



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 26 331 A1** 2005.01.05

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 26 331.4**

(22) Anmeldetag: **11.06.2003**

(43) Offenlegungstag: **05.01.2005**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 33/50**

(71) Anmelder:

Advalytix AG, 85649 Brunnthal, DE

(74) Vertreter:

**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München**

(72) Erfinder:

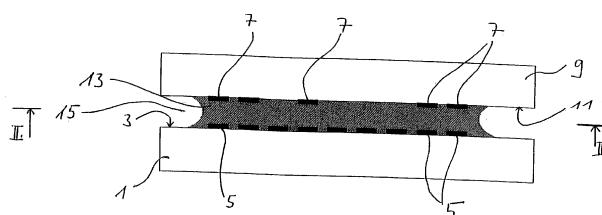
**Wixforth, Achim, Dr., 80636 München, DE; Gauer,
Christoph, Dr., 81667 München, DE**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Kontrolle von Microarrays und/oder Überwachung von Experimenten unter Verwendung von Microarrays**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kontrolle von Microarrays und/oder Überwachung von Experimenten unter Verwendung von Microarrays, bei dem ein Microarray mit einer ersten Vielzahl von Makromolekülen in einer ersten Anordnung von Spots auf einer ersten Festkörperoberfläche bereitgestellt wird, eine zweite Festkörperoberfläche mit einer zweiten Vielzahl von Makromolekülen in einer zweiten Anordnung von Spots bereitgestellt wird, die erste und zweite Festkörperoberfläche mit einer Flüssigkeit, der Makromoleküle enthält, die zumindest mit den Makromolekülen der Spots auf der zweiten Festkörperoberfläche hybridisieren können, in Kontakt gebracht werden, wobei sich die erste und zweite Festkörperoberfläche mit der Flüssigkeit zwischen sich gegenüberliegen, und eine Meßgröße zumindest eines Teiles der Spots auf der zweiten Festkörperoberfläche ausgewertet wird, die von dem Hybridisierungsgrad der Makromoleküle der Spots mit den Makromolekülen in der Flüssigkeit abhängt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kontrolle von Microarrays und/oder Überwachung von Experimenten unter Verwendung von Microarrays.

Stand der Technik

[0002] Eine Aufgabe der Molekularbiologie und der Chemie besteht darin, Bindungsereignisse verschiedener Makromoleküle, z. B. DNA-Fragmenten, quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Dabei bedient man sich u.a. sogenannter Microarrays, bei denen eine Sorte von Makromolekülen auf einer Festkörperoberfläche gebunden und eine zweite Sorte von Makromolekülen in Lösung miteinander in Kontakt gebracht werden („DNA-Microarrays“, Herausgeber M. Schena, Oxford University Press, 2000). Die auf der Festkörperoberfläche gebundenen Moleküle werden dabei meist in Form einer zweidimensionalen Matrix (Array) angeordnet, wobei typischerweise bestimmte Muster verwendet werden, die eine optimale Herstellung der Arrays gestatten. Zur Auswertung der Experimente werden Markierungstechniken angewandt, die Bindungsereignisse z. B. durch Fluoreszenzsignale anzeigen. Auch radioaktive oder elektrochemische Markierungstechniken sind bekannt.

[0003] Um wertvolles Probenmaterial zu sparen, verwendet man in der Microarraytechnologie meist ein Verfahren, bei dem eine gewisse Anzahl von Spots (bis zu mehreren 10.000) auf einer Festkörperoberfläche – meist einem funktionalisierten Glasträger, wie z. B. einem Objektträger – mittels sogenannter Spotter aufgebracht oder auch auf der Oberfläche synthetisiert werden. Darauf wird dann ein kleines Flüssigkeitsprobenvolumen gegeben, das die zu untersuchenden Probenmoleküle in meist unbekannter Konzentration enthält. Damit der gespottete Bereich des Microarrays komplett mit der Probenflüssigkeit bedeckt wird, verwendet man einen zweiten Festkörper, meist ein Mikroskopdeckgläschen, das die Probenflüssigkeit bedeckt und so einen dünnen (Kapillar-)Spalt definiert. Eine entsprechende Anordnung ist in **Fig. 4** schematisch dargestellt. Die Spots **105** des Microarrays sind auf die Oberfläche **103** des Substrates **101** aufgebracht. Mit Hilfe eines zweiten Festkörpers **130** wird der Spalt **115** definiert, in dem sich die Probenflüssigkeit **113** befindet. Nach einer gewissen Reaktionszeit wird eine Meßgröße der Spots **105** untersucht, die Auskunft darüber gibt, ob und in welchem Maße eine Hybridisierung der in den Spots **105** enthaltenen Makromoleküle mit Makromolekülen in der Flüssigkeit stattgefunden hat. Das Deckgläschen **130** stellt also eine mechanische Barriere dar, die den Flüssigkeitsfilm **113** begrenzt und über das Microarray ausbreiten soll. Die Höhe des Flüssigkeitsfilmes beträgt meist etwa 30 µm bis 500 µm. Die Dynamik der Moleküle in der Flüssigkeit bzw.

die Reaktionskinetik wird im wesentlichen durch Diffusion bestimmt.

[0004] Es ist kaum festlegbar, wann ein Hybridisierungsexperiment den Gleichgewichtszustand erreicht hat, da die Reaktionskinetik der Bindung von Molekülen in Lösung und derjenigen auf den Spots eines Microarrays in ausgesprochen komplexer Art und Weise von vielen Parametern abhängt, die im allgemeinen nicht oder nur näherungsweise bekannt sind. Dies sind u.a. die Konzentration der Moleküle in der festen und flüssigen Phase, konkurrierende Reaktionen, wie z. B. unspezifische Bindungen an der Substratoberfläche, die Größe der Moleküle und die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers. Meist wird die Hybridisierung von DNA-Microarrays daher als „Endpunkt-Experiment“ durchgeführt, der Zeitpunkt des Abbruchs jedoch wird meist willkürlich gewählt. Typisch ist eine Hybridisierungsdauer z. B. über Nacht.

