

(12)

(43) Veröffentlicht am: **15.01.2009**

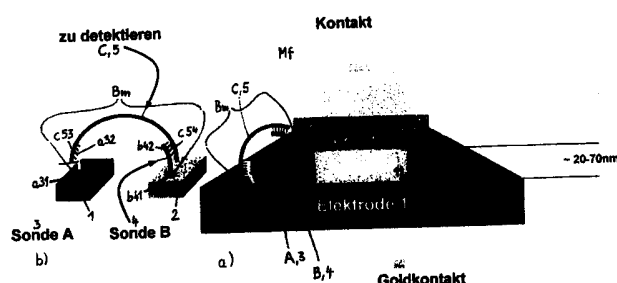
(51) Int. Cl.⁸: **G01N 33/53** (2006.01),
G01N 33/536 (2006.01),
C12Q 1/00 (2006.01),
C12Q 1/68 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

**AUSTRIAN RESEARCH CENTERS GMBH
- ARC
A-1220 WIEN (AT)
RHO-BEST COATING
HARTSTOFFBESCHICHTUNGS GMBH
A-6020 INNSBRUCK (AT)**

(54)

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von organischen bzw. biochemischen Substanzen, und zur Bestimmung von deren Konzentration in einem Fluidmedium (Fm) unter Einsatz eines zumindest zwei Elektroden umfassenden Nanogapsensors. Es ist vorgesehen, dass ein Nanogapsensor (100) mit materialunterschiedlichen Elektroden eingesetzt wird, wobei an die Oberflächen der beiden Elektroden (1, 2) des Sensors jeweils ein Sondenmolekül A(3), B(4) mit die Elektroden sensorgebunden wird und wobei die freien Reste der Sondenmoleküle zumindest eine bindungsfreudige Gruppe mit Spezifität für die Bindung mit einer gesuchten Substanz bzw. mit einem Analytmolekül C(5) im Fluidmedium aufweist, und dass dieses Analytmolekül mit jeweils mindestens zwei Bindungsstellen (c53, c54) selektiv aus dem es enthaltenden Fluidmedium austritt, an die freien Enden der Sondenmoleküle anbindet und mit denselben eine Brücke (Bm) bildet, wodurch die Impedanz geändert wird und aufgrund dieser Änderung auf die Konzentration der Substanz im Fluidmedium geschlossen wird.



Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von organischen bzw. biochemischen Substanzen, und zur Bestimmung von deren Konzentration in einem Fluidmedium (Fm) unter Einsatz eines zumindest zwei Elektroden umfassenden Nanogapsensors. Es ist vorgesehen, dass ein Nanogapsensor (100) mit materialunterschiedlichen Elektroden eingesetzt wird, wobei an die Oberflächen der beiden Elektroden (1, 2) des Sensors jeweils ein Sondenmolekül A(3), B(4) mit die Elektroden sensorgebunden wird und wobei die freien Reste der Sondenmoleküle zumindest eine bindungsfreudige Gruppe mit Spezifität für die Bindung mit einer gesuchten Substanz bzw. mit einem Analytmolekül C(5) im Fluidmedium aufweist, und dass dieses Analytmolekül mit jeweils mindestens zwei Bindungsstellen (c53, c54) selektiv aus dem es enthaltenden Fluidmedium austritt, an die freien Enden der Sondenmoleküle anbindet und mit denselben eine Brücke (Bm) bildet, wodurch die Impedanz geändert wird und aufgrund dieser Änderung auf die Konzentration der Substanz im Fluidmedium geschlossen wird.

(Fig. 1)

Einleitung

Die Identifizierung von Nukleinsäuren hat viele Anwendungen, diese inkludieren z.B. die Identifizierung pathologischer Organismen, genetische Tests und gerichtsmedizinische Gutachten. In der Automatisierung des gleichzeitigen Screenens von tausenden charakteristischen Nukleinsäuresequenzen sind dabei beträchtliche Fortschritte erzielt worden: in der Genchip- oder Mikroarray-Technologie werden viele verschiedene DNA-Sonden an Glas- oder Silikonchips exakt positioniert und dabei immobilisiert. Die zu untersuchende Probe wird mit dem Chip in Kontakt gebracht und hybridisiert nur im Falle von komplementären Nukleinsäuren in der Probe mit der Sonden-DNA am Chip. Fluoreszenzdetektion wird nachfolgend eingesetzt um die resultierenden doppelsträngigen Nukleinsäureprodukte zu detektieren. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass hunderte bis tausende von Sequenzen von automatischen Systemen untersucht werden können sowie entsprechende Systeme kommerziell erhältlich sind.

Die Hybridisierungsdetektion mittels Fluoreszenz ist daher an sich eine leistungsfähige Methode zur spezifischen Detektion von Nukleinsäuren. Trotzdem muss, um mit diesem System ein detektierbares und verlässliches Signal zu erhalten, für die Detektion zuerst das Zielmolekül in der Probe mittels PCR selektiv vermehrt werden; zusätzlich ist eine Markierung mit Fluoreszenzmarkern erforderlich. Diese Technologie erfordert folglich zur Auswertung auch ein System, welches Fluoreszenz erfassen kann. Aus diesen Gründen ist dieses etablierte System aufwendig und somit sind einfachere, direktere Methoden gefragt und notwendig.

Der hier präsentierte erfindungsgemäße Vorschlag zur Lösung dieses Problems bezieht sich auf die Nutzung von elektrischen Nano-Biosensoren zur Detektion von biologischen Molekülen, bevorzugt von Nukleinsäuren.

Warum elektrische Nanogap-Sensoren?

Biosensoren sind Sensoren, an deren Oberfläche Biokomponenten, also Sondenmoleküle, immobilisiert sind, die wiederum als Sensorelemente mit dem Analyten interagieren und ihre Reaktion an einen Transducer vermitteln können. Die eigentliche Erkennung findet also unmittelbar an der Oberfläche der Elektroden statt. Hinderlich hierbei ist bis zu einem gewissen Grad die elektrische Doppelschichtkapazität, also die Elektrodenpolarisation, welche durch die Akkumulation von Ionen in der Nähe der Elektrodenoberfläche bestimmt ist. Dadurch wird es schwierig, die Eigenschaften von biologischen Molekülen, welche bei einem Biosensor definitionsgemäß auf der Sensoroberfläche immobilisiert sind, zu messen; dies beeinflusst somit auch die Detektion des Analyten vor allem bei niederen Frequenzen negativ.

Geringe Nanogapgrößen bzw. -dimensionen hingegen minimieren Polarisationseffekte der Elektroden, und zwar unabhängig von der Frequenz. Wird der

Nanogap kleiner gewählt als die Dicke der elektrischen Doppelschicht, verschwindet die Abhängigkeit der Nanogapkapazität von der Ionenstärke. Dies ist besonders wichtig, wenn es im Zuge des Detektionsprozesses zu einer Veränderung der Ionenstärke, z.B. aufgrund von Waschprozessen, kommt.

Arten von Nanogapsensoren

Bisher publizierte Nanogapsensoren beruhen entweder auf der Messung dielektrischer Effekte, um Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA in Lösung voneinander zu unterscheiden, oder benützen DNA-Stränge, um eine mehr oder weniger leitfähige Verbindung zwischen einzelnen Elektroden herzustellen.

Bei dielektrischen Sensoren werden Veränderungen der Kapazität oder andere impedanz-basierende Daten als Indikator für die Existenz des Targetmoleküls oder seiner Konformation gewählt.

Gemäß eines anderen Ansatzes werden zwei Elektroden beispielsweise durch Nukleinsäuren miteinander verknüpft. Gemessen wird ein Anstieg der Leitfähigkeit zwischen diesen beiden Elektroden. Es sind folglich elektrisch leitfähige biologische Moleküle erforderlich. Die Leitfähigkeit kann durch Metallisierung der DNA-Stränge signifikant erhöht werden (Braun et al).

Erfindung:

Der hier vorgeschlagene, neue Ansatz besitzt durch einen komplett neuen Zugang die Vorteile dieser beiden erwähnten Ansätze. Vernetzungsreaktionen mit Wechselstrommessungen werden eingesetzt. Durch eine bestimmte Anordnung wird die Effizienz der Vernetzungsreaktion gesteigert und so die Erfassungsgrenze signifikant erniedrigt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, insbesondere von Molekülen, Molekülsequenzen, Molekülteilen od. dgl. und zur Bestimmung von deren Menge bzw. Konzentration in einem fluiden, also flüssigen oder aber auch gasförmigen Medium, wobei ein zumindest zwei Elektroden umfassender Nanogap-Sensor eingesetzt wird, gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1, welches die im Kennzeichen dieses Anspruchs genannten Merkmale aufweist.

Nähere Beschreibung des neuen Ansatzes bzw. der Erfindung.

Ein Nanogap, welcher durch zwei Elektroden aus unterschiedlichen Materialien begrenzt ist, wird aufgrund der Bindung des Analyten bzw. Analytmoleküls oder aber eines Hilfsmoleküls an zwei verschiedene Sonden bzw. Sondenmoleküle überbrückt. Verschiedene Sonden sind jeweils auf verschiedenen Elektroden immobilisiert und auf jeder der Elektroden kommt nur eine Sondenart vor. Jedes Analyt- bzw. Hilfsmolekül besitzt zwei verschiedene exponierte Bindungsstellen für die zwei Affinitätsbindestellen

der beiden unterschiedlichen Sonden, welche an die material-unterschiedlichen Elektroden sensorgebunden und somit dort immobilisiert sind. Die Erfassung dieser Verknüpfung erfolgt mit Hilfe der Wechselstromanalyse zwischen den Elektroden vor bzw. nach dem Bindungsereignis oder auch mit einer durchgehenden zeitlichen Erfassung, entsprechend einer online Erfassung in Echtzeit.

Hintergrund des erfindungsgemäß genutzten Ansatzes

Effizientere Vernetzung

Gemäß diesen neuen Ansatzes sollen die Elektroden z.B. durch DNA-Stränge miteinander verknüpft werden und so eine Detektion des Analyten herbeigeführt werden. Für eine effiziente Verknüpfung der Elektroden ist es wichtig, dass es zu keiner Konkurrenzreaktion kommt. In bisher veröffentlichten Nanogap-Sensorkonfigurationen war dies zumeist nicht der Fall: nur ein geringer Anteil der möglichen DNA-Stränge überbrückte den Nanogap, die meisten reagierten sich in anderen Reaktionen ab und formten z.B. „inner-electrode-loops“.

Eine deutliche Verbesserung der für das Messsignal verantwortlichen Reaktion stellt einen wesentlichen Bestandteil der vorliegenden Erfindung dar.

Betrachtet man z.B. die Patentanmeldung US 2006/0019273 A1 und im speziellen die dortige Fig. 12, stellt man fest, dass aufgrund der immobilisierten Fängermoleküle eine Konkurrenzreaktion durch Loopbildung möglich ist, welche in der US-Patentanmeldung jedoch nicht erwähnt wird: Beide Enden der zu detektierenden Nukleinsäuresequenz können an die gleiche Elektrode binden, dadurch erfolgt keine Überbrückung der einzelnen unterschiedlichen Elektroden und auch somit kein wesentlicher Beitrag zum Detektions-Signal. Aufgrund der sterischen Gegebenheiten ist evident, dass eine solche Loopbildung gegenüber der Überbrückung des Nanospalts sogar bevorzugt ist und folglich die detektierbaren Ereignisse nicht den prinzipiell erfolgten Bindungsereignissen entsprechen.

