(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 34 108 T2** 2007.08.09

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 143 014 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 108.4**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 202 360.2**
(96) Europäischer Anmeldetag: **23.04.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.10.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.01.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.08.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
872582 **23.04.1992** **US**

(73) Patentinhaber:
Houston Advanced Research Center, Woodlands, Tex., US; Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., US; Baylor College of Medicine, Houston, Tex., US

(74) Vertreter:
Luderschmidt, Schüler & Partner, 65189 Wiesbaden

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:
Hollis, Mark A., Concord, MA 01742, US; Ehrlich, Daniel J., Lexington, MA 01273, US; Murphy, R. Allen, Boxboro, MA 01719, US; Kosicki, Bernard B., Acton, MA 01720, US; Rathman, Dennis D., Ashland, MA 01721, US; Chen, Chang-Lee, Sudbury, MA 01776, US; Mathews, Richard H., Chelmsford, MA 01824, US; Burke, Barry E., Lexington, MA 01273, US; Eggers., Mitch D., The Woodlands, TX 77381, US; Hogan, Michael E., The Woodlands, TX 77381, US; Varma, Rajender Singh, The Woodlands, TX 77381, US

(54) Bezeichnung: **Elektrisches Verfahren zur Bestimmung von Molekülen**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Bei vielen Anwendungen ist es erwünscht, die Gegenwart von einer oder mehreren molekularen Strukturen in einer Probe zu bestimmen. Die molekularen Strukturen beinhalten typischerweise Liganden wie z. B. Zellen, Antikörper und Anti-Antikörper. Liganden sind Moleküle, welche durch einen speziellen Rezeptor erkannt werden. Liganden können Agonisten und Antagonisten für Zellmembranrezeptoren, Toxine, Gifte, Oligosaccharide, Proteine, Bakterien und monoclonale Antikörper enthalten, ohne darauf begrenzt zu sein. Beispielsweise ist eine DNA- oder RNA-Sequenzanalyse sehr nützlich bei der genetischen und Krankheitsdiagnose, toxikologischen Untersuchung, genetischen Forschung, im Ackerbau und in der Pharmazeutika-Entwicklung. Ebenso ist die Erkennung von Zellen und Antikörpern wichtig bei der Krankheitsdiagnose.

[0002] Eine Anzahl von Techniken wurde für die Erkennung von molekularen Strukturen entwickelt. Bei der DNA- und RNA-Sequenzbestimmung werden üblicherweise zwei Vorgehensweisen verwendet: die Autoradiographie und die optische Erkennung. Autoradiographie wird unter Verwendung von ^{32}P oder ^{35}S durchgeführt. Für die DNA-Sequenzanalyseanwendungen werden Nukleinsäurefragmente mit ^{32}P am Ende markiert. Diese endmarkierten Fragmente werden nach Größe getrennt, dann einem Röntgenfilm für eine bestimmte Zeitdauer ausgesetzt. Die Filmbelichtungsdauer steht in direktem Verhältnis zur Menge der Radioaktivität in der Nähe eines Bereichs des Films.

[0003] Die Verwendung jedes radioaktiven Markers ist mit verschiedenen Nachteilen verbunden. Als erstes erhöht die verlängerte Aussetzung gegenüber radioaktiven Elementen das Risiko, genetische Erkrankungen wie z. B. Krebs zu erwerben. Daher müssen Vorkehrungen getroffen werden, wenn radioaktive Marker verwendet werden oder es müssen Markierungen verwendet werden, um die Bestrahlung mit Radioaktivität zu reduzieren.

[0004] Typischerweise müssen Arbeiter eine Vorrichtung tragen, um kontinuierlich die radioaktive Strahlung zu überwachen. Zusätzlich müssen schwangere Frauen weitere Vorkehrungen treffen, um das Auftreten von genetischen Mutationen beim Ungeborenen zu verhindern.

[0005] Das übliche radioaktive Detektionsschema hat Empfindlichkeitsgrenzen sowohl im temporären als auch im räumlichen Bereich. Die Verwendung von radioaktiver Markierung hat derzeit eine räumliche Auflösung von einem Millimeter. Zusätzliche Hardware und Software sind erforderlich, um die räumliche Auflösung auf unter einen Millimeter zu reduzieren.

[0006] Die Empfindlichkeit der Bestimmung unter Verwendung von autoradiographischem Film ist direkt mit der Zeitdauer verknüpft, während der die radioaktiv markierten Fragmente dem Film ausgesetzt werden. Demzufolge kann die Bestrahlungszeit des Films im Bereich von Stunden bis Tagen variieren, abhängig von der Höhe der Radioaktivität an jeder der Erkennungsteststellen. Ein β-Scanner könnte die für die Bestrahlung des Films während der Radiographie erforderliche Zeit drastisch reduzieren. Jedoch erhöht der β-Scanner signifikant die Ausgaben, die mit dieser Art von Erkennung verbunden sind und hat eigentlich eine geringe räumliche Auflösung.

[0007] Optische Detektion von fluoreszenzmarkierten Rezeptoren wurde ebenfalls für die Bestimmung von molekularer Bindung verwendet. Kurz gesagt wird für DNA-Sequenzanalyseanwendungen ein basenspezifischer Fluoreszenz-Farbstoff kovalent an die Oligonukleotidprimer angeknüpft oder an die Kette, welche die Dideoxynukleotide, die in Zusammenhang mit der DNA-Polymerase verwendet werden, terminiert. Die entsprechende Absorptionswellenlänge für jeden Farbstoff wird ausgewählt und dazu verwendet, den Farbstoff anzuregen. Wenn die Absorptionsspektren der Farbstoffe eng beieinander liegen, kann eine spezielle Wellenlänge ausgewählt werden, um das komplette Set von Farbstoffen anzuregen.

[0008] Eine besondere optische Bestimmungstechnik erfordert die Verwendung eines Farbstoffs, beispielsweise Ethidiumbromid, welcher duplizierte Nukleinsäuren färbt. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs zeigt eine etwa 20-fache Erhöhung, wenn er an duplexierte DNA oder RNA gebunden ist, im Vergleich zu einsträngiger DNA. Diese Art von Farbstoff wird verwendet, um die Gegenwart von hybridisierter DNA (oder RNA) während eines Hybridisierungsexperiments zu bestimmen. Obwohl die Verwendung von konventionellen optischen Bestimmungsmethoden den Durchsatz der Sequenzierungsexperimente erhöht, sind die Nachteile erheblich.

[0009] US-A-S 234 506 offenbart einen Biosensor aus zumindest einer Lipid-Membran, wobei jede Membran

zumindest einen abgesperrten Ionenkanal (gated ion channel) beinhaltet. Die Membranen umfassen einen dicht gepackten Bereich aus selbstorganisierenden amphophilen Molekülen und der abgesperrte Ionenkanal hat eine Leitfähigkeit, die von dem elektrischen Feld abhängt, das quer über die Membran angelegt ist. Der Biosensor der vorliegenden Erfindung kann eine Vielzahl von diskreten Membranen aufweisen, die jeweils zumindest einen abgesperrten Ionenkanal enthalten. Die Leitfähigkeit jeder der Membranen ist unabhängig von der Leitfähigkeit der anderen Membranen messbar.

[0010] Die vorliegende Erfindung ist wie in den Ansprüchen beansprucht.

[0011] Ein weitergehendes Verständnis der Art und der Vorteile der hier vorliegenden Erfindung kann mit Bezug auf die detaillierte Beschreibung, die hierauf folgt und die unten beschriebenen Zeichnungen erlangt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0012] Fig. 1 zeigt eine schematische Teilansicht eines mikro-elektronischen Sensorarrays, der für die Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet ist.

[0013] Fig. 2 zeigt einen vergrößerten Blick auf einen Teil der Fig. 1.

[0014] Fig. 3 zeigt einen vergrößerten Blick auf den Elektrodenteil von Fig. 2.

[0015] Fig. 4 ist ein Schnitt entlang der Linie IV-IV von Fig. 3.

[0016] Fig. 5A–Fig. 5D sind schematische Querschnitts-Verfahrensdiagramme, die wichtige Schritte bei der Bildung der Teststellen zeigen.

[0017] Fig. 6A–Fig. 6H sind schematische Querschnitts-Verfahrensdiagramme, die wichtige Schritte bei der Bildung von alternativen Ausführungsformen der Teststellen zeigen.

[0018] Fig. 7 ist eine Auftragung des Verlustfaktors gegen die Frequenz für gebundene Teststellen (Kurve A) und ungebundene Teststellen (Kurve B).

[0019] Fig. 8 ist die Aufsicht auf eine alternative Teststellenausführungsform unter Verwendung einer mäanderförmigen Übertragungslinie.

[0020] Fig. 9 ist ein Schema eines Teststellenerkennungssystems unter Verwendung einer angelegten Wechselstrom-Eingangsspannung V_i mit einem Frequenzbereich von f_1 bis f_2.

[0021] Fig. 10 ist die Auftragung der Wechselstromleitfähigkeit der Teststelle gegen die Eingangsspannung V_i.

[0022] Fig. 11 ist die Auftragung von V_i gegen die Zeit für ein Signal mit konstanter Amplitude, welches sich von einer niedrigen Frequenz f_1 zu einer höheren Frequenz f_2 hin verändert.

[0023] Fig. 12 ist eine Auftragung der festgestellten Ausgangsspannung V_0 aus der Teststelle als Antwort auf die Wellenform der Eingangsspannung von Fig. 11.

[0024] **Fig.** 13 ist eine Auftragung der gemessenen Ausgangsspannung V_0 von einer Teststelle als Antwort auf eine Eingangswellenform V_i, die von f_2 zu f_1 hin abfällt.

[0025] Fig. 14 ist eine schematische Teilansicht einer Teststelle, hergestellt mit einer mechanischen Resonatorstruktur.

[0026] Fig. 15 ist ein schematischer Querschnitt einer alternativen Ausführungsform, bei der die Teststellen mit einem darunter liegenden CCD-Array ausgebildet sind.

[0027] Fig. 16 ist eine Ansicht wie in Fig. 15, wobei die Teststellen auf einer Wegwerfplatte gebildet werden und mit einem abtrennbaren CCD-Array verbunden sind.

[0028] Fig. 17 ist eine schematische Ansicht eines Systems zur Synthetisierung von Proben an den Teststellen.

[0029] Fig. 18 ist eine schematische Darstellung eines mikrofluiden Systems zur Synthese von Proben in situ.

[0030] Fig. 19 ist ein schematischer Querschnitt des mikrofluiden Systems von Fig. 18.

[0031] Fig. 20 ist ein Schema einer mikrofluiden Genosensor-Ausführungsform.

[0032] Fig. 21 ist eine schematische Darstellung des Verfahrens, wobei eine synthetische DNA-Probe selektiv an eine vorbestimmte DNA-Sequenz bindet.

[0033] Fig. 22 ist ein schematischer Querschnitt einer Testmulde, der zur Erkennung von Molekülen in biologischen Flüssigkeiten verwendet wird.

[0034] Fig. 23 ist eine schematische Wiedergabe einer erfindungsgemäßen oberflächenakkustischen Wellenausführungsform.

[0035] Fig. 24 ist ein Teilschema einer alternativen erfindungsgemäßen Adressierungs-Ausführungsform.

[0036] Fig. 25A–D ist eine Serie von Querschnittszeichnungen, welche eine alternative Methode der Array-Sensibilisierung zeigen.

[0037] Fig. 26A–D ist eine Serie wie in den Fig. 25A–D, welche ein alternatives Array-Sensibilisierungsverfahren aufzeigt.

Eingehende Beschreibung der Erfindung

I. Allgemeiner Überblick über das System

[0038] Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens und seiner Vorteile kann verstanden werden, wenn man die Fig. 1–Fig. 4 und 4A–4C der Zeichnungen betrachtet, bei welchen gleiche Nummerierungen für gleiche und korrespondierende Teile der verschiedenen Zeichnungen verwendet wurden.

[0039] Fig. 1 zeigt eine Apparatur, die zur Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet ist, die in Verbindung mit RNA- oder DNA-Sequenzierung verwendet wird. Wie im Folgenden beschrieben, kann die vorliegende Erfindung auch für die Zell-Erkennung und Antikörper-Erkennung oder die Erkennung von jedem hybridisierten Molekül verwendet werden.

[0040] Der Sequenzierer **10** enthält ein X-Y-Array von Teststellen **12**, die durch konduktive Leiterbahnen X1, X2, X3-XN auf der X-Achse und konduktive Leiterbahnen Y1, Y2, Y3-YN auf der Y-Achse elektronisch adressierbar sind. Der X-logische Schaltkreis **36** für die sequenzielle Adressierung jeder X-Linie wird an den Detektions- und Erkennungsschaltkreis **40** gekoppelt. Ähnliche Schaltkreise **56** werden an die Y-Linien Y1-YN gekoppelt. Der Array **10** und die logischen X- und Y-Schaltkreise **36** und **56** sowie Schaltkreis **40** können alle auf einem einzigen Halbleiterchip implementiert werden, abhängig von der Kostenfrage.

[0041] Die Teststellen **12**, die im Folgenden genauer beschrieben werden, werden in einem Halbleiterwafer unter Verwendung von halbleiter-photolithographischen Verfahrenstechniken gebildet. Jede Teststelle enthält eine Vielzahl von Proben **22** (siehe Fig. 4), die dazu fähig sind, an bekannte molekulare Strukturen zu binden (im Folgenden „Target(s)"). Die Targets können beispielsweise Biopolymere wie Polynukleotide, DNA, RNA, Zellen, Antikörper oder Anti-Antikörper enthalten. Für den Fall eines RNA- oder DNA-Sequenzierers können die synthetischen Proben beispielsweise Oligonukleotide enthalten. Alle Proben **22** in einer gegebenen Teststelle sind identisch. Aber die Proben in den jeweiligen Teststellen **12** unterscheiden sich in einer bekannten Sequenz für die gleichzeitige Bestimmung einer Vielzahl von unterschiedlichen Targets (oder Untersequenzen innerhalb eines Target-Moleküls) innerhalb eines einzelnen Arrays **10**.

[0042] Wenn eine Probensubstanz mit den Targets in einer elektrolytischen Lösung **18** auf das Array **10** aufgegossen wird, so binden die Targets mit den entsprechenden Proben **22** in einer Vielzahl von Mulden **42**, die an jeder Teststelle **12** gebildet wurden. Nach einer ausreichenden Zeit für die Bindung wird die Oberfläche des Arrays **10** gewaschen, um überschüssige Targets oder andere ungebundene molekulare Strukturen zu entfer-

nen. Die zurückbleibenden Targetstrukturen sind zum größten Teil an die Proben gebunden und an dem mikro-hergestellten Array **10** an bestimmten Teststellen **12** verankert. Jede Teststelle **12** wird dann elektronisch durch den logischen Schaltkreis **36** und **56** abgefragt, um zu bestimmen, ob Targets an diese Teststelle gebunden haben. Teststellen, die angebundene Targets tragen, z. B. hybridisierte Moleküle, haben veränderte elektrische Parameter, die durch den Detektionsschaltkreis **40** erkannt werden können, der über die X- und Y-Leitungen mit den Teststellen verbunden ist. Somit wird durch elektronisches Adressieren die Erkennung der spezifischen Target/Proben-Bindungen an jeder Teststelle **12** innerhalb des mikro-hergestellten Arrays **10** erhalten. Dabei wird die Zusammensetzung des Targets bestimmt, das nach dem Waschen noch vorhanden ist.

[0043] Für das Beispiel der DNA-Sequenzierung führt der Erkennungsschaltkreis **40** eine Sequenzanalyse aus, wie in Verbindung mit Fig. 21 beschrieben, basierend auf der Zusammensetzung der Targets (Nukleinsäuren) und detektiert durch den Schaltkreis **40**.

[0044] Beachte: Schaltkreis **40** ist vorzugsweise an die Teststellen mittels Transistorschalter (nicht gezeigt) unter Verwendung von Reihen- und Spalten-Adressierungstechniken gebunden, wie beispielsweise bei der Adressierung von dynamischem Arbeitsspeicher (DRAM) oder aktiven Matrixflüssigkristalldisplay-Baugruppen (AMLCD).

II. Teststellen

[0045] Die Teststellen **12** werden vorzugsweise als monolithische Strukturen auf einem Wafer oder Substrat **34** gebildet, bevorzugt auf einkristallinem Si oder ähnlichem, wie zum Beispiel Glas, Quarz, Aluminiumoxid, etc. Als erstes wird wahlweise ein Widerstandsarray von X- und Y-Widerständen **32**, gebunden an Leitungen RX1, RX2, RX3-RXN und RY1, RY2, RY3-RYN (wie in Fig. 1 gezeigt) durch Metallverdampfung oder Sputtern von geeignetem Material auf Substrat **34** gebildet. Die Leitungen sind an einem Ende an die Widerstände **32** gebunden, die aus Widerstandsmaterial wie z. B. Nichrom, Wolfram oder Platin gebildet werden und sich neben den Teststellen befinden, und an einem anderen Ende für Zwecke der Probensynthese, die später beschrieben werden, an den X-widerstandslogischen Schaltkreis **38** und Y-widerstandslogischen Schaltkreis **58**.

[0046] Alternativ können Widerstände **32** aus abgelagertem dotiertem Polysilizium, Wolfram oder Tantal oder Platinsiliziden, Nitriden oder Oxydnitriden durch wohlbekannte Techniken wie z. B. chemische Dampfablagerung (CVD), molekulare Strahlepitaxie (MBE), metallorganische CVD (MOCVD) oder ähnliche Halbleiterverfahren gebildet werden.

[0047] Bezugnehmend auf die Fig. 5A–Fig. 5D wird dann, nachdem die Widerstände **32** und Widerstands-RX- und RY-Adressierungsleitungen gebildet wurden, ein dicker (etwa 5000 Å) SiO_2-Film **50** durch CVD auf Schicht **32** gebildet. Eine dünne Schicht **28** von etwa 500 Å eines Maskierungsmaterials, wie z. B. Si_3N_4, wird dann auf dem SiO_2-Film **50** gebildet, beispielsweise durch chemische Dampfablagerung (CVD) (Fig. 5A).

