

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Mai 2009 (28.05.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/065711 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/064680

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Oktober 2008 (29.10.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 055 386.4
20. November 2007 (20.11.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRIEDRICH,

Katja [DE/DE]; Wittener Weg 52, 90425 Nürnberg (DE). GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte 1, 91074 Herzogenaurach (DE). PAULICKA, Peter [SK/DE]; Franz-Steinmetz-Weg 1, 91056 Erlangen (DE). STANZEL, Manfred [DE/DE]; Taunusstrasse 100, 91056 Erlangen (DE). WEBER, Renee [DE/DE]; Alte Steige 30, 89129 Langenau-Albeck (DE).

(74) Anwalt: SIEMENS AG; CT IP S AE, Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

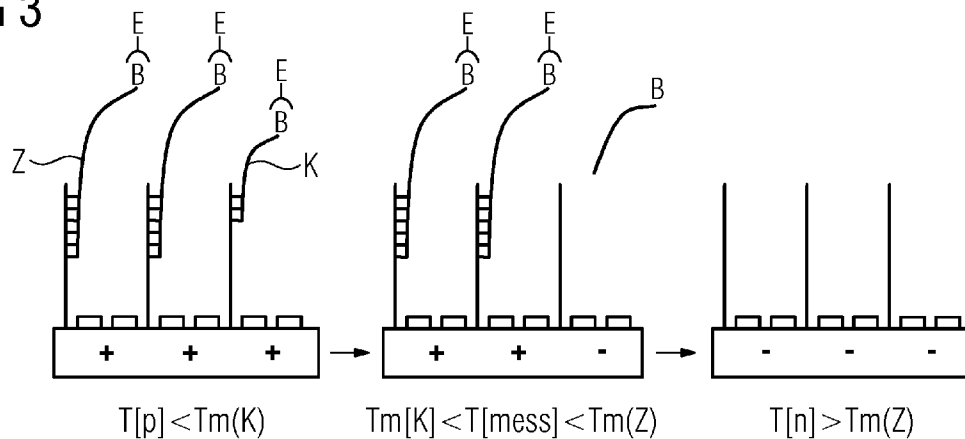
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND ARRANGEMENT FOR CALIBRATING A SENSOR ELEMENT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND ANORDNUNG ZUR KALIBRIERUNG EINES SENSORELEMENTS

FIG 3



(57) Abstract: The present invention relates to a method for calibrating a sensor element, which has an immobilized probe oligonucleotide, via which the bonding of a target nucleic acid (Z) can be detected by the sensor, comprising: a) bringing the sensor element into contact with a control nucleic acid (K), the melting temperature $T_m(K)$ of which is less than the melting temperature $T_m(Z)$ of the target nucleic acid (Z); b) hybridizing the control nucleic acid (K) to the probe oligonucleotide at a temperature $T[p] < T_m(K)$, and detecting a positive control signal; and optionally c) modifying the stringent conditions such that $T[n] > T_m(K)$ and detecting a negative control signal at a temperature $T[n]$. According to a refinement of the invention, a measuring signal of the target nucleic acid (Z) is measured at a measuring temperature $T[mess]$, where $T_m(K) < T[mess] < T_m(Z)$. The method is suited in particular for the calibration and quality control of microarrays.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Kalibrierung eines Sensorelements, welcher ein immobilisiertes Sondenoligonukleotid aufweist, über welches die Bindung einer Ziel-Nukleinsäure (Z) durch den Sensor erfasst werden kann, aufweisend: a) in Kontakt Bringen des Sensorelements mit einer Kontrollnukleinsäure (K) deren Schmelztemperatur $T_m(K)$ kleiner ist als die Schmelztemperatur

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2009/065711 A1



MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

T_m(Z) der Zielnukleinsäure (Z); b) Hybridisieren der Kontrollnukleinsäure (K) an das Sondenoligonukleotid bei einer Temperatur T_[p] < T_m(K), und erfassen eines Positiv-Kontrollsignals; und optional c) Verändern der Stringenzbedingungen, so dass T_[n] > T_m(K) und erfassen eines Negativ-Kontrollsignals bei einer Temperatur T_[n]. Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung wird bei einer Messtemperatur T [mess], wobei T_m(K) < T [mess] < T_m(Z), ein Messsignal der Zielnukleinsäure (Z) gemessen. Das Verfahren eignet sich insbesondere zur Kalibrierung und Qualitätskontrolle von Microarrays.

Beschreibung

Verfahren und Anordnung zur Kalibrierung eines Sensorelements

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren sowie eine Anordnung zur Kalibrierung von Sensorelementen, insbesondere zur Kalibrierung von Sensorelementen auf Mikroarray-Anordnungen.

10 In der Nukleinsäureanalytik hat die Entwicklung von Mikroarray-basierten Methoden in den letzten Jahren rasante Fortschritte gemacht. Eine Mikroarray-Anordnung ist eine Anordnung von einer Matrix von Sondenmolekülen, welche auf einem Sensor in einzelnen, adressierbaren Positionen angebracht sind, so dass jede Position in der Arrayanordnung ein Sensorelement bildet, mit welchem ein Zielmolekül nachgewiesen werden kann. Bei der Nukleinsäureanalytik werden als Sondenmoleküle üblicherweise Sondenoligonukleotide verwendet, welche z.B. in einer Anordnung in Form eines Chips in einer rasterartigen Matrix auf einem Träger immobilisiert („gespottet“)

15 sind. Durch Hybridisierung mit einer komplementären Ziel-Nukleinsäure kommt es zur Bindung an das Sondenoligonukleotid. Diese Bindung kann dann durch eine Mehrzahl von alternativen Verfahren detektiert werden, so dass aufgrund des Bindungsereignisses die Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure (Z) erfasst und gegebenenfalls auch quantifiziert werden kann. Als Nachweisprinzip kommen dabei optische, elektrochemische, gravimetrische, magnetische und andere geeignete Verfahren zum Einsatz.

30 Bei optischen Verfahren wird die Ziel-Nukleinsäure bzw. das Hybrid aus Sondenoligonukleotid und Ziel-Nukleinsäure durch ein Label markiert, welches zu einem optisch detektierbaren Signal führt. Dies kann ein Farbstoff, ein Fluorophor, ein Chromophor, ein interkalierender Farbstoff, ein Fluoreszenzfarbstoff oder ähnliches sein. Bei Auftreten eines Bindungsereignisses ist an der adressierbaren Position des jeweiligen Sondenoligonukleotids ein optisch detektierbares Signal er-

35

fassbar, z.B. durch eine CCD-Kamera, welche den gesamten Array abbilden kann.

Bei elektrochemischen Nachweisverfahren können die Sondenoligonukleotide auf einem elektrochemischen Sensor immobilisiert werden. Die Ziel-Nukleinsäure bzw. das Hybrid aus Sondenoligonukleotid und Ziel-Nukleinsäure wird durch ein Label markiert, welches an der Position des jeweiligen Sondenoligonukleotids lokal die elektrochemischen Eigenschaften an den Sensorelement verändert, so dass ein elektrisches Signal, z.B. eine Spannung, ein Stromfluss, eine Kapazitätsänderung oder ähnliches gemessen werden kann. Ein entsprechendes Verfahren ist aus DE 101 26 341 bekannt. Hierbei werden Ziel-Nukleinsäuren mit Biotin markiert, nach Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäure an das Sondenoligonukleotid wird die gebundene Ziel-Nukleinsäure mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase markiert und der alkalischen Phosphatase ein Enzymsubstrat angeboten, welches bei Umsatz durch die Phosphatase ein Produkt ergibt, welches lokal die Leitfähigkeit ändert, so dass an der Elektrode, auf welcher das Sondenoligonukleotid immobilisiert ist, ein lokaler Stromanstieg messbar ist.

Bei gravimetrischen Verfahren wird ein Signal erfasst, welches sich durch die Massenänderung bei Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäure an das Sondenoligonukleotid ergibt. Bekannt sind z.B. so genannte FBAR-Verfahren und Kantilever-Verfahren.

Bei einer magnetischen Detektion ist das Sondenoligonukleotid auf einem magnetischen Sensorelement immobilisiert, z.B. einem GMR-Sensor. Die Ziel-Nukleinsäure bzw. das Hybrid aus Sondenoligonukleotid und Ziel-Nukleinsäure kann nun z.B. mit paramagnetischen Partikel markiert werden, z.B. Eisenoxid-Nanopartikel, so dass an der Position des Sondenoligonukleotids bei Bindung der Ziel-Nukleinsäure lokal eine Veränderung der magnetischen Eigenschaften erfassbar ist.

Ein Problem, welches bei sämtlichen Detektionsprinzipien auf-
taucht, ist die Tatsache, dass zwischen einzelnen Sensorele-
menten qualitative Unterschiede auftreten können, die gerade
bei hoch sensitiven und quantitativen oder semiquantitativen
5 Messverfahren zu unterschiedlich starken Signalstärken führen
können. Auch durch andere äußere Einflüsse, z.B. Temperaturschwankungen oder Temperaturgradienten, durch die Fluidik an
der Sensoroberfläche bedingte Strömungsschwankungen oder
Strömungsgradienten und andere Faktoren, kann es dazu kommen,
10 dass nicht alle Sensorelemente in einer Mikroarray-Anordnung
die gleiche Sensitivität aufweisen bzw. bei entsprechend
gleicher Konzentration der Ziel-Nukleinsäure (Z) ein Signal
mit gleicher Signalstärke liefern. So ist es z.B. bekannt,
dass sich Sensorelemente, welche sich am Rand einer Mikroar-
15 ray-Anordnung befinden, anders verhalten, als Sensorelemente,
welche sich in der Mitte einer Mikroarray-Anordnung befinden.