Bei Hashioka et al. ist die DNA sogar nur an einer Elektrode befestigt, auch dadurch ist die Überbrückung des Nanospalts durch die DNA sicherlich wenig effektiv.

Die Patentanmeldung US 2002/0172963 A1 erwähnt die Wichtigkeit, keine Berührung der DNA mit dem Supportwafer, auf welchen die Nanogap-Elektroden aufgebracht sind, zuzulassen. Dies stellt einen Schritt dahingehend dar, dass die Effizienz der Bindungsereignisse gesteigert werden soll, sagt aber nichts über die Verhinderung anderer möglicher Nebenreaktionen aus. Gedanken über eine optimale Orientierung der zu messenden DNA liegen auch dort nicht vor.

Eine andere extrem wichtige Eigenschaft von Sensoren für die Nukleinsäureanalytik ist die Selektivität: Das Erkennen von Punktmutationen, also einzelner veränderter Basen, gewinnt immer stärker an Bedeutung. Methoden, wie

Punktmutationen detektiert werden können, sind in der Literatur an sich ausreichend beschrieben, z.B. in Sambrook et al, Molecular Cloning. Homologe Nukleotidsequenzen können prinzipiell durch selektive Hybridisierung detektiert werden, zur Steigerung der Selektivität werden so genannte stringente Bedingungen, wie niedrige Ionenstärken und erhöhte Temperatur eingesetzt.

Ein anderes Konzept besteht in der Steigerung der Selektivität durch den synchronen Einsatz zweier Sonden; dies findet sich z.B. bei Sandwich-Hybridisierungen und bei der Real-time-PCR. Hierbei müssen zwei verschiedene Sonden zur gleichen Zeit gebunden sein, um das Bindungsereignis detektieren zu können. Überbrückungsreaktionen sind an sich für solche SONDENSYSTEME prädestiniert, trotzdem verzichten z.B. Hashioka et al. und US 2006/0019273 A1 darauf.

Aus diesen Beispielen geht hervor, dass die Effizienz der Überbrückung bzw. der konkurrierenden Nebenreaktionen eine wichtige Rolle für Herabsetzung der Erfassungsgrenze unter Einhaltung der geforderten Selektivität für die Einsatzfähigkeit der Nanogap-Sensoren darstellt.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird vorgeschlagen, jene zwei Elektroden, welche überbrückt werden sollen, selektiv mit nur jeweils einer Sondenmolekül-Sorte zu besetzen, sodass „inner-electrode loops“ nicht möglich sind. Dadurch werden alle stattfindenden Bindungsereignisse gezwungen, den Nanospalt zu überbrücken und so zum Detektorsignal beizutragen.

Immobilisierung - Problemstellung

Bei der Verwendung von nanoskalierten Elektroden sind jedoch die z.B. in der Microarraytechnik verwendeten Verfahren zur orientierten selektiven Immobilisierung nicht anwendbar, da klassische Spot-sizes in etwa 100µm Durchmesser und 100 bis 400µm Abstand voneinander aufweisen, also die falsche Größenordnung besitzen. Ebenso sind bei nanoskalierten Elektroden bereits die Grenzen der klassischen Lithographie erreicht. Folglich ist ein anderer Ansatz notwendig.

Zusätzlich erhöhte Temperaturen zur Erzielung der notwendigen Selektivität beinhaltet weiters auch die Notwendigkeit, stabile Bindungen der Biomoleküle an die Sensoroberfläche sicherzustellen: Die für Elektrodensysteme gebräuchliche Thiol-Gold-Bindung ist nur eine quasi-kovalente, nicht aber eine echt-kovalente Bindung. Dies geht aus den involvierten Bindungsenergien eindeutig hervor. Dadurch wird bereits bei Temperaturen, welche für stringente Bedingungen normalerweise notwendig sind, die Gold-Thiol-Bindung thermisch instabil.

Bedingt durch das Sensorkonzept der Überbrückung von Nanogaps bedeutet aber ein Verlust auch nur eines kleinen Teils der über eine Thiolbindung angekoppelten DNA einen enormen Drift, welcher das Signal der erfolgten Hybridisierung überdecken wird.

Aus diesem Grund ist das beliebte System Thiol-Gold hier zwar für den Fall von „stärker abweichenden“ Sequenzen zur Detektion geeignet, nicht jedoch für den Fall von Punktmutationen. Für diesen Fall müssen andere, stärker an die Elektroden gebundene Systeme aufgefunden und eingesetzt werden. Zusätzlich muss für ein zukünftiges Produkt die Produktionskette innerhalb der etablierten Schienen der Halbleitertechnologie durchzuführen sein.

Ebenso ist es klar, dass bei Elektrodensystemen, welche nm-Abmessungen haben, eventuell notwendige Zwischenschichten zwischen Elektroden und der Biokomponente möglichst dünn sein müssen, also im nm-Bereich liegen oder im Optimalfall überhaupt keine Notwendigkeit für solche Zwischenschichten besteht. Fallweise notwendige Zwischenschichten müssen jedoch ausreichend gut definiert sein, was bei den Thiolen in der Realität nicht erreichbar ist (schwer steuerbare Multilayerschichten statt Monolayer). Dadurch ist ein Einsatz von länger kettigen Thiolen, welche prinzipiell temperaturstabiler sind und dadurch eventuell eingesetzt werden könnten, ebenfalls nicht möglich. Es kommen in der Realität also nur direkte Anbindungen an die Sensoroberfläche in Frage.

Immobilisierung – Lösung des Problems

Die selektive Immobilisierung im Nanobereich wird gemäß der vorliegenden Erfindung dadurch effizient erreicht, dass die beiden Elektroden, welche den Nanospalt begrenzen, von allem Anfang an aus verschiedenen Materialien gebildet werden, denn verschiedene Materialien bedingen auch verschiedene chemische und physikalische Eigenschaften. Chemische Reaktionen, welche zum Anknüpfen von Biomolekülen an deren verschiedene Oberflächen eingesetzt werden, können so konzipiert werden, dass selektiv nur eine bestimmte der materialunterschiedlichen Oberflächen mit einem bestimmten Biomolekül verknüpft werden kann. Dadurch ist es auf einfachem Wege möglich, Sondenmoleküle selektiv auf bestimmten, kleinen, auch nanoskalierten Arealen zu platzieren.

Bisher publizierte Ansätze zur selektiven Immobilisierung haben die erfindungsgemäß vorgesehene effektive Vorgangsweise, sich asymmetrischer Elektrodeneigenschaften zu bedienen, bisher nicht erwähnt.

Die Patentanmeldung US 2002/0022223 A1 erwähnt zwar eine getrennte Immobilisierung auf den Elektroden, liefert aber keine nähere Beschreibung über eine tatsächlich mögliche Durchführung. Die in dieser Druckschrift erwähnte Methoden sind für eine lokalisierte Immobilisierung in der nm-Größenordnung nicht praktikabel. Lediglich für die Minimierung der Immobilisierung auf dem Supportmaterial der Elektroden – nicht jedoch auf den Elektroden selbst - werden dort elektrostatische und/oder chemische Unterschiede zur selektiven Immobilisierung angedacht.

Die Patentanmeldung US 2004/012161 A1 erwähnt ebenfalls die Wichtigkeit der effizienten Verknüpfung der einzelnen Elektroden über die selektive Immobilisierung der einzelnen Sonden. Dies geschieht über einen aufwendigen Prozess, welcher Nickelelektroden und Gold-Elektroplating mit giftigen Zyanidionen verwendet, da, wie in dieser Patentanmeldung zutreffend angemerkt wird, mechanisches Platzieren von kleinsten Mengen im nm-Bereich nicht mehr möglich ist. Alle Elektroden bestehen aber prinzipiell aus dem jeweils gleichen Material. Diese bisher bekannt gewordenen Ansätze mögen prinzipiell ihr Ziel zwar erfüllen, sind jedoch einer billigen Massenproduktion nicht zugänglich.

Die Patentanmeldung US 2002/0172963 A1 zeigt in einem anderen Zusammenhang an sich die Idee, nicht auf dem Elektrodensubstrat zu immobilisieren und über elektrostatische Effekte und Umwege eine selektive Immobilisierung zu erreichen. Dieses Verfahren ist jedoch unnötig kompliziert und damit einer Massenfabrikation ebenfalls nicht zugänglich.

Eine andere veröffentlichte Patentanmeldung, nämlich US 2002/0172963 A1, hat primär eine Oberflächenvergrößerung durch elektrisch adressierbare Nanotubes zum Ziel. Selektive Immobilisierung wird über positive und negative Ladungen sowie Goldpartikel erzielt. Wiederum wird also die selektive Immobilisierung nicht über intrinsische Materialeigenschaften erreicht. Zusätzlich fallen in diesem Ansatz die Polarisierungseffekte nicht weg, da es sich hier nicht um eine Nanogap-Struktur handelt; zur Fertigung dieser Sensoren ist außerdem die teure Elektronenstrahl-Lithographie erforderlich.

Einfache Herstellung gemäß der Erfindung

Es besteht die Anforderung dass die Nanoelektroden einfach herstellbar sind. Die notwendigen Spaltbreiten sind in etwa durch die Größe bzw. Länge von PCR-Produkten bzw. anderer detektionsrelevanter Moleküle bestimmt und liegen typischerweise in der Größenordnung von etwa 50nm. „Konventionelle“ Nanoelektroden benötigen e-beam-Lithographie zur Herstellung, die dabei entstehenden Kosten machen das Produkt für den vorhandenen Markt jedoch uninteressant.

Die Integration von Molekularbiologie mit Nanoelektronik benötigt Oberflächen, welche sowohl stabil bei Kontakt mit biologischen Molekülen als auch mit den Fabrikationsmethoden der Mikroelektronik kompatibel sind. Zusätzlich sind thermisch stabile Bindungen der Sondenmoleküle mit der Sensoroberfläche notwendig.

Diamantoberflächen können mit Biomolekülen gut funktionalisiert werden. Diamant ist biokompatibel, chemisch extrem stabil, besitzt ein elektrochemisches Potentialfenster von 4V und ist mit der Halbleitertechnologie absolut kompatibel. Nanokristalline Diamantschichten werden auf Siliziumwafern abgeschieden, um die Erfordernisse für die praxisorientierte Fabrikation und Kommerzialisierung der Bauelemente sicherzustellen, da

hier die gut etablierten, CMOS-kompatiblen Prozesse im Vorteil sind. Dieser Ansatz stellt auch sicher, dass etablierte Strategien zur Kostenreduktion in einem späteren Stadium des neuen Projekts angewandt werden können.

Laterale Nanogaps mit Elektroden, welche nur einige zehn nm voneinander entfernt sind, können bis jetzt nur mit der aufwändigen Elektronenstrahlolithographie hergestellt werden. Die Reproduzierbarkeit dieser lateralen Nanogaps ist aber problematisch. Um eine hohe Sensitivität bei geringen Herstellungskosten für DNA-Chips zu erzielen, werden Metall-Nanogap-Elektroden vorgeschlagen (Hashioka), aber die derzeitige Ansätze benötigen komplizierte Techniken, wie eben die Elektronenstrahlolithographie (Hwang).

Alternative Nanofabrikations-Techniken unter Verwendung verschiedener Methoden zur Herstellung von für DNA-Chips brauchbaren Nanogaps bei geringeren Kosten wurden berichtet (Hashioka). Diese inkludieren Elektrodeposition (Qing et al.), Elektromigration (Iqbal), elektrochemische Methoden (He et al., Liu et al., Chen et al.) und Bruchstellentechniken (Reed et al.; Reichert et al.). All diese Methoden haben jedoch aufgrund von Kompatibilitätsproblemen mit derzeitigen Hochdurchsatz-Methoden in der Halbleiterindustrie stark limitierte Anwendungsmöglichkeiten.