[0048] Beachte: In den Fig. 5A–Fig. 5D ist lediglich ein Teil des Wafers **34**, der durch eine einzelne Teststelle **12** besetzt ist, gezeigt. Es soll so verstanden werden, dass vielmehr, d. h. etwa mehr als 7 Millionen solcher Stellen auf einem einzelnen Drei-inch-Si-Wafer unter Verwendung der derzeitigen Technologie gemäß Stand der Technik hergestellt und getestet werden können.

[0049] Die in der Teilansicht von Fig. 5A gezeigte Precursorstruktur wird als nächstes bearbeitet, um eine obere und eine untere fingerartige Elektrodenstruktur zu bilden, von der ein Teil in Querschnitt IV-IV von Fig. 3 gezeigt ist und im Detail in Fig. 4.

[0050] Zunächst werden Öffnungen **54** von etwa 2 Mikron Breite durch Fotolithographie und reaktives Ionenätzen (Fig. 5B) in der Si_3N_4-Schicht **28** gebildet. Danach wird etwa 4000 Å der SiO_2-Schicht **50** mit einer Säurelösung, wie z. B. gepufferte HF, nass geätzt, um den Vorsprung **54'** zu bilden (Fig. 5C).

[0051] Die oberen und unteren Elektroden **21** und **20** werden dann jeweils durch fortlaufende Elektronenstrahlverdampfung einer Haftschicht (300 Å) von Ti **26** gefolgt von 2000 Å einer Kontaktmetallisierung (Au) **16** gebildet. Es sei bemerkt, dass die Längskanten des verbleibenden Si_3N_4-Films **28** als genaue selbstausrichtende Maske für die Definition der Breite der Finger der unteren Elektrode **20** dienen und dabei einen engen Abstand zwischen der oberen und der unteren Elektrode ohne Kurzschluss ermöglichen. Nun können die Muldenstellen bei niedrigen angelegten Spannungen getestet werden. Die Elektroden nehmen auch ein relativ großes Volumen der Mulde ein gegenüber dem Volumen der wässrigen DNA-Lösung mit der Target-DNA **18** (siehe Fig. 4). Es ist besonders wichtig, dass der Abstand zwischen den oberen und den unteren Elektroden

in der Größenordnung der Länge (oder in Lösung Durchmesser) des Target-DNA-Moleküls ist. Daher ist das Verhältnis der Target-DNA zum Lösungsmittel im Zwischenelektrodenraum hoch, was die größte Empfindlichkeit gegenüber Vorhandensein oder Abwesenheit von Target-DNA während einer elektronischen Messung bewirkt.

[0052] Die Länge der Elektrodenfinger ist, wie in Fig. 3 und Fig. 5A gezeigt, etwa 100 μm und die Breite des Elektrodensets beträgt ebenso etwa 100 μm, wobei jeder Finger eine Breite von 2 μm hat, wie in Fig. 4 gezeigt, und einen Abstand von 2 μm.

[0053] Das ineinander verflochtene Design bringt eine Anzahl von Elektrodenperipherie und Probenvolumen auf einem kleinen Areal auf dem Wafer unter. Sein Verhältnis von Probenkapazität zu parasitierender Kapazität, bewirkt durch Leitungen, die zu der Stelle führen, ist groß.

[0054] Bezugnehmend auf die schematischen Teilsequenzansichten der Fig. 6A–Fig. 6F wird nun in diesem Zusammenhang ein alternatives Verfahren zum Herstellen der Teststellen **12A** beschrieben. Beachte: Wenn nicht spezifiziert, sind die Schichtdicken wie in den Fig. 5A–Fig. 5D angegeben. Eine SiO_2-Schicht **50** wird auf einem Si-Substrat **34** zum Wachsen gebracht (Fig. 6A). Der SiO_2-Film wird geätzt, um ein Array von 2 μm Breite mit Mulden **54**, die periodisch 2 μm von einander entfernt sind, zu bilden (Fig. 6B). Photolithographie und reaktives Ionenätzen bis zu einer Tiefe von etwa 0,5 μm wird verwendet, um die Mulde **54** zu bilden. Ein Polysilizium-Film **51** von etwa 2000 Å wird gebildet, beispielsweise durch CVD auf SiO_2-Schicht **50** (Fig. 6C). Die Bereiche des Films **51** auf dem Boden der Mulde und an der oberen Oberfläche werden durch reaktives Ionenätzen weggeätzt (Fig. 6D), wobei die Seitenwände aus Polysilizium **51** zurückbleiben. Die Seitenwände werden selektiv metallisiert **51'** durch Silizidierung unter Verwendung von W, Ti oder Pt (Fig. 6E). Am Ende werden Ni- oder Au-Elektroden **61** durch chemisches Plattieren auf den Silizidseitenwänden **51'** gebildet (Fig. 6F).

[0055] Die Fig. 6G und Fig. 6H zeigen alternative Ausführungsformen der Fig. 6E bzw. Fig. 6F. In Fig. 6G ist der Boden der Teststelle texturiert, in diesem Fall durch Riefen, um die Oberfläche zu vergrößern. Demgegenüber sind in Fig. 6H sowohl Elektrode **61** als auch die Bodenwand gerieft. Diese Texturierung vergrößert die Oberfläche einer gegebenen Stelle und erlaubt mehr Proben für eine größere Empfindlichkeit aufzubringen.

III. Elektronische Hybridisierungs-Nachweisverfahren

A. Allgemeine Methodik

[0056] Der Sensor-Array **10**, wie er in den Fig. 1–Fig. 4 beschrieben ist, kann als Genosensor verwendet werden, um die Gegenwart oder Abwesenheit von Target-DNA-Strängen in jeder Teststelle **12** zu prüfen.

[0057] Bei einem Dekodierungstest wird eine große Anzahl an relativ kurzen Oligonukleotidsträngen (Proben **22**) zum Wachsen gebracht oder in jeder Teststelle **12** platziert, so dass ein Ende des Strangs an einer oder mehreren Oberflächen der Stelle angebracht ist. Die Kodierungssequenz aller Stränge an einer vorgegebenen Stelle **12** ist bekannt und identisch und die Kodierungssequenz jeder Stelle ist unterschiedlich und einzigartig auf dem Array. Eine Lösung **18**, die lange Stränge von unbekannter (Target-) DNA enthält, wird dann über den Chip gewaschen. Idealerweise bindet die unbekannte DNA fest an die Oligonukleotidstränge **22** an jeder Stelle, die das Komplement zu einem Teil ihrer eigenen Kodierungssequenz enthält, aber in keiner anderen Mulde. In der Praxis können einige schwach gebundene Target-Falschbindungen auftreten, aber diese können durch Abwaschen der Mulde mit einer geeigneten Lösung bei geeigneter Ionenkonzentration und Temperatur verringert werden. Demzufolge wird nach dem Waschen eine Anzahl von Mulden im Array eine signifikante Menge dieser gebundenen oder hybridisierten DNA enthalten und der Rest wird lediglich die originalen Oligonukleotid-Stränge in wässriger Lösung enthalten. Die Mulden werden dann elektrisch unter Verwendung der Elektroden **16** und **20** an jeder Stelle sequentiell abgefragt. Die Stellen, welche hybridisierte DNA enthalten, werden registriert. Beispielsweise werden Stellen ohne hybridisierte DNA unterschiedliche elektrische Eigenschaften haben, wie diejenigen mit hybridisierter DNA und werden nicht registriert. Bei der Resonanzfrequenz eines DNA-Moleküls in wässriger Lösung kann der imaginäre Teil ϵ'' der komplexen relativen Permitivität $\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon''$ der Lösung annäherungsweise um den Faktor 10 bis 100 Mal größer sein als der Wert für eine wässrige Lösung ohne die DNA. Die unten angegebenen Verfahren B, C, D und E sind dazu bestimmt, diese Differenz in ϵ'' an jeder Stelle **12** zu messen oder zu bestimmen. Auf dieser Datenbasis rekonstruiert ein „überlappender" oder „neuronales-Netzwerk-" Computer-Algorithmus im Schaltkreis **40** die komplette Kodierungssequenz der unbekannten DNA.

B. Dissipations-Faktor-Test

[0058] Fig. 7 ist eine Auftragung des Dissipations-Faktors gegen den Logarithmus der Frequenz für gebundene (hybridisierte) DNA (Kurve B) und ungebundene DNA (Kurve A) die zeigt, wie der Dispersionsfaktor D = ∈"/∈' sich verändert, abhängig davon, ob die DNA gebunden ist oder nicht. Beachte: Abhängig von den jeweiligen gemessenen Proben können die Kurven von Fig. 7 umgekehrt sein, d. h. Kurve B könnte auch ungebundene DNA repräsentieren. Dieser Unterschied im Dispersionsfaktor wird verwendet, um die Gegenwart oder Abwesenheit von hybridisierter DNA, die in einer Teststelle gemäß Fig. 1–6 gebildet wurde, zu bestimmen. Der Dissipations-Faktor an jeder Teststelle wird durch wohlbekannte Instrumentierung, wie zum Beispiel ein LCR-Meter in Schaltkreis **40** gemessen. Das Messinstrument wird dann nach und nach mit jeder der Stellen **12** über logische Schaltkreise **36** und **56** verbunden.

C. Wechselstromleitfähigkeits-Test

[0059] Ebenso kann die Gegenwart oder Abwesenheit von hybridisierter DNA durch Messung der Wechselstromleitfähigkeit G_{AC} = ∈" A/d an jeder Teststelle bestimmt werden. Dabei ist A die effektive Fläche einer Elektrode und d der effektive Abstand zwischen den Elektroden.

[0060] Bei der Relaxations-Frequenz eines gegebenen DNA-Moleküls muss die Wechselstromleitfähigkeit **100** Mal oder mehr größer sein als die Leitfähigkeit, wenn keine DNA vorhanden ist. Fig. 9 zeigt eine schematische Darstellung davon, wie dieser Test ausgeführt werden kann. Eine gepulste oder frequenzabgetastete Wellenform wird über die Elektroden **21B** und **20B** auf jede der Teststellen **12B** angewendet. Die Proben **22** sind auf jeder Elektrode gebildet und eine wässrige Lösung der Target-Moleküle wird in den Mulden **42B** der Teststellen **12B** gebildet. Die Gegenwart von hybridisierter DNA wird bei einer DNA-Resonanzfrequenz, wie in Fig. 10 gezeigt, bestimmt.

[0061] Ein LCR-Meter kann für die Messung von G oder R = 1/G bei einer diskreten Frequenz verwendet werden. Alternativ kann, wie in Verbindung mit den Fig. 9 und Fig. 10 diskutiert, G als Funktion der Frequenz gemessen werden.

D. Übertragungsverlust-Bestimmungstest.

[0062] Signalverlust auf einer Übertragungsleitung wirkt sich ebenfalls empfindlich auf ∈" aus. Durch Einbringen einer Übertragungsleitung **11** zwischen die X- und Y-Leitungen an jeder Teststelle (wie in Fig. 8 gezeigt) kann die elektrische Bestimmung von hybridisierten Molekülen wie zum Beispiel DNA durch skalare Messung des RF-Verlustes einer elektromagnetischen Welle, die entlang der Leitung **11** jede der Teststellen **12A** passiert, ausgeführt werden. Leitung **11** kann eine Mikrominiatur-Version einer Trennleitung, einer Mikroleitung, eines Wellenleiters, eines koplanaren Wellenleiters, einer Schlitzleitung oder einer Koaxialleitung sein. Um ein Maximum an Empfindlichkeit mit diesen Verfahren zu erreichen, wird die Teststellen-Mulde **42A** relativ breiter und/oder länger gemacht als die Mulden in Fig. 4 und die Länge der Übertragungsleitung in der Mulde wird durch Anordnen in Mäander-Form maximiert.

E. Puls- und Pieps-Verfahren für die Bestimmung

[0063] Wie in Fig. 11 gezeigt, kann eine abgetastete Frequenz oder Spannung mit Piepsspannungswellenform V_i über die Elektroden an jeder Stelle angewendet werden, und die entstandene Antwortwellenform V_0 (Fig. 12 oder **Fig.** 13, abhängig davon, ob die Frequenz sich erhöht oder erniedrigt) wird analysiert, um die Gegenwart von hybridisierter DNA zu bestimmen, was durch ein Maximum bei der Frequenz der hybridisierten DNA angezeigt wird. Die Messung der Relaxations-Frequenz der hybridisierten DNA unter Verwendung einer frequenz-abgetasteten Wellenform gibt zusätzliche Information über die Eigenschaften der hybridisierten DNA, z. B. vernetzt gegenüber nicht vernetzt.

F. Mikromechanische Resonator-Bestimmungsverfahren

[0064] Bei dieser Anordnung wird eine Vielzahl von mechanischen Resonatorstrukturen an den Teststellen gebildet, die in einem Siliziumwafer **34C**, wie in Fig. 14 gezeigt, gebildet sind. Die Resonatorstruktur enthält eine untere Metallsensorelektrode **20C**, die sich in der X-Richtung erstreckt und einen oberen Membranresonatorfilm **21**, vorzugsweise aus Siliziumnitrid oder Metall, wie zum Beispiel Tantal, der sich entlang der Y-Richtung in der Ebene des Wafers erstreckt. Typischerweise hat die Membran eine Größe von etwa 100 µm im Durchmesser oder in Breite/Länge. Eine dielektrische Lücke **60**, vorzugsweise aus Luft, wird zwischen den

oberen und unteren Bauteilen **21C** und **20C** gebildet.

[0065] Eine Teststellenmulde **42C** wird über der Membran **16C** gebildet und die Proben **22C** in den Muldeoberflächen gebildet. Target-DNA-Lösung **18C** wird in der Testmulde **42C** abgegeben. Die mechanische Aushöhlung **60** zwischen der oberen und unteren Elektrode **16C** und **20C** bildet einen Resonator. Dieser Resonator hat eine Resonanzfrequenz im Kilohertz- bis Multimegahertzbereich mit einer schmalen Resonanzbandbreite.

[0066] Ein sich über den Resonator fortpflanzendes RF-Signal erzeugt eine charakteristische Hoch-Q-Antwort mit einer engen Bandbreite. Eine Verschiebung entweder von Q oder der Resonanzfrequenz weist auf die Gegenwart von hybridisierten Molekülen auf der Resonatoroberflächenelektrodenmembran **21C** hin.

[0067] Die Membranelektrode **21C** kann aus einem dünnen Film aus Siliziumnitrid unter Verwendung von chemischer Dampfablagerung bei einem gut kontrollierten Silizium- zu Stickstoffverhältnis und kontrollierter erhöhter Temperatur gebildet werden, um die Filmspannung einzustellen, wenn auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Membranen können auf unstrukturierten Silikonwafern gebildet werden und dann als freistehende Strukturen abgelöst werden, indem ein Siliziumfenster von der Rückseite her herausgeätzt wird. Beispiele für mechanische Resonatoren und Einzelheiten dieser wie oben beschriebenen zu verwendenden Konstruktion sind in Buser et al., „Silicon Pressure Sensor Based on a Resonating Element" Sensors and Actuators, A, 25-27 (1991) 717-722 und Prab et al. „Q-Factor and Frequency Shift of Resonating Silicon Diaphragms in Air" Sensors and Actuators A, 25-27 (1991) 691-698 gegeben.

H. Oberflächenakustik oder elektromagnetische Wellenbestimmungsverfahren

[0068] Eine ähnliche Klasse von Resonanzarraydetektoren kann aus Oberflächenwellenbauteilen gebildet werden, beispielsweise indem oberflächenakustische Wellen (SAW) oder oberflächenelektromagnetische Wellen eingesetzt werden. Im Falle eines SAW-Detektors, wie in Fig. 23 gezeigt, wird eine Resonanzstruktur **700** gebildet, wobei ein akustischer Übertrager **702** und ein SAW-Reflektor **407** verwendet werden. Die abgetastete Frequenzwelle W aus Quelle **708** wird über das akustische Medium **706** gestartet (vorzugsweise ein Lithiumniobat oder Quarzkristall). Der Reflektor **704** induziert diskrete Höhlenresonanzen, die durch Messung der durch den Übertrager abgebauten Energie mit dem Messinstrument **710** bestimmt werden. Teststellen **712** werden auf dem Medium gebildet. Jede Stelle kann einen zugeordneten Übertrager und Reflektor haben oder auf dem Substrat kann ein Multiplexer gebildet werden, um einen einzelnen Übertrager mit mehreren Stellen zu koppeln. Stellen mit daran gebundenen Target/Probenpaaren verschieben die Resonanzfrequenzen. Demzufolge werden Stellen mit daran gebundenen Proben bestimmbar. Als Übertrager **702** kann eine miteinander verflochtene Aluminiumdünnfilmstruktur, die auf das Lithiumniobatkristallsubstrat **706** aufgedampft wurde, angewendet werden. Der Reflektor **704** kann ein Aluminiumdünnfilmgitter sein. Standardphotolithografie und Verdampfen werden verwendet, um diese Strukturen zu bilden.

[0069] Alternativ kann die Phase der SAW-Welle nach dem Durchgang durch eine Teststelle in einer Übertragungsleitung mit einer Referenzübertragungsleitung verglichen werden, die im Substrat gebildet wird und die Phasenverschiebung, die durch die Bildung bewirkt wird, dazu verwendet werden festzustellen, welche Stellen gebundene Moleküle besitzen.

IV. Optische Hybridisierungsbestimmungsverfahren

A. Monolithischer integrierter CCD-Bilderzeuger/Ausleser

[0070] Bezugnehmend auf die schematische Querschnittsansicht von Fig. 15 wird nun eine alternative Apparatur beschrieben, die optische Detektion durch Verwendung eines monolithischen integrierten ladungsgekoppelten Vorrichtungs-(CCD) Sensors verwendet, um die Gegenwart oder Abwesenheit von hybridisierten Molekülen in einer Testmulde zu bestimmen.

[0071] Arrays **200** von ladungsgekoppelten Vorrichtungen (CCDs) werden als integrierte Schaltkreise auf Siliziumwafern **212** gebildet, um eine bilderzeugende Funktion zu gewährleisten. Der CCD-Array **200** liest Ladung aus, die unterhalb der Detektorelektroden **220** gebildet wird, wenn Lichtphotonen (hv) auf nicht-hybridisierte Teststellen **218A** auftreffen.

