



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 24 912 A1** 2005.01.05

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 24 912.5**
 (22) Anmeldetag: **30.05.2003**
 (43) Offenlegungstag: **05.01.2005**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/50**
C12Q 1/68

(71) Anmelder:
Siemens AG, 80333 München, DE

(72) Erfinder:
Gumbrecht, Walter, Dr., 91074 Herzogenaurach, DE; Paulicka, Peter, 91054 Erlangen, DE; Stanzel, Manfred, Dr., 91056 Erlangen, DE

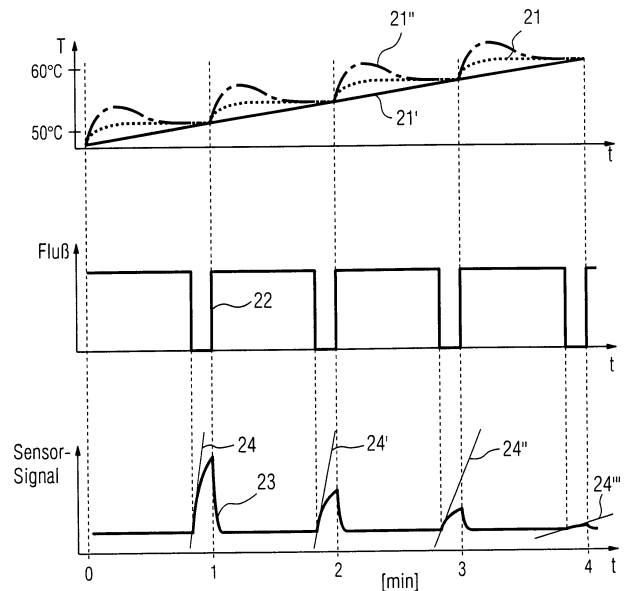
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
US2003/00 91 477 A1
US2003/00 87 242 A1
US2002/00 98 484 A1
US2002/00 37 530 A1
US2002/00 12 932 A1
US 62 55 677 B1
US 50 89 387
WO 02/0 86 162 A1
WO 99/67 628 A1
WO 98/08 083 A1
WO 01/23 600 A2
WO 00/11 473 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Detektion von DNA-Punktmutationen (SNP-Analyse) sowie zugehörige Anordnung**

(57) Zusammenfassung: Bei der SNP-Analyse wird eine DNA-Hybridisierung ausgenutzt und ein DNA-Chip verwendet. Im Einzelnen wird in einem definierten zeitlichen Ablauf eine zu analysierende flüssige DNA-Probe über den DNA-Chip geleitet. Nach erfolgter Hybridisierung unter niedrigen Stringenzbedingungen wird die Temperatur definiert verändert, so dass Fänger/Ziel-DNA-Hybride aufgeschmolzen werden, wobei das Aufschmelzen der Fänger/Ziel-DNA-Hybride in Abhängigkeit von der Temperatur detektiert und ausgewertet wird. Es sind neben dem bekannten DNA-Chip (1) wenigstens eine Einrichtung (10) zur Temperatursteuerung bzw. -regelung und eine Einrichtung (20, 30) zum lateralen Anströmen der Oberfläche (1) des DNA-Chips (1) vorhanden. Mit geeigneten Messmitteln können somit Faktoren für zusammenpassende (Match) Hybride und nicht zusammenpassende (Mismatch/single point Mismatch) Hybride erfasst und ausgewertet werden.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Detektion von DNA-Punktmutationen (SNP-Analyse), unter Ausnutzung einer Bindung (Hybridisierung) von nachzuweisender Ziel-DNA an auf einem DNA-Chip positionsspezifisch immobilisierter Fänger-DNA.

Stand der Technik

[0002] Die DNA-Analyse mittels Hybridisierungstechnik ist ein bekanntes Verfahren (in „Gentechnische Methoden“ G. Gassen und G. Schrimpf, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1999, Kap. 11 „Blottingverfahren und Hybridisierungen“, Seiten 243 bis 261). Auf einem festen Trägermaterial werden DNA-Sonden-Moleküle, sog. Fänger-Oligonukleotide immobilisiert, die aufgrund ihrer spezifischen Affinität mit der komplementären Proben-DNA, diese „einfangen“ indem sie sog. Hybride, d.h. Paare von Fänger- und Zielmolekül, bilden. Dieses Bindungsereignis wird üblicherweise durch optische oder auch enzymatische Reportermoleküle angezeigt.