Für den erfindungsgemäß vorgesehenen Verwendungszweck müssen die Elektroden selbst eine Leitfähigkeit aufweisen, welche eindeutig oberhalb derer der klassischen undotierten Halbleiter liegt. In Frage kommen folglich Metalle sowie hochdotierte bzw. hochdotierbare Halbleitermaterialien. Nicht-limitierende Beispiele hierfür sind Si- und C-basierte Materialien wie Silizium, Diamant oder diverse Graphitmodifikationen.

Eine andere Möglichkeit, Nanogap-Sensoren zu realisieren, bezieht sich auf Schichtsysteme. Schichtdicken sind auch im nm-Bereich reproduzierbar und einfach herstellbar. Ätzt man nun z.B. in einem Dreischichtsystem die mittlere, also zweite Schicht heraus, wird die Breite des Gaps ausschließlich durch die Dicke der ehemaligen zweiten Schicht bestimmt. Dieser Ansatz ist somit ausgesprochen reproduzierbar. Das letztliche Strukturieren des Bauelements kann mittels Standardlithographie durchgeführt werden. Komplizierte und teure Elektronenstrahlolithographie ist für die Endfertigung des Nanogap-Bauelements somit nicht notwendig.

Messung – Probleme und Verbesserungsansätze

Den bis jetzt publizierten Ansätzen zur Überbrückung von Nanoelektroden ist gemein, dass eine Leitfähigkeit der DNA vorausgesetzt wird. Gerade bezüglich DNA gibt es jedoch in der Literatur recht widersprüchliche Angaben zu den leitenden oder isolierenden Eigenschaften. Dies lässt komplexere, derzeit noch device- oder

anwendungsabhängige Zusammenhänge unbekannter Art vermuten, die zu berücksichtigen sind.

Beispielsweise bezieht sich US 2002/0172963 A1 auf biologische Moleküle, welche zu elektrischer Leitfähigkeit fähig sind und nennt dafür Nukleinsäuren wie DNA oder RNA. Gerade für diese sind jedoch die Ergebnisse der elektrischen Eigenschaften in der Literatur eher kontroversiell. Jene werden in US 2002/0172963 A1 genauer betrachtet, speziell deren Linkerabhängigkeiten, und optimiert. Als wesentliches Ergebnis ist kein Leitfähigkeitsbeitrag von einzelsträngiger, sehr wohl jedoch von doppelsträngiger DNA zu erwarten. Betrachtet man jedoch die Basenlängen typischer PCR-Fragmente, so sind nicht nur die zwei Sondenmoleküle, welche die zu detektierende Sequenz bestimmen, notwendig, sondern auch ein „Lückenfüller“ oder "helper oligonucleotide", siehe dortige Fig. 8, dies ist aber ansonsten in der genannten US-A1 nicht direkt erwähnt. Dies trägt jedoch zur Komplexität des Assays bei und verringert jedenfalls die Effizienz der Detektionsreaktion.

Es ist klar, dass dermaßen sorgfältig ausbalancierte Systeme unflexibel sind und Adaptationen für neue Situationen, wie z.B. das Verändern des Targetmoleküls, nur mit beträchtlichem Aufwand möglich sein können.

Wesentlich zielführender ist es folglich, wie gemäß der vorliegenden Erfindung vorgesehen, die elektrische Messung von weniger eingeschränkten Eigenschaften anzustreben: Die Option, Verbrückungen von Sensoren über viel empfindlichere und flexiblere Wechselstrommessungen statt über Gleichstromkurven zu charakterisieren/detektieren wurde in der Literatur bis jetzt nicht wahrgenommen: In diesem Fall sind isolierende statt leitende Eigenschaften von Analyten kein Hindernisgrund mehr für eine erfolgreiche Reaktion. Wechselstrommessungen bieten zusätzlich den Vorteil, dass für die Messung kein oder nur ein sehr geringer Strom fließen muss. Dadurch werden die Biomoleküle in ihren Verhalten durch die Messung nicht beeinflusst, und es ist eine störungsfreie online-Betrachtung der Ergebnisse möglich.

Dies ist z.B. bei in der Patentanmeldung US 2002/0172963A1 in [0082] angegebenen Spannungen im Bereich von Volt, welche irreversibel Reaktionen in Biomolekülen bedingen, nicht möglich. Dies verhindert eine mögliche Beobachtung von Biointeraktionen in Echtzeit.

Durch das Überbrücken des Spaltes zwischen den Elektroden wird der Analyt bzw. das Analyt- oder Hilfsmolekül auch für die Detektion optimal präsentiert und orientiert.

Vorgangsweise, Detektionsablauf

Detaillierte Beschreibung:

1. Sensorfabrikation
2. Immobilisierung; Möglichkeit Helper-oligonukleotide; Sequenzauswahl
3. Probenaufbereitung, PCR; fallweise Denaturierung der Nukleinsäure so ferne diese als Doppelstrang vorliegt
4. Messung vor/während/nach; Waschen; Temperatur
5. Chip-PCR

ad 1: Sensorfabrikation

Der erfindungsgemäß vorgeschlagene Nanosensor ist schematisch in der Fig. 1a gezeigt. Die gezeigte Materialkombination besitzt nur Beispielcharakter und demonstriert lediglich eine der möglichen Varianten der Durchführung. Zum Zwecke der Übersichtlichkeit ist als Ausschnitt nur ein einziger Elektrodensteg dargestellt. Es ist jedoch evident, dass auch mehrere dieser Stege in verbundener oder unverbundener Form auf einem Chip vereinigt sein können („Array“).

Zur Herstellung wird ein n⁺-dotierter Siliziumwafer thermisch oxidiert. Die Dicke der so aufgetragenen SiO₂-Schicht liegt in der Größenordnung von wenigen 10nm. Diese bestimmt letztlich die Breite des Nanogaps.

Als nächstes werden diese Wafer über CVD-Prozesse mit einer dünnen Schicht von Diamant beschichtet, Dicke 50 bis 200 nm. Metallkontakte, beispielsweise Gold, werden auf der Diamantschicht mittels Photolithographie und lift-off-Prozessen aufgebracht, um einen guten ohmschen Kontakt zu gewährleisten. Diese dienen als Anknüpfungspunkt zur elektronischen Detektions- und Auswerteeinheit. Im nächsten Schritt wird die Diamantschicht mit geeigneten Ionenätztechniken strukturiert. Schlussendlich wird dann die SiO₂-Schicht nasschemisch unterätzt oder eben komplett weggeätzt, um so den Nanogap freizulegen.

ad 2: Immobilisierung:

Eine selektive und hoch-präzise Immobilisierung wird durch den Einsatz verschiedener Materialien für die zwei Elektroden, welche z.B. aus Diamant und Silizium bestehen, sichergestellt. Dies ist schematisch in der Fig. 1 gezeigt. Verschiedene Materialien bedeuten auch verschiedene chemische Eigenschaften an den Oberflächen: In Kombination mit dem Einsatz selektiver Reaktionen resultieren kovalente Bindungen nur an bestimmten Oberflächen. Dadurch wird eine lokalisierte Chemie an den unterschiedlichen Elektroden und eine Auflösung in nm-Regime möglich, um z.B. DNA-Fragmente zur Überbrückung des Nanogaps zu zwingen.

Als ein - keineswegs einschränkendes - Beispiel wird ein Diamant-Silizium-Nanogap-Sensor näher beschrieben: Nitrophenylgruppen können elektrochemisch an der Diamant-Oberfläche immobilisiert werden. Diese werden dann zu Aminophenylgruppen umgewandelt und durch die Verwendung eines Crosslinkers, wie PDITC (chemischer Name: phenylenediisothio-cyanate), werden an diese Oberfläche kommerziell erhältliche Aminooligos kovalent gebunden.

Bei Diamant ist aber nicht nur die Möglichkeit gegeben, die Morphologie und die elektrischen Eigenschaften, wie Isolator-Verhalten, p-Leitfähigkeit, halbmimetallisches Verhalten, maß zu schneiden, auch die Oberflächenterminierung kann flexibel gestaltet werden. Beispielsweise sind Wasserstoff-, Sauerstoff-, Fluor- und Stickstoffterminierungen möglich. Das ermöglicht auch, andere chemische und nicht nur elektrochemische Ansätze für die selektive Immobilisierung im nm-Maßstab anzuwenden.

Als nächstes kann das andere Sondenmolekül selektiv an der Siliziumoberfläche immobilisiert werden, da die Diamantoberfläche bereits mit Oligonukleotiden abgeblockt ist. Die eigenen Arbeiten haben gezeigt (Poster auf der Bioelektrochemie 2005 von Roppert et al. sowie noch nicht veröffentlichte Daten), dass es möglich ist, DNA direkt an Silizium zu immobilisieren, ohne einen Silan-Zwischenlayer einsetzen zu müssen. Nachdem das Bauteil nanoskalierte Abmessungen besitzt, welche in der Größe genau abgestimmt werden müssen, würde eine nicht zu 100% exakte Zwischenschicht zwischen Sensor und Biomolekül mit höchster Wahrscheinlichkeit die Funktionen des Sensors stark beeinträchtigen.

Die beiden unterschiedlichen Sondenmoleküle werden also selektiv auf die material-unterschiedlichen Elektroden, welche einen Abstand voneinander aufweisen der durch das Gap determiniert ist, aufgebracht. Bedingt durch die Sequenzauswahl und die gewählten Bedingungen zur Detektion können die Sonden nicht miteinander interagieren; deswegen ist der in den US 2002/0022223 A1 und US 2005/0287589 A1 beschriebene Aspekt, dass die Sonden einander entfernungsbedingt nicht berühren dürfen, für die Erfindung in keiner Weise relevant.

ad 3: **Probenaufbereitung**

Die Isolierung, Probenaufbereitung und eventuelle Aufreinigung der Nukleinsäuren, Peptide, Proteine oder sonstiger Analyten erfolgt nach den bekannten state-of-the-art-Methoden. Die zu detektierenden Moleküle können auch selektiv oder unselektiv vor der Analyse angereichert bzw. vermehrt werden.

Speziell im Fall von Nukleinsäuren kann eine Vermehrung von DNA oder ein „Umschreiben“ von RNA in cDNA mit gleichzeitiger Vermehrung notwendig werden.

Für die Detektion muss beim Vorliegen einer doppelsträngigen Nukleinsäure möglicherweise eine Denaturierung der Nukleinsäure, z.B. durch Hitze oder Alkalieinfluss, erfolgen.

Spezielle Bedeutung hat jedoch der Einsatz als RNA-Sensor. Eine Detektion von z.B. Mikroorganismen über RNA-Detektion kann prinzipiell höhere Sensitivität erreichen, als eine solche über DNA, da rRNA-Moleküle in höherer Zahl vorliegen, als die sie detektierende DNA. Dadurch kann eine direkte Detektion von Nukleinsäuren ohne vorherige Vermehrung relativ einfach erreicht werden. Dies ist ein vorteilhafter Unterschied zu cDNA-Microarrays. Auch für den Nachweis von RNA-Viren, wie z.B. Influenza, ist dies in hohem Maß relevant.

ad 4: **Messung vor/während/nach**

Prinzipiell wird das Bauteil zunächst einmal für die Messung vorbereitet, indem die Kontakte mit einem entsprechenden Messgerät verbunden werden. Die Elektrodenbereiche werden mit Detektionspuffer ohne Analyt bzw. Analytmoleküle equilibriert. Nun erfolgt eine erste Messung des Bauteils unter den Bedingungen der Detektionsreaktion. Erst nach Ermittlung und eventueller Stabilisierung des Anfangswertes erfolgt eine Zugabe des Analyten bzw. der Analytmoleküle. Die Veränderung gegenüber dem Anfangswert kann kontinuierlich oder auch erst nach einem gewissen Zeitraum gemessen werden.