[0005] Im allgemeinen ist es nicht möglich, die Entwicklung der Signalintensität während der Hybridisierung als Funktion der Zeit zu beobachten, so daß eine Aussage über das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes nicht möglich ist. Ist der Gleichgewichtszustand bei der Auswertung noch nicht erreicht, wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse negativ beeinflusst. Auch der Vergleich z. B. der ausgewerteten Fluoreszenzintensität von nominell identischen Spots sagt nur relativ wenig über das Erreichen des Gleichgewichtszustandes aus, da im allgemeinen von vornherein nicht gesagt werden kann, in welchem Maße zwei nominell identische Spots tatsächlich identisch sind. Variationen können z. B. auf mangelnder Reproduzierbarkeit des Spotprozesses beruhen und durchaus beträchtlich sein. Ebenso ist nicht bekannt, mit welcher Qualität und Reproduzierbarkeit die Festkörperoberfläche mit den Spots belegt werden kann. Somit ist es schwierig, mangelnde Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsergebnisse bzw. Inhomogenitäten auf der Festkörperoberfläche entweder auf eine schlechte Hybridisierung oder auf ein mangelhaftes Spotten zurückzuführen.

[0006] Um eine gewisse Kontrolle über die Reproduzierbarkeit derartiger Experimente zu gewährleisten, werden bei bekannten Verfahren auf dem Microarray oft Repliken nominell identischer Spots, die in geeigneter Weise auf dem Array verteilt sind, aufgebracht. Durch einen Vergleich z. B. der Fluoreszenzintensität dieser Spots lassen sich dann Rückschlüsse auf die Homogenität bzw. die Reproduzierbarkeit der Experimente ziehen. Zu diesem Zweck sind Verfahren bekannt, die mit Bezug zu **Fig. 5** erläutert werden, die eine schematische Querschnittsansicht einer Anordnung zur Durchführung solcher bekannter Verfahren zeigt. Auf der Festkörperoberfläche **103** des Substrates **101** befinden sich die Spots **105** des Microarrays, dessen Hybridisierungs-

verhalten mit Makromolekülen **132** in der Flüssigkeit **113** untersucht werden soll. Der Probenlösung **113** sind zusätzlich Testmoleküle **134** in bekannter Konzentration zugegeben, die Idealerweise keine Kreuzreaktion mit den zu untersuchenden Makromolekülen der Spots **105** des Microarrays eingehen. Auf dem Microarray sind Testspots **107** in bekannter Anordnung verteilt, die wiederum nur mit den Testmolekülen **134** hybridisieren. Die Testmoleküle **134** sollen Idealerweise nur spezifische Bindungen mit den speziellen Testspots **107** auf dem Microarray eingehen. Dadurch ist es möglich, parallel zum eigentlichen Hybridisierungsexperiment ein Kontrollexperiment mit vorzugsweise bekanntem Ausgang durchzuführen und daraus Rückschlüsse auf das eigentliche Experiment zu ziehen.

[0007] Für eine solche Verfahrensführung ist es notwendig, daß Testspots auf das eigentliche Microarray aufgebracht werden. Die dabei gewählte geometrische Anordnung, die Spotdichte und -größe etc. können im allgemeinen nicht frei gewählt werden, da die Spoteinrichtungen die Flüssigkeit in der Regel in einem bestimmten Raster aus Mikro-Titerplatten aufnehmen und das Spotten der Testspots und des Arrays in einem Durchgang erfolgen sollte. Das führt im allgemeinen zu regelmäßigen Anordnungen solcher Testspots auf dem Array. Eine solche regelmäßige Anordnung verringert den statistischen Wert der Auswertung der Reaktionen der Testmoleküle an den Testspots. Die Auswertung der Testspots erfolgt entweder händisch oder mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung. In letzterem Fall müssen Makros geschrieben werden, die z. B. eine kleine Anzahl von 100 Testspots in einem Array von oftmals einigen 10.000 Testspots auf eine bestimmte Art und Weise miteinander vergleichen und auswerten. Dabei ergibt sich die Schwierigkeit, die Position der Testspots auf dem Array genau zu erkennen, da sich aufgrund der Toleranzen bei dem Spotprozess Verschiebungen ergeben können. Auch bei dem beschriebenen Verfahren unter Verwendung von Testmolekülen und Testspots können die Einflüsse des Spotprozesses selbst und der Hybridisierung auf Homogenität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht voneinander getrennt werden.

Aufgabenstellung

[0008] Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Kontrolle von Microarrays bzw. zur Überwachung von Experimenten unter Verwendung von Microarrays anzugeben, das möglichst genaue Information über die Homogenität und Reproduzierbarkeit des Spotherstellungsprozesses und/oder des Reaktionsgleichgewichtes geben kann.

[0009] Diese Aufgabe wird mit einem Verfahren zur Kontrolle von Microarrays und/oder Überwachung von Experimenten unter Verwendung von Microar-

rays gelöst, das die Merkmale des Anspruches 1 aufweist. Besondere Ausgestaltungen sind Gegenstand von Unteransprüchen. Die Aufgabe wird zudem mit einem Verfahren zur Untersuchung bzw. zum Nachweis von Hybridisierungsreaktionen von Makromolekülen in einer Flüssigkeit mit Makromolekülen an einer Festkörperoberfläche gelöst, das die Merkmale des Anspruches 12 oder die Merkmale des Anspruches 13 aufweist.

[0010] Erfindungsgemäß ist vorgesehen, daß ein Microarray mit einer ersten Vielzahl von Makromolekülen, die auf einer ersten Festkörperoberfläche in einer vorgegebenen ersten Anordnung von Spots gebunden sind, bereitgestellt wird. Dieses im folgenden als Probenarray bezeichnete Microarray enthält diejenigen Makromoleküle, deren Hybridisierung mit Makromolekülen in der Probenflüssigkeit analysiert werden soll. Erfindungsgemäß wird eine zweite Festkörperoberfläche mit einer zweiten Vielzahl von Makromolekülen in einer zweiten Anordnung von Spots bereitgestellt. Sowohl die erste als auch die zweite Festkörperoberfläche werden mit der Flüssigkeit in Kontakt gebracht, die Makromoleküle enthält, die zumindest mit den Makromolekülen der Spots auf der zweiten Festkörperoberfläche hybridisieren können. Dazu werden die Makromoleküle in den Spots der zweiten Festkörperoberfläche ggf. entsprechend ausgewählt.

[0011] Die Anordnung wird derart gewählt, daß sich die Flüssigkeit in Form eines Filmes zwischen den beiden Festkörperoberflächen befindet. Es wird dann eine Meßgröße zumindest eines Teiles der Spots auf der zweiten Festkörperoberfläche ausgewertet, die von dem Hybridisierungsgrad der Makromoleküle in den Spots auf der zweiten Festkörperoberfläche mit Makromolekülen in der Flüssigkeit abhängt. Aus der Auswertung dieser Meßgröße lassen sich die Qualitätsparameter bei dem Experiment bestimmen.

