oben, die reale Konfiguration der Komponenten in der neuen verbesserten Analyse-Vorrichtung 1. Es ist hier eine Deckeinheit II und eine Grundblockeinheit I gezeigt, zwischen welchen der hier nicht gezeigte Objektträger mit der durchzuführenden Reaktion angeordnet wird.

Die Grundblockeinheit I besteht - wie aus Fig. 4a ersichtlich - aus einem von Kühl/ Heizmediumskanälen 22, 22' durchzogenen Aluminiumblock 21, in welchem mittig die Magnetspulen-Matrix 20 mit den Mikro-Magnetspulen 2 angeordnet ist. Unterhalb dieser Matrix 20 ist ein weiterer kleiner, ebenfalls von einem Kühl- bzw. Heizmediumskanal 225 durchzogener Aluminiumblock 25 angeordnet.



Den Verlauf der Kühl/Heizmediumskanäle 22, 22' im Grundriss erläutert die Fig. 4b, in welcher die Zu- und Abflüsse durch Pfeile gekennzeichnet sind. Durch die Fertigung der Kanäle im Block 21 bedingte Öffnungen sind mit Stopfen verschlossen.

Nach oben hin abgedeckt ist der Aluminiumblock 21 mit einer dünnen Folie 23, auf welcher randseitig umlaufende Gummiringe 26,27 aufliegen, innerhalb welcher sich ein Raum 230 für die Platzierung der Probe befindet.

Die in der Fig. 4c gezeigte Deckeinheit II umfasst einen - hier mit der mittig eine Ausnehmung 34 aufweisenden Edelstahldeckfläche 35 - nach oben hin begrenzten Aluminiumblock 31, welcher ebenfalls von Kühl/Heizmediumskanälen 32 durchzogen ist und in welchem die ringförmige Einzel-Magnetspule 3 untergebracht ist.

Der Aluminiumblock 31 ist von einer mittigen Öffnung 34' durchsetzt, durch welche der Blick auf die Probe freigehalten ist, und nach unten hin mit einer Glasplatte 33 abgeschlossen.

Die Temperaturkontrolle erfolgt mittels Thermoelementen 300, welche die aktuellen Temperaturdaten an die schon oben genannte Thermokontrolleinheit abgeben.

Die Fig. 4d ermöglicht eine Übersicht über den Verlauf der Kühl/Heizmediumskanäle 32 im Aluminiumblock 31 der Deckeinheit II in Draufsicht.

Die Fig. 5 zeigt - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - schematisch den Weg- bzw. Bewegungsverlauf der Mikro-Magnetpartikel 75 im Flüssigkeitsfilm 70 zwischen Objektträger 4 bzw. Bio-Chip 6 und Deckglas 5. Bei Aktivieren der oberen Einzel-Magnetspule 3 wird das einzelne Magnetpartikel 75 entlang Bahn A etwa senkrecht aufwärts gezogen und durch das Magnetfeld einer etwas außerhalb der Aufstiegs-Bahn A liegenden jetzt magnetisierten Mikro-Magnetspule 2 und beim - durch Abschalten der Einzel-Magnetspule 3 erfolgenden Absinken wird das Magnetpartikel 75 seitlich abgelenkt und folgt dann etwa der Bahn B usw.

In der Fig. 6a und 6b sind die mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung erreichten Signalsteigerungen als Funktion der Konzentration an magnetischen Partikeln nach der Hybridisierung gezeigt:

Auf der Ordinate des Diagramms Fig.6a ist die Intensität der Fluoreszenz-Indikation und auf der Abzisse ist die Konzentration der Magnetpartikel M-PVA 13 bead (5-8 μm) (Chemagen AG, Arnold-Sommerfeld-Ring 2, D-52499 Baesweiler) in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgetragen.