Waschprozesse oder andere, in der biologischen Analytik gängige Methoden, wie Abblocken unspezifischer Bindungsstellen oder Temperaturerhöhung, können in diesen Vorgang integriert werden.

Alternative, in der Branche derzeit noch nicht verwendete übliche Verfahren sind dadurch jedoch nicht ausgeschlossen. Die US 2002/0022223 A1 erwähnt z.B. die Möglichkeit des Einsatzes nicht-wässriger Puffer mit geringer elektrischer Leitfähigkeit.

Einzelne Sensoren, welche wiederum selbst aus mehreren Belts bestehen können, können mit gleichen oder verschiedenen Sonden bzw. Sondenmolekülen zu einem so genannten Array auf einem Chip kombiniert werden. Diese Anordnung ist dann speziell geeignet, um in einer einzigen Probe mehrere bis sehr viele verschiedene Bestandteile zu detektieren, einen repräsentativen Querschnitt über eine Probe zu erhalten oder für diverse Kontrollsequenzen, die z.B. dazu dienen können, Punktmutationen zu erkennen oder carry-over-Kontaminationen aufzuspüren, vgl. z.B. US 20050287589 A1.

Alle diese Ansätze können mit einer bzw. in eine entsprechende(n) Mikrofluidik integriert werden, um einen entsprechenden Flüssigkeitsnachschub unter kontrollierten Bedingungen sicherzustellen.

Ebenfalls ist ein reverser Ansatz möglich. Hierbei wird eine vorhandene Brücke durch das Detektionseignis zerstört. Dies wird dadurch erreicht, dass das überbrückende Molekül als "Hilfsmolekül" eine höhere Affinität zu dem Analyten aufweist, als zu den Sondenmolekülen, welche es am Sensor festhalten.

Im Fall von Nukleinsäuren kann dies z.B. durch Einführung von Punktmutationen in das Brückenmolekül, bei Proteinen durch nicht exakt passende/unspezifische Antikörper bewerkstelligt werden.

Wichtig in diesem Zusammenhang sind auch Ligand Displacement Assays (LDAs). Hier wird ein bereits gebundenes Analytanalogon, welches mit dem Analyten strukturmässig auch ident sein kann, kann durch den "echten" Analyten verdrängt. Analyt und Analytanalogon stehen daher im Falle einer positiven Probe miteinander im Gleichgewicht GG. Durch eine nähere Optimierung des Tests kann dieses GG in Richtung der Bindung "echten" Analyten verschoben werden. Dadurch driftet z.B. dann ein Antikörper oder dgl. von der Sensor-Oberfläche ab, welcher dann eine Signaländerung in Lösung bzw. auch auf der Sensoroberfläche verursacht. Es handelt es sich also um einen Sonderfall eines kompetitiven Tests.

Durch komplexere Ansätze kann durch das Binden oder Abdriften eines Analyt(analogons) ein Abdriften größerer Molekülcluster verursacht werden, welches wiederum die Signalausbeute drastisch erhöhen kann. Es geht also darum, dass eine "vorgebundene" Situation mit einem Analyt(analogon), welches weiter konjugiert sein kann vorliegt, dieses wird durch den Analyten verdrängt, wodurch eine wesentlich größere Signaländerung hervorgerufen wird, als ein kleiner Analyt selbst auslösen könnte.

Konkrete Fälle zeigen die später behandelten Fig. 2 bis 4 und werden durch dieselben näher erläutert.

In allen Fällen können M-DNA-Techniken helfen, den Signalunterschied zwischen einer Überbrückung und einer Nicht-Überbrückung zu verbessern.

Ebenso ist in allen Fällen der Einsatz von sog. „helper-oligonucleotiden“, welche zu einer durchgehenden Doppelstrandsituation führen, umsetzbar.

Als Messmethoden kommen vor allem Impedanzmethoden in Frage. Verschiedene Frequenzen können eingesetzt werden, oder auch ganze Spektren abgefahren werden. Diese können mit einem DC-Offset versehen werden, oder es kann auch bei OCP (open circuit potential) oder mit floating Potential Verfahren gemessen werden. Ebenso kann eine externe Referenzelektrode eingesetzt werden, oder eine solche am Chip integriert werden. Vierpunktmessungen können ebenfalls eingesetzt werden. Diese Verfahren sind Meßmethoden welche dem Stand der Technik entsprechen, schließen aber andere Verfahren keineswegs aus.

Ad 5: **Chip-PCR**

Diese Anordnung ist auch für eine on-Chip-PCR geeignet. Prinzipiell sind hier zwei Anordnungen möglich: entweder werden die selektiv immobilisierten Primer analog zu einer „normalen“ PCR-Reaktion mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion miteinander verknüpft, oder der Ansatz folgt dem TaqMan-System: Ein Primer ist an einer Elektrode immobilisiert, die „Probe“ ist an der anderen Elektrode immobilisiert. Der zweite Primer ist frei in Lösung. Wird nun ein PCR-Produkt synthetisiert, kommt es zuerst im Zuge des Annealingschrittes zu einer Überbrückung des Gaps und dann bei der nachfolgenden Polymerisation/Extension wieder zu einer Hydrolisierung der Brückenbindung zwischen Primer 1 und der „Probe“ durch die 5'-3' Exonuclease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase. Wird hingegen kein Produkt gebildet, kommt es zu keiner Zeit der Reaktion zu einer Überbrückung des Nanospaltes und dadurch auch zu keiner Veränderung des Signals.

Die Ansprüche 2 bis 6 betreffen verschiedene bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, insbesondere die Ansprüche 2 und 3 verschiedene Arten der Vorgangsweise bei Auflösung einer zuerst bestehenden, mit Sondenmolekülen und Analytmolekül oder Analyt-Analogmolekül gebildeten Brücke zwischen den material-unterschiedlichen Elektroden und die Ansprüche 4 bis 6 günstige Ausbildungsformen der für die Erfindung wesentlichen Nanogap-Sensoren.

Schließlich betreffen die Ansprüche 7 bis 10 verschiedene Arten des Einsatzes der erfindungsgemäßen neuen Analysen-Technologie im nm-Bereich.

Anhand der Zeichnung wird die Erfindung näher erläutert.

Die Fig. 1a zeigt schematisch die neuartige Anordnung der Elektroden 1 und 2 des Nanogap-Sensors 100, welche aus zwei unterschiedlichen Materialien, wie z.B. kohlenstoffbasiertem Material z.B. dotiertem Diamant einerseits und aus Silicium andererseits gefertigt sind. Die beiden Elektroden 1 und 2 sind durch einen Isolator 12 voneinander getrennt, der hier beidseitig zurückgesetzt ist, sodass ein Spalt in Größe von einigen 10 nm zwischen den Elektroden 1 und 2 frei bleibt. Eine solche Zurücksetzung ist nicht unbedingt notwendig, und es muss kein Spalt vorhanden sein. Eine weitere Möglichkeit würde eine frei schwebende Konstruktion ohne unterstützenden Isolator dazwischen darstellen.

An die Elektrode 1 ist dort mit zumindest einem seiner peripheren Enden (sensorbindenden Enden) ein zumindest partiell längsorientiertes Sondenmolekül (= Affinitätsmolekül A bzw. 3) direkt oder über einen Linker an die Elektrode 1 gebunden und somit immobilisiert, während zumindest eines seiner freien (= peripheren) Enden von der Elektrode 1 wegragt.

In gleicher Weise ragt von der Elektrode 2 ein dort mit einem seiner peripheren Enden direkt oder indirekt gebundenes und somit immobilisiertes - zumindest partiell - längsorientiertes Sonden-Molekül B bzw. 4 mit zumindest einem seiner freien Enden frei weg. An die beiden freien Enden der beiden Sonden-Moleküle A, 3 und B, 4 ist mit zwei seiner respektiven Enden das Analyt-Molekül C bzw. 5 gebunden, das ursprünglich aus dem fluiden Medium Mf stammt und sich an die beiden Sonden-Moleküle A, 3 und B, 4 angelagert und gebunden hat, wobei insgesamt eine den nm-Spalt überbrückende und gleichzeitig die Elektroden 1 und 2 miteinander verbindende Brücke Bm gebildet wird.

Es ist also ein Übergang von einem Zustand mit zwei von den Elektroden 1 und 2 wegragenden Sonden-Molekülen A,3 und B,4 zu einer das Analyt-Molekül C,5 einschließenden, die Elektroden miteinander verbindenden Brücke Bm erfolgt, was zu einer messtechnisch erfassbaren Änderung der Wechselstrom-Impedanz führt und einem Rückschluss auf das Vorhandensein und gegebenenfalls auch der Menge an Analyt-Molekül C5 im fluiden Medium ermöglicht.

Die Fig. 1b zeigt - bei sonst gleich bleibenden Bezugszeichenbedeutungen - die Bildung der Brücke Bm zwischen den Elektroden 1 und 2 deutlicher.

Die Sonde A,3 ist mit ihrer sensorgebundenen Bindungsstelle a31 an die Elektrode 1 und die Sonde B,4 ebenfalls mit ihrer sensorgebundenen Bindungsstelle b41 an die Elektrode 2 gebunden. Die Affinitätsbindungsstellen a32 und b42 der beiden Sonden-Moleküle A,3 und B,4 sind mit den beiden im Wesentlichen endständigen bzw. exponierten Bindungsstellen c53 und c54 des Analyt-Moleküls C,5 jeweils eine oder mehrere Bindung(en) eingegangen und bilden insgesamt die Brücke Bm, welche die beiden Elektroden 1 und 2 über den nm-Spalt hinweg miteinander verbindet.

Die Fig. 2 zeigt - bei sonst gleich bleibenden Bezugszeichenbedeutungen - einen inversen Vorgang. Es existiert eine "vorgebundene Situation" mit einer bestehenden Brücke Bm zwischen den Elektroden 1 und 2, welche ein Hilfsmolekül D,6, z.B. ein DNA-Strangstück, als Brückenbestandteil aufweist. D,6 ist nicht notwendigerweise ein Analytmolekül.

Im fluiden Medium befindet sich ein an das Strangstück bzw. Hilfsmolekül D,6 anlagerungs- und bindungsfreudiges komplementäres Analyt-Molekül C,5, dasselbe lagert sich an das Hilfs-Molekül C,6 an, und die Bindungen desselben an die Affinitäts-Bindungsstellen der Sonden-Moleküle A,3 B,4 werden gelöst, womit die Brücke Bm zerstört ist, was wieder zu einer messbaren Impedanzänderung führt, welche Rückschlüsse auf das Vorhandensein und gegebenenfalls auch auf die Menge des Analyt-Moleküls C,5 ermöglicht.

Die Fig. 3 zeigt - bei sonst gleich bleibenden Bezugszeichenbedeutungen - einen zu Fig. 2 prinzipiell ähnlichen Vorgang. Hier sind im fluiden Medium Mf Moleküle E,7

vorhanden, welche an nur eine, nämlich d64 der beiden peripheren Bindungsstellen d63, d64 des Hilfs-Moleküls D,6 binden, wobei die Bindungskraft höher ist als die Bindung d64-b42 mit dem Sondenmolekül B,4.