[0012] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird also die zweite begrenzende Festkörperoberfläche nicht nur als Begrenzungselement für den Flüssigkeitsfilm, sondern als funktionalisiertes Kontrollelement eingesetzt. Der Abstand zwischen dem Probenarray und dem so gebildeten Kontrollelement, d.h. die Dicke des Flüssigkeitsfilmes, ist mit z. B. 30 µm bis 500 µm in der Regel kleiner als die oder gleich der Distanz zwischen benachbarten Spots auf dem Array, die aus fertigungstechnischen Gründen meist nicht näher zueinander als ca. 80 µm bis 250 µm aufgebracht werden können.

[0013] Die Spots des zweiten Microarrays, im folgenden Testarray genannt, können völlig unabhängig von der Art, der Dichte oder des Layouts des Probenarrays angeordnet bzw. ausgeführt sein. Es ist nicht notwendig, eine kleine Anzahl von Spots aus der großen Anzahl von Spots des Probenarrays zu identifi-

zieren. Das Testarray ist ein zusätzliches in das Experiment integrierbares Kontrollelement. Die Spots des Testarrays auf der zweiten Festkörperoberfläche sind in unmittelbarer Nähe der Spots des Probenarrays auf der ersten Festkörperoberfläche angeordnet, da sie sich im Abstand der Spalthöhe von wenigen Mikrometern zueinander befinden. Es ist also mit großer Sicherheit davon auszugehen, daß die experimentelle Umgebung der Spots auf dem Probenarray und der Spots auf dem Testarray gleich sind, wenn sich diese Spots z. B. gegenüberliegen.

[0014] Die Spots des Testarrays können in vorbestimmter, aber beliebiger Anordnung auf dem Testarray angeordnet sein, so daß insbesondere keine regelmäßige Anordnung notwendig ist.

[0015] Bei einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Korrelation des Signals der Meßgröße nominell identischer Spots auf dem Testarray ausgewertet. Ein Reaktionsgleichgewicht ist erreicht, wenn diese Korrelation unabhängig von der Entfernung der ausgewerteten Spots ist. Bei entsprechender Anordnung z. B. des Auswertalgorithmus können auch z. B. zwei verschiedene Spottypen mit unterschiedlichen Makromolekülen von z. B. unterschiedlicher Konzentration für eine entsprechende Aussage ausgewertet werden.

[0016] Bei der Auswertung der Korrelation von Signalen von zumindest zwei Spots des Testarrays ist es also möglich, vor der aufwendigen Analyse der Signale der großen Vielzahl von Spots auf dem Probenarray zunächst nur die Hybridisierung des Testarrays einer kleinen Anzahl von Spots mittels einer einfachen Korrelationsanalyse auszuwerten und nur bei einem positiven Ergebnis das umfangreiche Probenarray zu analysieren, dessen Auswertung sehr viel Zeit in Anspruch nimmt.

[0017] Die Auswertung von zwei nominell identischen Spots auf der zweiten Festkörperoberfläche ermöglicht zudem Aussagen über den Grad der Übereinstimmung dieser Spots, um Information über die Reproduzierbarkeit des zugrundeliegenden Spotherstellungsprozesses zu erhalten. Speziell wenn das Testarray auf der zweiten Festkörperoberfläche Felder nominell identischer Spots oder überhaupt nur eine Sorte nominell identischer Spots umfaßt, ist dazu nicht die Auswahl bestimmter einzelner Spots notwendig, wie es bei den beschriebenen Verfahren des Standes der Technik erforderlich ist. Die Distanz zweier Spots, die auf diese Weise zur Auswertung eingesetzt werden, wird dabei kleiner gewählt als die Diffusionslänge in den betrachteten Hybridisierungszeiten. Typische Werte für Diffusionslängen sind abhängig von der Größe der betrachteten Moleküle, der Temperatur oder der verwendeten Pufferlösung und liegen z. B. bei 100 µm/Stunde.

[0018] Das funktionalisierte Testarray kann mit Hilfe eines vollkommen unterschiedlichen und unabhängigen Ausleseverfahrens als das Probenarray verwendet werden. Möglich sind z. B. die Fluoreszenzmarkierung mit einem anderen Farbstoff als das Probenarray, die Markierung mit magnetischen Beads oder Metallkolloiden, die Markierung mit radioaktiv markierten Beads, die Markierung mit chemolumineszenten Bestandteilen, Ausleseverfahren, die ein elektrisches Auslesen erlauben, oder Auslesen eines Farbumschlages etc.

[0019] Zum Beispiel bei einem elektrischen Ausleseprozess kann vorteilhafterweise das Testarray separat kontaktiert werden und das Untersuchungsarray kann ein Standardarray sein.

[0020] Besonders einfach ist es, wenn die auszuwertende Meßgröße des Testarrays dieselbe Meßgröße ist, die auch bei dem Probenarray zur Durchführung des Experimentes eingesetzt wird. In der Regel kann dann für die Auswertung der unterschiedlichen Meßgrößen der gleiche Meßaufbau verwendet werden.

[0021] Bei einer besonderen Ausführungsform umfaßt das funktionalisierte Testarray zumindest in Teilbereichen eine Kopie des Untersuchungsarrays in spiegelverkehrter Form. Das Spotmuster ist also derart angeordnet, daß beim Anordnen der beiden Festkörperoberflächen mit dem Flüssigkeitsfilm zwischen sich jeweils nominell identische Spots gegenüberliegen. Eine solche Geometrie ist besonders vorteilhaft bei der Qualitätskontrolle des Spotherstellungsprozesses, da die Entfernung der nominell identischen Spots nur etwa 30 µm bis 500 µm entsprechend der Spaltdicke beträgt und somit kleiner ist als der Diffusionsradius der Makromoleküle in der Flüssigkeit im Verlauf einiger Stunden. Die nominell identischen Spots haben also eine chemisch identische Umgebung. Unterschiede in der Signalintensität können bei einer solchen Verfahrensführung nicht auf der Hybridisierung beruhen, sondern sind ausschließlich auf die mangelnde Reproduzierbarkeit beim Spotten zurückzuführen. Auf diese Weise wird also eine Qualitätskontrolle nur des Spotherstellungsprozesses mit einem realen biologischen System durchführbar.