Die in Quadratform dargestellten Signalwerte wurden mit der beschriebenen Vorrichtung erzielt, die mit Kreuzen dargestellten auf konventionelle Weise. Es zeigt sich ein hoher mittlerer Signalgewinn. Die Fig. 6a zeigt weiters in der linken Spalte unten die Referenzsignale der DNA-Sonde Ec. faecium 2 als kleine Kreuze. Der entsprechende Mittelwert ist in der rechten Spalte als kleines rotes Kreuz eingezeichnet. In der mittleren Spalte sind zu vier unterschiedlichen bead-Konzentrationen die Signale der Sonde Ec.



faecium 2 bei Einsatz der neuen Vorrichtung dargestellt. Jeder der hier gezeigten Datenpunkte (kleine Quadrate) entspricht einem Experiment, die Fehlerbalken ergeben sich dabei durch die Auswertung von je 6 Replikaten der Sonde *Ec. faecium* 2 pro Experiment. Die Hybridisierungszeit betrug in den jeweiligen Experimenten 25 min.

Es zeigte sich bei Einsatz der neuen Vorrichtung bei dieser Sonde über sämtliche Experimente ein mittlerer Signalgewinn von ca. 150 %, gegenüber einer herkömmlich durchgeführten Hybridisierung. Die Berechnung erfolgte durch arithmetisches Mitteln der Signale für die DNA-Sonde *Ec. faecium* 2 bei unterschiedlichen bead-Konzentrationen.

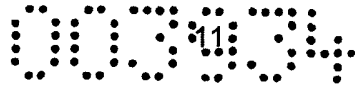
In der Fig. 6b sind - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - ebenfalls die unter Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung erzielten Intensitäten I der Fluoreszenz-Signale den Intensitäten der auf bisher bekannter Weise erhaltenen Signalen als Funktion der Hybridisierungszeit gegenübergestellt.

Hier ist auf der Abzisse die Hybridisierungszeit in min aufgetragen und die Konzentration an Mikro-Magnetpartikeln bzw. -beads M-PVA 13 bead 5-8 μm ist mit [1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] konstant gehalten.

Es zeigt sich schon nach 5 min ein sehr großer Signalgewinn bei Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung.



- (1) Advalytix AG, Eugen-Sänger-Straße 53.0, D-85649 Brunnthal, www.advalytix.de , SlideBooster SB400
- (2) R.H. Liu et.al. Bubble-induced acoustic micromixing, *Lab Chip*, 2002, 2, 151-157
- (3) WO 94/28396
- (4) GB 876,070 A
- (5) WO 00/09991 A1
- (6) EP 0 240 862 A1
- (7) WO 97/02357 A1
- (8) US 6,806,050 B2



Patentansprüche:

1. Vorrichtung zur Steigerung der Kontaktfrequenz bzw. -häufigkeit zwischen zwei miteinander zur Bindung befähigten Reaktionspartnern, vorzugsweise zwischen Analysator-Molekül bzw. -Molekülteil und Analyt-Molekül bzw. -Molekülteil, insbesondere zur Steigerung der Bindungseffektivität und zur Reduktion der für einen Nachweis erforderlichen Bindungszeiten in Bioanalyse-Arrays, wie z.B. DNA/RNA-, Protein- oder Immuno-Mikroarrays mit Hilfe von - mittels beidseitig des Reaktionsvolumens bzw. Reaktionsfluidfilms angeordneter, mit veränderlichen Strömen anspeisbarer Elektromagneten (3, 2, 20) - extern generierten Magnetfeldern berührungslos im fluiden Reaktionsmedium, insbesondere mit in der den Bioanalyse-Array umgebenden Flüssigkeit gezielt in Bewegung gesetzten para-, superpara- oder ferromagnetischen, sphärisch oder unregelmäßig geformten, gegebenenfalls mit einem der Reaktionspartner gecoateten, Mikro- oder Nanopartikeln (75)