Es löst sich die eben genannte Bindung und das Molekül E,7 bindet an der Bindungsstelle d64 des Hilfs-Moleküls D,6, womit die ursprüngliche Brücke Bm nicht mehr besteht und wieder eine Impedanzänderung zu beobachten ist.

Die Fig. 4 zeigt - bei sonst gleich bleibenden Bezugszeichenbedeutungen - eine mit den an die beiden Elektroden 1 und 2 sensor-gebundenen und mit ihren Affinitätsbindungen an die exponierten Bindungsstellen eines Hilfs-Moleküls D,6 gebundenen Sonden-Molekülen A,3 und B,4 gebildete Brücke Bm, welche z.B. durch ein Enzym E, 8 auf dreierlei verschiedene Art zerstört wird, nämlich I) durch Ablösen des Hilfs-Moleküls D,6 von den Sonden-Molekülen A,3, B,4, durch Entfernen der doppelsträngigen Bereiche II) durch Zerstörung des Hilfsmoleküls D,6 im einzelsträngigen Bereich oder III) durch Zerstörung der an der ursprünglichen Brücke Bm beteiligten Sonden-Moleküle A,3, B,4 und des Hilfs-Moleküls D,6. Durch die erfolgte Zerstörung der Brücke Bm erfolgt eine Änderung der Impedanz und es kann dadurch auf die Anwesenheit und über Messung der kinetischen Effekte auch auf Konzentration des Enzyms E,8 im fluiden Medium Mf geschlossen werden.

Zitate:

Patente:

US 2002/0172963 A1: "DNA bridged carbon nanotube arrays", Erfinder: Kelley; Fourkas; Naughton; Ren (alle US)

US 2002/0022223 A1; "High resolution DNA detection methods and devices", Erfinder: Connolly/US

US 2004/012161A1: "method for quantitative detection of nucleic acid molecules! Erfinder: Connolly/US

US 2005/0287589 A1: „High resolution DNA detection methods and devices“, Erfinder: Connolly/US

US 2006/0019273 A1: „Detection card for analyzing a sample for a target nucleic acid molecule, and uses thereof“, Erfinder: Connolly; Hainon; Murante; Grece; Tiller (alle US)

Paper

Braun E, Eichen Y, Sivan U, Ben-Yoseph G. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):775-8.

Chen F., Qing Q., Ren L., Wu Z., and Liu Z. APPLIED PHYSICS LETTERS 86, 123105 s2005d

Hashioka S., Saito M., Tamiya E. Matsumura H.: Appl. Phys. Lett. 85 (2004) 687

He H.X., Boussaad S., Xu B.Q., Li C.Z., Tao N.J. Journal of Electroanalytical Chemistry 522 (2002) 167–172

Hwang J. S., Kong K. J., Ahn D., Lee G. SAhn ., D. J. ,Hwang S. W.: Appl. Phys. Lett. 81 (2002) 1134.

Iqbal S. M., Balasundarama G., Ghosh S., Bergstrom D. E., Bashir R. APPLIED PHYSICS LETTERS 86, 153901 s2005d

Liu B., Xiang J., Tian J.-H., Zhong C., Mao B.-W., Yang F.-Z., Chen Z.-B, Wu S.-T., Tian Z.-Q. Electrochimica Acta 50 (2005) 3041–3047

Qing Q., Chen F., Li P., Tang W., Wu Z., Liu Z. Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 7771 – 7775

Reichert J., Ochs1 R., Beckmann1 D., Weber1 H. B., Mayor 1 M., H. v. Löhneysen VOLUME 88, NUMBER 17 PHYSICAL REVIEW LETTERS 29 APRIL 2002

Reed M. A., Zhou C., Muller C. J., Burgin T. P.,Tour J. M. 252-254 SCIENCE VOL. 278 10 OCTOBER 1997

Sambrook et al. "Molecular cloning", 3rd Ed. , CSHL Press

Poster

Roppert, K, Heer, R., Kast, M, Stepper, C, Koeck, A, Brueckl, H.: "A new approach for an interdigitated electrodes DNA-sensor", presentiert auf der Bioelectrochemistry 2005 in Coimbra.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Identifizierung von organischen und biochemischen Substanzen, insbesondere von Molekülen, Molekülsequenzen, Molekülteilen od. dgl. und zur Bestimmung von deren Menge bzw. Konzentration in einem fluiden, also flüssigen oder gasförmigen, Medium, wobei ein zumindest zwei Elektroden umfassender Nanogap-Sensor eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet,

- dass ein Nanogap-Sensor (100) zum Einsatz gebracht wird, dessen zumindest zwei voneinander durch eine elektrisch isolierende Schicht (12) oder durch einen nicht-materiellen Spalt (12) voneinander getrennte Elektroden (1, 2) aus voneinander verschiedenen, elektrisch leitenden und/oder prinzipiell halbleitenden, jedoch im Hinblick auf die Halbleiter-Eigenschaft relativ hohe Leitfähigkeit aufweisenden, Materialien gebildet sind,

- dass an die Oberfläche der ersten Elektrode (1) des Sensors (100) ein - vorzugsweise mit einer zumindest partiellen Längsorientierung ausgestattetes - erstes Affinitäts- bzw. Sonden-Molekül A (3) mit einem sensor-bindungsfähigen Bereich (a31) an einem seiner Enden oder in Nähe eines seiner Enden an das Material der ersten Elektrode (1) spezifisch bzw. individuell sensor-gebunden und dort immobilisiert wird, wobei der freie Rest dieses ersten Sonden-Moleküls A(3) zumindest eine, vorzugsweise aber mehrere freie, Affinitäts-Bindestellen (a32) darstellende, bindungsfähige bzw. -freudige Gruppe(n), Molekül-Sequenz(en) od. dgl. aufweist, welche eine zumindest gewisse Spezifität für die Bindung mit einer gesuchten Substanz, insbesondere mit einem Analyten bzw. Analytmolekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) aufweist,

- dass an die Oberfläche der zweiten Elektrode (2) des Sensors (100) ein - vorzugsweise ebenfalls mit einer zumindest partiellen Längsorientierung ausgestattetes, in Relation zu dem ersten Affinitäts- bzw. Sonden-Molekül A (3) anderes, zweites Affinitäts- bzw. Sonden-Molekül B (4) mit einem bindungsfähigen Bereich (b41) an einem seiner Enden oder in Nähe eines seiner Enden an das vom Material der ersten Elektrode (1) verschiedene Material der zweiten Elektrode (2) spezifisch bzw. individuell sensor-gebunden und dort immobilisiert wird, wobei der freie Rest dieses zweiten Sonden-Moleküls B(4) als Affinitäts-Bindestelle (b42) zumindest eine, vorzugsweise aber mehrere freie, bindungsfähige bzw. -freudige, Gruppe(n), Molekül-Sequenz(en) od. dgl. ebenfalls mit einer zumindest gewissen Spezifität für die Bindung mit einer gesuchten Substanz, insbesondere mit einem Analyten bzw. Analyt-Molekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) aufweist,

- dass aus einem zu prüfenden - üblicherweise verschiedene Moleküle, Molekül-Abschnitte bzw. -teile, Molekül-Sequenzen od. dgl. enthaltenden, die Elektroden (1, 2) und den Isolator bzw. Spalt (12) zwischen denselben umspülenden, fluiden Medium (Mf) - ein als solches gesuchtes, insbesondere in seiner Menge und/oder Konzentration, zu bestimmendes, durch ein bekanntes Molekül, einen derartigen Molekülabschnitt bzw. -teil, eine derartige Molekül-Sequenz od. dgl. gebildetes Analyt-Molekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) mit im Wesentlichen beliebiger Gestalt, mit jeweils mindestens zwei voneinander beabstandeten Bindungsstellen (c53, c54; d63, d64) für die sensor-gebundenen, immobilisierten Sonden-Moleküle A(3) und B(4) bzw. für deren bewegliche freie Enden mit freien Affinitäts-Bindungsstellen (a32) und (a42) selektiv aus dem zu analysierenden, dasselbe enthaltenden, fluiden Medium (Mf) austritt und mittels der jeweils an seinen exponierten Stellen, wie insbesondere an den verschiedenen Enden bzw. in deren Nähe jeweils angeordneten, exponierten Bindungsstellen (c53, c54; d63, d64) mit, insbesondere bindungsfähigen bzw. bindungsfreudigen Gruppen, Molekülsequenzen od. dgl. mit den die Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) darstellenden bindungsfähigen bzw. -freudigen Gruppen, Molekül-Sequenzen od. dgl., jeweils an den freien beweglichen Enden der mit ihren jeweils anderen peripheren Enden bzw. Endbereichen über die dortige Sensor-Anbindestellen (a31, a41) jeweils an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) spezifisch sensor-gebundenen bzw. dort immobilisierten ersten und zweiten Affinitäts- bzw. Sonden-Moleküle A (3) und B (4) - unter Ausbildung eines bzw. einer letztlich die beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) miteinander verbindenden, insgesamt aus den Sonden-Molekülen A(3) und B(4) und dem Analyt-Molekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) gebildeten Brücken-Moleküls bzw. Brücke (Bm) - jeweils eine die Isolatorschicht bzw. den Spalt (12) zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) überbrückende Bindung eingeht, oder aber

- dass das an die beiden - selbst mit jeweils ihren Sensor-Bindungsstellen (a31, b41) an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) sensor-gebundenen Sonden-Moleküle A (3) und B (4), über deren Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) gebundene Hilfs-Molekül (D6) enthaltende bestehende Brücken durch Einwirkung eines in dem fluiden Medium (Mf) enthaltenen, zu einer Bindung mit zumindest einer Bindungsstelle (d63, d64) des Hilfs-Moleküls D(6), die stärker ist, als zumindest eine der Bindungsgruppen (a32d63, b42d64) zwischen Hilfs-Molekül D(6) und zumindest einem der beiden Sonden-Moleküle A(3), B(4) befähigten Analyt-Moleküls E(7) von zumindest einem der an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) gebundenen Sonden-Moleküle A (3) und B (4) getrennt, also eine vorher bestandene Brücken (Bm) aufgelöst wird, und

- dass auf Basis der bei Ablauf des Brückenbildungs- oder des Brückenaufhebungs-Vorgangs auftretenden Änderung der Impedanz bzw. des Frequenzspektrums eines an die beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) angelegten Wechselstromes, wobei im Falle einer Brückenbildung die vor der Brückenmolekül-Bildung vorhanden gewesene Abwesenheit und die nach der erfolgten Brückenbildung dann vorliegende Anwesenheit des gesuchten Analyt-Moleküls C(5) an den Elektroden, oder im Fall der Brückenaufhebung eine selektive Anbindung des Analyt-Moleküls C(5) an Komponente(n) einer mit Hilfe eines Hilfs-Moleküls D(6) vorgefertigten Brücke führt, egal ob das Analyt-Molekül C(5) nach erfolgter Reaktion eine direkte oder indirekte Verbindung mit der Sensoroberfläche eingegangen ist oder in Lösung geht, das Vorhandensein, die Menge bzw. Konzentration des gesuchten Moleküls ermittelt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auflösung einer mit den einerseits an jede der beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) gebundenen Sonden-Molekülen A(3) und B(4) und andererseits mit dem über deren Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) mit denselben beidseitig gebundenen Hilfsmolekül D(6), insbesondere mit einem DNA-Sequenzstrang, gebildeten Brücke (Bm) vorgenommen wird, indem mittels des fluiden Mediums (Mf) ein im Wesentlichen an das Hilfs-Molekül D(6) anlagerungs- und mit demselben stark bindungsfähiges Analyt-Molekül C(5), insbesondere ein komplementäres DNA-Sequenzstück, zugeführt wird, welches mit dem Hilfs-Molekül D(6), insbesondere mit einem entsprechenden DNA-Sequenzstrang, bindet, und unter Bildung eines letztlich in das fluide Medium abwandernden Doppelmoleküls, insbesondere eines DNA-Doppelstrangs, die beiden Affinitäts-Bindungen (d63a32, d64b42) an die beiden, an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) sensor-gebundenen Sonden-Moleküle A(3) und B(4) gelöst werden. (Fig. 2)