Für den verlässlichen, fehlerfreien Betrieb von auf Mikroar-
rays basierenden Assays ist also eine verlässliche und feh-
20 lerfreie Qualitätskontrolle erforderlich. Diese muss vor al-
lem die wesentlichen Elemente einer Positiv- und Negativkon-
trolle beinhalten. Hierzu sollte ein jeweiliges Sensorelement
im Idealfall mittels einer Zwei-Punktkalibrierung kalibriert
werden, d.h. jeder Sensor sollte neben der zu bestimmenden
25 Probe auch noch mit zwei bekannten Proben (-Konzentrationen)
beaufschlagt werden und die jeweiligen Messsignale aufge-
zeichnet werden.

Insbesondere für Mikroarray-Systeme mit einer hohen Anzahl
30 von Sensorelementen bzw. adressierbaren Positionen ist diese
Vorgehensweise sehr schwierig zu realisieren, da ein Zwei-
Punkt-Kalibriersystem üblicherweise komplexe und kosteninten-
sive Maßnahmen erfordert. In der Technik ist es bekannt, die-
ses Problem dadurch zu lösen bzw. zu umgehen, indem in der
35 Mikroarray-Anordnung verschiedene Sensorelement-Positionen
als Kontroll-Sensorelemente (Kontroll-Spots) vorgesehen wer-
den. Dies hat jedoch den Nachteil, dass dabei angenommen wer-
den muss, dass sich die verschiedenen Sensoren absolut gleich

verhalten, und dass die vorgesehenen Kontroll-Spots für alle Sensorelemente repräsentativ sind.

Aufgabe der Erfindung ist die Realisierung einer einfachen,
5 kostengünstigen Zwei-Punkt-Kalibrierung, die jeweils mit ein
und demselben Sensorelement durchgeführt werden kann, welches
auch als Sensor für eine Ziel-Nukleinsäure verwendet wird.
Erfindungsgemäß wird dieses Ziel erreicht durch das Verfahren
gemäß Anspruch 1 und die Anordnung gemäß Anspruch 14. Vor-
10 teilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den abhängi-
gen Ansprüchen beschrieben.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kalibrierung eines
Sensorelements, welcher ein immobilisiertes Sondenoligonukle-
15 otid aufweist, über welches die Bindung einer Ziel-
Nukleinsäure (Z) durch den Sensor erfasst werden kann, auf-
weisend:

- a) In Kontakt Bringen des Sensorelements mit einer Kon-
trollnukleinsäure (K) deren Schmelztemperatur $T_m(K)$ kleiner
20 ist als die Schmelztemperatur der Zielnukleinsäure $T_m(Z)$;
- b) Hybridisieren der Kontrollnukleinsäure (K) an das Sonde-
noligonukleotid bei einer Temperatur $T[p] < T_m(K)$, und erfassen
eines Positiv-Kontrollsignals; und optional
- c) Verändern der Stringenzbedingungen, so dass $T[n] >$
25 $T_m(K)$, und erfassen eines Negativ-Kontrollsignals.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Kalibrierung
eines Sensorelements nach Anspruch 1, aufweisend:

- a) In Kontakt Bringen des Sensorelements mit einer Mischung
30 aufweisend Kontrollnukleinsäure (K) und Ziel-Nukleinsäure
(Z), wobei die Schmelztemperatur der Kontrollnukleinsäure
 $T_m(K)$ kleiner ist als die Schmelztemperatur der Zielnuklein-
säure $T_m(Z)$;
- b1) Hybridisieren der Mischung an das Sondenoligonukleotid
35 bei einer Temperatur $T[p] < T_m(K)$, und erfassen eines Posi-
tiv-Kontrollsignals;
- b2) Verändern der Stringenzbedingungen bei $T=T[\text{mess}]$, so
dass:

$T_m(K) < T[\text{mess}] < T_m(Z)$,

und erfassen eines Messsignals; und optional

c) Verändern der Stringenzbedingungen, so dass $T[n] > T_m(Z)$, und erfassen eines Negativ-Kontrollsignals.

5

$T_m(K)$ ist die Schmelztemperatur der Kontrollnukleinsäure bei gegebenen Lösungsmittelbedingungen.

10 $T_m(Z)$ ist die Schmelztemperatur der Ziehnukleinsäure bei gegebenen Lösungsmittelbedingungen.

$T[n]$ ist die Temperatur, bei der die Messung des Negativkontrollsignals durchgeführt wird.

15 $T[p]$ ist die Temperatur, bei der die Messung des Positiv-Kontrollsignals durchgeführt wird.

$T[\text{mess}]$ ist die Temperatur, bei der die Messung eines Messsignals durchgeführt wird.

20

Bevorzugt wird das Verändern der Stringenzbedingungen durch Erhöhen der Temperatur erreicht. Alternativ kann es durch Verändern der Lösungsmittelbedingungen oder durch Verändern einer Kombination der Lösungsmittelbedingungen und Temperatur erreicht werden.

25

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung können mehrere Messsignale 1 bis n bei unterschiedlichen Temperaturen $T[\text{mess } 1-n]$ gemessen werden, wobei $T_m(K) < T[\text{mess } 1-n] < T_m(Z)$.

30

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann das Verfahren für eine Mehrzahl von in einer Arrayanordnung angeordneten Sensorelementen durchgeführt werden.

35

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung können Ziehnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure mit einem detektierbaren Label markiert werden.

Zielnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure können direkt markiert sein (z.B. mit einem Farbstoff, Enzym, o.ä.), sie können aber auch indirekt markiert sein (z.B. mit Biotin, einer Erkennungssequenz für einen sekundären Bindungspartner mit Label o.ä.).

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann das detektierbare Label ein enzymatisches Label sein, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzen kann.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann vor Schritt (a) das Sensorelement mit detektierbarem Produkt in Kontakt gebracht werden, um ein erstes Kalibrierungssignal zu erfassen.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann auf einem weiteren Sensorelement, auf welchem detektierbares Label direkt immobilisiert ist, zusätzlich ein Temperatur-Kompensationssignal jeweils bei den Temperaturen $T[p]$, $T[\text{mess}]$, $T[\text{mess } 1-n]$ und $T[n]$ erfasst werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann das Sensorelement ein elektrochemisches Sensorelement sein und Zielnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure mit einem detektierbaren Label markiert werden, welches ein enzymatisches Label ist, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzt.

Das enzymatische Label kann insbesondere eine Phosphatase sein.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung ist die Schmelztemperatur $T_m(K)$ der Kontrollnukleinsäure (K) bevorzugt um mindestens 5°C kleiner, stärker bevorzugt mindestens 10°C kleiner als die Schmelztemperatur $T_m(Z)$ der Zielnukleinsäure (Z).

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann bevorzugt als Kontrollnukleinsäure eine Nukleinsäurezusammensetzung verwendet werden, welche randomisierte Decaoligonukleotidsequenzen aufweist. Die Verwendung von randomisierten 6, 7, 8, 9, 11, 5 12, 13, 14, oder 15-meren ist auch möglich. Insbesondere sind biotinylierte Oligomere bevorzugt. Ebenfalls möglich sind Kontrollnukleinsäuren, welche eine spezifische Erkennungssequenz tragen, die an eine spezifische komplementäre Sequenz an dem Sondenoligonukleotids des Sensorelements bindet, wobei 10 diese komplementäre Sequenz des Sondenoligonukleotids nicht an die Zielnukleinsäure bindet.

Die Erfindung betrifft ferner eine Anordnung, aufweisend:

- 15 - mindestens ein Sensorelement mit einem darauf immobilisierten Sondennukleotid, über welches die Bindung einer Ziel-Nukleinsäure (Z) durch das Sensorelement erfasst werden kann, wobei ein Bindungskomplex aus Sondenoligonukleotid und Ziel-Nukleinsäure eine Schmelztemperatur $T_m(Z)$ aufweist;
- 20 - Heiz- und /oder Kühlmittel zur Veränderung der Temperatur an dem Sensorelement;
- mindestens eine Kontrollnukleinsäure, welche mit dem Sondennukleotid ein Bindungskomplex bilden kann, der eine Schmelztemperatur von $T_m(K) < T_m(Z)$ aufweist.

25

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung weist die Anordnung ferner eine Mehrzahl von in einer Arrayanordnung angeordneten Sensorelementen auf. Die Sensorelemente können als Microarray vorgesehen sein, z.B. als Biochip. Die Arrayanordnung kann 30 als Teil einer mikrofluidischen Vorrichtung ausgeführt sein. Eine mikrofluidische Vorrichtung ist eine Vorrichtung, in welcher Fluide, insbesondere Flüssigkeiten in Volumina im Mikroliterbereich gehandhabt werden können.

35 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung ist die Kontrollnukleinsäure in der Anordnung als Trockenreagenz bevorratet. Durch Einbringen eines entsprechenden Lösungsmittels (z.B.

eine Pufferlösung) wird die Kontrollnukleinsäure gelöst und kann dann an Sondenoligonukleotide binden.

5 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung ist die Anordnung in Form eines Kits vorgesehen, umfassend eine Vorrichtung, welche die Heiz- und oder Kühlmittel und das mindestens ein Sensorelement umfasst, und umfassend eine Zusammensetzung, welche die Kontrollnukleinsäure aufweist.

10 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung ist die Kontrollnukleinsäure mit einem detektierbaren Label markiert.

15 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung ist das detektierbare Label ein enzymatisches Label, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzen kann.

20 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung ist auf einem weiteren Sensorelement detektierbares Label direkt immobilisiert.

25 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung ist das Sensorelement der Anordnung ein elektrochemisches Sensorelement und die Kontrollnukleinsäure ist mit einem detektierbaren Label markiert, welches ein enzymatisches Label ist, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzt.

30 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung weist die Anordnung als Kontrollnukleinsäure eine Nukleinsäurezusammensetzung auf, welche randomisierte Decaoligonukleotidsequenzen aufweist.

35 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung sind die Nukleinsäuren mit randomisierten Decaoligonukleotidsequenzen biotinyliert.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Sensorelement ein Element, welches bei Bindung einer Ziel-Nukleinsäure (Z) an ein mit dem Sensorelement assoziiertes Sondenoligonukleotid ein messtechnisch verwertbares Signal erfassen kann. Dieses
5 Signal kann ein qualitatives oder ein quantitatives Signal sein. Bevorzugt ist das Signal quantitativ, d.h. die Signalstärke korreliert mit der Menge der gebundenen Ziel-Nukleinsäuren.