dadurch gekennzeichnet,

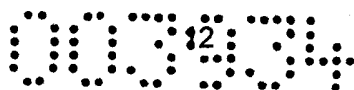
dass auf einer Seite des Reaktionsgefäßes bzw. Reaktionsfluidfilms, insbesondere eines Objektträgers (4) mit - den bzw. die Reaktionspartner (73) und die Reaktionsflüssigkeit (70) und vorzugsweise ein Mikro-Bioanalyse-Array (6) abdeckendem - transparentem Deckglas (5), in der unmittelbarer Nähe eine zweidimensional flächige Matrix (20) bzw. ein Array mit einer Mehrzahl von individuell mit Magnetisierstrom jeweils vorgegebener, zeitabhängig variabler Stärke und/oder Spannung - einem jeweils gewünschten zeitabhängig variablen bzw. veränderlichen Magnetisierungs- bzw. Feldstärke-Muster entsprechend - anspeisbaren Miniatur- bzw. Milli-Magnetspulen (2) gegebenenfalls mit oder ohne feldverstärkendem Kern (21), angeordnet ist und

dass auf der anderen Seite des Reaktionsgefäßes, insbesondere Objektträger (4) mit dem Mikro-Bio-Analysearray (6), in dessen unmittelbarer Nähe nur eine, ebenfalls mit variablen Magnetisierstrom anspeisbare Magnetspule (3) positioniert ist, deren Magnetfeld das gesamte Reaktionsgefäß oder wesentliche Teile desselben, insbesondere den gesamten (Mikro)-Bioanalysearray (6), durchsetzt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1,

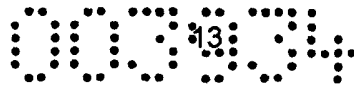
dadurch gekennzeichnet,

dass sie eine Magneten-Ansteuerungseinrichtung (8) mit Zentral-Steuereinheit (81) aufweist, mittels welcher die Einzel-Magnetspule (3) und jede der Miniatur-Magnetspulen (2) der Magnetspulen-Matrix bzw. des Magnetspulen-Arrays (20) jeweils individuell und unabhängig von den anderen Miniatur-Magnetspulen, mit insbesondere hinsichtlich Stromart, wie DC oder AC, mit beliebiger Frequenz, Wellenform, Amplitude und/oder



Phasenverschiebung, variablen Magnetisierungsstrom anspeisbar bzw. bestrombar sind, sodass - einem jeweils gewählten Programm entsprechend - jeweils örtlich, in allen drei Raumrichtungen, verschieden - eine ortsvariable Bewegung der Magnet-Partikel (75) mit jeweils gewünschter Bewegungsrichtung, -bahn und -geschwindigkeit in der Reaktionsflüssigkeit im Reaktionsfluidfilm bzw. in der den (Mikro-)Bioanalyse-Array bzw. Bio-Chip (6) umgebenden Flüssigkeit induzierbar ist.

3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Einzel-Magnetspule (3) ringförmig und ohne Kern ausgebildet ist, um die Sicht auf das Reaktionsgefäß, insbesondere auf den (Mikro-)Bioanalyse-Array bzw. Mikro-Biochip (6), freizuhalten.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Mikro-Magnetspulen (2) der Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) mit möglichst kleinen Zwischenräumen zwischen einander mit jeweils kreisförmigem, quadratischem oder hexagonalem Querschnitt ausgebildet und in einer Quadrat-Matrix oder bienenwabenartigen Sechseck-Matrix (20) angeordnet sind.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie insgesamt in einer Kammer angeordnet ist, in welcher die Feuchte des das Reagenzgefäß, insbesondere den (Mikro-)Bioanalyse-Array (6), umgebenden Gases, sowie vorzugsweise die bzw. dessen Temperatur und gegebenenfalls Druck kontrollierbar und einstellbar ist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5
dadurch gekennzeichnet,
- dass die Einzel-Magnetspule (3) in einem Block (31) aus gut wärmeleitfähigem Material, insbesondere aus Aluminium, angeordnet ist und dass in demselben eine diese Einzel-Magnetspule (3) im Nahbereich ihrer dem Reaktionsgefäß, insbesondere dem (Mikro-)Bioanalyse-Array (6), nahen Oberfläche außen umringender und ein vorzugsweise gesonderter, oberhalb derselben im Nahbereich von deren Innenrand angeordneter, mit einer Kühl- oder Heizflüssigkeit durchströmbarer Fluidmediums-Kanal (32, 32') vorgesehen ist.