[0022] Bei einer besonders vorteilhaften Verfahrensführung wird so zunächst die Übereinstimmung der Spots und damit die Reproduzierbarkeit des Spotherstellungsprozesses geprüft. Die gegenüberliegenden Spots sind so nahe beieinander, daß sie im wesentlichen die gleiche chemische Umgebung haben. Bei guter Übereinstimmung der Spots kann dann wie oben beschrieben auf einfache Weise aus der Auswertung der Korrelation zweier nominell identischer Spots des Testarrays Information über den Grad des Reaktionsgleichgewichtes erhalten werden.

[0023] Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Anordnung der Spots auf der ersten Festkörperoberfläche in dem Probenarray spiegelsymmetrisch bezüglich einer mittigen Achse in der Ebene des Microarrays ist und das Testarray mit den Testspots auf der zweiten Festkörperoberfläche nominell identisch ist. Auf diese Weise ist es möglich, das Probenarray und das Testarray identisch herzustellen und durch einfache Verdopplung des Spotherstellungsprozesses die zwei für das erfindungsgemäße Verfahren dieser Ausgestaltung notwendigen Microarrays zu erhalten.

[0024] Der Homogenisierungs- bzw. Verteilungsprozeß der Flüssigkeit in dem Spalt zwischen den beiden Festkörperoberflächen kann zusätzlich gefördert werden. Bei einer besonderen Ausführungsform wird dazu ein Mischverfahren mit Hilfe des Impulsübertrages von Oberflächenschallwellen eingesetzt, ähnlich wie es in WO 03/018181 A1 beschrieben ist. Dabei ist es von besonderem Vorteil, daß die Oberflächenschallwellen mit auf dem Substrat integrierten Oberflächenschallwellenerzeugungseinrichtungen, z. B. Interdigitaltransducern, einfach anzuregen sind.

[0025] Besonders vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Überprüfungsverfahren im Rahmen eines Untersuchungs- bzw. Nachweisverfahrens für Hybridisierungsreaktionen von Makromolekülen einzusetzen. Es kann dann vor und/oder während der zu untersuchenden Hybridisierungsreaktion die Reproduzierbarkeit des Spotherstellungsprozesses, in dem die Spots für die Hybridisierungsreaktion hergestellt worden sind, untersucht werden bzw. die Homogenität des Flüssigkeitsfilms und die Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes überwacht werden.

Ausführungsbeispiel

[0026] Die erfindungsgemäßen Verfahren werden anhand der beiliegenden Figuren im Detail erläutert. Die Figuren sind schematischer Natur und nicht notwendigerweise maßstabsgetreu. Dabei zeigt:

[0027] **Fig. 1:** einen Querschnitt durch eine Anordnung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens,

[0028] **Fig. 2:** eine Draufsicht auf einen Schnitt durch die Anordnung der **Fig. 1** in Blickrichtung II,

[0029] **Fig. 3:** einen Schnitt durch eine Anordnung zur Durchführung einer anderen Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens,

[0030] **Fig. 4:** einen Schnitt durch eine Anordnung zur Durchführung eines Verfahrens des Standes der Technik, und

[0031] **Fig. 5:** einen Schnitt durch eine Anordnung zur Durchführung eines anderen Verfahrens des

Standes der Technik.

[0032] **Fig. 1** zeigt eine schematische Schnittansicht durch eine Anordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. **1** bezeichnet z. B. einen Glasträger, z. B. einen Objektträger, auf den in an sich bekannter Weise ein Microarray aus Spots **5** aufgebracht ist. Ein solches Microarray kann mehrere 10.000 solcher Spots umfassen, die z. B. mit unterschiedlichen Makromolekülen funktionalisiert sind. Der Abstand der einzelnen Spots beträgt je nach Anwendung in der Regel 80 µm bis 250 µm. Mit **3** ist diejenige Oberfläche des Glassubstrates **1** bezeichnet, auf der dieses Probenarray aufgebracht ist.

[0033] Gegenüber der Oberfläche **3** befindet sich ein zweites Substrat **9**, das ebenfalls z. B. ein Objektträger aus Glas sein kann. Auf dessen dem Substrat **1** gegenüberliegender Oberfläche **11** befinden sich Testspots **7** in einer Anordnung eines Testmicroarrays. Auch diese Spots sind in einem an sich bekannten Spotprozess aufgebracht worden. Die Anzahl der Testspots **7** ist sehr viel kleiner als die Anzahl der Spots des zu untersuchenden Arrays **5** und wird z. B. von nur 100 Spots gebildet. Zwischen den Oberflächen **3**, **11** der Substrate **1**, **9** befindet sich ein Spalt **15** einer Höhe von z. B. 30 µm bis 500 µm. Dieser Spalt wird in nicht gezeigter Weise z. B. mit entsprechenden Abstandshaltern aufrecht erhalten. In dem Spalt **15** befindet sich die Flüssigkeit **13**, die diejenigen Makromoleküle enthält, deren Hybridisierungsverhalten mit den Makromolekülen in den Spots **5** untersucht werden soll.

[0034] **Fig. 2** zeigt eine Draufsicht auf die Oberfläche **11** in Blickrichtung II. Erkennbar ist die Anordnung der Testspots **7**, die in regelmäßiger oder unregelmäßiger Anordnung vorgesehen sein können und in sehr viel geringerer Anzahl als die gegenüberliegenden Untersuchungsspsots **5** vorhanden sind.

[0035] **Fig. 3** zeigt eine Anordnung, bei der ein Substrat **9** mit Testspots **7** in Form eines Arrays vorgesehen ist, die in spiegelverkehrter Anordnung zu den Spots **5** des Untersuchungsarrays auf der Oberfläche **3** des Substrates **1** vorgesehen sind. So liegen sich nominell identische Spots gegenüber.

[0036] Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit den gezeigten Ausführungsformen wie folgt durchgeführt werden. Auf den Objektträger **1** wird in an sich bekannter Weise z. B. mit Hilfe eines an sich bekannten Spotters ein Microarray aufgebracht. Dazu wird z. B. mit einem Feld von Pipetten automatisiert aus einer Mikro-Titerplatte mit entsprechenden Wirkstoffen Material entnommen und in dem Muster des Feldes der Pipetten auf den Objektträger **1** in Arrayform aufgebracht. Die einzelnen Spots enthalten dabei Makromoleküle, die für den einzelnen Spot charakteristisch sind. Die Spots unterscheiden sich in der Regel

durch die Art der Makromoleküle, die in ihnen gebunden sind.

[0037] Auf die Oberfläche **11** des Substrates **9** werden in an sich ähnlicher Weise Testspots **7** in sehr viel geringerer Anzahl aufgebracht. Einige oder alle dieser Testspots sind nominell identisch und enthalten dieselbe Sorte Moleküle in nominell gleicher Menge.