[0072] Die Wellenlänge des Lichts (hv) wird so ausgewählt, dass sie zu einer bekannten Absorptionslinie einer hybridisierten DNA passt. Die Empfindlichkeit des Verfahrens wird durch Verwendung von absorbierenden

Farbstoffen wie zum Beispiel Ethidiumbromid, welches sich selektiv in die hybridisierte DNA einschaltet, erhöht. Das Licht passiert relativ wenig abgeschwächt die nicht-hybridisierten Teststellen **218A**, wird aber durch die gebundenen Moleküle oder den Farbstoff in den hybridisierten Teststellen **218B** abgeschwächt.

[0073] Die Lichtphotonen induzieren eine Ladung **223** im Siliziumwafer **212** unterhalb der unter den nicht-hybridisierten Mulden **218A** liegenden Elektrode **220**. Solche Ladungen werden dann aus dem CCD-Array in wohlbekannter Art und Weise ausgelesen und verarbeitet, um die Teststellen, welche hybridisierte Moleküle enthalten, zu identifizieren.

[0074] Der CCD-Array-Gensosensor **200** aus Fig. 15 wird durch Wachsenlassen einer Feldoxidschicht **214** aus SiO_2 auf einem epitaxialen Si-Wafer/Substrat **212** gebildet. CCD-Gate-Elektroden **220** werden dann durch Sputtern von Metallen wie zum Beispiel Tantal oder Wolfram auf dem Oxid **214** gebildet. Eine dielektrische oder Polymerschicht **216**, vorzugsweise aus lichtdurchlässigem Material wie Siliziumnitrid oder Glas, SiO_2 oder Polyimid wird dann über den Elektroden gebildet. Mulden **230** werden dann in der Schicht **216** direkt oberhalb der Gate-Elektroden **220** gebildet. Die Mulden werden mit einer dünnen Schutzschicht (nicht gezeigt) passiviert, wie zum Beispiel Siliziumnitrid oder Aluminiumoxid, um den Abbau des CCD-Bausteins, wenn er einer wässrigen Lösung ausgesetzt wird, zu verhindern. Standardlithografische Techniken werden verwendet, um die Gates und Mulden auszurichten.

[0075] Proben (nicht gezeigt) werden dann in den Mulden **230** gebildet, um jede Teststelle **218** vor dem Einbringen der wässrigen Testlösung **224** zu individualisieren.

[0076] Bei einer alternativen Anordnung werden die Target-Moleküle mit Markierungen unter Verwendung irgendeines wohlbekannten Markierungsmechanismusses, wie zum Beispiel mit Fluoreszenzfarbstoffen, Radioisotopen oder Chemolumineszenz markiert. Der CCD-Array wird, wie in Fig. 15 gezeigt, mit einem epitaxialen Si-Substrat **212**, einem Feldoxid **214**, CCD-Gates **220**, dielektrischer Schicht **216** und Mulden **230** gebildet.

[0077] Die Testbereiche werden jeweils mit einzigartigen Proben (nicht gezeigt) und Testlösungen **224**, welche die markierten Targets enthalten, versehen. Die Targets können mit lumineszentem oder chemolumineszentem oder radiologischem Material markiert werden. Die Teststellen, welche hybridisierte markierte DNA enthalten, emittieren Strahlungen, die durch Auftreten einer Ansammlung von Ladung in einem Bereich unterhalb eines jeweiligen CCD-Gates **220** bestimmt wird.

[0078] Vorzugsweise wird bei der markierten Target-Ausführungsform ein Filter **250**, der aus einem Aluminium- oder Wolframmetallgitter oder einem dielektrischen Multischichtinterferenzfilter gebildet wird, in der dielektrischen Schicht **216** zwischen Mulde **230** und der Metallelektrode **220** gebildet. Der Filter **250** ist so ausgeführt, dass er die Anregungsstrahlung (hv) oder α-, β-, γ-Partikel blockiert und die Sekundäremission **240** passieren lässt. Die Sekundäremission ist entweder Licht oder andere Teilchen, wie zum Beispiel Elektronen, die durch die Anregung stimuliert wurden. Der chemolumineszente Ansatz erfordert die Umwandlung von chemischer Energie in elektromagnetische Strahlung. Bevorzugte Materialien sind stabilisierte 1,2-Dioxetane. Im Gegensatz zu anderen chemolumineszenten Modalitäten können enzymkatalisierte 1,2-Dioxetan-Derivate ein Lichtsignal erzeugen, welches Stunden bis Tage andauert. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist in der Nähe von 477 nm und die Emission kann durch Kontrolle des pH kontrolliert werden. Bei 477 nm beträgt die Quanteneffizienz des einzusetzenden CCD lediglich etwa 13 %. Daher kann es notwendig sein, das chemolumineszente Signal zu verstärken. Verfahren zur Verstärkung schließen die Zugabe von wasserlöslichen Makromolekülen (zum Beispiel bovines Serumalbumin) ein, um das chemolumineszente Signal zu verstärken.

[0079] Die Vorteile der Verwendung von 1,2-Dioxetanen sind vielfältig. Zusätzlich dazu, dass keine radioaktive Aussetzung stattfindet, ist dieses Verfahren relativ einfach auszuführen (Reagenzien und Ausrüstung sind preiswert). Letztendlich hat dieses Verfahren einen geringen Hintergrundrauschanteil und eine große dynamische Bandbreite.

[0080] Bei einer alternativen zweiteiligen Implementierung, wie in Fig. 16 gezeigt, wird der Probestellenarray **200'** auf einem separaten dünnen transparenten Substrat, wie zum Beispiel einer 10-Mil dicken Pyrexplatte **270** gebildet. Diese separate Platte wird mit präzisen Ausrichtungsmerkmalen, wie zum Beispiel geätzten oder aufgedruckten Gittern (nicht gezeigt) ausgerüstet, um eine präzise automatisierte Überlagerung der getrennten Probenplatte auf einen getrennten CCD-Array **260** zu erlauben. Jede Array-Stelle auf der Probenplatte wird mit einzigartigen Proben sensibilisiert. Das CCD-Array wird dann mit oder ohne blockierende Filter **250** gemäß Fig. 15 hergestellt. In einer Ausführungsform wird eine Analyse durchgeführt, indem die Probenplatte in kontrollierte Nähe über das CCD-Array gebracht wird, ohne eine Linse zu verwenden, um die Platte auf dem CCD

abzubilden. Die Bestrahlung der Platte erfolgt wie in jeder der oben diskutierten Ausführungsform in Verbindung mit Fig. 15. Eine weitere Alternative besteht darin, die separate Probenplatte **200'** auf dem CCD-Array **260** unter Verwendung einer Linse abzubilden. Dies erlaubt eine größere Trennung zwischen der Platte und dem CCD-Array, wenn zum Beispiel Sekundärfluoreszenz verwendet wird und erlaubt die Abtrennung der Anregung und der Fluoreszenz durch schiefes Anregen der Probenplatte. Abbildung mit Vergrößerung oder Verkleinerung ist möglich, so dass die Probenplattenabmessungen getrennt vom CCD optimiert werden können.

[0081] Das CCD-Device, welches verwendet wird, um das Probenarray für jede dieser Geometrien zu kontrollieren, kann von herkömmlicher Art sein und empfindlich für ultraviolettes und sichtbares Spektrum. Ein alternativer Ansatz ist die Verwendung eines infrarotwärmeempfindlichen Array-Detektors, wie zum Beispiel einem Platinsilizid- oder Iridiumsilizid-Infrarotbilderzeuger. Diese letztere Auswahl erlaubt die direkte Kontrolle von Wärme, die von der Probenanordnung während einer biochemischen Reaktion, wie zum Beispiel einer Hybridisierung oder einer Antikörperwirkung, entwickelt wird. DNA-Hybridisierung und andere wärmeentwickelnde Reaktionen können direkt durch ihre thermische Charakteristik während der Reaktion gemessen werden. Die Infrarotdurchlässigkeits- und Reflektionseigenschaften des Produkts (zum Beispiel hybridisierte DNA) sind wesentlich verschieden von den Reaktanten aufgrund der Bildung von neuen Molekularbindungen mit neuen Absorptionen von infrarotaktiven Schwingungs- und Rotationsmoden im Produktmolekül. In der Konfiguration der Fig. 15 und Fig. 16 können die thermischen Eigenschaften auch durch Kontrolle des thermisch erzeugten Rauschens bei herkömmlich sichtbarer Wellenlänge oder einem IR-Detektor-Array kontrolliert werden. In diesem Fall wird die Wärme, die durch die biochemische Reaktion erzeugt wird, durch thermische Übertragung über die dünnen Apparaturschichten übertragen und als Rauschsignal an Elektrode **220** gemessen. Das Array kann außerdem mit infrarotem, sichtbarem oder ultraviolettem Licht gemäß Anordnung in Fig. 15 strahlungsgeflutet werden. In diesem Fall wird Licht speziell aus einem zum Produkt gehörenden Absorptionsband (zum Beispiel hybridisierte DNA) gewählt. Im unreagierten Zustand fällt die Strahlungsflut durch die Mulde und wird durch Filter **250** reflektiert. Mulden, in denen die gewünschte Reaktion aufgetreten ist, werden bei der Flutstrahlungswellenlänge absorbierend. Nach der Absorption ändert sich die Flutbestrahlung automatisch in Wärme und wird, nachdem sie in die Vorrichtung unterhalb der aktiven Muldenstelle geleitet wurde, gemessen.

V. Probenbildung

A. Allgemeines

[0082] Ein Verfahren zur Bildung des Array **10** verwendet Proben, die an Teststellen **12** im Array angeheftet sind. Unterschiedliche Proben entsprechend dem Typ des erwünschten Targets können an den Teststellen **12** angebracht werden. Oligonukleotide, ein- oder zweisträngige DNA oder RNA, Antikörper oder Antigen-Antikörperkomplexe, Tumorzellen und andere Testproben, die dem Fachmann bekannt sind, können verwendet werden. Die Proben werden an den Teststellen durch Befestigung an ein festes Trägersubstrat auf der Oberfläche der Mulden **42** befestigt oder alternativ direkt auf die Elektroden **16** oder **20**, wie in Fig. 4 gezeigt, befestigt. Die festen Trägersubstrate, die verwendet werden können, um die Oberfläche der Mulden **42** zu bilden, beinhalten organische oder anorganische Substrate wie zum Beispiel Glas, Polystyrole, Polyimide, Siliziumdioxid und Siliziumnitrid.

[0083] Die festen Trägersubstrate oder die Elektroden müssen funktionalisiert werden, um eine Oberflächenchemie zu erzeugen, die für die Bildung von kovalenten Bindungen mit den ausgewählten Proben förderlich ist. Als ein Beispiel kann ein Glasträger mit einer Epoxidgruppe durch Reaktion mit einem Epoxisilan funktionalisiert werden. Die Epoxidgruppe auf dem Träger reagiert mit einer 5'-aminoderivatisierten Oligonucleotidprobe und bildet eine sekundäre Aminbindung, wie von Parkam and Loudon, BBRC 1:1-6 (1978) beschrieben. Die Bildung dieser kovalenten Bindung befestigt die Proben 26 auf der Trägeroberfläche am gewünschten Array. Beispiele funktionalisierter Polystyroloberflächen beinhalten 5'-Aldehyd- oder Carbonsäurederivate, gekoppelt an hydrazid-aktiviertes Polystyrol, wie von Kremsky et al., (1987) Nucl. Acids Res. 15:2891-2909 beschrieben und 5'-Aminoderivate, gekoppelt an Polystyrol, welches durch Diazotierung aktiviert wurde und 5'-Phosphatderivate, gekoppelt an aminofunktionalisiertes Polystyrol, wie von Lund et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:10861-10880 beschrieben.

[0084] Für die direkte Befestigung der Proben an den Elektroden muss die Elektrodenoberfläche mit Materialien gefertigt werden, die dazu fähig sind, Konjugate mit den Proben zu bilden. Materialien, die in die Oberfläche der Elektroden eingebracht werden können, um direktes Befestigen von Proben zu ermöglichen, beinhalten Elektrometallmaterialien wie zum Beispiel Gold, Nioboxid, Iridiumoxid, Platin, Titan, Tantal, Wolfram und andere Metalle. Diese Elektrometalle sind dazu fähig, stabile Konjugate direkt auf der Plattenoberfläche durch Bindungen mit organischen Thiolgruppen, die in die Probe eingebracht wurden, zu bilden, wie von Whitesides

et al. (1990) Langmiur 6:87-96 und Hickman et al. (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:1128-1132 beschrieben. Als ein Beispiel bildet eine synthetische DNA-Probe, markiert mit einer Thiolgruppe entweder am 5'- oder am 3'-Ende, ein stabiles Konjugat mit einem Metall, wie zum Beispiel Gold, auf der Plattenoberfläche, um ein Array von direkt befestigten Proben zu erzeugen.

B. Array-Sensibilisierung

[0085] Die Proben an jeder Teststelle müssen eindeutig dazu fähig sein, an ein bekanntes molekulares oder zelluläres Target zu binden. Die Proben können außerhalb des Chips gebildet (synthetisiert) und durch Robotermanipulation mit Mikropipetten in jede Teststelle eingebracht werden. In dieser Ausführungsform sind die Proben an Gold oder SiO_2 oder andere Materialien der Teststelle durch Maßnahmen der Anbindungschemie, wie zuvor beschrieben, gebunden. Dieses Verfahren ist ausreichend dafür, Probenarrays von geringer Dichte (bis zu etwa 100/cm) herzustellen.

[0086] Alternativ können die Proben an jeder Teststelle hergestellt werden. Dieses Verfahren basiert auf der Tatsache, dass Schlüsselschritte der Probenherstellung temperaturabhängig sind. Durch Anheben der Temperatur einer Oberfläche in ortsselektiver Art und Weise kann die Probenchemie zu speziellen Teststellen innerhalb eines Arrays dirigiert werden. Dieser Ansatz ist im Teilschema der Fig. 17 gezeigt.

[0087] Als ein Beispiel für diese Ausführungsform wird ein Array **400** mit Teststellen **412**, wie zuvor in den Fig. 1–Fig. 4 gezeigt, gebildet. In einer Ausführungsform dieses Ansatzes werden die Proben auf einer zugänglichen SiO_2-Oberfläche synthetisiert. Um die Probensynthese zu beginnen, wird zunächst eine Verbindungssubstanz an die Oberfläche geheftet. Um die Verbindungssubstanz zu befestigen werden die Testellen in ein Epoxysilanz (Fluid A) eingetaucht, welches ein Epoxid kovalent an die Oberfläche bindet. Das Epoxid wird dann hydrolisiert und dann mit Tritylchlorid blockiert, um die erhaltene primäre Hydroxylgruppe zu schützen.

[0088] Um die Probensynthese zu beginnen, wird das Array in eine schutzgruppenabspaltende Lösung eingetaucht, typischerweise verdünntes Dichloracetat in Alkohol. Ein Laserstrahl **414**, erzeugt von einem Laser **416**, wird dann mechanisch durch ein Galvanometerscansystem **418** über den Array gescannt.

[0089] Der Laser hat den Zweck, die Oberfläche an ausgewählten Teststellen zu erwärmen. Die Arbeit des Strahls wird durch einen logischen und schaltenden Schaltkreis **420** kontrolliert, der darauf programmiert ist, ausschließlich die Teststellen **412** zu bestrahlen, an denen die Schutzgruppenabspaltung erwünscht ist. Nach der Bestrahlung wird die Lösung zur Schutzgruppenabspaltung dann entfernt, wobei an den Stellen, an denen bestrahlt wurde, freie OH-Gruppen erhalten werden. Die Teststellen mit freien OH-Gruppen sind nun für die Addition mit den Nucleinsäurebasen frei.

[0090] DNA-Probensynthese kann nun auf dem Array durchgeführt werden. Jede bekannte Chemie einschließlich Phosphoramidit-, Phosphotriester- oder Hydrogenphosphonatverfahren kann eingesetzt werden. Der Chip wird in eine Lösung eingetaucht, die einen der aktivierten Basenprecursor, zum Beispiel Adenosin (A), enthält und diejenigen Teststellen, die im vorhergehenden Schritt bestrahlt wurden, werden sich mit A verknüpfen.

[0091] Wenn man der üblicherweise für die Oligonucleotidsynthese eingesetzten Standardphosphodiesterchemie folgt, wird der Chip dann in die schutzgruppenabspaltende Lösung wieder eingetaucht und dann nochmals bestrahlt. Beispielsweise soll angenommen werden, dass Teststellen bestrahlt werden, an die Guanosin (G) geknüpft werden soll. Nach der Bestrahlung wird aktiviertes G zugegeben und das Verfahren der Synthese einer zweiten Phosphodiesterbindung wird wiederholt.

[0092] Der Arbeitszyklus wird dann auf dem Chip für Thymidin und dann für Cytosin ausgeführt. Im Ganzen sind aufgrund der vier Nucleinsäurebasen vier Bestrahlungszyklen erforderlich, um den Probenarray um eine Nucleinsäurenuntereinheit zu erweitern. Um ein Array mit 10-Basen-langen Proben herzustellen, sind vierzig Zyklen erforderlich.

[0093] Die Laserinitiierung der Reaktion tritt entweder durch lokale Erwärmung oder durch Photochemie auf. Eine bevorzugte Ausführungsform verwendet einen Laser mit einer sichtbaren Wellenlänge oder einen UV-Argon-Ionenlaser in Kombination mit einem Galvanometerscansystem, um die photochemische Synthese zu initiieren. Alternativ kann ein Argon- oder ein Infrarotlaser für die Initiierung der Synthese durch lokale Erwärmung einer Array-Stelle verwendet werden, da bekannt ist, dass Synthesereaktionen hoch temperaturempfind-

lich sind.

[0094] Das Verfahren kann ebenfalls auf die Synthese von Peptiden oder anderen polymeren Proben auf festen Trägern angewendet werden, basierend auf dem Prinzip der thermisch adressierbaren Schutzgruppenabspaltung. Zum Beispiel wird im Fall der Peptidsynthese eine ortsselektive Peptidsynthese durch thermische Entfernung der fmoc-Schutzgruppen, typischerweise in verdünnter Base, erreicht, gefolgt durch Kappen und die anderen üblichen Schritte zur Peptidsynthese.