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auflösung einer mit den einerseits an jede der beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) sensor-gebundenen Sonden-Molekülen A(3) und B(4) und andererseits mit dem über deren Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) mit denselben gebundenen Hilfsmolekül D(6), insbesondere mit einem DNA-Sequenzstrang, gebildeten Brücke (Bm) vorgenommen wird, indem mittels des fluiden Mediums (Mf) eine nur an eine der beiden zuerst mit den Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) bzw. bindungsfähigen Gruppen der beiden an die beiden material-unterschiedlichen Elektroden sensor-gebundenen immobilisierten Sonden-Moleküle A (3) und B (4) gebundenen exponierten Bindungsstellen bzw. Gruppen (c53, c54) des Hilfs-Moleküls D(6) anlagerungs- und

bindungsfähige Molekülgruppe enthaltende Analyt-Molekül E (7) unter Lösung nur einer der beiden Affinitäts-Bindungen (d63a32, d64b42) mit einem der beiden sensor-gebundenen Sonden-Moleküle A(3) und B(4) und somit unter Auflösung der Brücke (Bm) an eine der so frei gewordenen beiden exponierten Bindungsstellen, bzw. bindungsfähigen Gruppen (d63, d64) des Hilfs-Moleküls D(6) bindet. (Fig. 3)

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,

dass ein Nanogap-Sensor (100) eingesetzt wird, bei welchem der Abstand bzw. die Dicke der Isolierschicht bzw. des Spaltes (12) zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) in der Größenordnung von bis zu 500 nm, vorzugsweise von bis zu 200 nm, insbesondere im Bereich von 20 bis 70 nm, liegt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,

dass ein Nanogap-Sensor (100) eingesetzt wird, bei welchem der Abstand zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) durch eine Schicht aus einem festen, oder flüssigen dielektrischen Material, beispielsweise aus anorganischen Isolatormaterialien aus dem Bereich der Mikroelektronik oder des Feldeffekttransistor-Einsatzes, insbesondere Oxide, Nitride und/oder Chalkogenide, beispielsweise Siliziumoxid, Siliziumnitrid, Aluminiumoxid, Zirkonoxid, Silikonnitrid, Tantal pentaoxid, oder aber Dünnschichtfilme verschiedener Herkunft, wie insbesondere Langmuir-Blodgett (LB)-Filme, Polyelektrolyt-Multilayer und selbstorganisierte Monolagen aus verschiedenen Materialien und Materialkombinationen, sowie diverse Polymere, welche im Vergleich zu der kleineren Leitfähigkeit der beiden Messelektroden eine um mindestens drei Zehnerpotenzen geringere Leitfähigkeit aufweisen, wie beispielsweise Kapton®, Nafion® oder andere welche dem Fachmann bekannt sind, besonders bevorzugt schon heute oder in Zukunft routinemäßig genutzte, im Rahmen der Mikrosystemtechnologie in reproduzierbaren Schichtdicken herstellbare Isoliermaterialien, wie insbesondere SiO₂ und Si-Nitrid gebildet ist. Ebenfalls kann die Isolierschicht im Fall von komplett unterätzten Nanobelts mit dem Elektrolyten ident sein.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,

dass ein Nanogap-Sensor (100) eingesetzt wird, dessen beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) in ihrem eigenschaft-bestimmenden Material jeweils aus einer Kombination von zweien beliebigen der im Folgenden genannten Materialien

gebildet sind, wobei die Kombinationen innerhalb oder außerhalb der Materialgruppen gebildet sein können:

Metalle, wie beispielsweise Gold, Platin, Silber, Quecksilber; Halbleiter, welche dotiert sind, wie beispielsweise Silizium (Silicon) und Germanium; III-V bzw. II-VI-Halbleiter, wie beispielsweise GaAs, CdS, CdSe, CdTe; kohlenstoffhaltige Schichten, wie beispielsweise Grafit, Fullerene, Nano-tubes, diamond-like-carbon, Diamant in verschiedenen Ausführungen, so z.B. als Einkristall, mikrokristallin, vorzugsweise aber nano- oder ultra-nanokristallin, sowie Materialkombinationen, Legierungen einschließlich Dotierungen, oder aber auch andere an sich bekannte Elektrodenmaterialien, wie insbesondere Galliumnitrid, SiC (Siliziumcarbid), AlN (Aluminiumnitrid), ATO oder ITO wobei eine Kombination von zwei hoch dotierter Nichtmetallen besonders bevorzugt ist, hierbei besonders bevorzugt eine Kombination von hoch dotiertem, fast schon metallisch leitendem Silizium mit hoch dotiertem Diamant, insbesondere UNCD (Ultra-Nanocristalliner Diamant).

7. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem nicht die Affinitätsbindungen (d63a32 oder d64b42) des Hilfs-Moleküls D(6) an die beiden Sonden-Moleküle A (3), B (4) zur Überbrückung der beiden Elektroden (1, 2) gelöst wird, sondern das brückenbildende Hilfs-Molekül D(6) an zumindest einer beliebigen Stelle zerstört wird, z.B. für die Detektion von DNasen oder proteolytisch wirksamen Enzymen F(8). Fig. 4)

8. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem unterschiedliche Biomoleküle als zumindest eines der Affinitäts- bzw. Sonden-Moleküle A (3) und B (4) dienen, wie z.B. Antikörper, welche über das bzw. mittels des Analyt-Moleküls C (5) die Bildung einer Brücke verursachen, oder Nukleinsäure-Sequenzen, welche durch Hybridisierung eine Überbrückung der material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) verursachen, wobei die Möglichkeit von Linker-Sequenzen und Spacern, welche eine erhöhte Beweglichkeit der Sonden-Moleküle A (3) und B (4) gegenüber den Oberflächen der material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) gewährleisten, inkludiert ist.

9. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem künstlich generierte Analoga von Biomolekülen wie z.B. PNAs und LNAs, als Affinitäts- bzw. Sonden-Moleküle A (3) und B (4), eingesetzt werden.

10. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem durch eine fortlaufende chemische Reaktion, wie z.B. durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ein Band zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) bzw. zwischen den beiden an dieselben einseitig sensor-gebundenen Sonden-Molekülen A (3) und B (4) geknüpft oder zerstört wird, welches zur Detektion herangezogen wird.

Wien, am 4. Juli 2007

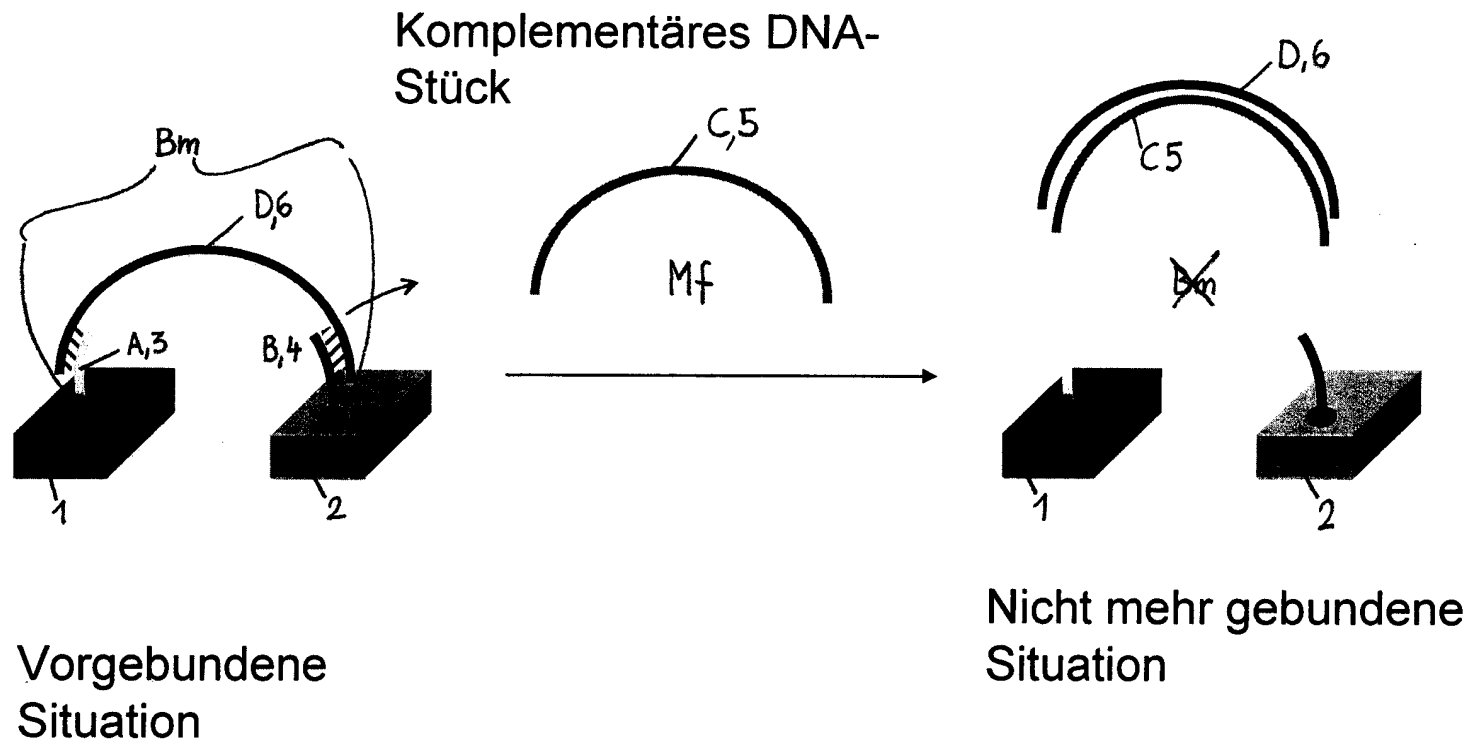
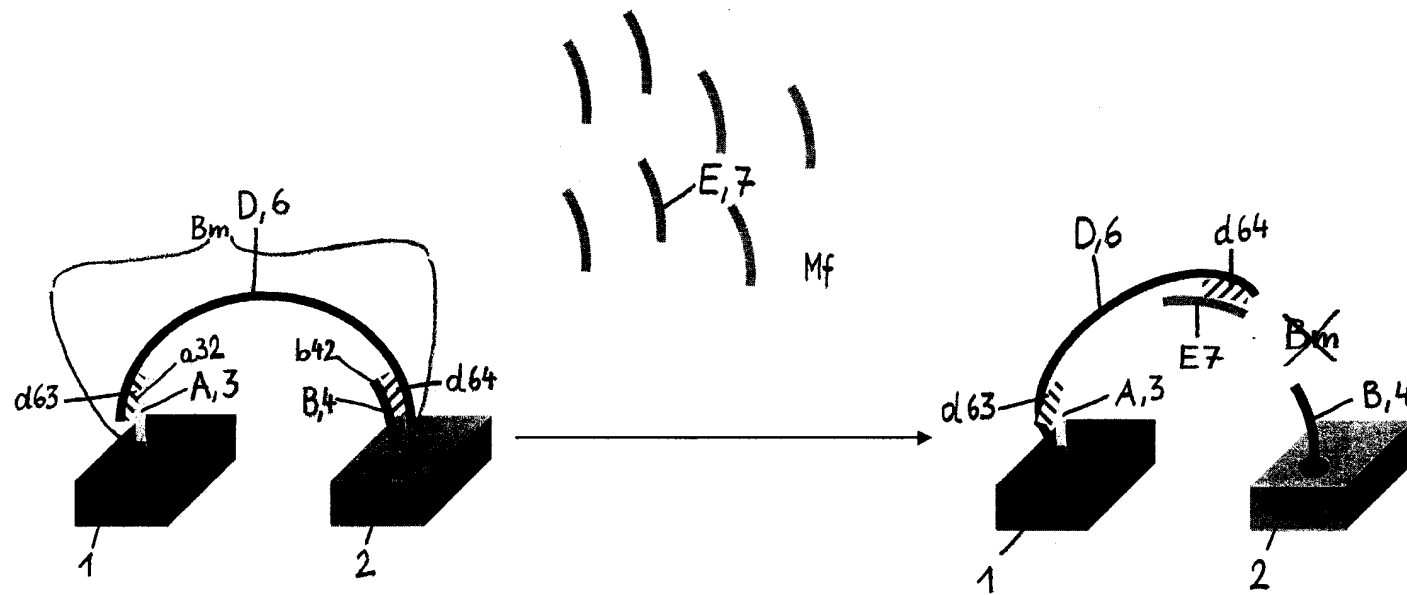