[0038] Auf das Microarray, das sich auf der Oberfläche **3** befindet, wird ein kleines Volumen der Probenflüssigkeit gegeben, das zu untersuchende Probenmoleküle in meist unbekannter Konzentration enthält. Im folgenden wird das Substrat **9** mit der Oberfläche **11**, auf dem sich die Testspots **7** befinden, in Richtung der Oberfläche **3** des Substrates **1** auf der Flüssigkeit angeordnet, wobei ein wohldefinierter Abstand eingehalten wird. Dies wird z. B. durch entsprechende Abstandshalter erreicht oder in einer Vorrichtung, die bereits nur eine Anordnung in einem vorgegebenen Abstand ermöglicht. Die Höhe des Flüssigkeitsfilmes wird auf diese Weise zu etwa 30 µm bis 500 µm in gewünschter Form eingestellt. Wie beschrieben sind die einzelnen Spots **5** des Microarrays auf der Oberfläche **3** in der Regel 80 µm bis 150 µm auseinander. Insofern unterliegt die vertikale Dimension der Figuren einem anderen Maßstab als die horizontale Dimension und ist insofern nur schematisch zu verstehen.

[0039] Die Makromoleküle sind dabei derart fluoreszenzmarkiert, daß sowohl die Spots **5** des Untersuchungsarrays auf der Oberfläche **3** als auch die Testspots **7** auf der Oberfläche **11** einen Fluoreszenzsignal zeigen, das von der Hybridisierung mit den Makromolekülen der Flüssigkeit **13** abhängt. Alternativ sind die Makromoleküle in der Flüssigkeit **13** entsprechend fluoreszenzmarkiert.

[0040] Gegebenenfalls wird durch eine zusätzlich vorgesehene Mischvorrichtung (z. B. unter Verwendung des Impulsübertrages von Oberflächenschallwellen, wie es in WO 03/018181 A1 beschrieben ist) gefördert.

[0041] Die wenigen Testspots **7** lassen sich auf einfache Weise lokalisieren und auf ihre Fluoreszenz hin untersuchen, nachdem eine typische Reaktionszeit vergangen ist. Das Reaktionsgleichgewicht ist erreicht, wenn die Korrelation der Intensität nominell identischer Spots auf dem Testarray unabhängig von ihrer Entfernung ist. Wurde auf diese Weise festgestellt, daß sich das Gleichgewicht eingestellt hat, so wird die sehr viel aufwendigere Auswertung der Fluoreszenz der Testspots **5** in bekannter Weise vorgenommen. Dabei ist vorteilhaft, daß sich die Testspots **7** in unmittelbarer und chemisch gleicher Umgebung befinden wie die direkt gegenüberliegenden Spots **5** des Untersuchungsarrays auf der Oberfläche **3**.

[0042] Die jeweilige Korrelation der Spotintensitäten von nominell identischen Spots **7** des Testarrays auf der Oberfläche **11** kann hierbei mit bekannten Verfahren der abstandsabhängigen Korrelationsrechnung über z. B. die Ermittlung der jeweiligen Spotintensitäten der Fluoreszenz und Bildung der jeweiligen Korrelation auch als Funktion der Zeit angegeben werden. Bei geeigneter lateraler Anordnung der Testspots **7** kann Auskunft über die langreichweitige Homogenität der Hybridisierungsbedingungen auf dem eigentlichen Microarray mit den Untersuchungssspots **5** an der gegenüberliegenden Oberfläche **3** gegeben werden. Das funktionalisierte Substrat **9** mit den Testspots **7** kann darüber hinaus auch ein vollkommen anderes und unabhängiges Ausleseverfahren als das eigentliche Microarray aus Untersuchungssspots **5** auf der Oberfläche **3** verwenden. Zum Beispiel kann die Fluoreszenzmarkierung der Makromoleküle in den Testspots **7** einen gänzlich anderen Farbstoff verwenden als die markierten Makromoleküle in den Spots **5** des eigentlichen Microarrays auf der Oberfläche **3**.

[0043] Wird z. B. die Fluoreszenz der Makromoleküle in dem Untersuchungssspots **5** ausgewertet, so können andererseits die Makromoleküle in den Testspots **7** mit magnetischen Beads oder Metallkolloiden, mit radioaktiv markierten Beads oder z. B. mittels Chemolumineszenz markiert sein. Ebenso ist es möglich, Ausleseverfahren einzusetzen, die ein elektrisches Auslesen erlauben, oder Makromoleküle derart zu markieren, daß ein Farbumschlag bei der Hybridisierung stattfindet.

[0044] In jedem Falle läßt sich über die entsprechende Auswertung der Korrelation der Signale der einzelnen Testspots **7** feststellen, ob die Flüssigkeit und die darin enthaltenen Materialien homogen verteilt sind und sich auf diese Weise ein Reaktionsgleichgewicht in dem gesamten Flüssigkeitsfilm **13** eingestellt hat. Untersuchung nominell gleicher Spots mit einem Abstand kleiner als die Diffusionslänge in dem betrachteten Zeitraum gibt zudem Auskunft über die Homogenität und Reproduzierbarkeit des Spotprozesses.

[0045] Fig. 3 zeigt eine Anordnung zur Durchführung eines Verfahrens, bei dem eine spiegelverkehrte Kopie des Microarrays auf der Oberfläche **3** des ersten Substrates **1** auf der Oberfläche **11** des zweiten Substrates **9** vorgesehen ist. Zunächst wird wie bereits mit Bezug zu Fig. 1 beschrieben das Microarray mit den Untersuchungssspots **5** auf der Oberfläche **3** in einem bekannten Spotprozess aufgebracht. Auf die Oberfläche **11** des Substrates **9** wird eine spiegelverkehrte Kopie desselben Microarrays aufgebracht, wobei die Spots dieses identischen Testarrays mit **7** bezeichnet sind. Besonders vorteilhaft ist es für diese Verfahrensführung, wenn das Microarray spiegelsymmetrisch bezüglich einer mittigen Spiegelachse

in der Ebene des Arrays ist. Dann müssen zur Erzeugung des Untersuchungsarrays mit den Spots **5** und des Testarrays mit den Spots **7** nur zwei identische Microarrays erzeugt werden.