[0095] Alternativ kann eine „Kleber"-Schicht an einer Teststelle durch gescannte Laserbestrahlung lokal aktiviert werden, s. Fig. 26A–D (oder deaktiviert) oder lokal angewendet werden, Fig. 25A–D. In dieser Anordnung wird der ultraviolette, sichtbare oder Infrarotlaser verwendet, um photochemisch oder thermisch die Hafteigenschaften der gewünschten Arraystellen zu ändern. Die Probenlösung, zum Beispiel vom Typ A, wird dann über das Array gewaschen, was in einem lokalen Anhaften der Proben vom Typ A an den gewünschten Stellen resultiert. Die Probenlösung vom Typ A wird dann schnell vom System abgespült, eine zweite Laserbestrahlung an neuen Arraystellen durchgeführt und eine Probenlösung vom Typ B eingeführt, um Proben vom Typ B anzuheften. Das Verfahren wird wiederholt, um das gesamte Array zu sensibilisieren.

[0096] Array-Sensibilisierung kann erreicht werden, indem beispielsweise ein CW-Argon-Ionen- oder CW-Nd:YAG-Laser unter Verwendung von Scanoptiken wie Galvanometern oder rotierenden Spiegeln verwendet wird oder ein fixierter Laserstrahl mit einem computerkontrollierten X-Y-Gerüst. Ein Aktivierungs- oder Deaktivierungsprozess in einer „Kleb"-Schicht kann vorzugsweise unter Verwendung eines kurz-gepulsten Lasers wie zum Beispiel einem gepulsten Nd:YAG-Laser oder Excimer-Laser bewirkt werden. Ein ausgezeichneter Ansatz ist, einfach die „Kleb"-Schicht **902** zur „Entschützung" zu bedecken und dabei den „Kleber" durch Abtragen eines passivierenden Materials **904**, das über den „Kleber" aufgebracht wird, offenzulegen (s. Fig. 26A–D). Beispiele für „Kleb"-Schichten sind Epoxide, Thiole oder hydrophile, zum Beispiel hydratisierte Oberflächen. Passivierungsmaterialien können hydrophobe Materialien wie zum Beispiel fluor-terminierte Fluorkohlenstoffe oder die Derivate von Hexamethyldisilizan sein.

[0097] Fig. 25A–D und Fig. 26A–D zeigen zwei alternative Verfahren für die Probenbildung unter Verwendung des „Kleb"-Ansatzes. Weiterhin zeigt jede zwei alternative Wege, um die Teststellen zu aktivieren. Ein Weg besteht darin, ein programmierbares Element wie zum Beispiel ein Heizelement **906** zu verwenden, das unterhalb einer Teststelle eingebettet ist, um eine thermische Reaktion an der Teststelle zu induzieren und somit eine Klebeschicht **920** zu erzeugen oder abzulagern, an der die Proben haften. Vollständig synthetisierte Proben **912** werden über die Stellen gewaschen und haften an den offenen Klebschichtstellen **920**, Fig. 25D. Danach wird eine andere Stelle gebildet oder bloßgelegt und eine andere Probe angeheftet. Alternativ wird externe Bestrahlung wie in Fig. 25B verwendet, um die Klebeschicht **920** zu bilden, oder wie in Fig. 26B und C eine passivierende Schicht **904** abgetragen und eine Klebeschicht **902** offengelegt.

[0098] Zusätzlich zur Verwendung eines gescannten Laserstrahls kann ein alternatives „direktes Musterbildungs"-Verfahren unter Verwendung eines stationären Belichtungsstrahls mit einem rekonfigurierbaren „Licht-Ventil" **415** (in gepunkteter Linie in Fig. 17 gezeigt), wie zum Beispiel ein Flüssigkristalldisplay oder ein schaltbares Spiegelarray, der mit einem Laser oder einer intensiven Lampe beleuchtet wird, verwendet werden. Das illuminierte „Lichtventil" wird auf den Sensorarray **400** mit einem Linsensystem (nicht gezeigt) abgebildet. Die Pixelelemente im „Lichtventil" werden elektronisch „an" oder „aus" geschaltet, um die zugehörigen Bereiche, die im Sensorarray sensibilisiert werden sollen, auszuwählen. Eine ausgezeichnete „Lichtventil"-Vorrichtung für diesen Zweck ist beschrieben in J.A. Neff et al. (Proc. of the IEEE, Vol. 78, Nr. 5, Mai 1990).

[0099] Ein weiterer Ansatz für die On-Chip-Synthese von Proben wird beschrieben in der PCT Internationalen Veröffentlichungs-Nr. WO90/15070 mit dem Titel „Very Large Scale Immobilized Peptide Synthesis" von Pirrung et al., angemeldet auf Affymax Technologies mit dem Internationalen Veröffentlichungsdatum vom 13. Dezember 1990. Dieser Ansatz basiert eher auf lasergesteuerter Photochemie von Schutzgruppen als auf stellengesteuerter thermischer Chemie oder Oberflächen.

[0100] Ein weiteres Verfahren für die Synthese von Probesträngen verwendet die eingelagerten Widerstände **32**, beschrieben im Zusammenhang mit den Fig. 1 und Fig. 4, um lokal vorbestimmte Array-Teststellen zu erwärmen, ohne benachbarte Stellen wesentlich zu erwärmen. Dies ermöglicht das Stattfinden von thermisch aktivierter Synthese von Proben wie zum Beispiel kurzen Oligonucleotidsträgen in situ als Antwort auf das Anlegen von Spannungen über ausgewählte Widerstände. Alternativ können hohe Ströme angewendet werden, um alle Widerstände zu erwärmen, mit Ausnahme von denen, die sich in der Nähe der Mulden befinden, in denen eine Reaktion erwünscht ist. Bei dieser Alternative werden nicht-synthetisierte Mulden bei einer Tempe-

ratur oberhalb der gewünschten Synthesetemperatur gehalten, wobei eine Synthesereaktion in diesen Mulden verhindert wird.

[0101] Der elektrisch adressierbare Teststellenarray der Erfindung stellt außerdem die Fähigkeit zur Verfügung, elektronisch eine Synthesereaktion in einer gegebenen Mulde, einer Reihe oder einer Spalte von Mulden durch Anwendung eines elektrischen Potentials auf die Elektroden einer solchen Mulde oder von Mulden zu starten oder zu katalysieren.

[0102] Das Potential kann dazu verwendet werden, um chemische Reaktanden aus den in der Nähe der Mulden abgelagerten Lösungen anzuziehen und/oder eine spezielle chemische Reaktion in den Mulden zu katalysieren.

[0103] Weiterhin kann die Hybridisierung zwischen Target-Molekularstrukturen und fertigen Proben durch die Anwendung eines elektrischen Potentials auf die Elektroden kurz nachdem die Target-Lösung auf die Teststellen aufgegeben wurde erhöht werden. Ohne Anwendung eines Potentials müssen die Targetmolekularstrukturen durch die Lösung zu den Proben hin diffundieren. Wegen der Ineffizienz solch eines Diffusionsprozesses muss man typischerweise 1,5 bis 2 Stunden reagieren lassen, bis signifikante Hybridisierung stattfindet und auch dann verbleibt eine wesentliche Anzahl von Proben unhybridisiert. Ein elektrisches Potential kann geladene Targetstrukturen direkt zu Proben in der Nähe von oder angeheftet auf die Elektroden ziehen, was in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung sowohl die Hybridisierungsrate als auch die Gesamtanzahl von Target/Probenhybridisierungen, die üblicherweise in einem gegebenen Experiment hergestellt werden können, erhöht. Umgekehrt kann ein umgekehrt ausgerichtetes Potential anschließend angelegt werden um dabei zu helfen, unhybridisierte und falsch gebundene Targetmoleküle herunterzuwaschen (zu entfernen). Diese Technik ist nicht nur auf die elektronischen Genosensoren der Fig. 1 bis Fig. 9 anwendbar, die Elektroden in jeder Teststelle besitzen, sondern kann auch sowohl bei den mikromechanischen Resonator- als auch bei den CCD-basierten Ansätzen unter Verwendung entweder der Elektroden, die innerhalb oder unter jeder Teststelle vorhanden sind, oder durch Herstellung von einer oder mehrerer zusätzlicher Elektroden an jeder Teststelle für diesen Zweck eingesetzt werden.

[0104] Alternativ kann das Potential, welches an einzelne Mulden angelegt wird, auch dazu verwendet werden, einen Stromschub durch die Muldenstruktur zu schicken, der dazu ausreicht, eine „Kleber"-Schicht oder eine Kleber passivierende Schicht, ähnlich zu der im oben beschriebenen letzten Verfahren, zu verdampfen. Sensibilisierung des Arrays ist ähnlich dem elektronischen Programmieren eines Arrays von elektrischen Sicherungen.

[0105] Bezugnehmend auf die Fig. 18 und Fig. 19 wird im Folgenden ein mikrofluides System zur Herstellung von einzigartigen Genosensorproben in situ an eine Teststelle beschrieben. Bei dieser Ausführungsform sind die Reagenzienquellen **352** individuell über die Kanäle L1, L2-LN an die jeweiligen Mikrokanalventile V1, V2-VN, die in einem geeigneten Substrat **341** gebildet wurden, fluidgekoppelt. Die Ventile V1-VN ermöglichen den Fluss von Lösung in die mannigfaltige Linie L4. Eine mikrofluide Peristaltikpumpe P1 drückt die Lösung auf den Array **10'**, der von laserstrahlungsdurchlässigen Filmen **344** und **343**, wie zum Beispiel Siliziumnitrid oder Siliziumdioxid, eingeschlossen ist.

[0106] Strahlung aus Laser **416'** wird selektiv auf individuelle Teststellen **12'**, die auf dem Substrat **341** gebildet werden, in Übereinstimmung mit dem zuvor beschriebenen Scan- oder Abbildungsverfahren projiziert. Das Laserscannen der Teststellen induziert eine lokale Aktivierung der jeweiligen Stellen, wenn die Einlasslösungsflüssigkeiten schnell unter Verwendung der Ventile V1-VN geschaltet werden.

[0107] Das komplette Fluidsystem, wie auch der Array, können auf einem einzelnen Chip eines Halbleiters oder eines dielektrischen Materials, wie zum Beispiel Si, Glas, Al_2O_3, etc., gebildet werden. Kanäle **432** werden in das Substrat **341** unter Verwendung von konventioneller Photolithografie und Ätzmitteln geätzt oder durch mikromechanische Techniken eingebracht. Ein Array **10'** von Teststellen **12'** wird auf dem Substrat gebildet, wie in Zusammenhang mit den Fig. 1–6 beschrieben.

[0108] Das mikrofluide Fließsystem, wie in Fig. 19 abgebildet, kann wie folgt gebildet werden. Ein Photoresistmaterial wird auf ein Substrat **341**, welches beispielsweise aus Pyrexglas gebildet wurde, spingecoatet. Die Mikrokanalstruktur wird dann unter Verwendung von Standardphotolithografie im Photoresist gebildet und das Muster einschließlich der Kanalstrukturen **343** und **342** in das Substrat durch Ätzen unter Verwendung von gepufferter HF übertragen. Eine Membranaktivierungsschicht **344** aus vorzugsweise einem piezoelektrischen Material wie zum Beispiel Bleizirkoniumtitanat oder PVDF-Polymer und Metallelektroden wird dann auf die Mi-

krokanalstruktur gebunden. Während der Sensibilisierung wird der Array **10'** gegen das mikrofluide System vorzugsweise unter Verwendung eines elastomeren O-Rings **345** abgedichtet. Alternativ machen Aktivierungschichten, wie sie dem Fachmann bekannt sind, eher Verwendung von Legierungen mit Formgedächtnis als von piezoelektrischen Stoffen oder basierend auf passiven Materialien, die elektrostatisch deformiert werden, beispielsweise Aluminiumfilme, die durch Gleichspannungen, die an Elektroden angelegt werden (nicht gezeigt) gebogen werden.

[0109] Die Massenproduktion der Fließkanalstruktur ist unter Verwendung der oben genannten photolithographischen Techniken machbar. Für gewisse Kanalformen ist es bevorzugt, Lasermikromaschinentechniken wie zum Beispiel solche, die für die Ätzung von Silizium in einer Chlorumgebung entwickelt wurden, zu verwenden. Sowohl durch Verwendung der Photolithographie als auch durch Verwendung von Mikromaschinen kann eine negative Gießform hergestellt werden und dann beispielsweise unter Verwendung von Thermokompressionsverfahren zu einer positiven Form repliziert werden.

VI. Mikrofluide molekulare Detektion

[0110] Die oben diskutierten Arrays arbeiten auf dem Prinzip des massiven parallelen Verwendens von Schablonen. Ein alternativer Ansatz ist in Fig. 20 gezeigt. Dieses System ist ein schneller serieller Mikrofluiddetektor, der mit Nanolitern oder Picolitern Lösungsvolumen arbeitet. Dieses System ist zusammengesetzt aus einem mikrohergestellten System von Kapillarkanälen und Ventilen V1-VN+3, verbunden mit einem Hauptkanal C1 und einem einzelnen (oder einigen verbundenen) hochempfindlichen Detektorarray(s) **480**, die wie zuvor beschrieben gebildet wurden. Ein stetiger aber geringvolumiger Strom einer Lösung, die unbekannte Moleküle enthält, wird unter der Verwendung der Verfahren, wie es oben in Verbindung mit den Fig. 18 und Fig. 19 beschrieben ist, vermischt. Die unbekannte Lösung wird sequentiell mit ähnlich kleinen Volumina einer Lösung gemischt, die einzigartige Chargen von Oligonucleotidsträngen aus den Quellen S1-SN+3 in fluidem Fluss enthält. Der Detektor **418** kontrolliert den Fluss um abzuschätzen, welche Oligonucleotidchargen mit den unbekannten Molekülen in einer Hybridisierungsreaktion reagiert haben. Hybridisierung kann bestimmt werden, wie zuvor beschrieben, entweder elektrisch oder optisch durch Beobachtung einer charakteristischen Verschiebung oder eines eindeutigen spektralen Merkmals in den elektrischen oder optischen Eigenschaften der Lösung, wenn sie durch den Detektor fließt. Ein wichtiges Merkmal dieses Systems gemäß Fig. 20, Fig. 18 und Fig. 19 ist die Verwendung eines extensiven Kanal- oder Kapillarnetzwerks, das ein minimales Totvolumen hat und schnellen Fliessgeschwindigkeiten, um ein sequentielles Verarbeiten des Flusses ohne diffusionsinduziertes Verschmieren der Chargen zu erlauben. Dieses Konzept ist unpraktisch bei der Verwendung von makroskopischen Röhren und Ventilen, weshalb es bevorzugt ist, ein solches Netzwerk zu miniaturisieren. In vorherigen Experimenten haben wir mikrochemisches Laserfräsen von Fließkanälen mit 1- bis 10-µm-Durchmesser in Silizium unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren in Verbindung mit Fig. 19 gezeigt. Preiswerte Replikation eines mit Mikromaschinen erzeugten Netzwerks, das auf einem Si-Wafer existiert, kann durch Spritzgießen oder Prägen erreicht werden. Die Ventile erfordern integrierte elektrische Auslöser, die entweder durch einen on-board-oder durch einen off-board-Mikroprozessor geschaltet werden können.

VII. Probenbindungsmechanismus

[0111] Eine schematische Veranschaulichung des Bindungsmechanismus für die Sequenzierung unter Verwendung einer synthetischen DNA-Probe ist in Fig. 21 gezeigt. Sequenzierung durch Hybridisierung (SbH) ist ein neuer Sequenzierungsansatz, der die natürliche Basenpaarungseigenschaft ausnutzt, um einen Erkennungsmechanismus für das Dekodieren einer Stickstoffbasen enthaltenden DNA zur Verfügung zu stellen. In Fig. 21 ist eine Teilsequenz **802** einer DNA-Probe auf der rechten Seite wiedergegeben. Vier Basen **804** in der Beispiel-DNA sind mit einem kurzen Stück einer synthetischen DNA **806**, die an eine Oberfläche geheftet ist, gepaart. Die trägergebundene DNA-„Probe" dient als Erkennungselement für das Auftreten einer perfekt komplementären Sequenz in der Proben-„Target"-DNA **802**.

[0112] Das Konzept der Verwendung eines größeren Sets von DNA-Proben zum Entziffern der Basensequenz eines DNA-Probentargets ist unten gezeigt. Beispiel 1 zeigt einen kleinen Teil der Basensequenz einer DNA-Probe, die vor der Analyse durch Wärme zu einsträngiger Form konvertiert wird. Indem die Proben-DNA einem Set von synthetischen DNA-Proben ausgesetzt wird, welche alle möglichen Sequenzen für eine gegebene Probenlänge repräsentieren (zum Beispiel alle 65,536 8-basischen Proben) und anschließendes Detektieren, welche der Proben spezifisch an die Target-DNA gebunden haben, kann eine komplette Liste der Oligonucleotidsequenzen, die in der DNA-Probe enthalten sind, erzeugt werden. In dem Fall, der in Beispiel 2 (unten) gezeigt ist, würden nur die 8-er Proben, die aufgelistet sind, zu den DNA-Probensequenzen hybridisiert werden. Dann wiederum wird ein Überlappungsalgorithmus verwendet, um die komplette Sequenz der Tar-

get-DNA aus dem Oligonucleotidinhalt zu erzeugen.

Beispiel I

Unbekannte einsträngige DNA (Target)

ATCGCTTACGGTAATC

Beispiel II

Hybridisierte synthetische genetische Proben

TAGCGAAT
AGCGAATG
GCGAATGC
CGAATGCC
GAATGCCA
AATGCCAT
ATGCCATT
TGCCATTA
GCCATTAC

VIII. Anwendungen

[0113] Kommerzielle Anwendungen der vorliegenden Erfindung mit Bezug auf DNA- und RNA-Bestimmung beinhalten genetische Forschung, genetische und Infektionskrankheiten-Diagnose, toxikologische Tests, individuelle Identifizierungen, landwirtschaftliche Identifizierungen und Sortenoptimierung, Qualitätssicherung durch Erkennung von Verunreinigungen sowie Überprüfen von Berufsrisiken durch Mutationsbestimmung.