10 Ein Sondenoligonukleotid ist ein Oligonukleotid, welches als Sonde zur Bindung einer Ziel-Nukleinsäure dient. Bevorzugt ist als Sondenoligonukleotid eine einzelsträngige Nukleinsäure. Das Sondennukleotid kann mit DNA, RNA oder synthetischen oder modifizierten Nukleotidanaloga aufgebaut sein. Bevorzugt
15 hat das Sondenoligonukleotid eine definierte Sequenz. Bevorzugt hat das Sondenoligonukleotid eine Länge von mehr als 10 Nukleotiden, stärker bevorzugt mehr als 20 Nukleotiden. Ein „immobilisiertes“ Sondenoligonukleotid bedeutet ein Nukleotid, welches auf dem Sensorelement oder in ausreichend räumlicher Nähe zu dem Sensorelement räumlich fixiert ist, derart,
20 dass es unter den Bedingungen, unter welchen Messungen an diesem SONDENSensorelement durchgeführt werden, seine Position an dem Sensorelement oder in ausreichender Nähe zu dem Sensorelement beibehält. Das Sondenoligonukleotid kann direkt
25 an dem Sensorelement aufgebracht sein, z.B. auf der Elektrode eines elektrochemischen Sensorelements oder in unmittelbarer räumlicher Nähe zu dem Sensorelement, es kann indirekt, z.B. über ein Spacer-Molekül immobilisiert sein oder durch ein Kompartiment immobilisiert sein, d.h. durch eine Abgrenzung
30 oder Umschließung. Eine Kontrollnukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, welche ebenfalls an das Sondenoligonukleotid hybridisieren kann, wobei allerdings das Hybrid aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure (K) eine geringere Schmelztemperatur als der
35 Hybrid aus Sondenoligonukleotid und Ziel-Nukleinsäure (Z) aufweist. Dies wird üblicherweise dadurch erreicht, dass die Länge des komplementären Strangs, über welchen Kontrollnukleinsäure und Sondenoligonukleotid hybridisieren, kürzer ist

als die Stranglänge, über welche die Ziel-Nukleinsäure mit dem Sondenoligonukleotid hybridisiert. Hierauf wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Der Begriff „hybridisieren“ umfasst das In-Kontakt-Bringen von zwei Nukleinsäuren (z.B. Sondenoligonukleotid und Kontroll-Nukleinsäure) unter Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Pufferzusammensetzung, Salzkonzentration), welche die Ausbildung von Hybriden über komplementäre Stränge ermöglichen.

10 Der Begriff „Erfassen eines Signals“ umfasst alle Schritte und Voraussetzungen, welche notwendig sind, damit an dem Sensorelement ein Signal abgeleitet werden kann, welches auf die Bindung einer Nukleinsäure an das Sondenoligonukleotid anzeigen kann. Bei einer direkten Markierung, Markierung der Ziel-
15 Nukleinsäure mit einem Farbstoff, kann das Signal z.B. direkt mit Hilfe einer CCD-Kamera erfasst werden. Bei einer indirekten Markierung, z.B. durch Biotinylierung der Ziel-Nukleinsäure oder Kontroll-Nukleinsäure, sollen im Sinne der vorliegenden Erfindung alle weiteren erforderlichen Schritte
20 (Inkubation mit Streptavidin-Enzymkomplex, Waschschrirte, Inkubation mit Enzymsubstrat und Messen des Messsignals) durch den Begriff „Erfassen eines Signals“ mit umfasst sein.

Unter dem Begriff Positiv-Kontrollsignal wird im Sinne der
25 vorliegenden Erfindung ein Signal verstanden, welches unter den jeweils gegebenen Bedingungen (Temperatur etc.) der maximalen Signalstärke entspricht, welche an dem Sensorelement abgeleitet werden kann. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn sämtliche individuellen Sondenoligonukleotid-Moleküle einen
30 Bindungspartner gebunden haben.

Mit dem Begriff Negativ-Kontrollsignal wird im Kontext der vorliegenden Erfindung ein Signal bezeichnet, welches für das jeweilige Sensorelement unter den jeweiligen Messbedingungen
35 einem Minimalsignal oder einem Hintergrundrauschen entspricht. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn keine der einzelnen Sondenoligonukleotid-Moleküle bei Erfassen des Signals einen Bindungspartner gebunden hat.

Eine Arrayanordnung bedeutet eine Anordnung von einzelnen Sensorelementen, welche in einzeln adressierbaren Positionen angeordnet sind.

5

Ein detektierbares Label bedeutet im Kontext der vorliegenden Erfindung eine Markierung, durch welche direkt oder indirekt ein messbares Signal erfasst werden kann. Dies kann ein direktes Label sein, z.B. ein Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff, radioaktive Markierung etc. Ebenso ist durch den Begriff detektierbares Label jedoch eine indirekte Markierung umfasst, bei welcher zur Erfassung eines messbaren Signals weitere Schritte erforderlich sind, z.B. Biotin-Markierung, Antikörper-Markierung, Enzym-Markierung etc.

10
15

Die Wahl einer Sequenz und deren Länge in Basenpaaren für ein Sondenolignukleotid hängt von einer Vielzahl an Überlegungen ab. Die Länge einer Sondenolignukleotidsequenz darf eine bestimmte Länge nicht überschreiten. Mit der Länge des Sondenolignukleotids wächst die Schmelztemperatur des Duplexes aus Sondenolignukleotid und Zielnukleinsäure. Die Schmelztemperatur (T_m) ist diejenige Temperatur, bei der das Sondenolignukleotid sich von der Zielnukleinsäure löst (schmilzt), oder anders ausgedrückt, unterhalb seiner Schmelztemperatur hybridisiert es mit der Zielnukleinsäure. Die Schmelztemperatur eines Nukleinsäuredoppelstrangs hängt bei konstanten äußeren Bedingungen (Lösungsmittelbedingungen) allerdings nicht nur von seiner Länge ab, sondern auch von seiner Nukleotidzusammensetzung. G-C-Basenpaarungen werden durch drei Wasserstoffbrücken stabilisiert, T-A-Basenpaarungen nur über zwei. G-C-Basenpaarungen sind also „stabiler“. Die Schmelztemperatur nimmt also mit der Anzahl an G-Nukleotiden und C-Nukleotiden stärker zu. Die Schmelztemperatur lässt sich mit mehreren Methoden berechnen, die Angaben beziehen sich jeweils auf °C:

20
25
30
35

Die GC-Methode ist eine einfache aber auch ungenaue Methode:

$$T_m (\text{°C}) = (64 + 41 * (\%GC - 16.4)) \text{°C}$$

wobei %GC der Anteil an G und C Basen an der Gesamtzahl der Basen ist.

5

Die "salt adjusted"-Methode ist etwas genauer und bezieht die Konzentration an Na⁺-Ionen im Reaktionsansatz mit ein:

$$T_m (\text{°C}) = (100,5 + 41 * \%GC - (820:L) * 16,6 \log[\text{Na}^+]) \text{°C}$$

10

Wobei L die Gesamtzahl der Basen ist und wobei [Na⁺] die Konzentration an Na⁺ Ionen angibt.

Eine weitere Methode ist die „base stacking“ Methode, bei der die Enthalpie- und Entropieterme der Helixbildung bei der Hybridisierung mit einbezogen werden.

Auch weitere Bestandteile des Lösungsmittels haben einen Einfluss auf die Schmelztemperatur. Insbesondere, wenn Formamid verwendet wird, um die Hybridisierungsbedingungen zu steuern. Mit folgender Formel lässt sich die Temperatur unter Berücksichtigung dieser Parameter abschätzen:

$$T_m = 81,5 + 0,41 * (\% GC) + 16,6 \log [\text{Na}^+] - (820:L) - 0,61 * (\% \text{ Formamid}) - 1,4 (\% \text{ mismatch})$$

Wobei % mismatch = Anteil der fehlgepaarten Basen. Die Hybridisierungstemperatur sollte optimalerweise etwa 5-10°C unter der Schmelztemperatur für DNA/DNA-Hybride sein, bei DNA/RNA-Hybriden reichen 5°C.

Für kürzere Sequenzen werden andere Näherungsformeln verwendet. Um die Hybridisierungs-Temperatur zu schätzen, hat sich in der Praxis die (4+2)-Regel bewährt: Dabei werden für jedes Cytosin und jedes Guanin 4°C gezählt, für jedes Adenin und jedes Thymidin 2°C. Diese Summe abzüglich 5-10°C ergibt die ungefähre Hybridisierungs-Temperatur. Die verschiedenen Formeln zur näherungsweisen Berechnung der Schmelztemperatur

35

zeigen, dass neben der Sondenlänge (Länge des komplementären Bereichs) auch GC Gehalt, Salzkonzentration und Lösungsmittelbeschaffenheit die Schmelztemperatur bestimmen. Die Kombination dieser Parameter stellt die Stringenzbedingungen dar, welche darüber entscheiden, ob zwei komplementäre oder zumindest abschnittsweise komplementäre Nukleinsäurestränge hybridisieren oder nicht. Entsprechend können durch Variation der Parameter Temperatur, Salzkonzentration, Lösungsmittelzusammensetzung die Stringenzbedingungen verändert werden und die Hybridisierung (auch „Annealing“ bezeichnet) bzw. das Schmelzen oder Auflösen der Doppelstränge gesteuert werden.

Mittlerweile gibt es auch eine große Anzahl an Software, mit der man die Schmelztemperatur von Sequenzen berechnen kann.

15

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen und den angehängten Figuren veranschaulicht und beispielhaft beschrieben. In den Figuren zeigen:

20 Figur 1: eine schematische Darstellung eines beispielhaften Sensorelements, wie es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung findet;

Figur 2: eine schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform der Erfindung;

25

Figur 3: eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung;

30 Figur 4: eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung; und

Figur 5: eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung.