- dass gegebenenfalls auch die Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) in einem Aluminiumblock oder -tisch (21) angeordnet ist und seitlich rundum von einem mit einer Kühl- oder Heizflüssigkeit durchströmbaren Fluidmediums-Kanal (22, 22') umgeben ist und
- dass gegebenenfalls zusätzlich unterhalb der Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) ein Kühlkanal-System (225) in einem gesonderten Metallblock (25) angeordnet ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,

- dass der Metall-, insbesondere Aluminiumblock (31) mit der Einzelmagnetspule (3) zum Reaktionsgefäß, insbesondere zum Bioanalyse-Array (6) bzw. Mikro-Biochip, hin mit einer Glasplatte (33) abgeschlossen ist,
- dass gegebenenfalls der Metall-, insbesondere Aluminiumblock (21) mit der Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) mittels Aluminium- oder Kunststoff-Deckfolie (23) abgeschlossen ist und
- dass gegebenenfalls die beiden Metall-, insbesondere Aluminiumblöcke (21, 31) mittels mindestens eines randnah angeordneten geschlossenen Gummi-Ringelements (26, 27) zwischen der oben genannten Glasplatte (23) und der Deckfolie (23) unter Ausbildung einer von der Umgebung und deren Einflüssen abgeschotteten Probenkammer (230) voneinander beabstandet gehalten sind.