[0114] Es wird derzeit angenommen, dass 4.000 bis 5.000 genetische Erkrankungen bei Menschen existieren, bei welchen eine mutationsbedingte Änderung in einem Gen die Funktion eines genetischen Produkts zerstört oder verhindert, was zu einem ernsten medizinischen Zustand führt. Die betroffenen Gene und Proteine (Genprodukte) sind jedoch bisher lediglich für eine kleine Anzahl von menschlichen genetischen Krankheiten identifiziert, obwohl die Anzahl ständig ansteigt. Ein paar Beispiele von menschlichen genetischen Erkrankungen, für die Mutationen mit diesen Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden, sind identifiziert, einschließlich zystischer Fibrose, Phenylketonurie, Alzheimer Krankheit, Krebs, Duchenne Muskeldystrophie sowie familienbedingte Hypercholesterinämie. Obwohl in einigen Fällen die Krankheit mit einer oder sehr wenigen spezifischen Mutationen im Zusammenhang stehen, wird es offenkundig, dass viele, wenn nicht die meisten, genetischen Erkrankungen durch eine Vielzahl von Mutationen ausgelöst werden, die über das betroffene Gen verteilt sind. Im ersteren Fall kann die Gegenwart eines defekten Gens durch Verwendung von einfachen DNA-Hybridisierungsbestimmungstests gefunden werden, bei welchen eine synthetische DNA-Probe verwendet wird, um zwischen einem Wildtyp und einer mutierten DNA-Sequenz zu unterscheiden. Im letzteren Falle ist ein wesentlicher DNA-Sequenzierungsaufwand erforderlich, um über ein vollständiges Gen hinweg nach Mutationen zu suchen, die mit einer Krankheit in Zusammenhang stehen.

[0115] Die Wichtigkeit des Auffindens von Mutationen in mit Krankheiten verknüpften Genen liegt sowohl in der Fähigkeit, nach Trägern von rezessiven Generkrankungen zu suchen, was zu einer genetischen Beratung und informierten Fortpflanzungsentscheidungen hin führt, als auch in den Möglichkeiten, vorgeburtliche Diagnose zu treffen, die einen therapeutischen Eingriff ermöglichen kann. Bei angemessener Wahl der Oligonucleotidproben führt der Sequenzer **10** zu einer neuen, gengerichteten DNA-Sequenzierungsprozedur, die schnell jegliche Mutation innerhalb des Zielgens entdeckt, was die Diagnose von genetischen Erkrankungen und die Identifikation von Trägern, insbesondere wenn eine Vielzahl von verschiedenen Mutationen den Defekt verursachen kann, vereinfacht. Vielleicht wichtiger ist die schnelle Natur und der hohe Durchsatz des Verfahrens, was verspricht, Populationsstudien zu vereinfachen, die darauf abzielen zu entdecken, welche Mutationen in welchen Zielgenen aktuell mit einer Krankheit assoziiert sind und welche Mutationen harmlosen Poly-

morphismus repräsentieren. Es wird erwartet, dass diese Information zu einer Vereinfachung der Technologie für die spezielle Bestimmung von zerstörenden Mutationen führt, sowie zu wertvollen Struktur-Funktions-Zusammenhängen, welche die Entwicklung von Therapeutika vereinfacht.

[0116] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf genetische Erkrankungen beschränkt. Sie kann verwendet werden zur schnellen Identifizierung mit hohem Durchsatz von infektiösen Mitteln. Für jede Spezies oder Stamm eines Virus oder Mikroorganismus wird ein einzigartiges diagnostisches Muster der Hybridisierung innerhalb eines Arrays **10** vorhergesagt.

[0117] Die gen-gerichtete Mutationsbestimmung, wie oben beschrieben, wird auch wichtige Verwendung bei der Umweltforschung haben, zum Beispiel die Bestimmung von Mutationen, die dadurch induziert werden, das Zellen chemischen Agenzien chronisch ausgesetzt werden.

[0118] Gleichermaßen kann die vorliegende Erfindung für das individuelle Monitoring von Angestellten verwendet werden, die Chemikalien oder Strahlung an ihrem Arbeitsplatz ausgesetzt sind (zum Beispiel durch periodisches Screening nach Mutationen in Populationen von zirkulierenden Lymphozyten). Eine wichtige Anwendung dieser Technologie wird die Entwicklung eines Vorhersagemodells für das mutagene Risiko durch die Charakterisierung und Auffindung von punktuellen Mutationen in großem Maßstab und in spezifischen Genen, wie zum Beispiel denjenigen für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) sein.

[0119] Arrays mit hoher Dichte werden eine Vielzahl von Verwendungen bei der Genom-Sequenzierung finden und werden wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei den Bemühungen um das derzeitige Human-Genom-Projekt (HGP) spielen, um die vollständige Sequenz von 3 Milliarden Basenpaaren im menschlichen Genom zu bestimmen. Wichtiger jedoch sind die neuen Human-Genom-Projekte, die entstehen werden aufgrund dessen, dass schnelle Technologien mit hohem Sequenzierungsdurchsatz erhältlich sind. Es wird ein Bedarf dafür bestehen, repetitive DNA-Sequenzanalyse für wichtige Teile des menschlichen Genoms, erhalten von einer großen Anzahl von Individuen, durchzuführen, um komplexe Multigen-Krankheitsbedingungen und andere genetische Charakteristika zu charakterisieren. Diese Aktivität wird noch lange nachdem das derzeitige HGP abgeschlossen ist weiterbestehen und revolutionären Fortschritt in den biomedizinischen Wissenschaften erbringen.

[0120] Eine weitere mögliche Verwendung der vorliegenden Erfindung besteht in der „DNA-Typisierung", wobei die DNA-Sequenzunterschiede zwischen den Individuen analysiert werden. Der erfindungsgemäße Sequenzer für das gleichzeitige Screening einer großen Anzahl von polymorphen Markern in der DNA eines Individuums hat dramatische Vorteile gegenüber der gegenwärtigen Technik der Einschränkung der Fragmentlängenpolymorphismusanalyse (RFLP), die zeit- und arbeitsintensiv ist. DNA-Typisierung kann eine wichtige Rolle in der Forensik und beim Vaterschaftstest spielen. Zusätzlich besteht ein Interesse daran, das gesamte Personal im bewaffneten Bereich zu DNA-Typisieren.

[0121] Da wertvolle neue Pflanzen und Vieh durch genetische Techniken entwickelt werden, wird ein Bedarf für die DNA-Typisierung bestehen, um die Quelle und den Besitz von landwirtschaftlichen Produkten zu verifizieren. Die Sequenzinformation, die man von der Genomsequenzierung bei Menschen, Pflanzen und Tieren erhalten wird, wird zu einer erhöhten Anwendung von genetischen Konstruktionstechniken führen, um pharmazeutische Mittel zu entwickeln und eine verbesserte Ernte und Viehbestand zu erzeugen. Beispiele beinhalten Stämme, die stärker resistent gegen Krankheiten und harte Klimabedingungen sind, sowie Nutzpflanzen, die eine höhere Ausbeute oder einen höheren Nährwert besitzen.

[0122] Die vorliegende Erfindung kann im Zusammenhang mit der Bestimmung von Proben verwendet werden, die andere molekulare Strukturen als DNA oder RNA haben, wie zum Beispiel Zellen und Antikörper. Tabelle III zeigt brauchbare Probentypen für andere molekulare Strukturen auf, die als Target dienen können. Die angegebenen Probentypen sind nicht als ausschließlich anzusehen.

Tabelle III

Probentypen

Target	Probe
DNA, RNA	Oligonukleotid
Antikörper	Antigen (Peptid), Antiantikörper
Zelle	Antikörper; Protein
Hormonrezeptor	Hormon
Aviden	Biotin
Immunglobulin	Protein A
Enzym	Enzymfaktor
Lektine	spezielle Kohlenwasserstoffe

[0123] Wenn der Detektor Peptide oder andere Antigene als Proben anwendet, kann er dazu verwendet werden, Antikörper in biologischen Flüssigkeiten wie in Fig. 22 gezeigt zu bestimmen.

[0124] In dieser Ausführungsform wird ein Peptidantigen (die Probe **22**) an das SiO_2 **50** auf dem Boden der Testmulden **12A** fixiert (ähnlich wie in Fig. 6H gezeigt), wobei ein bifunktionelles Vernetzungsmittel, wie z. B. eines mit einem Silan an einem Ende und einem Epoxid oder einer anderen peptid-spezifischen Gruppe am anderen Ende, verwendet wird.

[0125] Die behandelte Oberfläche wird dann mit einem Fluid **18**, welches einen Antikörper (das Target T) enthält, inkubiert. Da Antikörper große Moleküle sind (150 000 bis 950 000 MW, abhängig von der Klasse) erzeugt die resultierende Target/Probenbindung eine große Änderung in der Permittivität der Testmulden **12A**. Die Größenordnung des Effekts kann zusätzlich durch Behandlung des Target/Probenkomplexes mit einem zweiten Antikörper verstärkt werden, der spezifisch für den Zielantikörper ist, wobei ein sehr großer Komplex erzeugt wird.

[0126] Die Affinität und Selektivität von Antikörper/Antigen- und Antikörper-Antikörperwechselwirkung ist gut bekannt und die Basis für eine bestehende Klasse der Biotechnologie (ELISA-Essays, Immunhistochemie und andere). Die hier beschriebene Technologie verwendet diese gut verstandenen Bindungswechselwirkungen in einem neuen mikroelektronischen Detektionsschema.

[0127] Die kommerzielle Anwendung der Methodik ist dafür geeignet, die Gegenwart jedes von Hunderten von Tausenden von verschiedenen Antikörpern und anderen Proteinen gleichzeitig in einer Blutprobe oder einem anderen biologischen Fluid zu bestimmen. Dies ist insbesondere nützlich bei der Bluttypisierung, der Detektion einer Virusinfektion wie z. B. AIDS oder der Diagnose von Krebs. Es kann ebenfalls sehr nützlich als Forschungswerkzeug sein. Es könnte die Verwendung von ELISA-Essays und anderen biochemischen Verfahren zur Bestimmung von Antikörper/Antigenwechselwirkungen ersetzen oder erweitern.

[0128] Wenn der Detektor dafür als eine Probe, Peptide, Antikörper oder andere Moleküle, die an Zellen binden, eingesetzt wird, kann er dafür verwendet werden, spezielle Zelltypen in biologischen Flüssigkeiten zu bestimmen.

[0129] In dieser Anordnung enthält Probe **22** einen Antikörper, Protein oder anderes Molekül, das dafür bekannt ist, auf die Zelloberfläche zu binden. Das Target T ist in diesem Falle eine intakte Zelle mit Rezeptoren T zur Bindung mit den Proben **22**.

[0130] Eine Flüssigkeitslösung, die Zellen enthält, wird zu dem Detektor zugegeben. Nach der Target/Probenbindungswechselwirkung gibt die Bindung der Detektormulden, die an eine Zelle gekoppelt sind, einen Anstieg. Da Zellen keinen Strom leiten und geringe dielektrische Frequenzrelaxaktion zeigen, kann die Bindung einer Zelle entweder durch Änderung der absoluten Leitung in einer Mulde bestimmt werden (eine Modifikation vom Coulter-Prinzip) oder durch Induktion eines geringen dielektrischen Frequenzrelaxaktionseffekts.

[0131] Die kommerzielle Anwendung der Methodik ist für die Bestimmung der Gegenwart von Zellen mit veränderten Zelloberflächeneigenschaften, insbesondere Zellen im Blut oder anderen Zellflüssigkeiten, geeignet. Zellen aus festen Geweben können nach Standardgewebedispergierungsmethoden analysiert werden. Solch ein Detektor kann für die Diagnose einer Virusinfektion und für die Krebsdiagnose wie auch als wissenschaftliches Forschungswerkzeug geeignet sein. Es könnte als Ersatz für die Verwendung von Fluoreszenzmikros-

kopie (Immunhistochemie) und fluoreszenzaktiviertes Zellsortieren dienen.

IX. Vorteile

[0132] Derzeitige Mikrofabrikationstechniken ermöglichen preiswerte Herstellung von Multimegabitspeichern, die gleichmäßige Dichte und Eigenschaften aufweisen. Nun können Arrays aus möglicherweise Millionen von individuellen biologischen Testmulden oder Stellen, vergleichbar mit standardmäßigen elektronischen Baugruppen, bei ähnlichen Kosten miniaturisiert werden. Zum Beispiel kann leicht ein 1 cm × 1 cm großer Array mit einer Million biologischer Teststellen hergestellt werden. Darüber hinaus erhöhen die gleichmäßigen elektrischen Eigenschaften des Gerätes, das in einer solchen Art und Weise hergestellt wird, die Bestimmungsempfindlichkeit weit über andere Ansätze hinaus.

[0133] Ein wichtiger Vorteil des mikrohergestellten elektronischen Detektors und des optischen Absorptions-CCD-Detektors, die zuvor beschrieben wurden, ist der, dass das Bestimmungsverfahren eine direkte Bestimmung der molekularen Target/Probenbindung erlaubt. Daher ist es nicht notwendig, einen toxischen Fluoreszenz-, radioaktiven oder chemischen Marker an die Targets oder Proben anzubringen. Es muss lediglich ein angemessenes elektrisches Signal oder eine Frequenzverschiebung für die Bestimmung wahrgenommen werden. Solche Signale oder Verschiebungen treten völlig natürlich für viele Target/Probenkombinationen wie z. B. von DNA und RNA mit einem Oligonukleotid auf. Wenn jedoch das Signal oder die Verschiebung im elektronischen Detektor nach der Bindung schwach oder nicht existent ist, kann ein geladener molekularer Marker an das Target gebunden werden. Zusätzlich wird die Bestimmung im elektronischen Detektor durch Änderung in der Frequenzcharakteristik beobachtet im Gegensatz zu einer Änderung bei der Größencharakteristik, die verschleiert werden kann, wenn das mikrohergestellte Array korrodierenden biologischen Lösungen ausgesetzt ist. Demzufolge kann das Gerät gereinigt und eine Vielzahl von Malen ohne Beeinträchtigung seiner Genauigkeit wiederverwendet werden. Obwohl das Bestimmungsverfahren etwas der Korrosion der Elektroden widersteht, kann eine Passivierungsschicht eingesetzt werden, um die Platten für eine noch längere Verwendung zu überziehen.

[0134] Die elektronische Schalteinheit, die dazu verwendet wird, die Teststellen abzufragen, um die Bestimmungsmessungen durchzuführen, kann direkt auf dem Wafer, der den biologischen Array enthält, hergestellt werden. Schaltmatrizen, Signalverarbeitungsschaltkreis und Energiequellen können alle auf dem gleichen Chip aufgebracht werden, um schnelle Bestimmung über den ganzen Array zu vereinfachen. Konsequenterweise kann die Einbringung des aktiven Schaltkreises auf den Wafer außerdem die Experimentkosten stark reduzieren.

[0135] Die Dichte der Testproben **22**, die an den Teststellen **12** befestigt sind, bestimmt direkt die Empfindlichkeit. Es wurde gezeigt, dass das mikroelektronische Verfahren eine um den Faktor zehn verbesserte Unterscheidung zwischen kurzen (nichthybridisierten) und langen (hybridisierten) einsträngigen DNA-Fragmenten zur Verfügung stellt, wohingegen der interpolierende Farbstoff-optische Ansatz einen Faktor von drei bereitstellt.

[0136] Die Eliminierung in den meisten Fällen von radiographischen Filmen reduziert die Testzeit, da ein Belichten des Films nicht erforderlich ist. Die Probenherstellungszeit wird stark reduziert, da die Nukleinsäurefragmente nicht markiert werden müssen. Das Bestimmungsverfahren ist schnell, die Messungen können durchgeführt werden, sobald sich eine ausreichende molekulare Bindung gebildet hat. Weiterhin kann der Messprozess durch einen On-Chip-Mikroprozessorkontroller automatisiert werden, um ein sehr schnelles Verfahren für den Zugang zu jeder Teststelle auf dem Array sicher zu stellen.

[0137] Die in diese Arten von Detektionsvorrichtungen eingebrachte mikroelektronsiche Technologie reduziert den Preis für ein derartiges Experimentieren drastisch. Hauptsächlich können die effizienten Massenproduktionstechniken, die für Megabit-Speicherchips und Megapixel-CCD-Abbildungschips eingesetzt werden, eingesetzt werden.

[0138] Obwohl die vorliegende Erfindung und ihre Vorteile im Detail beschrieben wurden, soll verstanden werden, dass eine Vielzahl von Änderungen, Substitutionen und Abwandlungen hiervon gemacht werden können, ohne vom Umfang der im anhängenden Anspruch definierten Erfindung abzuweichen.

[0139] Beispielsweise kann der aktive Schaltkreis des Genosensorarrays, wie z. B. die Schaltkreise **36**, **56**, **38**, **58** und **40** aus Fig. 1, monolithisch auf dem Array mit den Vertiefungen oder dem gleichen Substrat integriert werden. Schaltmatrizen, analoge Testschaltkreise und analoge oder digitale (Mikroprozessor-) Kontroller

können alle auf dem gleichen Wafer hergestellt werden, um die elektrischen Tests auszuführen oder zu vereinfachen. Wie in Fig. 24 gezeigt, können Transistoren wie z. B. TRX 1 in jedes Substrat in der Nähe einer jeweiligen Teststelle **12** integriert werden, z. B. um jede Stelle elektrisch zu entkoppeln, außer wenn sie verprobt wird. Dies würde eine zusätzliche Adressleitung A3 für jede Spalte benötigen, würde aber die parasitische Kapazität und Spurensignale von nicht verwendeten Leitungen reduzieren. Eine größere Reduktion dieser unerwünschten Effekte könnte durch eine zweite Adressleitung und einen Satz von Transistoren, der an die Y-Seite der Stellen **12** gekoppelt ist, erreicht werden.

[0140] Es wurde gezeigt, dass CCD-Schaltkreise (einschließlich CCD-Implementierungen von neuronalen Netzwerken) eine große Vielzahl von Signalverarbeitungs- und Mustererkennungsfunktionen ausführen können. Die Integration eines CCD-Datenverarbeitungsschaltkreises in einen Genosensor-Array kann die DNA-Bestimmung und die -Dekodierung vereinfachen und mit dem integrierten CCD-Bildgeber kompatibel sein, wie in Zusammenhang mit den Fig. 15 und Fig. 16 beschrieben.