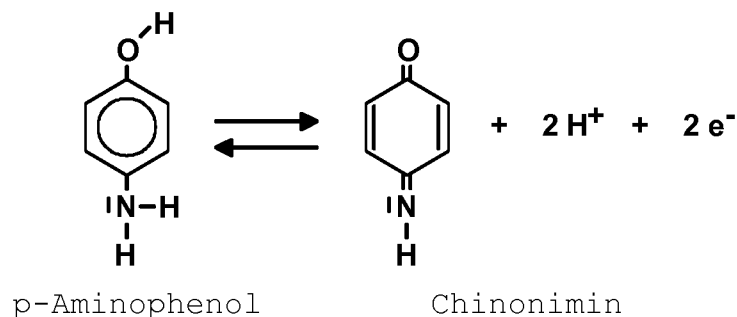
35

Figur 6: eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung.

In der Figur 1 ist ein beispielhaftes Sensorelement mit einer Messanordnung mit zwei Elektroden 2 und 3, wobei zusätzlich eine Goldfläche 5 vorhanden ist, auf welcher ein Sondenoligonukleotid 100 immobilisiert ist. Alternativ können entsprechende Sondenoligonukleotide auch direkt auf den Elektroden 2,3 immobilisiert sein. Entsprechende Sensorelemente sind beispielsweise ausführlich in DE 101 26 341 A1 beschrieben.

Figur 1 zeigt schematisch ein Substrat 1 mit planarer Oberfläche, welches beispielsweise durch die kristallographische Oberfläche eines Silizium-Chips gebildet wird. Auf dem Substrat 1 ist ein Array von elektrochemischen Detektoren 2, 3, auf vorgegebenen Arraypositionen realisiert, mit denen bioanalytische Untersuchungen mit enzymgekoppelten Reaktionen vorgenommen werden. Im Einzelnen ist für die bioanalytischen Untersuchungen ein Sondenoligonukleotid mit 100, ein Analytmolekül mit 200 und ein sog. Enzym-Label mit 300 bezeichnet. Dabei reagiert das Sondenoligonukleotid 100 spezifisch mit einem komplementären Analytmolekül 200 (dies kann eine Zielnukleinsäure oder Kontrollnukleinsäure sein) und immobilisiert so arraypositionsspezifisch einen Enzym-Label 300. Anschließend zugegebenes Enzym-Substrat 400 wird durch die katalytische Wirkung des Enzym-Labels in ein Produkt 500 überführt.

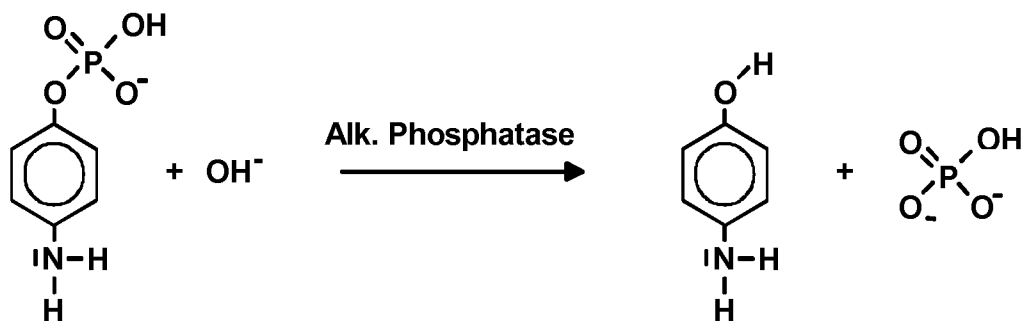
Auf dem Sensorelement kann mit Hilfe der Elektroden 2, 3 die Abnahme/Zunahme von Substrat/Produkt gemessen werden. Als detekierbares Produkt 500 sei als Beispiel das Redoxpaar p-Aminophenol/Chinonimin genannt:



Am entsprechenden Redoxprozess sind 2 Elektronen sowie 2 H⁺-Ionen beteiligt.

- 5 Dieses System kommt z.B. bei Enzym-gekoppelten Nachweisreaktionen zum Einsatz. Dabei wird das Enzym "Alkalische Phosphatase" als Label- bzw. Verstärkungs-Substanz eingesetzt. Alkalische Phosphatase ist in der Lage, p-Aminophenyl-Phosphat in p-Aminophenol und Phosphat zu spalten:

10



p-Aminophenyl-Phosphat

- Das entstehende p-Aminophenol wird am Elektroden-System oxidiert bzw. das Redoxpaar p-Aminophenol/Chinonimin zyklisiert. Das Signal kann dann als Anstieg der Stromstärke (I) im Verlauf der Zeit (t) an den Elektroden abgeleitet werden, wobei die Signalstärke $S = dI/dt$.

- 20 In Figur 2 ist eine schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform der Erfindung gezeigt. Ein Sensorelement wird mit Kontrollnukleinsäuren (K) beladen bei einer Temperatur $T[p] < T_m(K)$, wobei $T_m(K)$ die Schmelztemperatur des Duplexes aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure unter gegebenen Lösungsmittelbedingungen ist. Die Konzentration der
- 25 Kontrollnukleinsäure ist ausreichend hoch, dass alle freien Sondenolignukleotide abgesättigt werden können. Bei der Temperatur $T[p]$ hybridisieren die Kontrollnukleinsäure-Moleküle an sämtliche freie Sondenolignukleotide. Die Kontrollnukleinsäure ist mit Biotin (B) gelabelt bzw. markiert. Nun wird
- 30 Streptavidin-konjugiertes Enzym (E) zugegeben, welches an Biotin (B) bindet und ein Substrat (nicht gezeigt) umsetzen

kann, so dass an dem Sensorelement ein Signal (+) abgeleitet werden kann.

Bei der Temperatur $T[p]$ sind alle Sondenoligonukleotide mit
5 Kontrollnukleinsäure abgesättigt, so dass man ein maximales Signal als Positiv-Kontrollsignal erhält.

Anschließend wird die Temperatur auf $T[n] > T_m(K)$ erhöht. Die
Duplexe aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure
10 schmelzen auf, so dass die Kontrollnukleinsäuren freigesetzt werden und (zusammen mit dem Enzym weggespült werden können. Bei der Temperatur $T[n]$ sind alle Sondenoligonukleotide nun wieder ungesättigt, so dass kein Signal (-) bzw. lediglich ein Rauschsignal gemessen wird und man ein minimales Signal
15 als Negativ-Kontrollsignal erhält.

Die Werte für das Positiv-Kontrollsignal und das Negativ-Kontrollsignal können z.B. in einer Steuereinrichtung gespeichert werden und als zukünftige Referenzwerte weiter benutzt
20 werden. Man kann auf diese Weise eine spezifische Kalibrierung für die einzelnen Positionen eines Microarray durchführen, bei dem jede Arrayposition (jeder „Spot“) durch das in Fig. 2 dargestellte Verfahren kalibriert wird. Dies kann auch zur Qualitätskontrolle des Microarrays durchgeführt werden.

25

In Figur 3 ist eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung gezeigt. Ein Sensorelement wird mit einer Probe beladen, welche mutmaßlich die Zielnukleinsäure (Z) für ein entsprechendes Sondenoligonukleotid ent-
30 hält. Ferner wird Kontrollnukleinsäure (K) mit hinzu gegeben. Die Temperatur beträgt $T[p] < T_m(K)$, wobei $T_m(K)$ die Schmelztemperatur des Duplexes aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure unter gegebenen Lösungsmittelbedingungen ist (zusätzlich gilt $T_m(K) < T_m[Z]$). Die Konzentration der Mischung aus Zielnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure ist aus-
35 reichend hoch, dass alle freien Sondenoligonukleotide mit Zielnukleinsäure oder Kontrollnukleinsäure abgesättigt werden können. Bei der Temperatur $T[p]$ hybridisieren die Ziel- und

Kontrollnukleinsäure-Moleküle an sämtliche freie Sondenoligonukleotide. Die Kontrollnukleinsäure ist mit Biotin (B) gelabelt. Nun wird Streptavidin-konjugiertes Enzym (E) zugegeben, welches an Biotin (B) bindet und ein Substrat (nicht
5 gezeigt) umsetzen kann, so dass an dem Sensorelement ein Signal (+) abgeleitet werden kann.

Bei der Temperatur $T[p]$ sind nun alle Sondenoligonukleotide mit Ziel- oder Kontrollnukleinsäure abgesättigt, so dass man
10 ein maximales Signal als Positiv-Kontrollsignal erhält.

Anschließend wird die Temperatur $T[mess]$ auf $T_m(K) < T[mess] < T_m(Z)$ erhöht, wobei $T_m(Z)$ die Schmelztemperatur des Duplexes aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure unter gegebenen Lösungsmittelbedingungen ist. Die Duplexe
15 aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure schmelzen auf, so dass die Kontrollnukleinsäuren freigesetzt werden und (zusammen mit dem daran gebundenen Enzym) weggespült werden können. Bei der Temperatur $T[mess]$ liefern nur noch die Sondenoligonukleotide, die mit Zielnukleinsäure belegt sind, ein
20 Signal (+), welches ein Messsignal für die Zielnukleinsäure ist.

Anschließend wird nun die Temperatur auf $T[n] > T_m(Z)$ erhöht.
25 Die Duplexe bzw. Hybride aus Sondenoligonukleotid und Zielnukleinsäure schmelzen jetzt auch auf, so dass die Zielnukleinsäuren freigesetzt werden und (zusammen mit dem Enzym) weggespült werden können. Bei der Temperatur $T[n]$ sind alle Sondenoligonukleotide nun wieder ungesättigt, so dass kein
30 Signal (-) bzw. lediglich ein Rauschsignal gemessen wird und man ein minimales Signal als Negativ-Kontrollsignal erhält.