Wien, am 13.April 2006

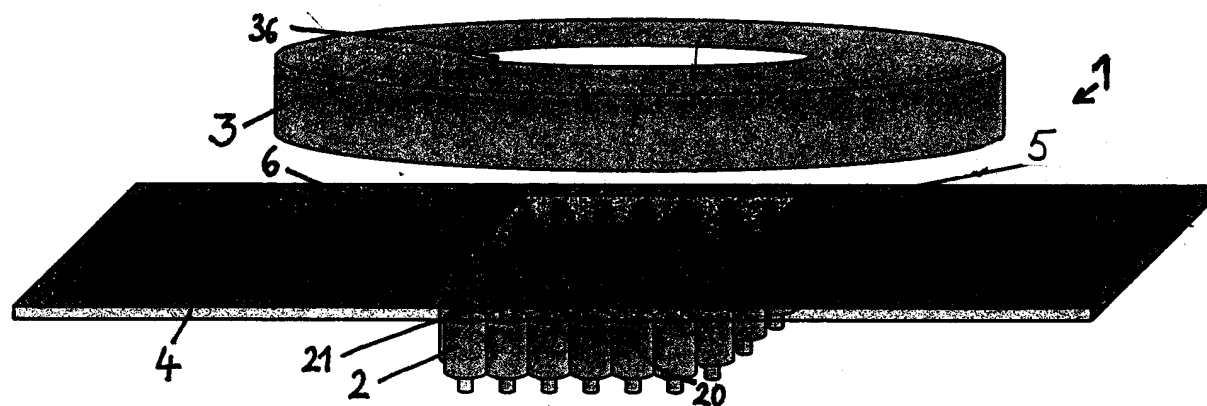


Fig. 1

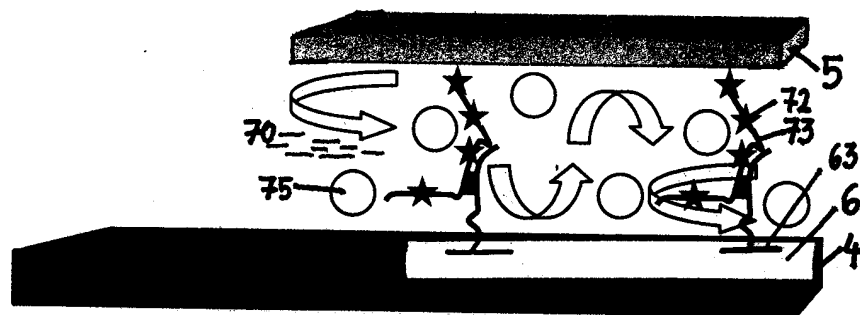


Fig. 2

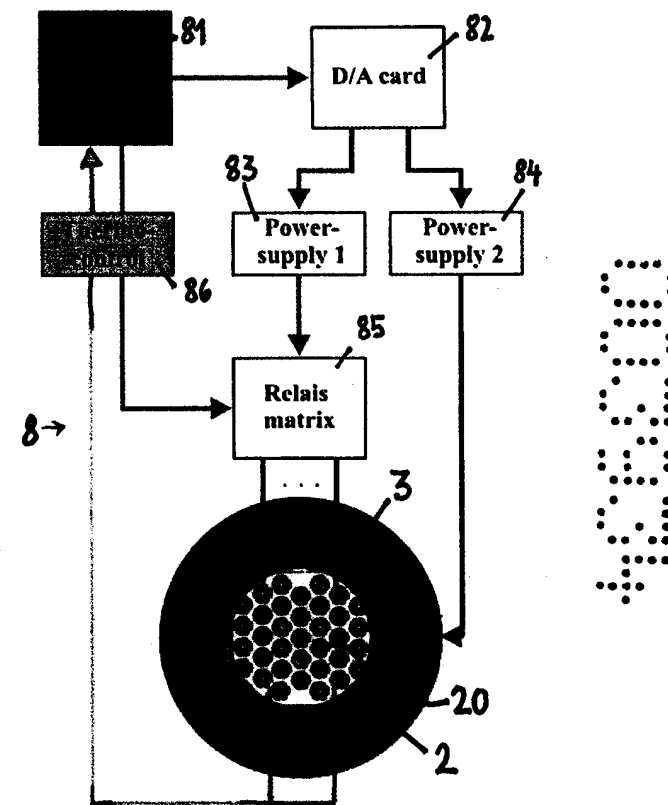


Fig. 3