[0141] Während die Erfindung in Zusammenhang mit einem nassen Typ des Testens gezeigt wurde, bei dem Lösungen verwendet werden, ist es ebenso durchführbar, einen „trocknen" oder „Gel-" Ansatz zu verwenden, bei welchem die Proben und die hybridisierten Probe/Target-Kombinationen in einem trocknen Medium oder einem Gel gebildet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verstärkung der Hybridisierung zwischen einer synthetisierten Sonde und einem Zielmolekül, bei dem man
a) eine Anordnung von Teststellen, die jeweils eine Vielzahl dieser synthetisierten Sonden enthalten, bereitstellt, wobei mit jeder Stelle eine Elektrode in Verbindung steht;
b) diesen Stellen eine Quelle von Zielmolekülen zuführt; und
c) ein Potential von einer Spannungsquelle an eine entsprechende Elektrode anlegt, um dabei diese Zielmoleküle an diese synthetisierten Sonden zu ziehen.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

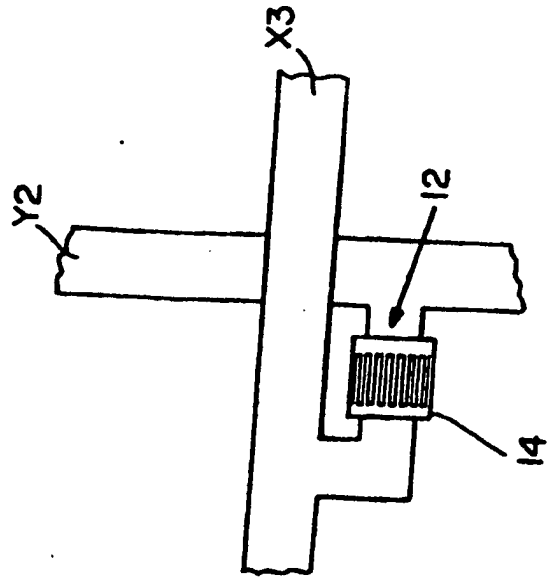


Fig. 2

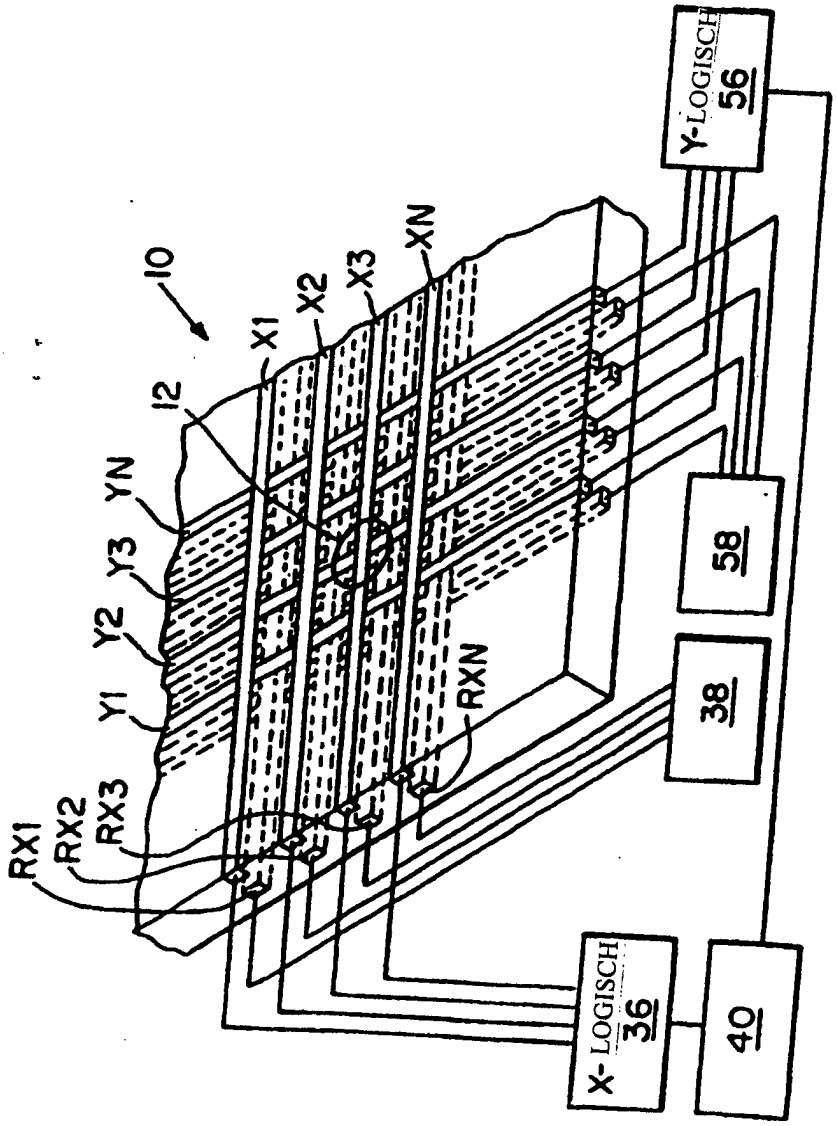


Fig. 1

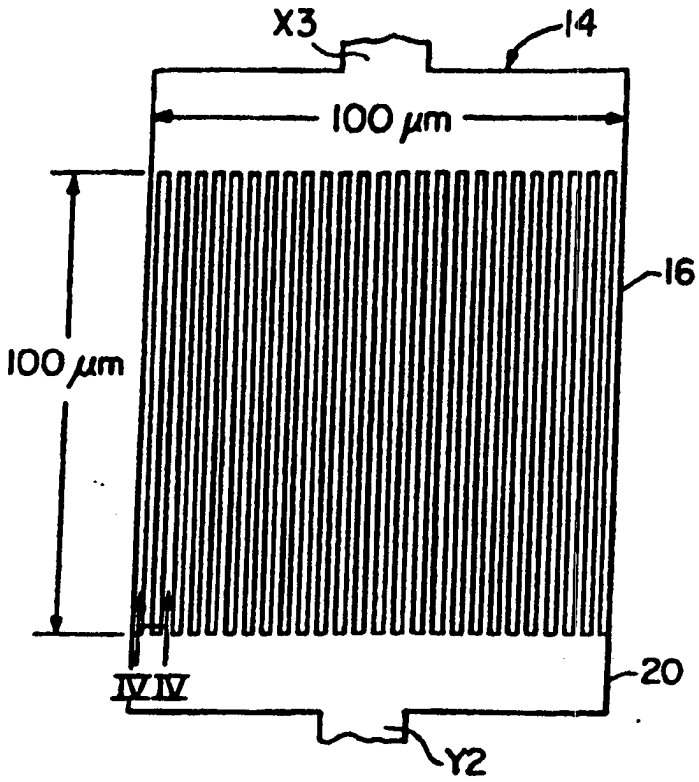

X3
14
100 µm
100 µm
16
IV IV
20
Y2

Fig. 3

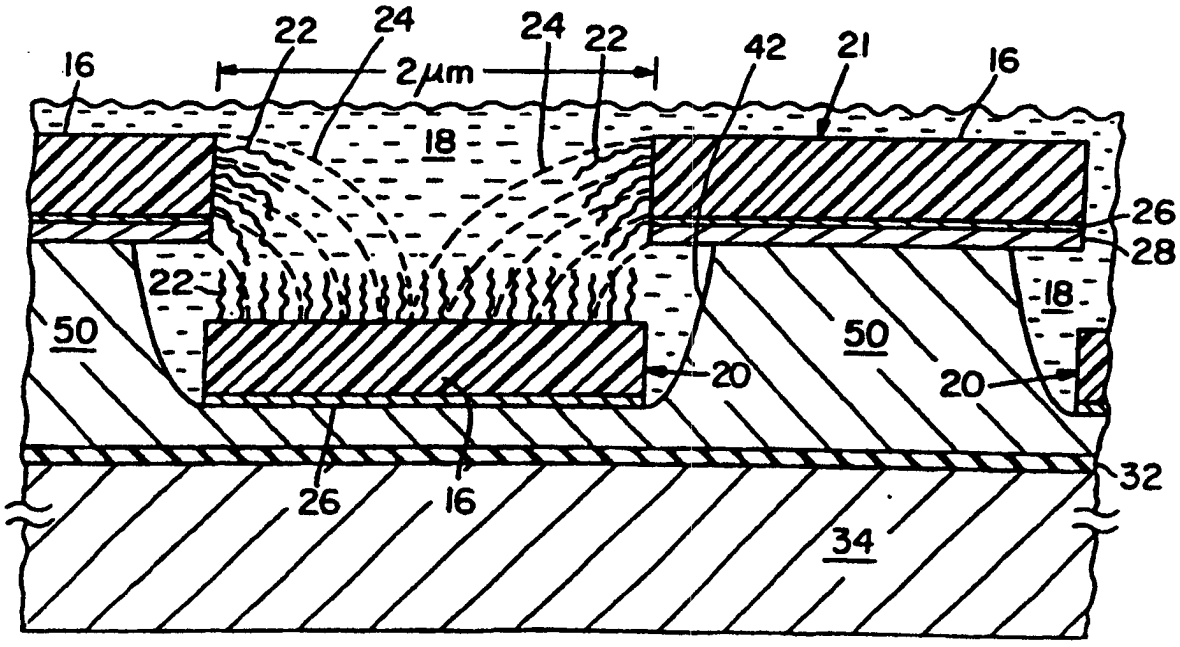

16
22
24
2µm
24
22
42
21
16
18
26
28
22
50
50
20
20
18
32
26
16
34

Fig. 4

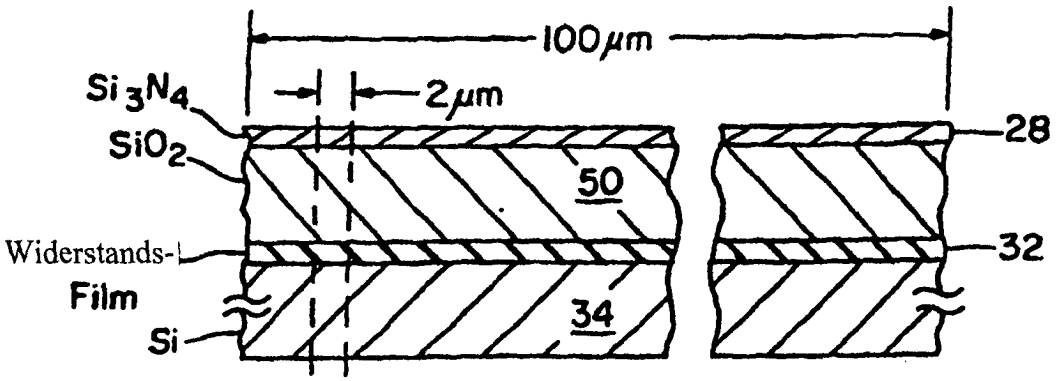


Fig. 5A

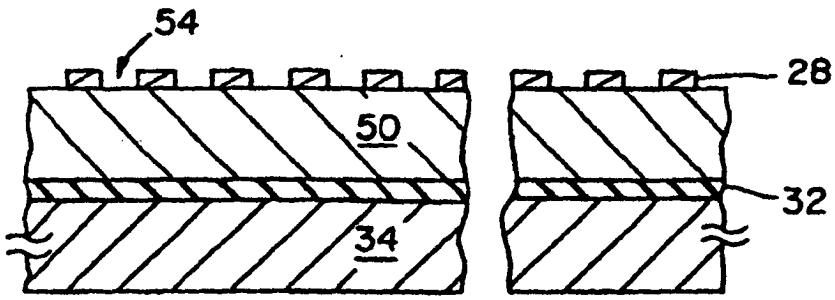


Fig. 5B

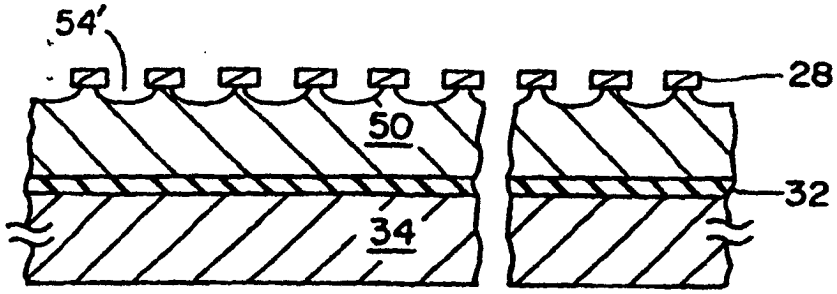


Fig. 5C

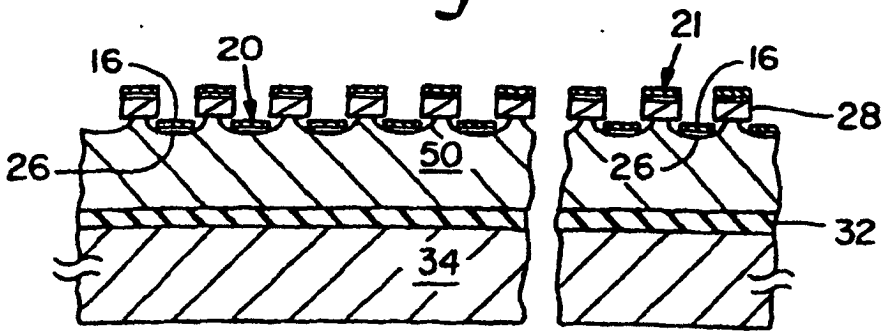


Fig. 5D

Fig. 6A

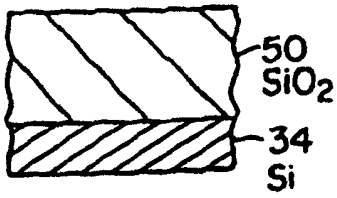


Fig. 6B

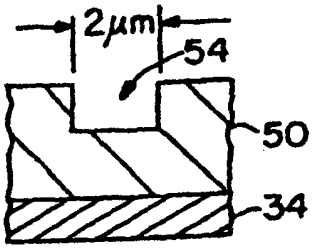


Fig. 6C

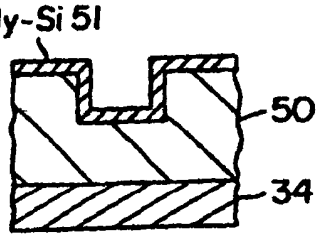


Fig. 6D

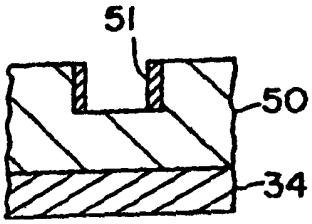


Fig. 6E

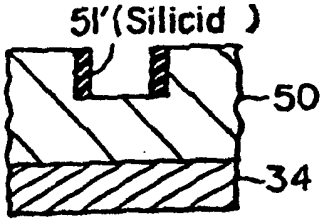


Fig. 6F

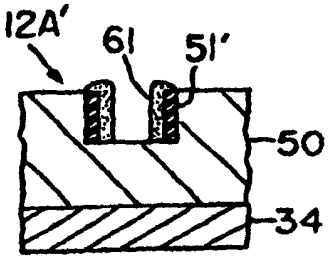


Fig. 6G

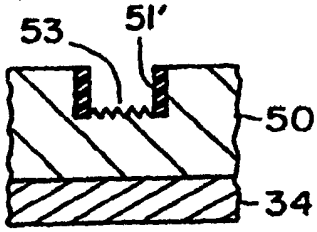
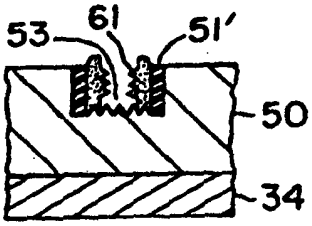