[0046] Die so erzeugten Microarrays werden mit dem Flüssigkeitsfilm **13** zwischen sich in analoger Weise gegenüber angeordnet, wie es bereits mit Bezug zur Ausführungsform der **Fig. 1** beschrieben ist. Es liegen sich dann nominell identische Spots im Abstand von der Dicke des Flüssigkeitsfilmes gegenüber. Die Entfernung nominell identischer Spots ist damit kleiner als der typische Diffusionsradius der Probenmoleküle, so daß die sich gegenüberliegenden Spots eine chemisch im wesentlichen identische Umgebung haben. Unterschiede in der ausgewerteten Fluoreszenzintensität können also nicht auf der Hybridisierung beruhen, sondern sind ausschließlich auf mangelnde Reproduzierbarkeit beim Spotten zurückzuführen. Auf diese Weise kann eine Qualitätskontrolle nur des Spotherstellungsprozesses mit einem realen biologischen System durchgeführt werden. Das registergerechte Übereinanderbringen der nominell identischen Spots der zwei Arrays ist mit einfachen mechanischen Mitteln leicht zu bewerkstelligen.

[0047] Im Anschluß an diese Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Spotherstellungsprozesses kann dann z. B. wie beschrieben aus der Korrelation der Signale zweier Spots des Testarrays auf den Grad des Reaktionsgleichgewichtes geschlossen werden.

[0048] Weitere Ausführungsformen von Anordnungen zur Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren umfassen noch komplexere Testarrays, die z. B. eine elektrische Auslesung geeigneter Parameter zur Bestimmung des Experimentfortschrittes bzw. der Homogenität der Hybridisierungsbedingungen erlauben. Dabei kann man positiv von der Tatsache Gebrauch machen, daß das funktionalisierte Testarray getrennt vom eigentlichen Microarray elektrisch kontaktiert werden kann. Die Art der Auslesung erfolgt z. B. mittels Gleichstromverfahren (z. B. Leitfähigkeitsmessung an speziell präparierten Meßbereichen), mittels Wechselstromverfahren (z. B. dielektrische Verfahren, die kapazitive Signale verarbeiten), induktive Meßverfahren, die die Permeabilität speziell präparierter Meßbereiche erfassen, mittels Hochfrequenzmeßverfahren (Oberflächenplasma und Resonanzmethoden, die über frustrierte Totalreflexion die dielektrische Umgebung speziell präparierter Meßbereiche erfassen) oder Meßverfahren mit akustischen Oberflächenschallwellen, die die Hochfrequenzleitfähigkeit, die dielektrische Umgebung oder den Massenbelag speziell präparierter Meßbereiche erfassen.

[0049] Bei den erfindungsgemäßen Verfahren werden nicht Teile des eigentlichen zu untersuchenden

Microarrays zur Kontrolle eingesetzt, sondern das gegenüberliegende Begrenzungssubstrat. Vorteilhafterweise ist bei den erfindungsgemäßen Verfahren die vertikale Distanz zwischen Microarray und Kontrollelement konstant und in der Regel mit 30 µm bis 500 µm kleiner als die Distanz zwischen benachbarten Spots auf dem Array (80 µm bis 250 µm).

[0050] Mit den erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich auf vorteilhafte Weise die Reproduzierbarkeit des Spotherstellungsprozesses und/oder das Erreichen eines Gleichgewichtes bzw. der Endpunkt eines Hybridisierungsexperimentes auf einfache Weise sicher überprüfen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kontrolle von Microarrays und/oder Überwachung von Experimenten unter Verwendung von Microarrays, die für die Untersuchung der Hybridisierung von Makromolekülen in einer Flüssigkeit mit Makromolekülen auf einer ersten Festkörperoberfläche einsetzbar sind, mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen eines Microarrays mit einer ersten Vielzahl von Makromolekülen, die auf einer ersten Festkörperoberfläche (**3**) in einer vorgegebenen ersten Anordnung von Spots (**5**) gebunden sind,
- Bereitstellen einer zweiten Festkörperoberfläche (**11**) mit einer zweiten Vielzahl von Makromolekülen, die in einer zweiten Anordnung von Spots (**7**) gebunden sind,
- in Kontakt Bringen der ersten und der zweiten Festkörperoberfläche (**3**, **11**) mit einer Flüssigkeit (**13**), die Makromoleküle enthält, die zumindest mit den Makromolekülen der Spots (**7**) auf der zweiten Festkörperoberfläche (**11**) hybridisieren können, wobei die erste und zweite Festkörperoberfläche (**3**, **11**) mit der Flüssigkeit (**13**) zwischen sich derart gegenüber angeordnet sind, daß die Flüssigkeit in Form eines Filmes mit beiden Festkörperoberflächen (**3**, **11**) in Kontakt ist, und
- Auswerten einer Meßgröße zumindest eines Teiles der Spots (**7**) auf der zweiten Festkörperoberfläche (**11**), die von dem Hybridisierungsgrad der Makromoleküle in den Spots dieses Teiles mit den Makromolekülen in der Flüssigkeit (**13**) abhängt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem eine Korrelation der Signale der Meßgröße von zumindest zwei Spots (**7**) auf der zweiten Festkörperoberfläche (**11**) ausgewertet wird, um Information über den Grad der Homogenität der Hybridisierung bzw. die Erreichung des Gleichgewichtszustandes zu erhalten.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Korrelation der Signale der Meßgröße nominell identischer Spots auf der zweiten Festkörperoberfläche (**11**) ausgewertet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die Korrelation der Signale der Meßgröße zumindest zweier nominell identischer Spots (7) auf der zweiten Festkörperoberfläche (11) ausgewertet wird, um Information über den Grad der Übereinstimmung dieser Spots (7) und somit über die Reproduzierbarkeit des Spotherstellungsprozesses zu erhalten.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die an den Spots (7) der zweiten Festkörperoberfläche (11) ausgewertete Meßgröße einer Meßgröße entspricht, die zur Untersuchung der Hybridisierung von Makromolekülen in der Flüssigkeit (13) und Makromolekülen der Spots (5) der ersten Festkörperoberfläche (3) ausgewertet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem Spots (7) auf der zweiten Festkörperoberfläche (11) derart angeordnet sind, daß bei dem in Kontakt Bringen der ersten und der zweiten Festkörperoberfläche (3, 11) mit der Flüssigkeit (13) zwischen sich zumindest ein Teil der Spots (5) auf der ersten Festkörperoberfläche (3) Spots (7) auf der zweiten Festkörperoberfläche (11) gegenüberliegen, die nominell zu den gegenüberliegenden Spots auf der ersten Festkörperoberfläche identisch sind,
– eine Meßgröße gegenüberliegender Spots ausgewertet wird, die vom Hybridisierungsgrad der Makromoleküle dieser Spots mit den Makromolekülen in der Flüssigkeit (13) abhängt, und
– aus dem Vergleich der Signale der Meßgröße gegenüberliegender Spots auf den Grad der Übereinstimmung der gegenüberliegenden Spots und somit auf die Reproduzierbarkeit des Prozesses zur Herstellung der Spots geschlossen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die zweite Festkörperoberfläche (11) eine zu der Anordnung der Spots (5) auf der ersten Festkörperoberfläche (3) zumindest in Teilbereichen spiegelverkehrte Anordnung von Spots (7) umfaßt, und die zweite Festkörperoberfläche (11) der ersten Festkörperoberfläche (3) derart gegenüberliegend angeordnet wird, daß sich nominell gleiche Spots der ersten und der zweiten Festkörperoberfläche (3, 11) gegenüberliegen.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem die Anordnung der Spots (5) auf der ersten Festkörperoberfläche (3) spiegelsymmetrisch bezüglich einer mittleren Achse in der Ebene der Festkörperoberfläche (3) ist, und die Anordnung der Spots (7) auf der zweiten Festkörperoberfläche (11) identisch zu der Anordnung der Spots (5) auf der ersten Festkörperoberfläche (3) ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei dem die Flüssigkeit zwischen der ersten und zweiten Festkörperoberfläche mit Hilfe des Impulsübertrages von Oberflächenschallwellen bewegt bzw.