[0003] Anwendung für solche DNA-Analysen ist z.B. die Detektion von Infektions-Erregern, wie Tuberkulose oder HIV. Eine besondere Anforderung an die DNA-Analytik wird bei sog. „Single Nucleotide Polymorphismen“, kurz SNP's, gestellt. Hier ist es erforderlich, dass ein Fängermolekül, das aus ca. 20 verschiedenen Nukleotiden besteht, Zielmoleküle, die sich in nur einem einzigen Nukleotid unterscheiden, selektiv bindet bzw. nicht bindet. Da die bindungsenergetischen Unterschiede sehr klein sind, sind die Anforderungen an die Selektivität des DNA-Sensors sehr hoch.

[0004] DNA-Sensoren sind vom Stand der Technik bekannt, wozu beispielsweise auf die nichtvorveröffentlichte DE 102 59 820 A1 und die DE 102 59 821 A1 des Anmelders verwiesen wird. Die Bildung der Fänger/Ziel-DNA-Hybride erfolgt unter spezifischen Randbedingungen, wobei zueinander passende Fänger/Ziel-DNR-Paare eine höhere Bindungsenergie haben als solche, die eine Fehlbasenpaarung besitzen. Aufgrund der geringen Bindungsenergieunterschiede bei SNPs lassen sich „perfect match“ und „single point mismatch“ oftmals nicht eindeutig unterscheiden.

[0005] Letzteres Problem wurde bisher dadurch gelöst, dass bei den Analyseverfahren des Standes der Technik ein sog. „stringenter Waschschriff“ eingeführt wurde, d.h. die Ionenstärke einer Waschflüssigkeit wurde so gewählt, dass die zunächst unspezifisch gebundenen „single base mismatch“ Zielmoleküle von den Fängern getrennt werden, die „perfect match“ Zielmoleküle jedoch an den Fängermolekülen gebunden bleiben. Ebenso sind noch aufwendigere opti-

sche Schmelzpunktanalysen möglich. Bei diesem Verfahren nutzt man die intrinsische Veränderung der Lichtabsorption beim Schmelzen des DNA-Doppelstranges und es ist kein optischer Label notwendig. Sowohl beim stringenten Waschen als auch bei der optischen Schmelzpunktanalyse, bei der außerdem relativ große Mengen an DNA benötigt werden und ein Spektrophotometer für die Detektion in flüssiger Phase unerlässlich ist, können die Bedingungen meist nur auf einen einzigen SNP eingestellt werden. Befinden sich mehrere SNPs auf einem Sensor-Chip, so ist die Trennung aller Fehlpaarungen nicht möglich. Bei der optischen Detektion von Schmelzkurven ist oftmals die erforderliche Stabilität des optischen Signals (intrinsische Aktivität der DNA, bzw. Label) für kontinuierliche Messungen, bzw. Wiederholungsmessungen nicht gegeben. Das Gleiche gilt für irreversible Detektionsverfahren. Insbesondere kann es erforderlich sein, dass der Chip nach dem stringenten Waschen getrocknet werden muss, bevor er einer optischen Auslesung zugeführt werden kann. In „An Active Microelectronics Device for Multiplex DNA Analysis“, M. Heller, IEEE Engineering in Medicine and Biology, March/April 1996, Seiten 100 bis 104 wird weiterhin eine sog. „elektrische Stringenzbehandlung“ beschrieben, bei der die Hybridisierung auf einem mit Elektroden versehenen Chip vorgenommen wird. Single-point-mismatch Hybride werden aufgrund des Poly-Anionen-Charakters der DNA durch negative Polarisierung der Elektroden getrennt. Dieses Verfahren hat sich jedoch nicht als robustes und allgemeines Verfahren etablieren können. Außerdem ist bei diesem Verfahren eine genaue Kenntnis der jeweiligen SNP-Energieunterschiede erforderlich um die individuellen elektrischen Bedingungen wie elektrisches Potential, evtl. Pulsdauer und Intensität einstellen zu können. Durch die Anwendung von energiereichen Pulsen kann die DNA beschädigt werden.