Fig. 6H



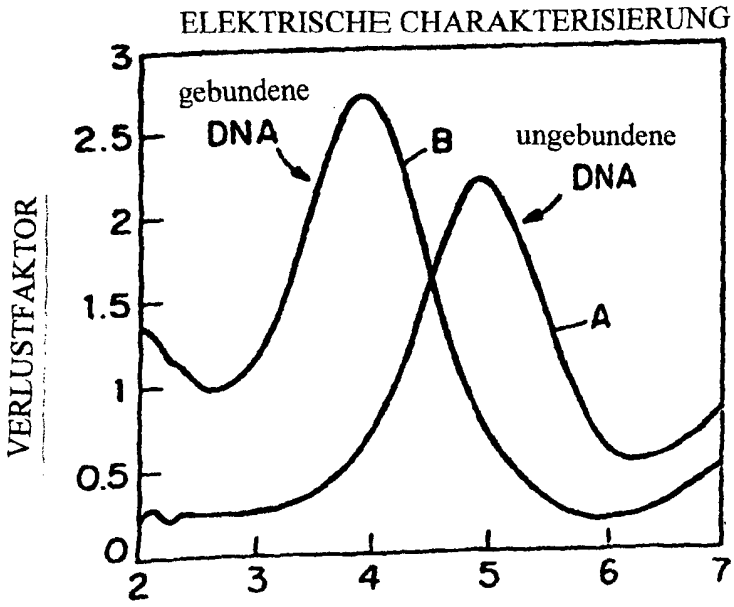


Fig. 7

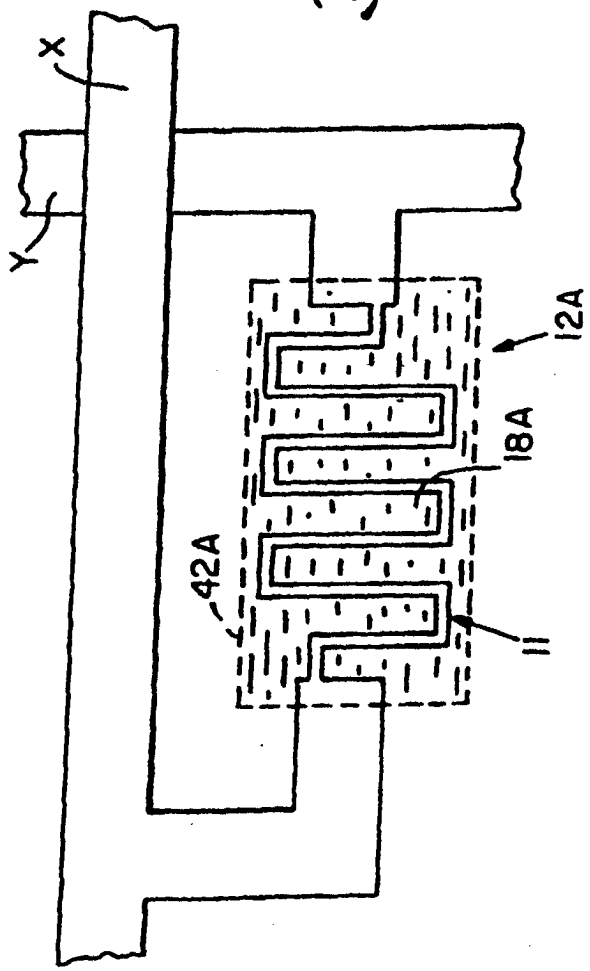


Fig. 8

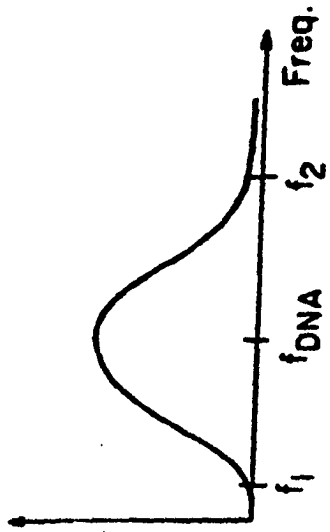


Fig. 10

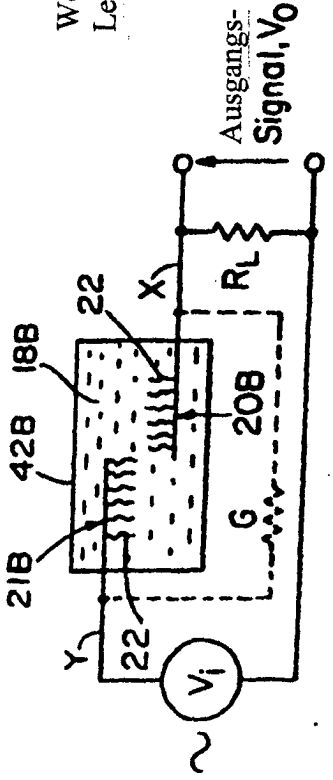


Fig. 9

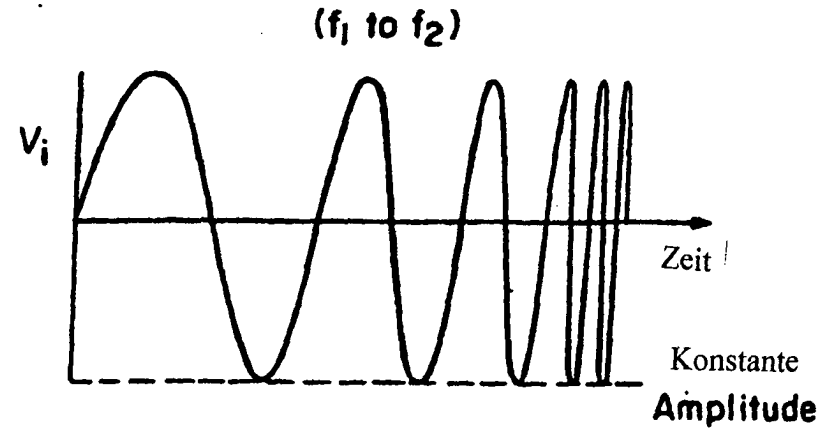


Fig. 11

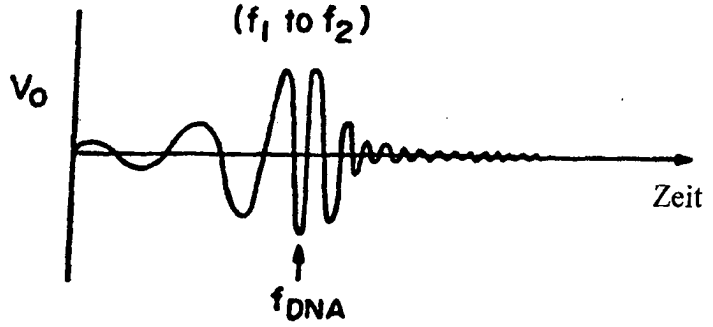


Fig. 12

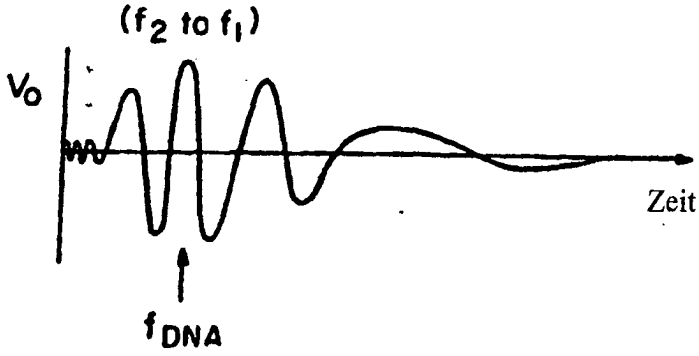


Fig. 13

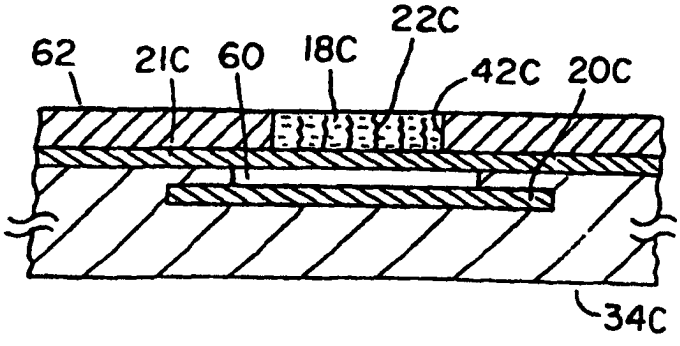


Fig. 14

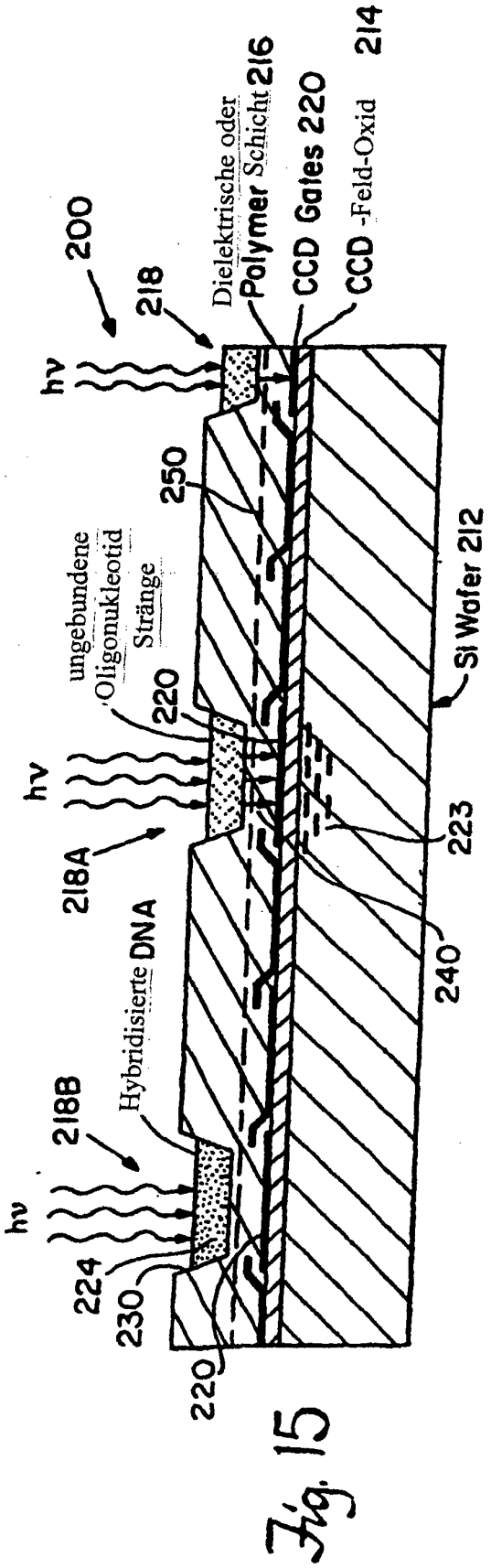

200
218
hν
Dielektrische oder
Polymer Schicht 216
CCD Gates 220
CCD -Feld-Oxid 214
250
ungebundene
Oligonukleotid
Stränge
220
hν
218A
Hybridisierte DNA
223
Si Wafer 212
240
218B
hν
224
230
220

Fig. 15

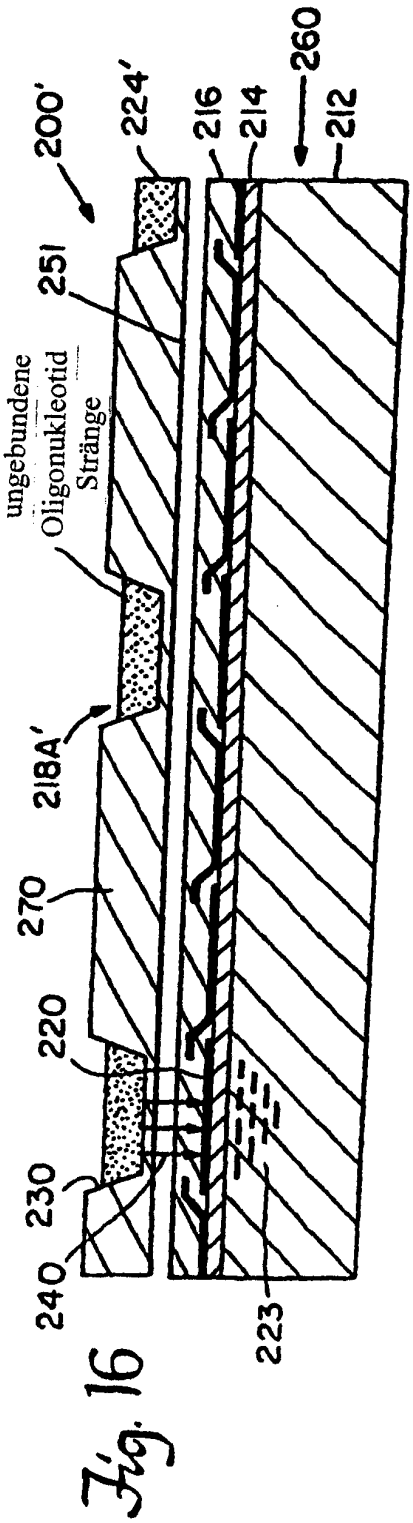

200'
224'
216
214
260
212
251
ungebundene
Oligonukleotid
Stränge
218A'
270
220
230
240
223

Fig. 16

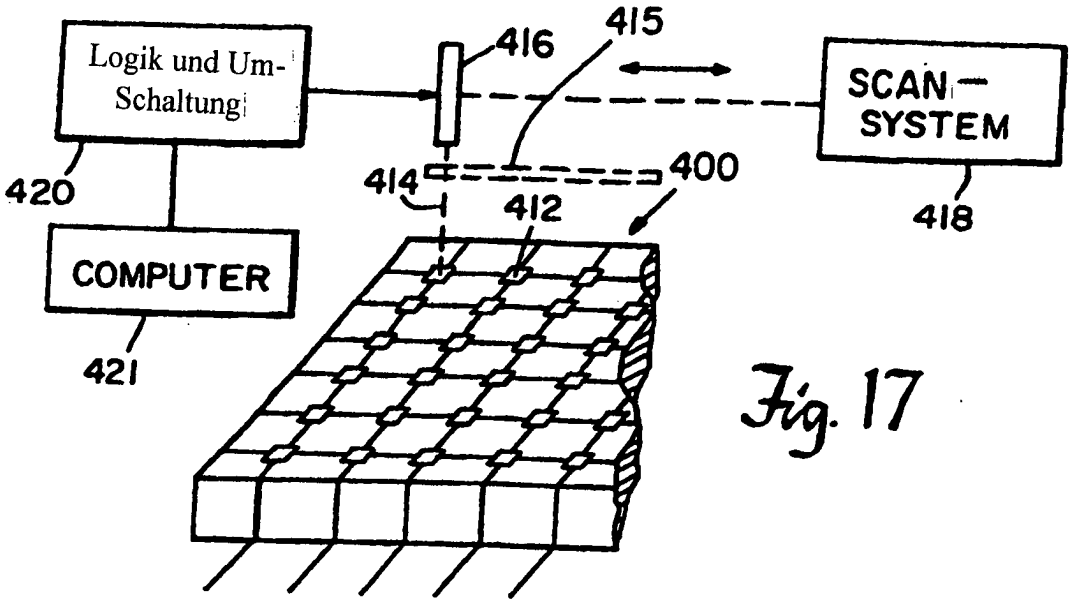

Logik und Um-
Schaltung
420
COMPUTER
421
416
415
414
412
400
SCAN-
SYSTEM
418

Fig. 17

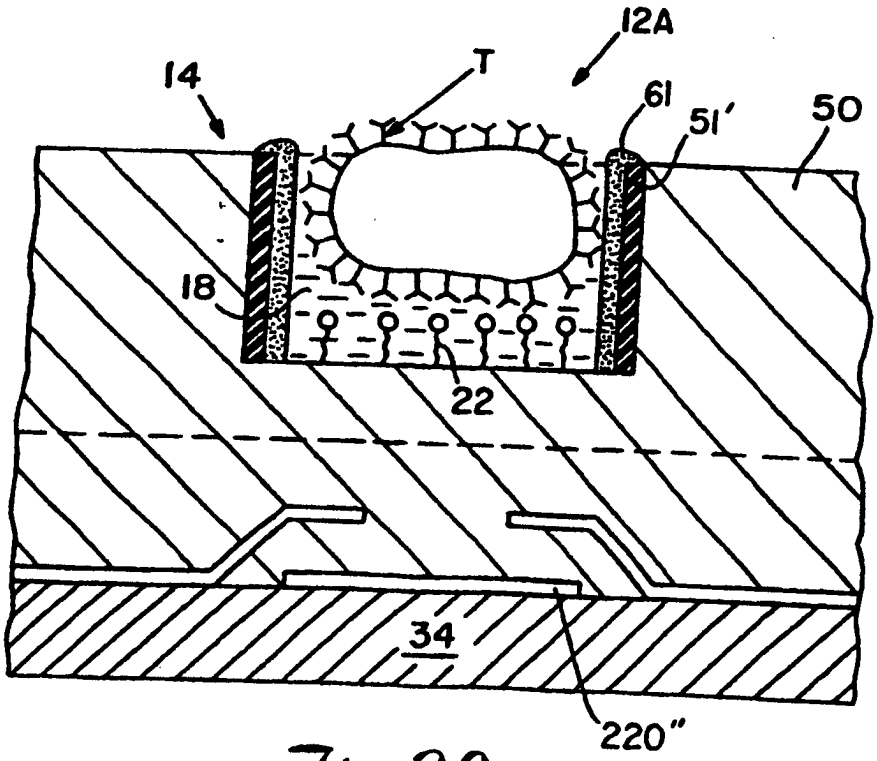

12A
14
T
61
51'
50
18
22
34
220"

Fig. 22

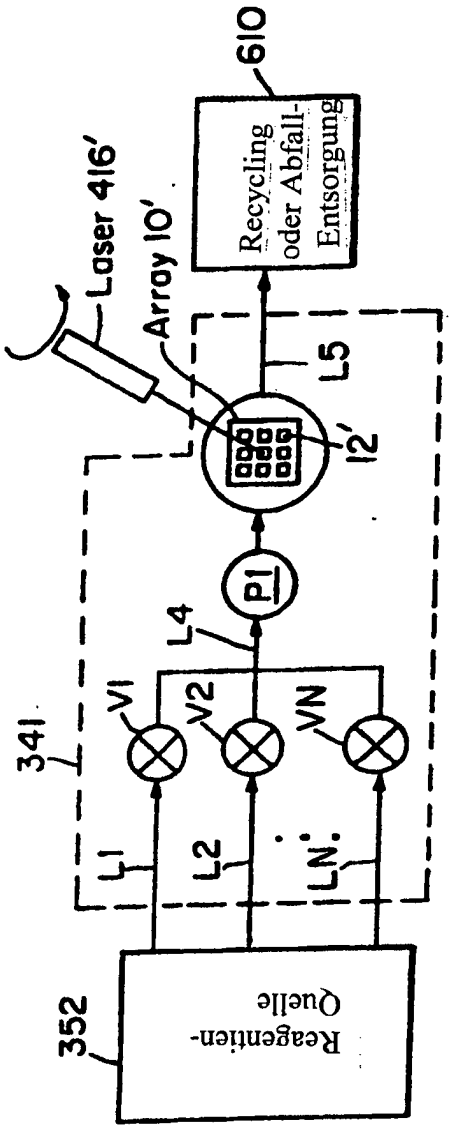

Laser 416'
Array 10'
610
Recycling oder Abfall-Entsorgung
L5
12'
P1
L4
341
V1
V2
VN
L1
L2
LN
352
Reagenzien-Quelle

Fig. 18

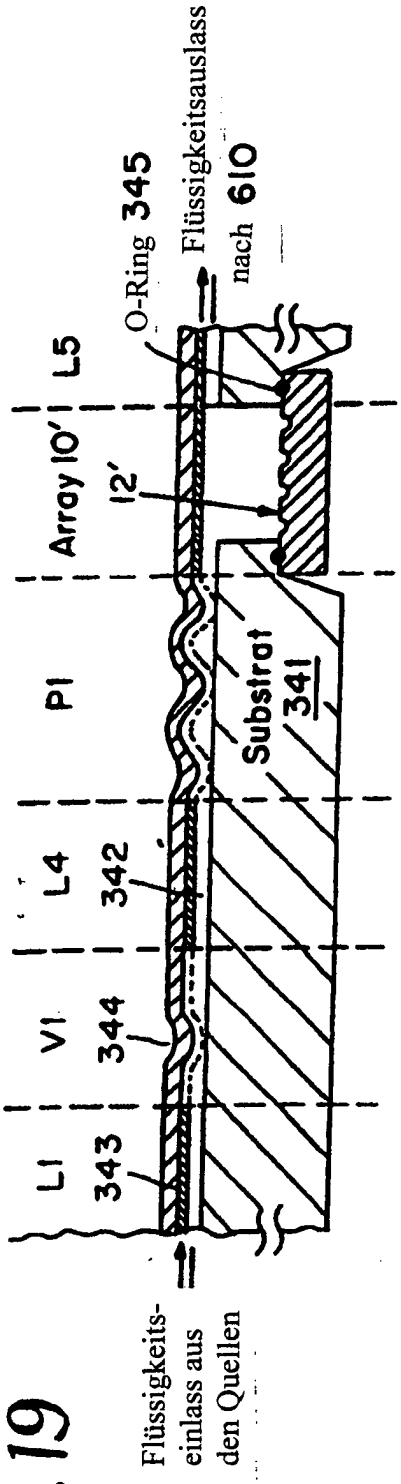

O-Ring 345
Flüssigkeitsauslass nach 610
L5
Array 10'
12'
P1
Substrat 341
L4
342
V1
344
L1
343
Flüssigkeits-einlass aus den Quellen