durchmischt wird, die in zumindest einer der Festkörperoberflächen angeregt werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem der Abstand der ersten und zweiten Festkörperoberfläche (3, 11) und somit die Dicke des Flüssigkeitsfilmes (13) zwischen der ersten und zweiten Festkörperoberfläche auf 30 µm bis 500 µm eingestellt wird.

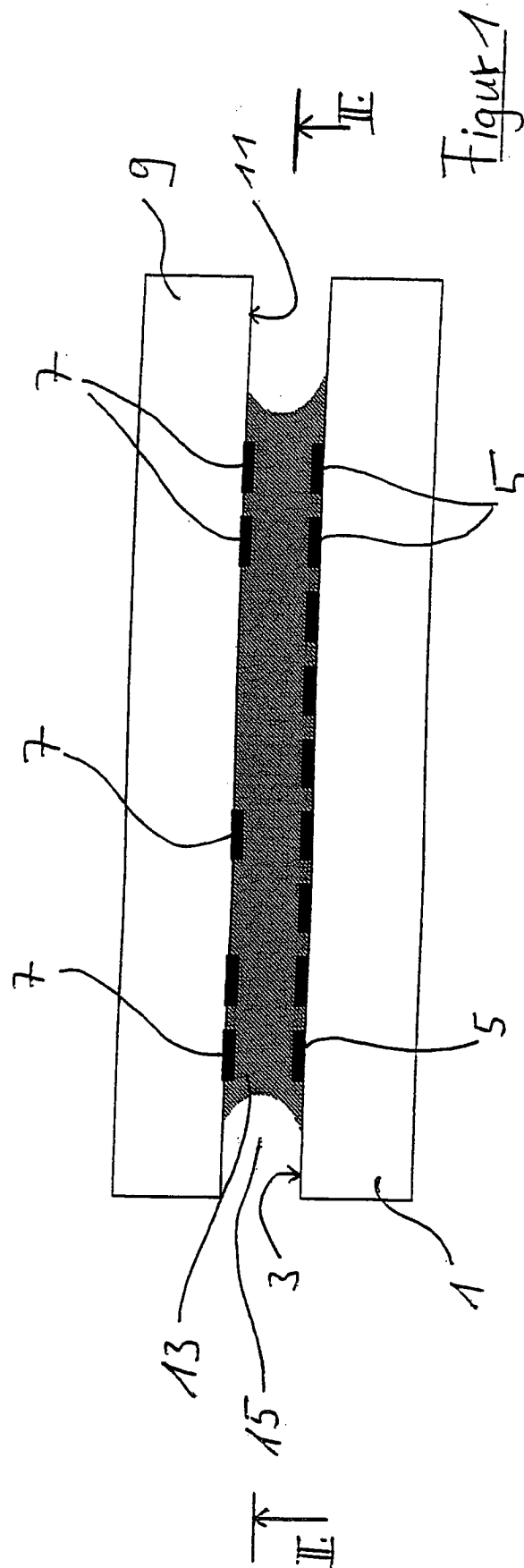
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem die ausgewertete Meßgröße die Fluoreszenz ist.

12. Verfahren zur Untersuchung bzw. zum Nachweis von Hybridisierungsreaktionen von Makromolekülen in einer Flüssigkeit mit Makromolekülen an einer ersten Festkörperoberfläche (3), die in Form eines Microarrays aus Spots (5) angeordnet sind, bei dem die Flüssigkeit (13) zwischen die erste und eine zweite Festkörperoberfläche (3, 11) in Form eines Flüssigkeitsfilmes (13) in Kontakt mit beiden Festkörperoberflächen (3, 11) eingebracht wird, und eine Meßgröße ausgewertet wird, die von dem Grad der Hybridisierung der Makromoleküle in der Flüssigkeit (13) mit den Makromolekülen an der ersten Festkörperoberfläche (3) abhängt, wobei vor und/oder während der Hybridisierungsreaktion die Reproduzierbarkeit des Spotherstellungsprozesses, mit dem die Spots auf der ersten Festkörperoberfläche eingebracht wurden, unter Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 überprüft wird.