Der Signalstärkewert der Zielnukleinsäure $S[Z]$ kann beispielsweise dann in Relation zu dem Positiv-Kontrollsignal und Negativ-Kontrollsignal ausgedrückt werden, z.B. gemäß der
35 Formel:

$$S[Z] = (S[mess] - S[n]) / (S[p] - S[n]).$$

Auf diese Weise kann bei jeder Messung eine gleichzeitige Kalibrierung des Sensorelements durchgeführt werden, was eine besonders hohe Messgenauigkeit ermöglicht.

5

Die Sequenz der Kontrollnukleinsäure ist z.B. so gewählt, dass sie über eine kürzere komplementäre Sequenz an das Sondenoligonukleotid bindet, als die Zielnukleinsäure. Alternativ kann die Kontrollnukleinsäure auch einen geringeren GC-Gehalt oder eine Kombination aus geringerem GC-Gehalt und kürzerer komplementär bindender Sequenz als die Zielnukleinsäure aufweisen. In den Figuren 2 bis 6 ist dies lediglich schematisch dargestellt. Lediglich aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Zielnukleinsäure mit fünf bindenden Basenpaaren und die Kontrollnukleinsäure mit zwei bindenden Basenpaaren dargestellt. Bevorzugt bindet die Zielnukleinsäure über einen Bereich von 15 oder mehr, stärker bevorzugt 30 oder mehr bindenden Basenpaaren.

20 Wenn die Zielnukleinsäure über einen komplementären Bereich von ca. 20 bis 25 Basen an das Sondenoligonukleotid bindet, so kann für die Kontrollnukleinsäure der komplementäre Bereich beispielsweise mit einer Länge von 6 bis 12 Basen gewählt werden. Es ist möglich, eine Zielnukleinsäure zu wählen, welche im komplementären Bereich teilweise eine zur Zielnukleinsäure identische Sequenz aufweist, so dass sie über teilweise dieselben Nukleotide im Sondenoligonukleotid wie die Zielnukleinsäure bindet. Es ist auch denkbar, als Kontrollnukleinsäure kurze Oligomere mit randomisierten Sequenzen zu verwenden, z.B. randomisierte Hexamere, randomisierte Decamere oder ähnliche.

Gemäß einer alternativen Ausführungsform weist das Sondenoligonukleotid einen Bereich mit einer Sequenz auf, die nicht an die Zielnukleinsäure hybridisieren kann, sondern nur an die Kontrollnukleinsäure. Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann dieser Bereich durch einen Spacer von der Sequenz, welche die Zielnukleinsäure bindet, beabstandet sein, so dass es

35

sogar möglich ist, dass Zielnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure gleichzeitig an das gleiche Sondenoligonukleotidmolekül binden. Dies ist z.B. in Figur 4 dargestellt, wo an ein Sondenoligonukleotid sowohl die kürzere Kontrollnukleinsäure als auch die längere Zielnukleinsäure an unterschiedliche Bereiche des Sondenolignukleotids binden können. Das Verfahren gemäß Fig. 4 wird ansonsten entsprechend dem Verfahren gemäß Fig. 3 durchgeführt.

10 In Fig. 5 ist eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung gezeigt, bei dem eine Schmelzpunktcurve der Zielnukleinsäure (Z) bestimmt wird. Ein Sensorelement wird mit einer Probe beladen, welche mutmaßlich die Zielnukleinsäure für ein entsprechendes Sondenoligonukleotid enthält. Ferner wird - wie beim Verfahren gemäß Fig. 3 15 Kontrollnukleinsäure (K) mit hinzugegeben. Die Temperatur beträgt $T[p] < T_m(K)$, wobei $T_m(K)$ die Schmelztemperatur des Duplexes aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure unter gegebenen Lösungsmittelbedingungen ist. Die Konzentration der Mischung aus Zielnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure ist ausreichend hoch, so dass alle freien Sondenolignukleotide mit Zielnukleinsäure oder Kontrollnukleinsäure 20 abgesättigt werden können. Bei der Temperatur $T[p]$ hybridisieren die Ziel- und Kontrollnukleinsäure-Moleküle an sämtliche freie Sondenolignukleotide. Die Kontrollnukleinsäure ist mit Biotin (B) gelabelt. Nun wird Streptavidin-konjugiertes Enzym (E) zugegeben, welches an Biotin (B) bindet und ein Substrat (nicht gezeigt) umsetzen kann, so dass an dem Sensorelement ein Signal (+) abgeleitet werden kann.

30 Bei der Temperatur $T[p]$ sind nun alle Sondenolignukleotide mit Ziel- oder Kontrollnukleinsäure abgesättigt, so dass man ein maximales Signal als Positiv-Kontrollsignal erhält.

35 Anschließend wird die Temperatur schrittweise über $T[\text{mess } 1]$ $T[\text{mess } 2]$ etc. erhöht auf $T[p] < T[\text{mess } 1-n] < T_m(Z)$ und wobei $T_m(Z)$ die Schmelztemperatur des Duplexes aus Sondenoligonukleotid und Zielnukleinsäure unter gegebenen Lösungsmittel-

bedingungen ist. Die Duplexe aus Sondenoligonukleotid und Kontrollnukleinsäure schmelzen als erstes (wie in Fig. 5 bei T[mess 1] dargestellt) auf, so dass die Kontrollnukleinsäuren freigesetzt werden und (zusammen mit dem daran gebundenen Enzym) weggespült werden können. Bei der Temperatur T[mess 1] liefern nur noch die Sondenoligonukleotide, die mit Zielnukleinsäure belegt sind, ein Signal, welches ein Messsignal für die Zielnukleinsäure ist. Bei der schrittweisen Temperaturerhöhung beginnen nun auch die Duplexe aus Sondenoligonukleotid und Zielnukleinsäure nach und nach aufzuschmelzen (wie in Fig. 5 bei T[mess 2] dargestellt), so dass eine Schmelzkurve erstellt werden kann.

Schließlich wird nun die Temperatur auf $T[n] > T_m(Z)$ erhöht. Die Duplexe aus Sondenoligonukleotid und Zielnukleinsäure schmelzen jetzt vollständig auf, so dass sämtliche Zielnukleinsäuren freigesetzt werden und (zusammen mit dem Enzym) weggespült werden können. Bei der Temperatur T[n] sind alle Sondenoligonukleotide nun wieder ungesättigt, so dass kein Signal (-) bzw. lediglich ein Rauschsignal gemessen wird und man ein minimales Signal als Negativ-Kontrollsignal erhält.

Ferner kann mit Para-aminophenol (pAP), dem primären Substrat der elektrochemischen Reaktion, eine initiale Kalibrierungsmessung durchgeführt werden, um festzustellen, ob alle Elektroden auf das Vorhandensein dieser redoxreaktiven Substanz ansprechen. Damit kann verifiziert werden, dass sämtliche Elektroden auf dieses redoxreaktive Produkt ansprechen. Nun wird freies Para-aminophenol weggespült und mit einer temperatur-abhängigen Messsequenz begonnen.

In Figur 6 ist eine schematische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der Erfindung gezeigt. In der oberen Reihe ist die normale Messsequenz, so wie für Fig 5 beschrieben, zusammengefasst:

Hybridisierung mit Zielnukleinsäure (Z) und Kontrollnukleinsäure (K), Messung der Positivkontrolle bei $T[p] < T_m(K)$, Ab-

schmelzen der Kontrollnukleinsäure und Erstellen der Schmelz-
kurve der Zielnukleinsäure bei $T[p] < T[mess\ 1-n] < T_m(Z)$ und Er-
fassen des Signals der Negativkontrolle bei $T[n] > T_m(Z)$. Auf
weiteren Sensorelementen des Sensors, die als gesondert aus-
gelegte Spots zur Temperaturkontrolle ausgeführt sind, sind
5 Sondenoligonukleotide aufgebracht, welche ein Biotin tragen
(in Fig. 6 in der unteren Reihe dargestellt). Hier bindet das
Enzym über den Komplex Biotin - Streptavidin über den gesam-
ten gemessenen Temperaturbereich von $T[p] < T_m(K)$, $T[p] < T[mess$
10 $1-n] < T_m(Z)$, $T[n] > T_m(Z)$ unabhängig von der Schmelztemperatur
der DNA-Hybride an die Sondenoligonukleotide und liefert eine
Aussage über die Abhängigkeit des Detektionssystems (Enzymak-
tivität und elektrochemische Redoxreaktion) von der Tempera-
tur. Anhand des Temperaturverlaufs des Maximalsignales kann
15 die Signalstärke auf den Mess-Spots, auf welchen die Zielnuk-
leinsäure gemessen wird, korrigiert werden.

Ferner ist es möglich, zusätzliche Negativkontroll-Spots vor-
zusehen, welche mit Sondenoligonukleotiden mit randomisierten
20 Sequenzen beschichtet sind, die also nicht spezifisch die
Nukleinsäure binden können. Dadurch können unter anderem un-
spezifische Bindungseffekte und strömungsbedingte Temperatur-
effekte kompensiert werden. Schließlich wird jedes Sensor-
Paar auf Enzym-Umsatz (Substrat-Turnover) in Mol/(Liter x
25 sec.) kalibriert. Auch hier ist es wiederum möglich, aus der
Signalstärke für den Mess-Spot (welcher Sondenoligonukleotide
trägt, die für die Zielnukleinsäure spezifisch sind) und dem
Negativkontroll-Spot ein kompensiertes Signal zu errechnen,
z.B. durch Bildung von Differenz oder Quotient.