Fig. 2

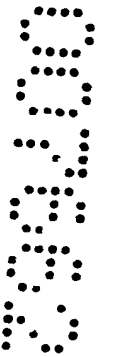




Vorgebundene
Situation

Brücke wieder offen

Fig. 3



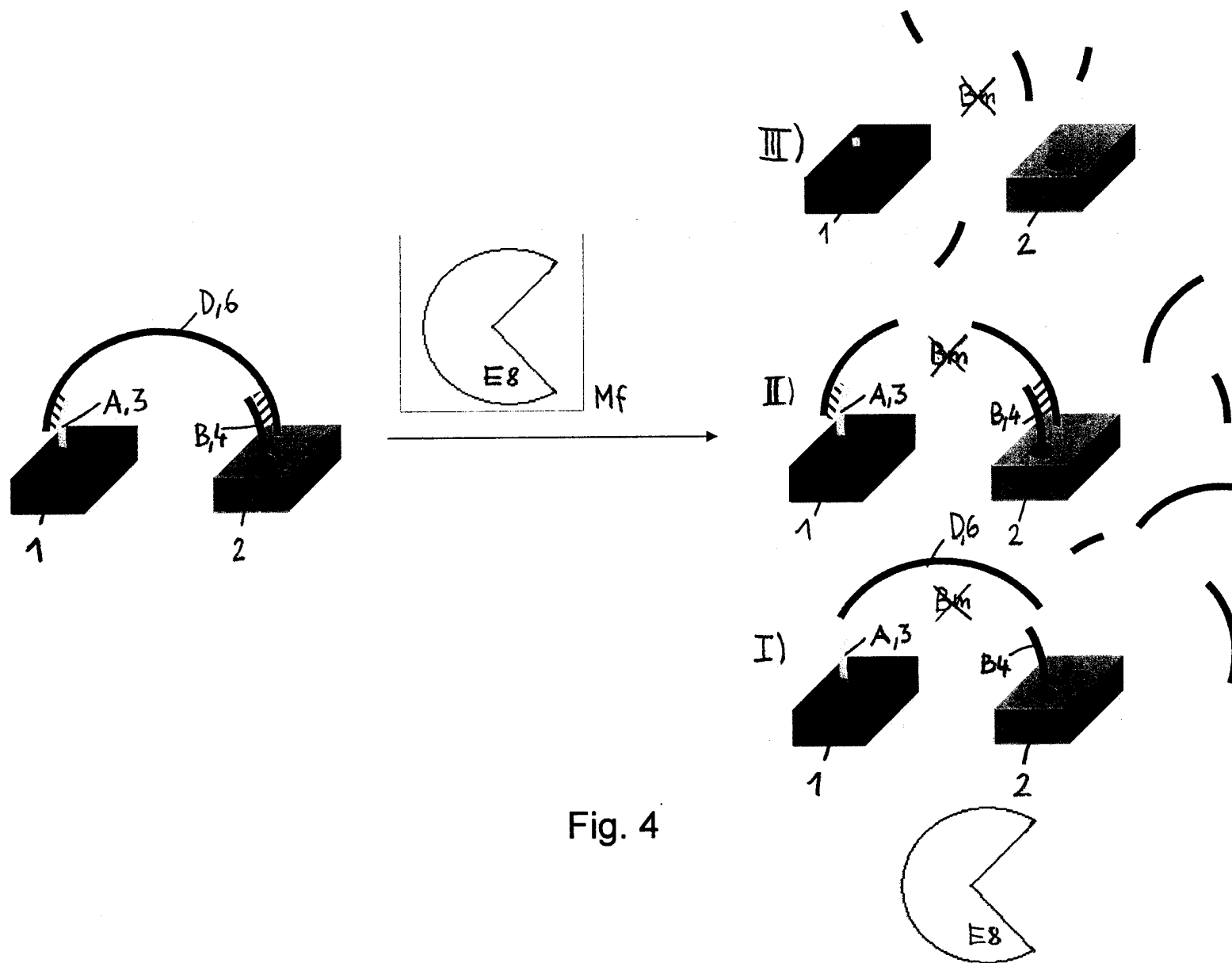


Fig. 4

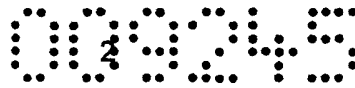
8338

**re: Österreichische Patentanmeldung A 1033/2007
Austrian Research Centers GmbH - ARC
rho-BeSt coating Hartstoffbeschichtungs GmbH**

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Identifizierung von organischen und biochemischen Substanzen, insbesondere von Molekülen, Molekülsequenzen oder Molekülteilen und zur Bestimmung von deren Menge bzw. Konzentration in einem fluiden, also flüssigen oder gasförmigen, Medium, wobei ein zumindest zwei Elektroden umfassender Nanogap-Sensor eingesetzt wird, dadurch gekennzeichnet,
- dass ein Nanogap-Sensor (100) zum Einsatz gebracht wird, dessen zumindest zwei voneinander durch eine elektrisch isolierende Schicht (12) oder durch einen Spalt (12) voneinander getrennte Elektroden (1, 2) aus voneinander verschiedenen, elektrisch leitenden und/oder prinzipiell halbleitenden, jedoch im Hinblick auf die Halbleitereigenschaft relativ hohe Leitfähigkeit aufweisenden, Materialien gebildet sind, dass
 - a) an die Oberfläche der ersten Elektrode (1) des Sensors (100) ein mit einer zumindest partiellen Längsorientierung ausgestattetes erstes Affinitäts- bzw. Sonden-Molekül A (3) mit einem sensor-bindungsfähigen Bereich (a31) an einem seiner Enden oder in Nähe eines seiner Enden an das Material der ersten Elektrode (1) spezifisch bzw. individuell sensor-gebunden und dort immobilisiert wird, wobei der freie Rest dieses ersten Sonden-Moleküls A(3) zumindest eine, vorzugsweise mehrere freie, Affinitäts-Bindestellen (a32) darstellende, bindungsfähige bzw. -freudige Gruppe(n), Molekül-Sequenz(en) oder Molekülteile aufweist, welche eine zumindest gewisse Spezifität für die Bindung mit einer gesuchten Substanz, also mit einem Analyten bzw. Analytmolekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) aufweist,
 - dass an die Oberfläche der zweiten Elektrode (2) des Sensors (100) ein ebenfalls mit einer zumindest partiellen Längsorientierung ausgestattetes, in Relation zu dem ersten Affinitäts- bzw. Sonden-Molekül A (3) anderes, zweites Affinitäts- bzw. Sonden-Molekül B (4) mit einem bindungsfähigen Bereich (b41) an einem seiner Enden oder in Nähe eines seiner Enden an das vom Material der ersten Elektrode (1) verschiedene Material der zweiten Elektrode (2) spezifisch bzw. individuell sensor-gebunden und dort immobilisiert wird, wobei der freie Rest dieses zweiten Sonden-Moleküls B(4) als Affinitäts-Bindestelle (b42) zumindest eine, vorzugsweise aber mehrere freie, bindungsfähige bzw. -freudige, Gruppe(n), Molekül-Sequenz(en) oder Molekülteile ebenfalls mit einer zumindest

NACHGEREICHT



gewissen Spezifität für die Bindung mit der gesuchten Substanz, also mit dem Analyten bzw. Analyt-Molekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) aufweist,

- dass aus einem zu prüfenden - üblicherweise verschiedene Moleküle, Molekül-Abschnitte bzw. -teile oder Molekül-Sequenzen enthaltenden, die Elektroden (1, 2) und den Isolator bzw. Spalt (12) zwischen denselben umspülenden, fluiden Medium (Mf) - das als solches gesuchte, in seiner Menge und/oder Konzentration zu bestimmende, durch ein bekanntes Molekül, einen derartigen Molekülabschnitt bzw. -teil oder eine derartige Molekül-Sequenz gebildete Analyt-Molekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) mit im Wesentlichen beliebiger Gestalt, mit jeweils mindestens zwei voneinander beabstandeten Bindungsstellen (c53, c54; d63, d64) für die sensor-gebundenen, immobilisierten Sonden-Moleküle A(3) und B(4) bzw. für deren bewegliche freie Enden mit freien Affinitäts-Bindungsstellen (a32) und (a42) selektiv aus dem zu analysierenden, dasselbe enthaltenden, fluiden Medium (Mf) austritt und mittels der jeweils an seinen exponierten Stellen, wie insbesondere an den verschiedenen Enden bzw. in deren Nähe jeweils angeordneten, exponierten Bindungsstellen (c53, c54; d63, d64) mit bindungsfähigen bzw. bindungsfreudigen Gruppen, Molekülsequenzen oder Molekülteilen mit den die Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) darstellenden bindungsfähigen bzw. -freudigen Gruppen, Molekül-Sequenzen oder Molekülteilen, jeweils an den freien beweglichen Enden der mit ihren jeweils anderen peripheren Enden bzw. Endbereichen über die dortige Sensor-Anbindestellen (a31, a41) jeweils an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) spezifisch sensor-gebundenen und dort immobilisierten ersten und zweiten Affinitäts- bzw. Sonden-Moleküle A (3) und B (4) - unter Ausbildung eines bzw. einer letztlich die beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) miteinander verbindenden, insgesamt aus den Sonden-Molekülen A(3) und B(4) und dem Analyt-Molekül C (5) oder Hilfs-Molekül D(6) gebildeten Brücken-Moleküls bzw. Brücke (Bm) - jeweils eine die Isolatorschicht bzw. den Spalt (12) zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) überbrückende Bindung eingeht,

oder dass

- b) das an die beiden - selbst mit jeweils ihren Sensor-Bindungsstellen (a31, b41) an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) sensor-gebundenen Sonden-Moleküle A (3) und B (4), über deren Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) gebundene Hilfs-Molekül (D6) enthaltende, vorher gebildete, also schon bestehende Brücken durch Einwirkung eines in dem fluiden Medium (Mf) enthaltenen, zu einer Bindung mit zumindest einer Bindungsstelle (d63, d64) des Hilfs-Moleküls D(6), die stärker ist, als zumindest eine der Bindungsgruppen (a32d63, b42d64) zwischen Hilfs-Molekül D(6) und zumindest einem der beiden Sonden-Moleküle A(3), B(4) befähigten Analyt-Moleküls E(7) von zumindest einem der an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) gebundenen Sonden-

NACHGEREICHT



Moleküle A (3) und B (4) getrennt, also dass eine vorher bestandene Brücken (Bm) aufgelöst wird, und dass

- c) auf Basis der bei Ablauf des Brückenbildungs-Vorgangs a) oder des Brückenauflösungs-Vorgangs b) auftretenden Änderung der Impedanz bzw. des Frequenzspektrums eines an die beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) angelegten Wechselstromes,

wobei im Falle einer Brückenbildung a) die vor der Brückenmolekül-Bildung vorhanden gewesene Abwesenheit und nach der erfolgten Brückenbildung dann vorliegende Anwesenheit des gesuchten Analyt-Moleküls C(5) an den Elektroden, oder

im Fall der Brückenauflösung b) eine selektive Anbindung des Analyt-Moleküls C(5) an Komponente(n) einer mit Hilfe eines Hilfs-Moleküls D(6) vorgefertigten Brücke führt - egal, ob das Analyt-Molekül C(5) nach erfolgter Reaktion eine direkte oder indirekte Verbindung mit der Sensoroberfläche eingegangen ist oder in Lösung geht,

das Vorhandensein und/oder die Menge und/oder die Konzentration des gesuchten Moleküls ermittelt wird.