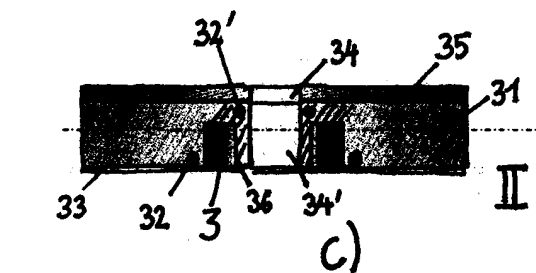
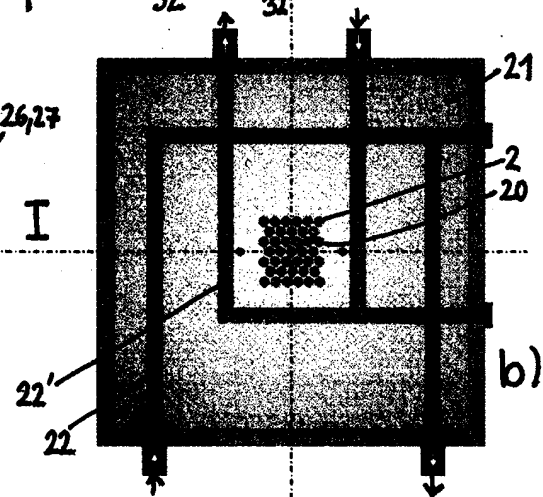
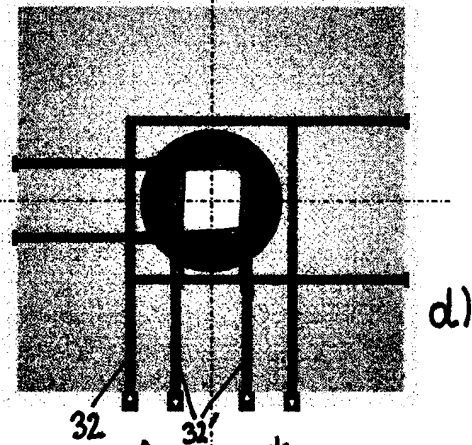
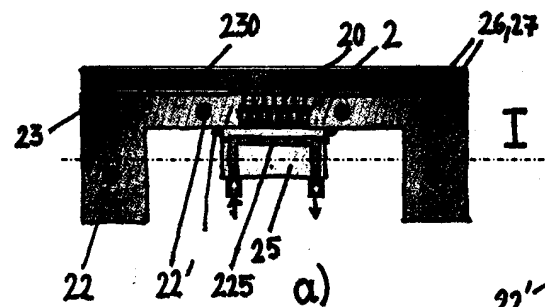
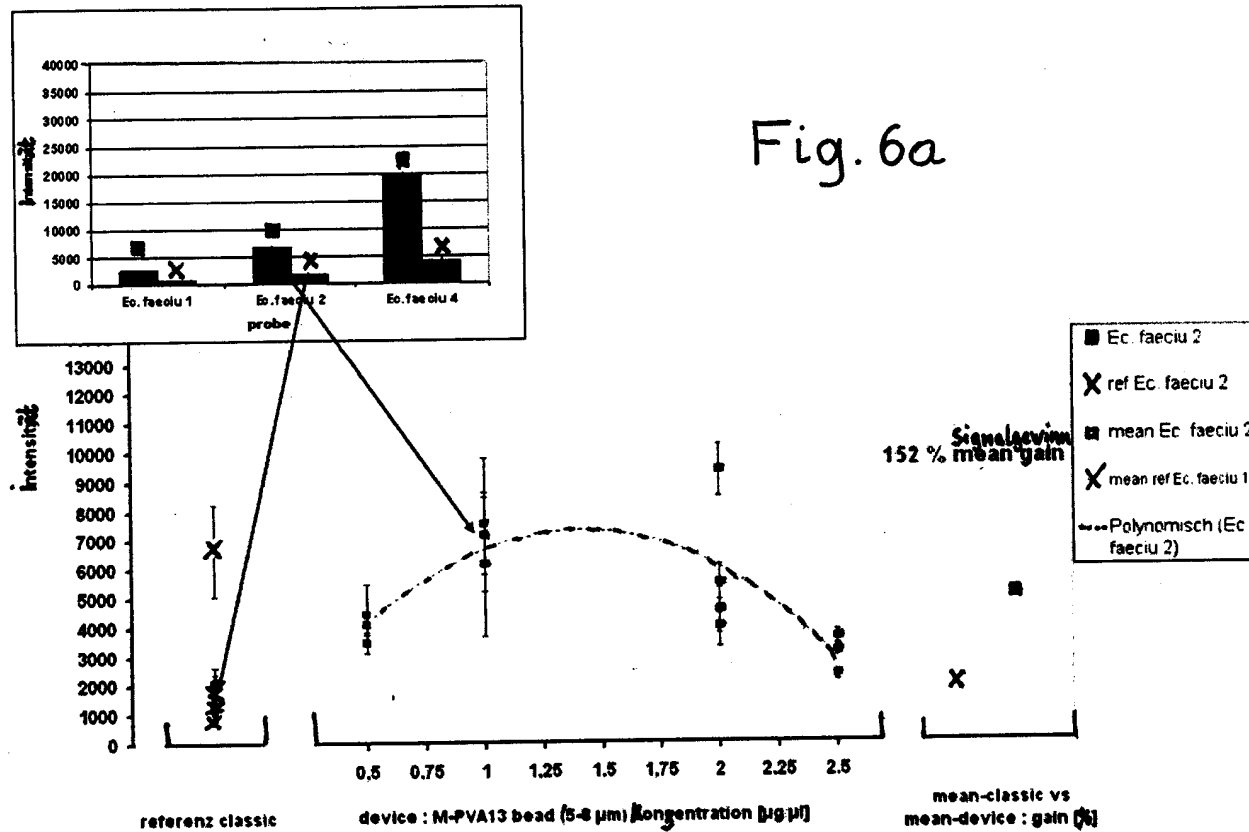