30 Es wird darauf hingewiesen, dass die Beispiele lediglich ver-
anschaulichend und beispielhaft sind und dass im Rahmen des
Schutzumfangs der Patentansprüche Änderungen und Modifikatio-
nen möglich sind. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Ver-
fahren in Verbindung mit anderen Sensorelementen und Markern
35 oder Labeln verwendet werden, z.B. für optische, magnetische
oder gravimetrische Sensorelemente.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kalibrierung eines Sensorelements, welches ein immobilisiertes Sondenoligonukleotid aufweist, über
5 welches die Bindung einer Ziel-Nukleinsäure (Z) durch den Sensor erfasst werden kann, aufweisend:
 - a) In Kontakt Bringen des Sensorelements mit einer Kontrollnukleinsäure (K) deren Schmelztemperatur $T_m(K)$ kleiner ist als die Schmelztemperatur der Zielnukleinsäure $T_m(Z)$
 - 10 b) Hybridisieren der Kontrollnukleinsäure (K) an das Sondenoligonukleotid bei einer Temperatur $T[p] < T_m(K)$, und erfassen eines Positiv-Kontrollsignals
2. Verfahren nach Anspruch 1, aufweisend den zusätzlichen
15 Schritt:
 - c) Verändern der Stringenzbedingungen, so dass $T[n] > T_m(K)$, und erfassen eines Negativ-Kontrollsignals.
3. Verfahren zur Kalibrierung eines Sensorelements nach Anspruch 1, aufweisend:
20
 - a) In Kontakt Bringen des Sensorelements mit einer Mischung aufweisend Kontrollnukleinsäure (K) und Ziel-Nukleinsäure (Z), wobei die Schmelztemperatur der Kontrollnukleinsäure $T_m(K)$ kleiner ist als die Schmelztemperatur der Zielnukleinsäure $T_m(Z)$;
25
 - b1) Hybridisieren der Mischung an das Sondenoligonukleotid bei einer Temperatur $T[p] < T_m(K)$, und erfassen eines Positiv-Kontrollsignals;
 - b2) Verändern der Stringenzbedingungen bei einer Messtemperatur $T=T[mess]$, so dass:
30 $T_m(K) < T[mess] < T_m(Z)$,
und erfassen eines Messsignals; und
4. Verfahren nach Anspruch 2, aufweisend den zusätzlichen
35 Schritt:
 - c) Verändern der Stringenzbedingungen, so dass $T[n] > T_m(Z)$, und erfassen eines Negativ-Kontrollsignals.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verändern der Stringenzbedingungen durch Erhöhen der Temperatur erreicht wird
- 5 6. Verfahren nach Anspruch 3, wobei mehrere Messsignale 1 bis n bei unterschiedlichen Temperaturen $T[\text{mess } 1-n]$ gemessen werden, wobei $T_m(K) < T[\text{mess } 1-n] < T_m(Z)$.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei
10 das Verfahren für eine Mehrzahl von in einer Arrayanordnung angeordneten Sensorelementen durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei
15 Zielnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure mit einem detektierbaren Label markiert werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das detektierbare Label ein enzymatisches Label ist, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzen kann.
20
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei vor Schritt (a) das Sensorelement mit detektierbarem Produkt in Kontakt gebracht wird, um ein erstes Kalibrierungssignal zu erfassen.
25
11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei auf einem weiteren Sensorelement, auf welchem detektierbares Label direkt immobilisiert ist, zusätzlich ein Temperatur-Kompensationssignal jeweils bei den Temperaturen $T[p]$, $T[\text{mess}]$, $T[\text{mess } 1-n]$ und $T[n]$ erfasst wird.
30
12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei
35 das Sensorelement ein elektrochemisches Sensorelement ist und wobei Zielnukleinsäure und Kontrollnukleinsäure mit einem detektierbaren Label markiert sind, welches ein enzymatisches Label ist, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzt.

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Schmelztemperatur $T_m(K)$ der Kontrollnukleinsäure (K) um mindestens 5°C kleiner ist als die Schmelztemperatur $T_m(Z)$ der Zielnukleinsäure (Z).
14. Anordnung, aufweisend
- mindestens ein Sensorelement mit einem darauf immobilisierten Sondennukleotid, über welches die Bindung einer Ziel-Nukleinsäure (Z) durch das Sensorelement erfasst werden kann, wobei ein Bindungskomplex aus Sondenoligonukleotid und Ziel-Nukleinsäure eine Schmelztemperatur $T_m(Z)$ aufweist;
 - Heiz- und /oder Kühlmittel zur Veränderung der Temperatur an dem Sensorelement;
 - mindestens eine Kontrollnukleinsäure, welche mit dem Sondennukleotid ein Bindungskomplex bilden kann, der eine Schmelztemperatur von $T_m(K) < T_m(Z)$ aufweist.
15. Anordnung nach Anspruch 14, ferner aufweisend eine Mehrzahl von in einer Arrayanordnung angeordneten Sensorelementen.
16. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 oder 15, wobei die die Kontrollnukleinsäure in der Anordnung als Trockenreagenz bevorratet ist.
17. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 oder 15, wobei die Anordnung in Form eines Kits vorgesehen ist, umfassend eine Vorrichtung, welche die Heiz- und oder Kühlmittel und das mindestens eine Sensorelement umfasst, und umfassend eine Zusammensetzung, welche die Kontrollnukleinsäure aufweist.
18. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei, wobei die Kontrollnukleinsäure mit einem detektierbaren Label markiert ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das detektierbare Label ein enzymatisches Label ist, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzen kann.
- 5
20. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei auf einem weiteren Sensorelement detektierbares Label direkt immobilisiert ist.
- 10
21. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 20, wobei das Sensorelement ein elektrochemisches Sensorelement ist und wobei die Kontrollnukleinsäure mit einem detektierbaren Label markiert ist, welches ein enzymatisches Label ist, welches ein Substrat zu einem durch das Sensorelement detektierbaren Produkt umsetzt.
- 15
22. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 21, wobei die Schmelztemperatur $T_m(K)$ der Kontrollnukleinsäure (K) um mindestens 5°C kleiner ist als die Schmelztemperatur $T_m(Z)$ der Zielnukleinsäure (Z).
- 20
23. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 22, aufweisend als Kontrollnukleinsäure eine Nukleinsäurezusammensetzung, welche randomisierte Decaoligonukleotidsequenzen aufweist.
- 25
24. Anordnung nach Anspruch 23, wobei die Nukleinsäuren mit randomisierten Decaoligonukleotidsequenzen biotinyliert sind.
- 30
25. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 24, wobei das Sensorelement ein elektrochemisches Sensorelement ist.