13. Verfahren zur Untersuchung bzw. zum Nachweis von Hybridisierungsreaktionen von Makromolekülen in einer Flüssigkeit mit Makromolekülen an einer ersten Festkörperoberfläche (3), die in Form eines Microarrays aus Spots (5) angeordnet sind, insbesondere nach Anspruch 12, bei dem die Flüssigkeit (13) zwischen die erste und eine zweite Festkörperoberfläche (3, 11) in Form eines Flüssigkeitsfilmes (13) in Kontakt mit beiden Festkörperoberflächen (3, 11) eingebracht wird, und eine Meßgröße ausgewertet wird, die von dem Grad der Hybridisierung der Makromoleküle in der Flüssigkeit (13) mit den Makromolekülen an der ersten Festkörperoberfläche (3) abhängt, wobei die Homogenität der Hybridisierung (13) unter Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 überprüft wird.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



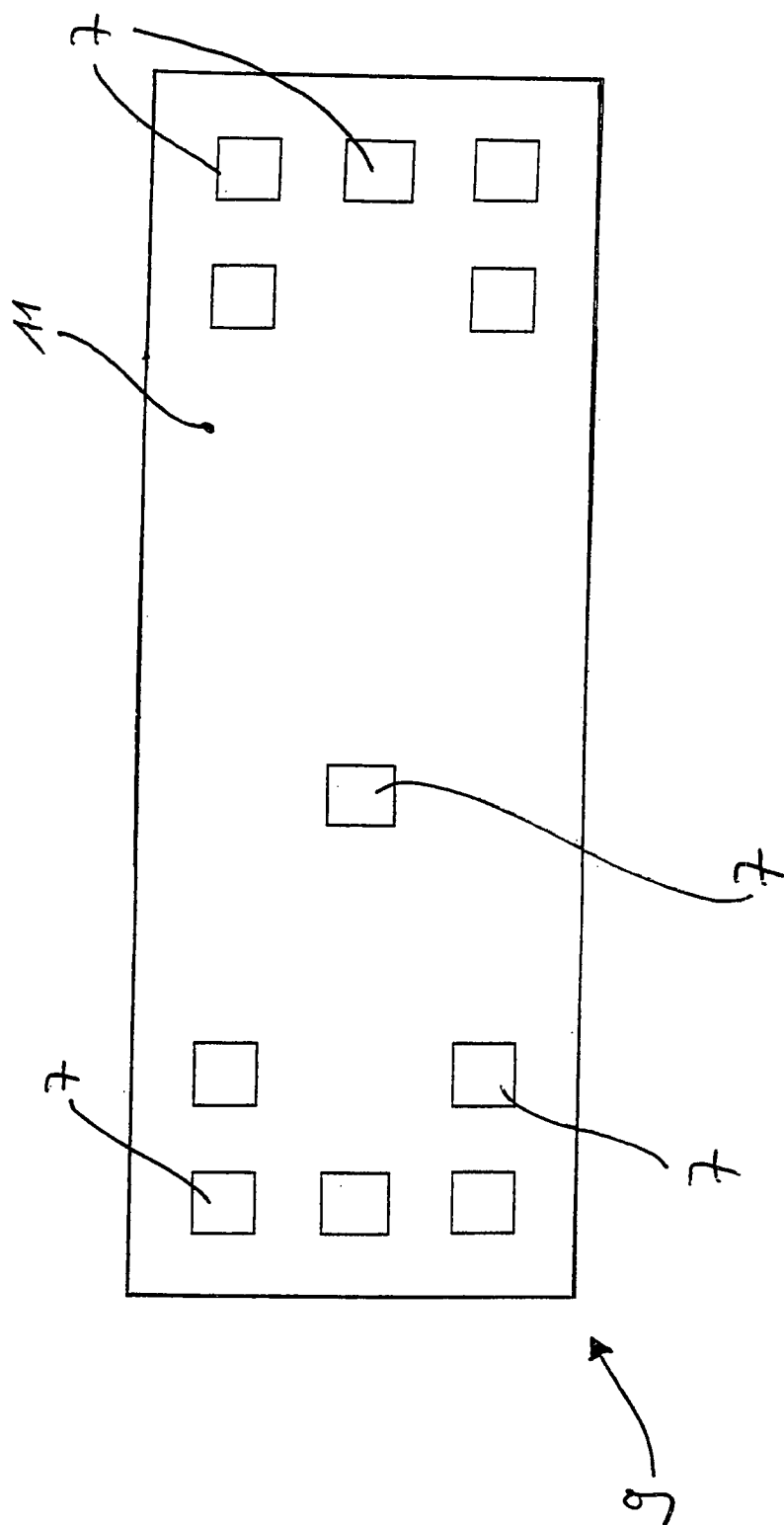
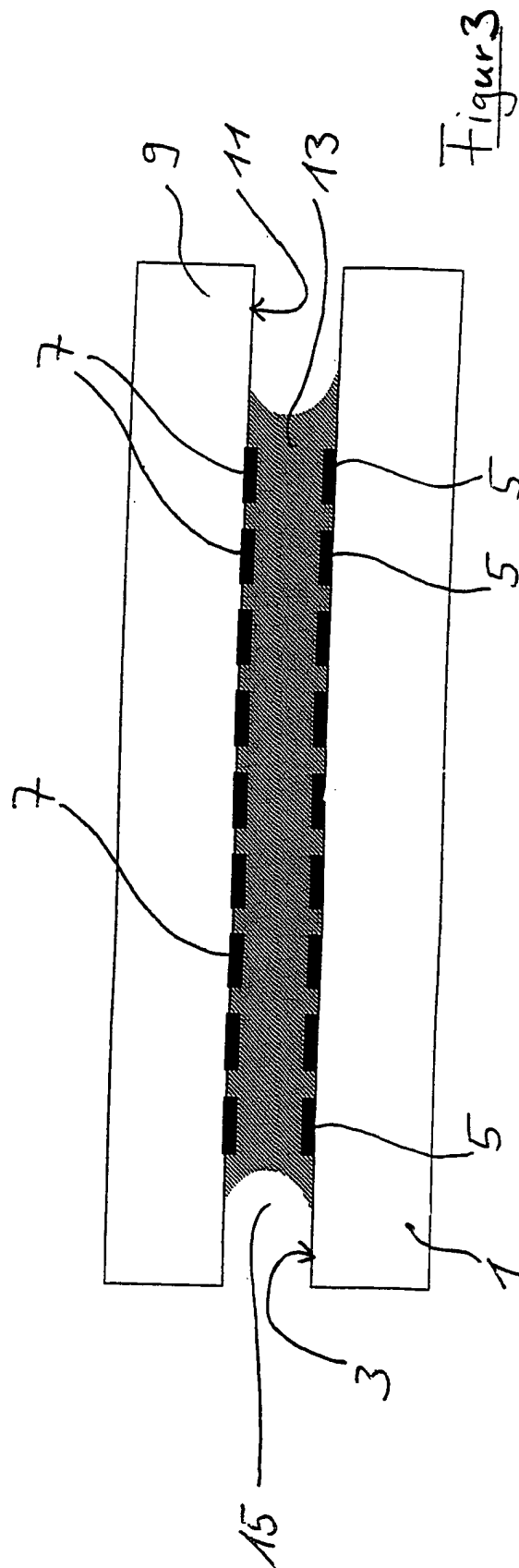


Figure 2



Figur 3