Fig. 4



889

Fig. 6a



000034

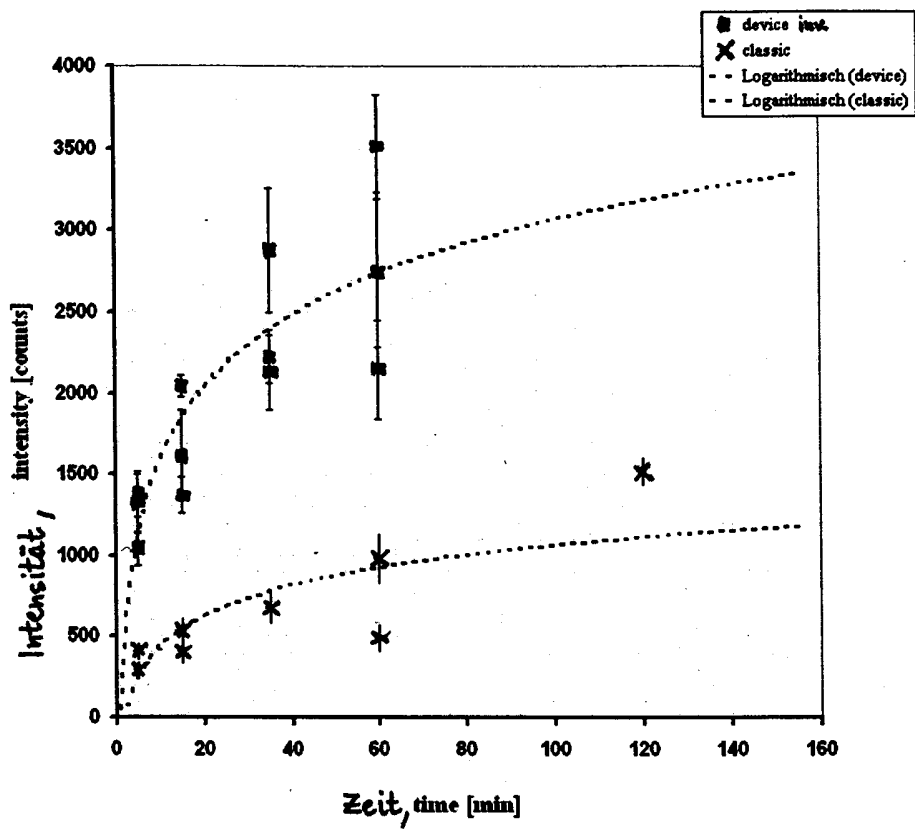


Fig. 6b

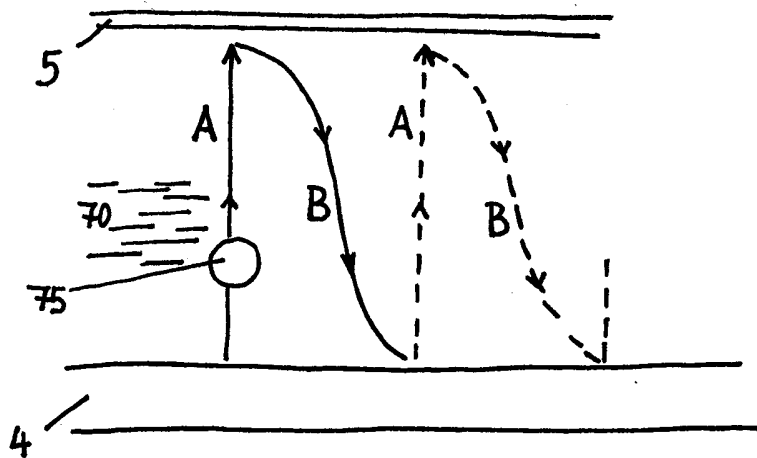


Fig. 5