FIG 1

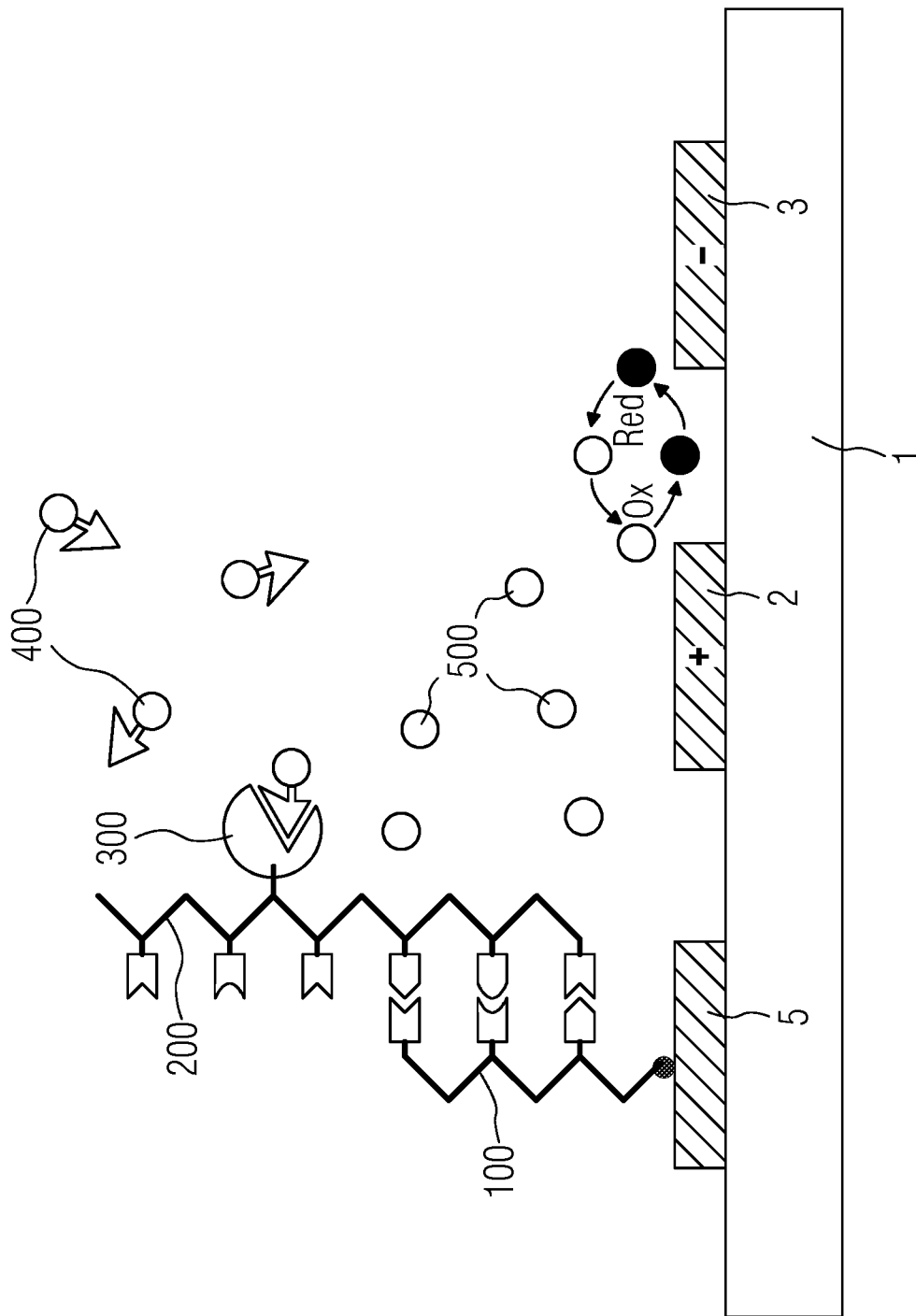


FIG 2

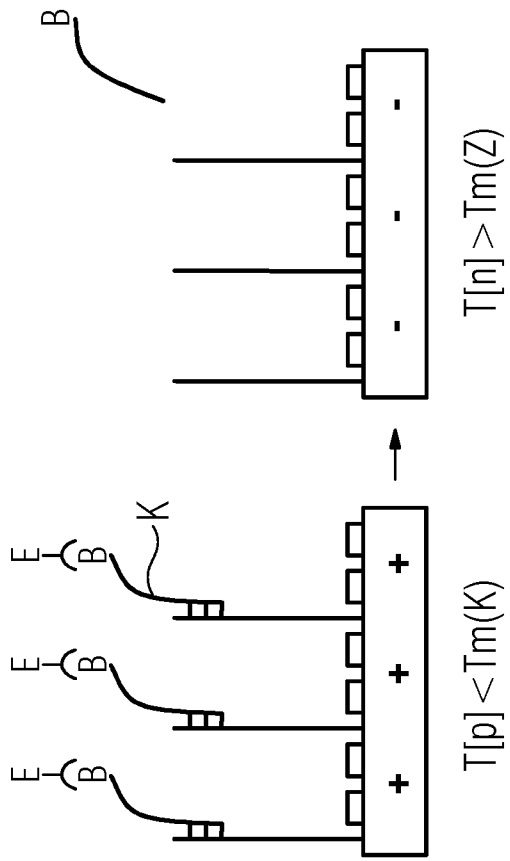
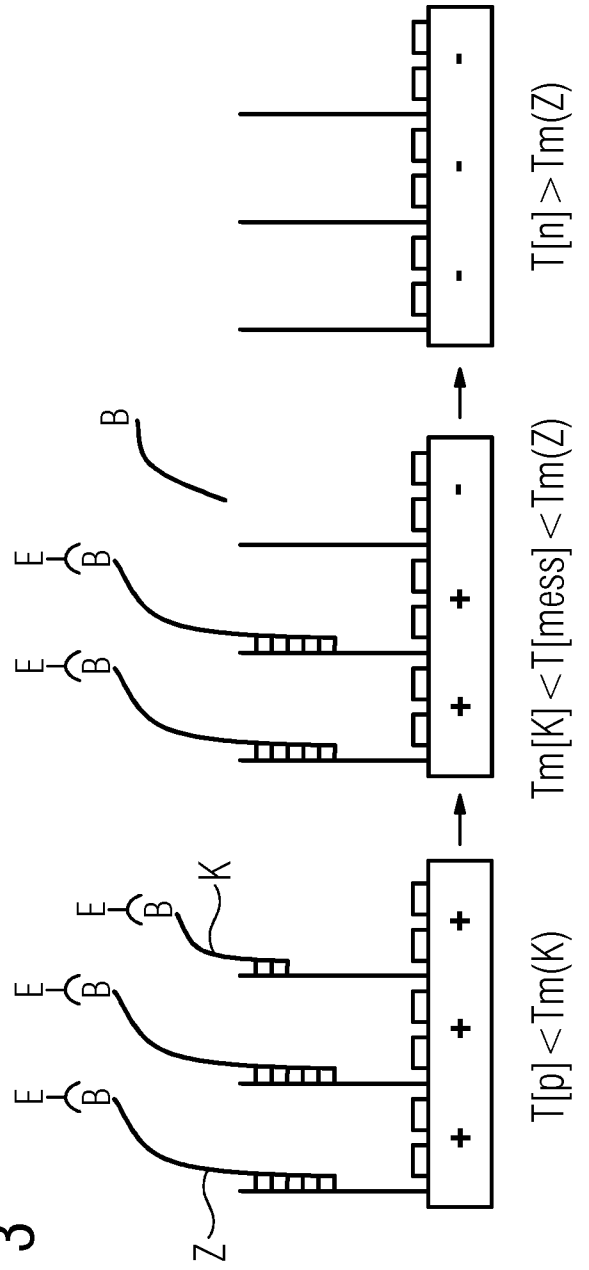