Fig. 19

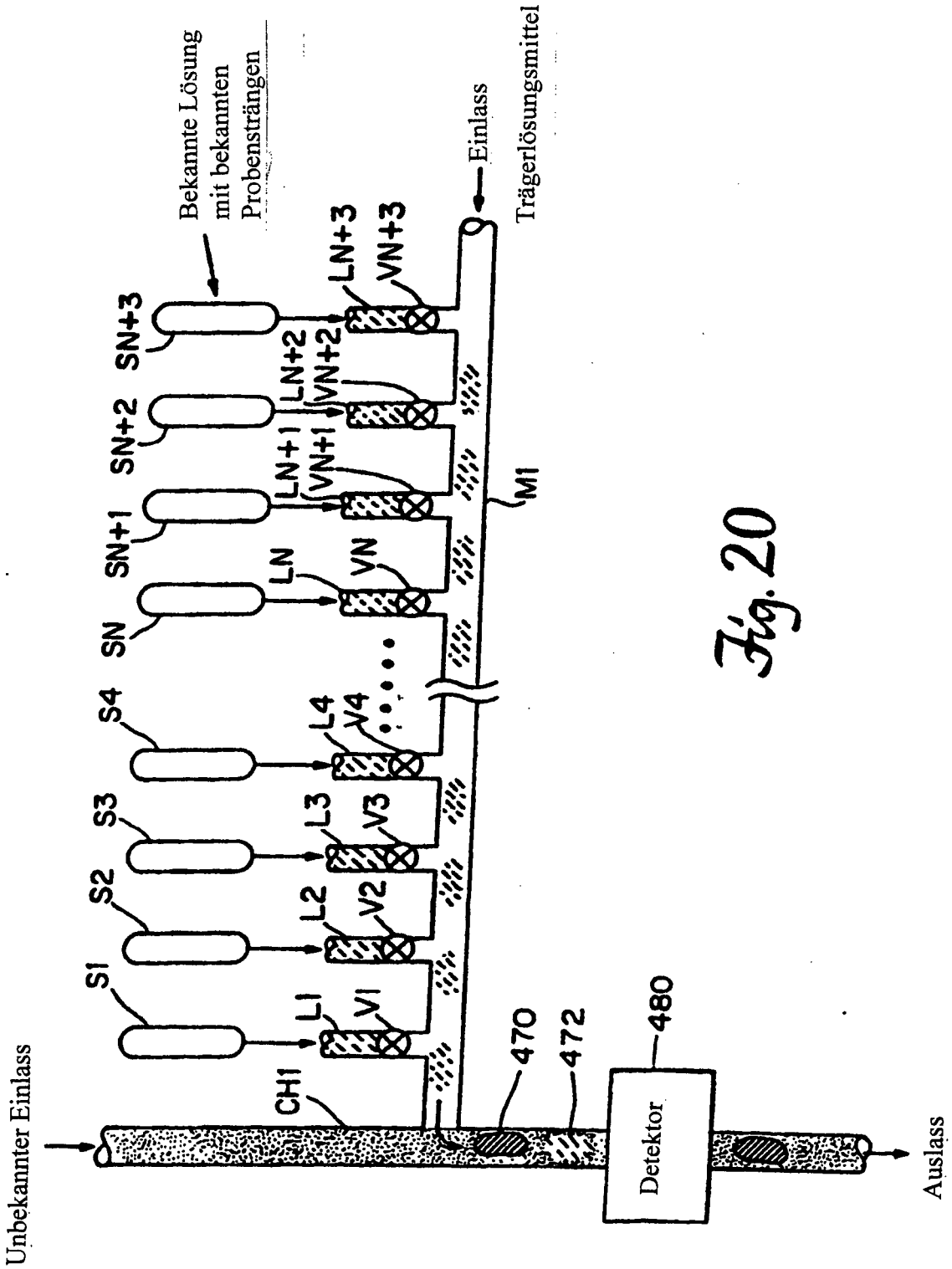

Unbekannter Einlass
Bekannte Lösung mit bekannten Probensträngen
Trägerlösungsmittel
Einlass
Auslass
Detektor
CH1
M1
470
472
480
S1
S2
S3
S4
SN
SN+1
SN+2
SN+3
L1
L2
L3
L4
LN
LN+1
LN+2
LN+3
V1
V2
V3
V4
VN
VN+1
VN+2
VN+3

Fig. 20

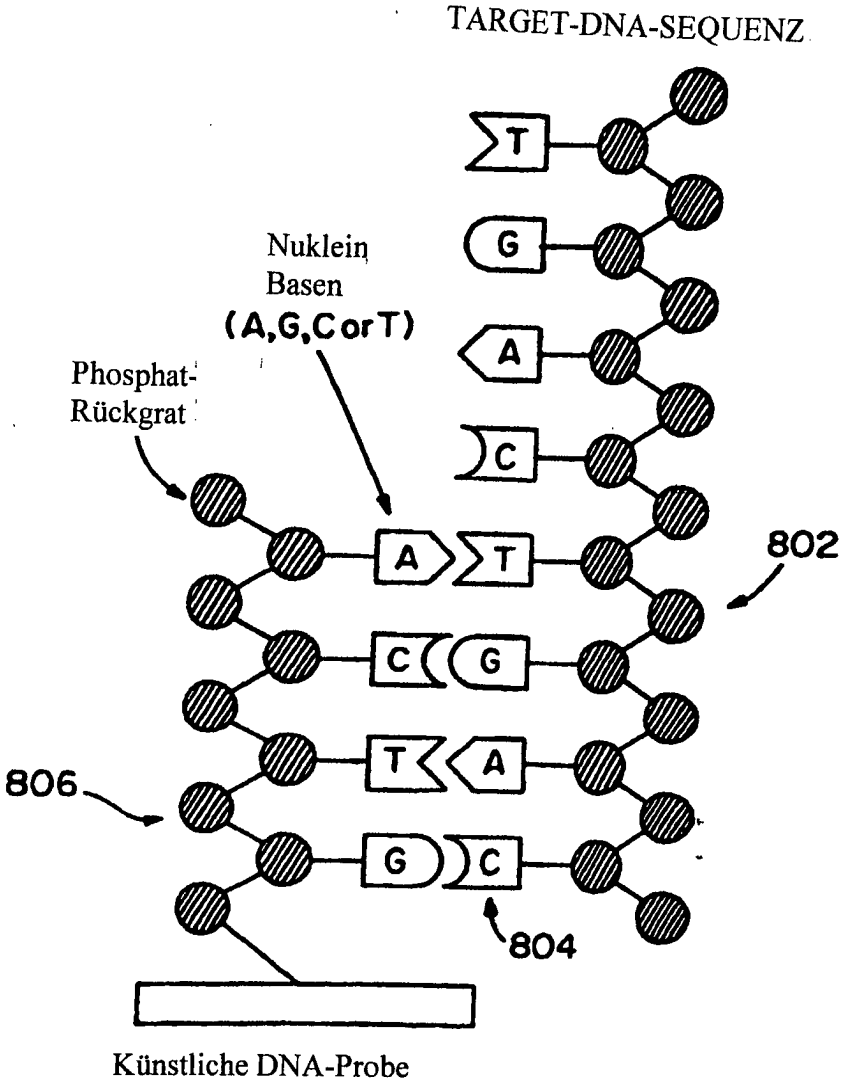

TARGET-DNA-SEQUENZ
Nuklein
Basen
(A,G,CorT)
Phosphat-
Rückgrat
T
G
A
C
A
T
C
G
T
A
G
C
802
806
804
Künstliche DNA-Probe

Fig. 21

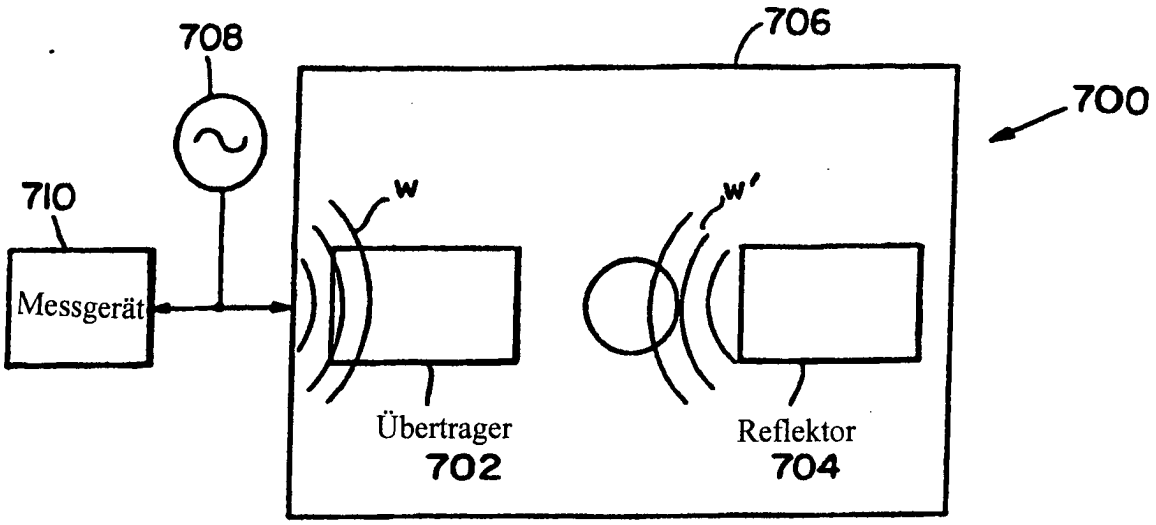

708
706
700
710
w
w'
Messgerät
Übertrager
702
Reflektor
704

Fig. 23

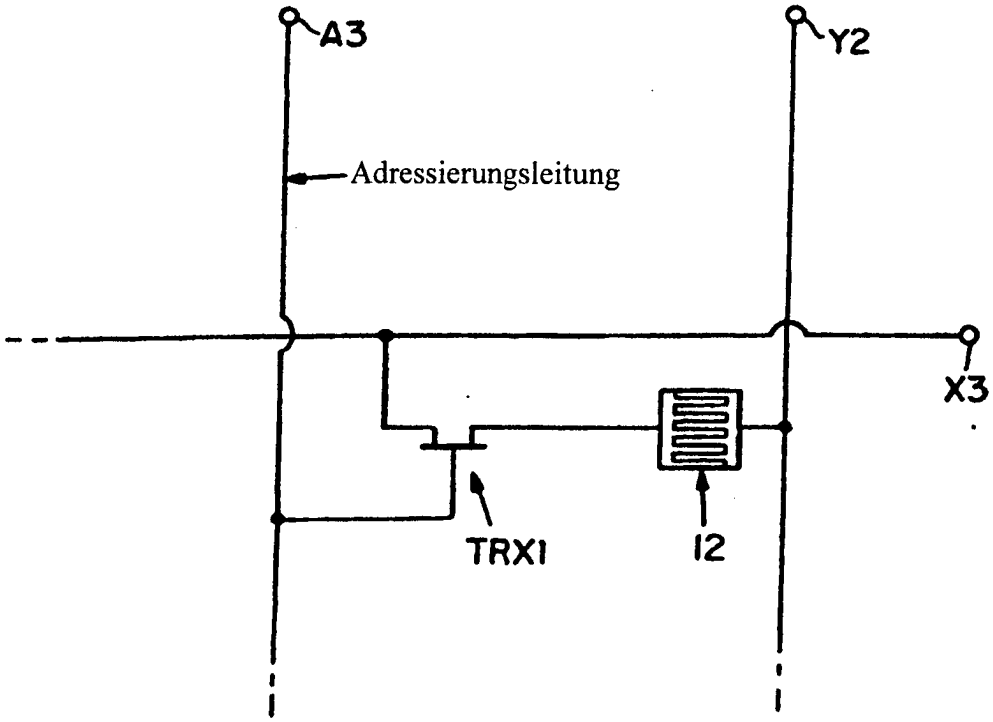
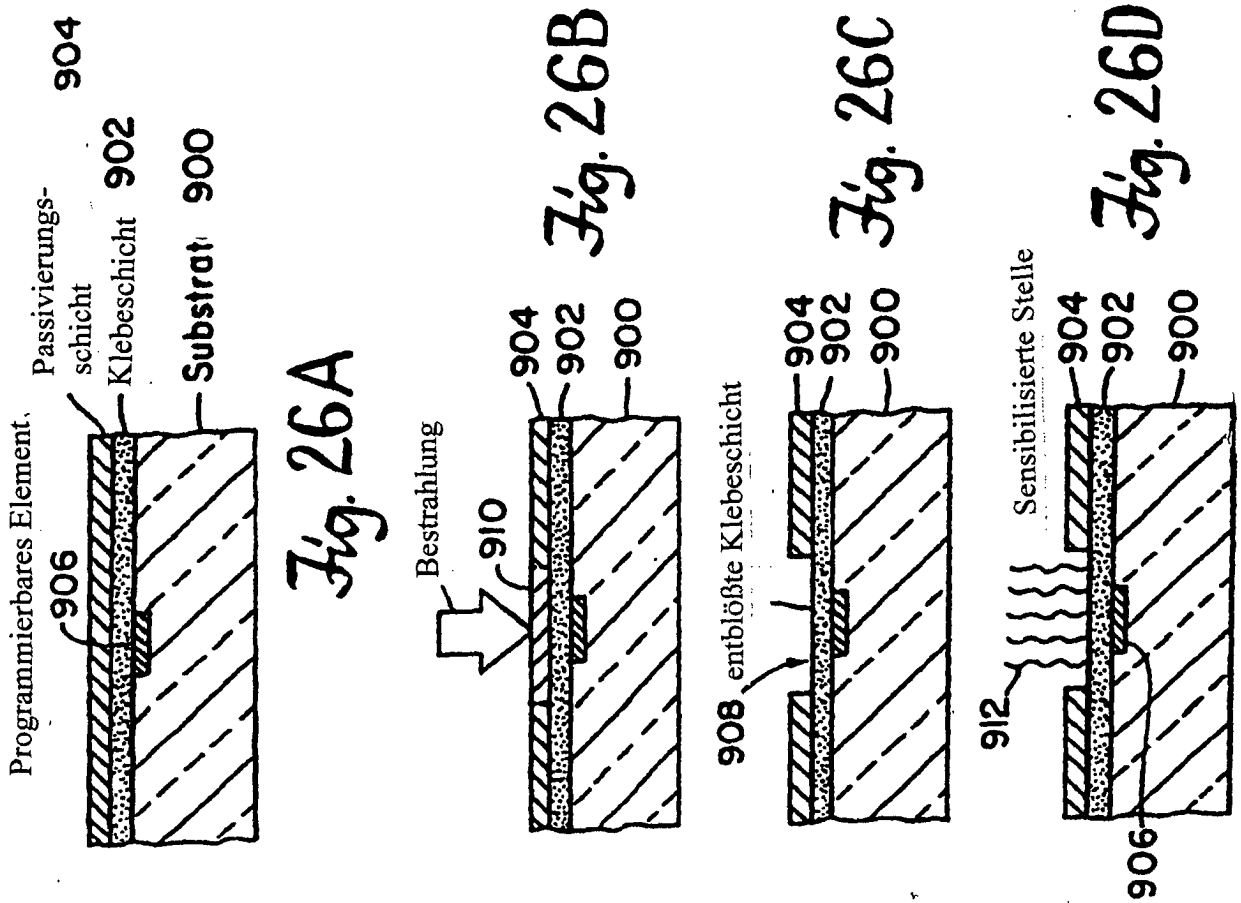
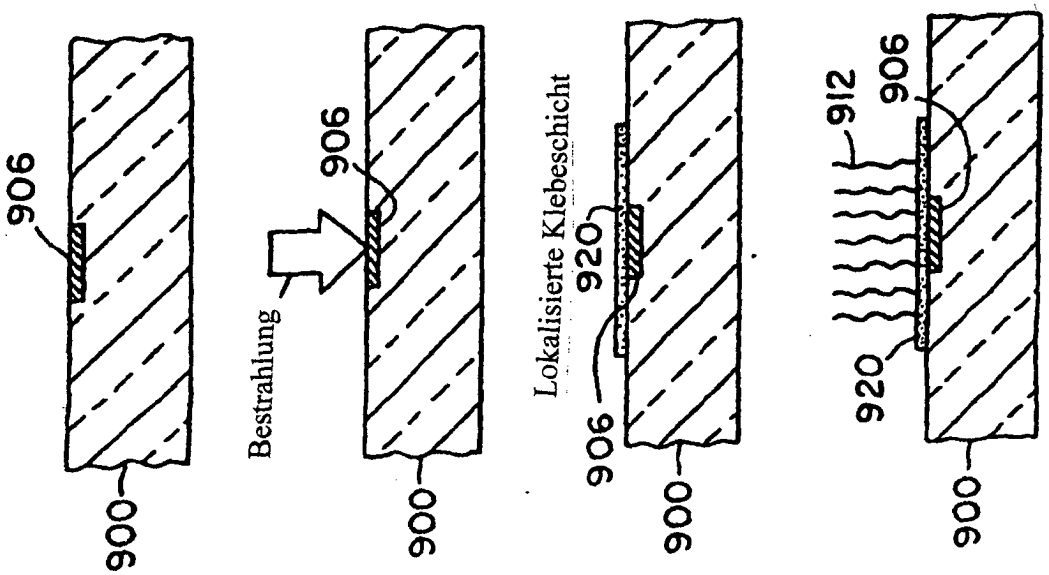

A3
Y2
Adressierungsleitung
X3
TRX1
12

Fig. 24


Programmierbares Element
Passivierungs-schicht
Klebeschicht
Substrat
904
902
900
906
Fig. 26A
Bestrahlung
910
Fig. 26B
908
entblößte Klebeschicht
Fig. 26C
912
Sensibilisierte Stelle
Fig. 26D


906
900
Fig. 25A
Bestrahlung
906
900
Fig. 25B
Lokalisierte Klebeschicht
920
906
900
Fig. 25C
912
906
920
900
Fig. 25D