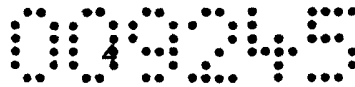
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

dass eine Auflösung einer mit den einerseits an jede der beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) gebundenen Sonden-Molekülen A(3) und B(4) und andererseits mit dem über deren Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) mit denselben beidseitig gebundenen Hilfsmolekül D(6), insbesondere mit einem DNA-Sequenzstrang, gebildeten Brücke (Bm), vorgenommen wird, indem mittels des fluiden Mediums (Mf) ein im Wesentlichen an das Hilfs-Molekül D(6) anlagerungs- und mit demselben stark bindungsfähiges Analyt-Molekül C(5), insbesondere ein komplementäres DNA-Sequenzstück, zugeführt wird, welches mit dem Hilfs-Molekül D(6), insbesondere mit einem entsprechenden DNA-Sequenzstrang, bindet, und unter Bildung eines letztlich in das fluide Medium abwandernden Doppelmoleküls, insbesondere eines DNA-Doppelstrangs, die beiden Affinitäts-Bindungen (d63a32, d64b42) an die beiden, an die material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) sensor-gebundenen Sonden-Moleküle A(3) und B(4) gelöst werden. (Fig. 2)

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,

dass eine Auflösung einer mit den einerseits an jede der beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) sensor-gebundenen Sonden-Molekülen A(3) und B(4) und andererseits mit dem über deren Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) mit denselben gebundenen Hilfsmolekül D(6), insbesondere mit einem DNA-Sequenzstrang, gebildeten Brücke (Bm) vorgenommen wird, indem mittels des fluiden Mediums (Mf) eine nur an eine

NACHGEREICHT



der beiden zuerst mit den Affinitäts-Bindungsstellen (a32, b42) bzw. bindungsfähigen Gruppen der beiden an die beiden material-unterschiedlichen Elektroden sensor-gebundenen immobilisierten Sonden-Moleküle A (3) und B (4) gebundenen exponierten Bindungsstellen bzw. Gruppen (c53, c54) des Hilfs-Moleküls D(6) anlagerungs- und bindungsfähige Molekülgruppe enthaltende Analyt-Molekül E (7) unter Lösung nur einer der beiden Affinitäts-Bindungen (d63a32, d64b42) mit einem der beiden sensor-gebundenen Sonden-Moleküle A(3) und B(4) und somit unter Auflösung der Brücke (Bm) an eine der so frei gewordenen beiden exponierten Bindungsstellen, bzw. bindungsfähigen Gruppen (d63, d64) des Hilfs-Moleküls D(6) bindet. (Fig. 3)

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,

dass ein Nanogap-Sensor (100) eingesetzt wird, bei welchem der Abstand bzw. die Dicke der Isolierschicht bzw. des Spaltes (12) zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) in der Größenordnung von bis zu 500 nm, vorzugsweise von bis zu 200 nm, insbesondere im Bereich von 20 bis 70 nm, liegt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet,

dass ein Nanogap-Sensor (100) eingesetzt wird, bei welchem der Abstand zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) durch eine Schicht aus einem festen, oder flüssigen dielektrischen Material, vorzugsweise aus anorganischen Isolatormaterialien aus dem Bereich der Mikroelektronik oder des Feldeffekttransistor-Einsatzes, aus der Gruppe Oxide, Nitride und/oder Chalkogenide, insbesondere Siliziumoxid, Siliziumnitrid, Aluminiumoxid, Zirkonoxid, Siliziumnitrid oder Tantalpentoxid, oder als Dünnschichtfilme verschiedener Herkunft, insbesondere Langmuir-Blodgett (LB)-Filme, Polyelektrolyt-Multilayer und selbstorganisierte Monolagen aus verschiedenen Materialien und Materialkombinationen, sowie Polymere, welche im Vergleich zu der kleineren Leitfähigkeit der beiden Messelektroden eine um mindestens drei Zehnerpotenzen geringere Leitfähigkeit aufweisen, insbesondere Kapton®, Nafion® oder andere dem Fachmann bekannte, routinemäßig genutzte, im Rahmen der Mikrosystemtechnologie in reproduzierbaren Schichtdicken herstellbare Isoliermaterialien, insbesondere SiO₂ und Si-Nitrid, vorliegen, oder im Fall von komplett unterätzten Nanobelts mit dem Elektrolyten ident ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein Nanogap-Sensor (100) eingesetzt wird, dessen beide material-unterschiedliche Elektroden (1, 2) in ihrem eigenschaft-bestimmenden Material jeweils aus einer Kombination von jeweils zwei beliebigen, untereinander unterschiedlichen Materialien der im Folgenden genannten Materialgruppen gebildet sind:

Metalle, insbesondere Gold, Platin, Silber, Quecksilber; Halbleiter, welche dotiert sind, wie beispielsweise Silizium und Germanium; III-V bzw. II-VI-Halbleiter, insbesondere GaAs, CdS, CdSe, CdTe; kohlenstoffhaltige Materialien, insbesondere Grafit, Fullerene, Nano-tubes, diamond-like-carbon, Diamant als Einkristall, mikrokristallin und vorzugsweise nano- oder ultra-nanokristallin, sowie Materialkombinationen, Legierungen einschließlich Dotierungen, oder mit anderen Elektrodenmaterialien, insbesondere Galliumnitrid, SiC (Siliziumcarbid), AlN (Aluminiumnitrid), ATO oder ITO wobei eine Kombination von zwei hoch dotierter Nichtmetallen bevorzugt ist, insbesondere eine Kombination von hoch dotiertem, fast schon metallisch leitendem Silizium mit hoch dotiertem Diamant, vorzugsweise UNCD (Ultra-Nanocrystalliner Diamant).

7. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem nicht die Affinitätsbindungen (d63a32 oder d64b42) des Hilfs-Moleküls D(6) an die beiden Sonden-Moleküle A (3), B (4) zur Überbrückung der beiden Elektroden (1, 2) gelöst wird, sondern das brückenbildende Hilfs-Molekül D(6) an zumindest einer beliebigen Stelle zerstört wird, für die Detektion von DNasen oder proteolytisch wirksamen Enzymen F(8). Fig. 4)

8. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem unterschiedliche Biomoleküle als zumindest eines der Affinitäts- bzw. Sonden-Moleküle A (3) und B (4) eingesetzt werden, vorzugsweise Antikörper, welche über das bzw. mittels des Analyt-Moleküls C (5) die Bildung einer Brücke verursachen, oder Nukleinsäure-Sequenzen, welche durch Hybridisierung eine Überbrückung der material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) verursachen, wobei die Möglichkeit von Linker-Sequenzen und Spacern, welche eine erhöhte Beweglichkeit der Sonden-Moleküle A (3) und B (4) gegenüber den Oberflächen der material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) gewährleisten, inkludiert ist.

NACHGEREICHT

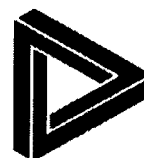
000245

9. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem künstlich generierte Analoga von Biomolekülen, vorzugsweise PNAs und LNAs, als Affinitäts- bzw. Sonden-Moleküle A (3) und B (4), eingesetzt werden.

10. Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 für den Nachweis eines biochemischen Vorgangs, bei welchem durch eine fortlaufende chemische Reaktion, wie vorzugsweise durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ein Band zwischen den beiden material-unterschiedlichen Elektroden (1, 2) bzw. zwischen den beiden an dieselben einseitig sensor-gebundenen Sonden-Molekülen A (3) und B (4) geknüpft oder zerstört wird, welches zur Detektion herangezogen wird.

Wien, am 22. August 2008

NACHGEREICHT



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : G01N 33/53 (2006.01); G01N 33/536 (2006.01); C12Q 1/00 (2006.01); C12Q 1/68 (2006.01)		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: G01N 33/53//G01N 33/536 , C12Q 1/00B4 , C12Q 1/00B6 , C12Q 1/68D		
Recherchierte Prüfsubstanz (Klassifikation):		
Konsultierte Online-Datenbank: Wpi, Epodoc, TXT, Embase, NPL, Medline, Pubmed, Internet		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 4. Juli 2007 eingereichten Ansprüchen 1-10 erstellt.		
Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	DE10113550A1 (INFINEON TECHNOLOGIES AG) 2. Oktober 2002 (02.10.2002) <i>*Ganzes Dokument, besonders auch Paragraphen [0030-0040],[0047-0055], [0093-0100], Figuren 3, 4, Ansprüche*</i>	1-10
	--	
X	US2003203394 A1 (EICHEN YOAV et al.) 30. Oktober 2003 (30.10.2003) <i>*Ganzes Dokument, besonders Figuren, Beispiele 14,15 *</i>	1-10
	--	
X	US2004248282 A1 (SOBHA M PISHARODY et al.) 9. Dezember 2004 (09.12.2004) <i>*Ganzes Dokument, besonders Figuren, Ansprüche[0068-0071],[0083-0091],[0119-0151],[*</i>	1-10
	--	
X	WO2003/076902 A2 (INTEGRATED NANO TECHNOLOGIES) 18. September 2003 (18.09.2003) <i>* Ganzes Dokument, besonders Figuren, Anspruch 51, [0044],[0078]*</i>	1-10
	--	
X	US6133046 A (Clerc) 17. Oktober 2000 (17.10.2000) <i>*Ganzes Dokument, besonders Figuren, Ansprüche, Spalte 3*</i>	1-10
	--	
Datum der Beendigung der Recherche: 2. Mai 2008		☒ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Dr. GÖRNER
¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
	Im vorgelegten Schutzbegehren führen die vorhandenen Rückbezüge jeweils eines Anspruches auf mehrere Ansprüche beziehungsweise die Verknüpfungen von Merkmalen durch "und/oder" zu einer unüberschaubaren Anzahl an Merkmalskombinationen, sodass keine genaue und unterscheidende Kennzeichnung gemäß § 91 Abs. 1 PatG erreicht wird. ----	