FIG 3



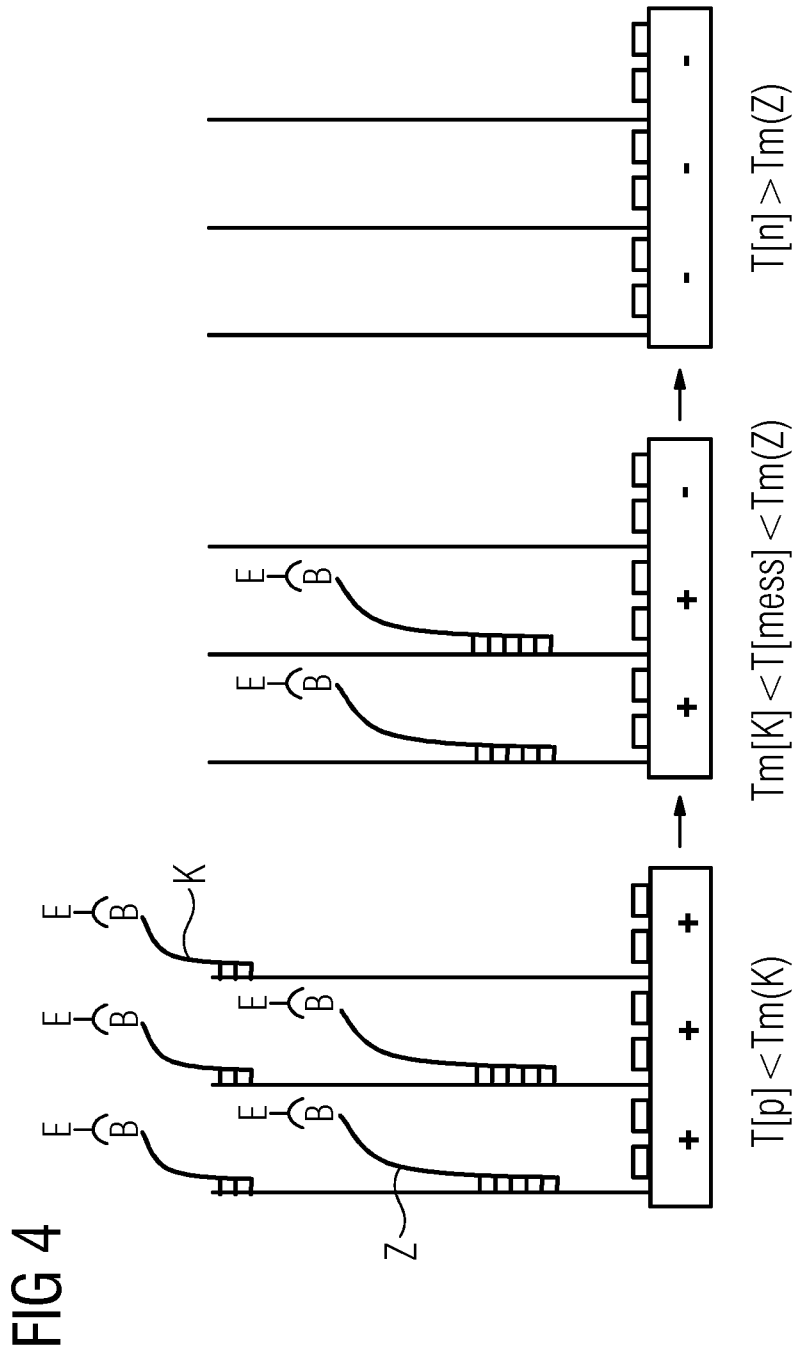


FIG 5

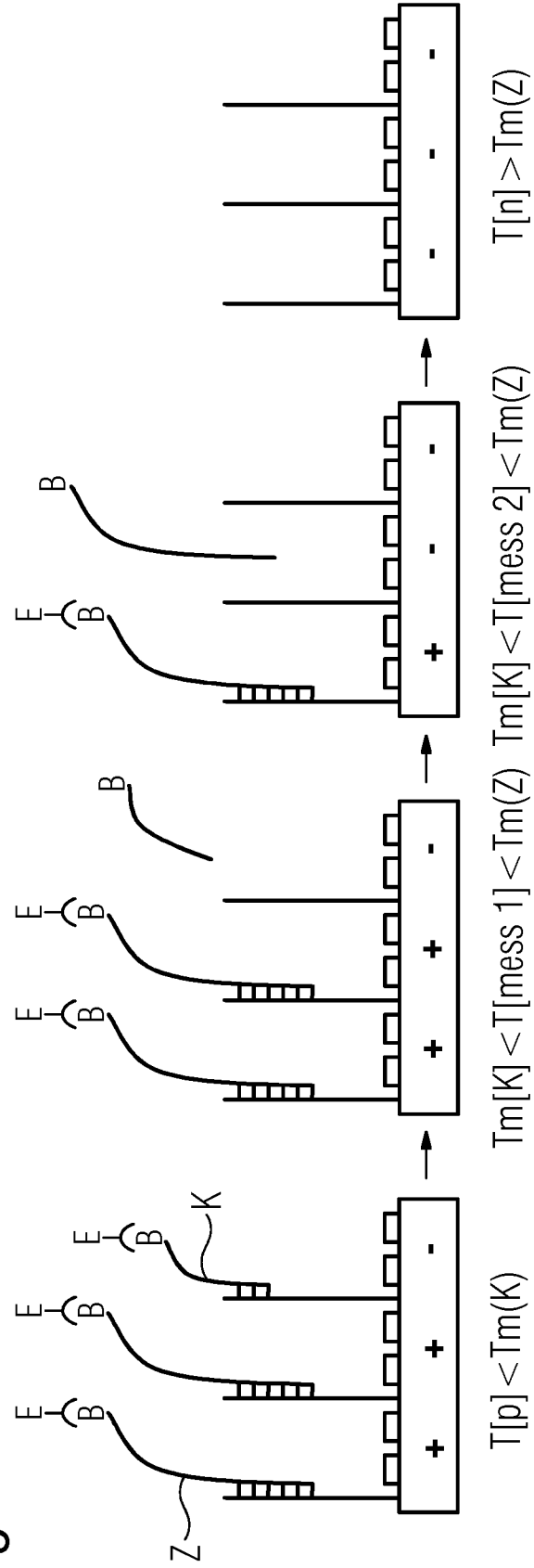
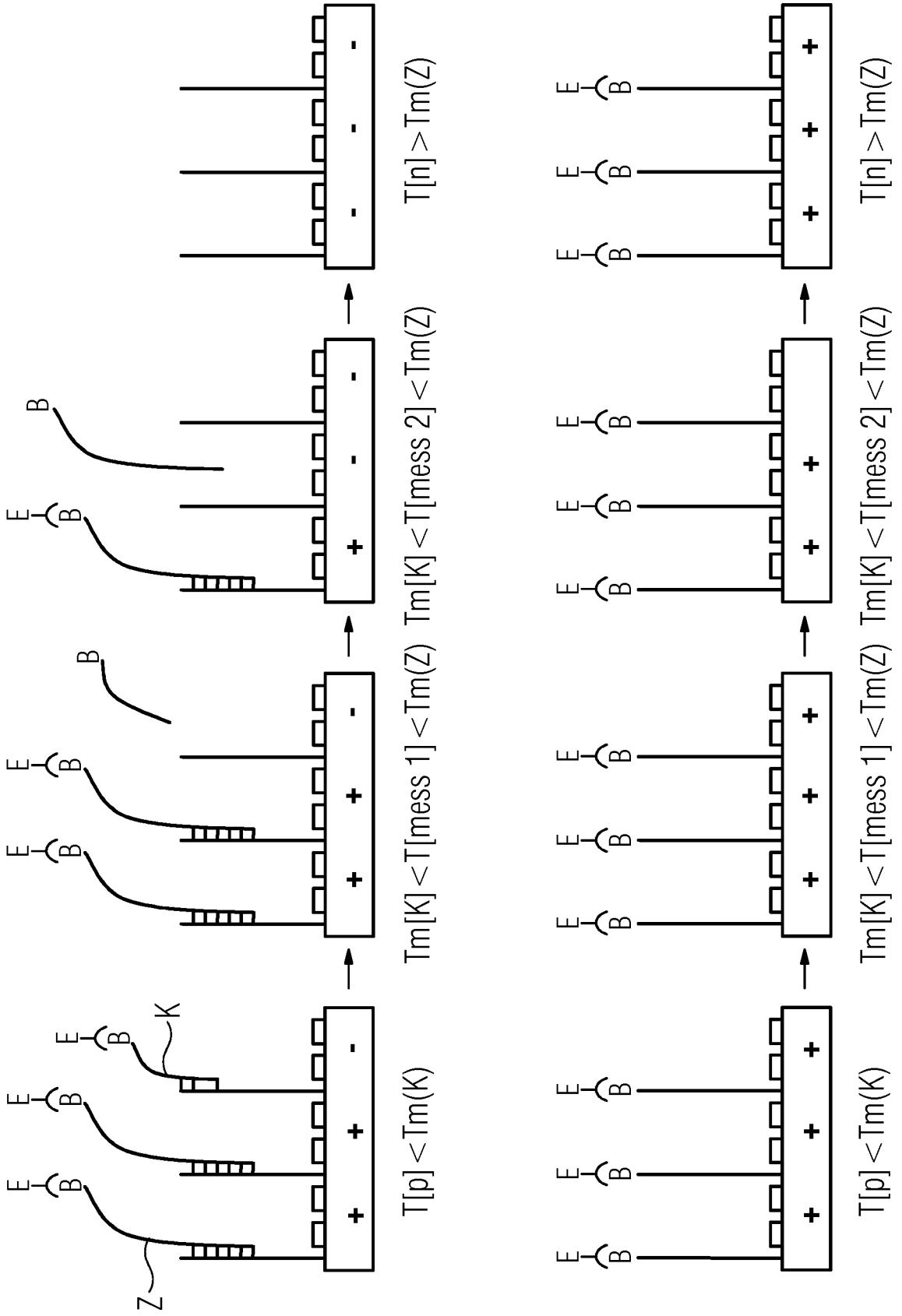


FIG 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/064680

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/064012 A (ALOPEX GMBH [DE]; MANN WOLFGANG [DE]; KRISPIN OLIVER [DE]; HOFFMUELLER) 14 July 2005 (2005-07-14)	1-3,5-25
Y	page 17, line 12 - page 18, line 8; claims 3-21; figure 6 page 15, lines 20-29	4
X	US 2004/081974 A1 (GAO BEN [CN]) 29 April 2004 (2004-04-29)	14-25
Y	paragraph [0040]; claims 1-9	4
A	EP 1 108 472 A (HITACHI LTD [JP]) 20 June 2001 (2001-06-20) the whole document	1-25
	----- -/-- -----	

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents :
- | | |
|---|---|
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | *Z* document member of the same patent family |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search 9 Februar 2009	Date of mailing of the international search report 18/02/2009
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Santagati, Fabio
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/064680

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/062666 A (UNIV DENMARK TECH DTU [DK]; DUFVA MARTIN [DK]; PETRONIS SARUNAS [SE];) 7 June 2007 (2007-06-07) example 3 -----	1-25
A	EP 1 132 485 A (HITACHI SOFTWARE ENG [JP]) 12 September 2001 (2001-09-12) claims 7-9 -----	14-25
A	WO 2004/106546 A (SIEMENS AG [DE]; GUMBRECHT WALTER [DE]; PAULICKA PETER [DE]; STANZEL M) 9 December 2004 (2004-12-09) claim 28 -----	14-25
A	WO 02/097413 A (SIEMENS AG [DE]; GUMBRECHT WALTER [DE]; STANZEL MANFRED [DE]; MUND KON) 5 December 2002 (2002-12-05) -----	9,12,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/064680

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005064012	A	14-07-2005	DE 10361137 A1	28-07-2005
			EP 1706505 A2	04-10-2006
US 2004081974	A1	29-04-2004	AU 2002338167 A1	13-05-2004
			CA 2429101 A1	24-04-2004
			WO 2004038042 A1	06-05-2004
			CN 1446264 A	01-10-2003
			EP 1437416 A1	14-07-2004
			JP 2005519642 T	07-07-2005
EP 1108472	A	20-06-2001	DE 60029913 T2	06-09-2007
			US 6428749 B1	06-08-2002
			US 6346383 B1	12-02-2002
WO 2007062666	A	07-06-2007	NONE	
EP 1132485	A	12-09-2001	DE 60119409 T2	26-04-2007
			JP 3871846 B2	24-01-2007
			JP 2001255328 A	21-09-2001
			US 2002022226 A1	21-02-2002
WO 2004106546	A	09-12-2004	AT 408031 T	15-09-2008
			CN 101094923 A	26-12-2007
			DE 10324912 A1	05-01-2005
			EP 1629116 A1	01-03-2006
			JP 2007503000 T	15-02-2007
			US 2007264630 A1	15-11-2007
WO 02097413	A	05-12-2002	DE 10126341 A1	12-12-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/064680

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12Q1/68

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2005/064012 A (ALOPEX GMBH [DE]; MANN WOLFGANG [DE]; KRISPIN OLIVER [DE]; HOFFMUELLER) 14. Juli 2005 (2005-07-14)	1-3,5-25
Y	Seite 17, Zeile 12 - Seite 18, Zeile 8; Ansprüche 3-21; Abbildung 6 Seite 15, Zeilen 20-29	4
X	US 2004/081974 A1 (GAO BEN [CN]) 29. April 2004 (2004-04-29)	14-25
Y	Absatz [0040]; Ansprüche 1-9	4
A	EP 1 108 472 A (HITACHI LTD [JP]) 20. Juni 2001 (2001-06-20) das ganze Dokument	1-25

-/--

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Februar 2009

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/02/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Santagati, Fabio

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2007/062666 A (UNIV DENMARK TECH DTU [DK]; DUFVA MARTIN [DK]; PETRONIS SARUNAS [SE];) 7. Juni 2007 (2007-06-07) Beispiel 3 -----	1-25
A	EP 1 132 485 A (HITACHI SOFTWARE ENG [JP]) 12. September 2001 (2001-09-12) Ansprüche 7-9 -----	14-25
A	WO 2004/106546 A (SIEMENS AG [DE]; GUMBRECHT WALTER [DE]; PAULICKA PETER [DE]; STANZEL M) 9. Dezember 2004 (2004-12-09) Anspruch 28 -----	14-25
A	WO 02/097413 A (SIEMENS AG [DE]; GUMBRECHT WALTER [DE]; STANZEL MANFRED [DE]; MUND KON) 5. Dezember 2002 (2002-12-05) -----	9,12,21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/064680

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2005064012 A	14-07-2005	DE 10361137 A1	28-07-2005
		EP 1706505 A2	04-10-2006
US 2004081974 A1	29-04-2004	AU 2002338167 A1	13-05-2004
		CA 2429101 A1	24-04-2004
		WO 2004038042 A1	06-05-2004
		CN 1446264 A	01-10-2003
		EP 1437416 A1	14-07-2004
		JP 2005519642 T	07-07-2005
EP 1108472 A	20-06-2001	DE 60029913 T2	06-09-2007
		US 6428749 B1	06-08-2002
		US 6346383 B1	12-02-2002
WO 2007062666 A	07-06-2007	KEINE	
EP 1132485 A	12-09-2001	DE 60119409 T2	26-04-2007
		JP 3871846 B2	24-01-2007
		JP 2001255328 A	21-09-2001
		US 2002022226 A1	21-02-2002
WO 2004106546 A	09-12-2004	AT 408031 T	15-09-2008
		CN 101094923 A	26-12-2007
		DE 10324912 A1	05-01-2005
		EP 1629116 A1	01-03-2006
		JP 2007503000 T	15-02-2007
		US 2007264630 A1	15-11-2007
WO 02097413 A	05-12-2002	DE 10126341 A1	12-12-2002