Aufgabenstellung

[0006] Davon ausgehend ist es Aufgabe der Erfindung, ein einfaches und robustes, wie auch schonenes und reversibles Verfahren, das in einem Arbeitsgang mehrere SNPs mit unterschiedlichen, idealerweise auch unbekanntem Schmelz-Temperaturen sicher detektieren kann, vorzuschlagen und eine zugehörige Anordnung zur Durchführung des Verfahrens zu schaffen.

[0007] Die Aufgabe ist erfindungsgemäß durch die Abfolge der Verfahrensschritte gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den abhängigen Verfahrensansprüchen angegeben.

[0008] Eine zugehörige Anordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist Gegenstand des Patentanspruches 30. Weiterbildungen dieser Anordnung sind in den abhängigen Sachan-

sprüchen angegeben.

[0009] In spezifischer Weiterbildung macht sich das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafterweise das Verfahren der elektrochemischen Detektion, insbesondere des Redoxcyclings in Kombination mit einem Enzymlabel bzw. enzymatischer Verstärkung zunutze. Das dabei verwendete Enzym weist vorzugsweise eine thermische Stabilität auf. Die DNA-Fängermoleküle befinden sich auf einem festen Trägermaterial, vorzugsweise einem Silizium-Chip oder einem mit Elektroden versehenem Isolator.

[0010] Bei der erfindungsgemäßen Anordnung sind wenigstens eine Einrichtung zur Temperaturkontrolle bzw. -regelung der Flüssigkeit über den Hybridisierungspositionen des Chips sowie eine Einrichtung zur Regelung der Flüssigkeitsfließgeschwindigkeit und zugehörige Detektionsmittel vorhanden. Im Einzelnen ist dazu der Sensorchip mit einem Mikrofluidiksystem inkl. Präzisionspumpe verbunden.

Ausführungsbeispiel

[0011] Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen. Es zeigen

[0012] Fig. 1a, 1b und 1c das methodische Vorgehen bei der Erfindung mit drei Beispielen für vorgegebene Temperaturprofile, einem Flüssigkeitsflussprofil sowie mit einem Sensorsignal einer einzelnen Hybridisierungsposition in Abhängigkeit von der Zeit,

[0013] Fig. 2 und 3 die aus den Sensorsignalen (Stromkurven) gemäß Fig. 1c abgeleiteten Auswerte- bzw. Schmelzkurven mit den Anfangssteigungen des Stroms bzw. den auf das 40°C Signal normierten Stromanstieg als Funktion der Temperatur,

[0014] Fig. 4 eine schematisch dargestellte Anordnung zur Durchführung des Verfahrens,

[0015] Fig. 5 und Fig. 6 die vergrößerte Darstellung zweier Verfahrenszustände in der Anordnung gemäß Fig. 4,

[0016] Fig. 7 und Fig. 8 ein Ausführungsbeispiel zur optischen Detektion beim beschriebenen SNP-Verfahrens und

[0017] Fig. 9 und Fig. 10 ein Ausführungsbeispiel zur elektrochemisch enzymatischen Variante des Verfahrens.

[0018] Es soll ein Verfahren zur Detektion von DNA-Punktmutationen (SNP-Analyse), unter Ausnutzung einer Bindung, d.h. Hybridisierung, von nachzuweisender Ziel-DNA an auf einem DNA-Chip positionsspezifisch immobilisierter Fänger-DNA durchge-

führt werden:

Zur vorteilhaften Realisierung der SNP-Analyse wird insbesondere folgendermaßen vorgegangen: Ein Silizium-Chip mit mindestens einer Hybridisierungsposition und vorzugsweise elektrochemischen Transducern z.B. in Form von Mikro-Edelmetall-Elektroden wird mit mindestens einer Art von DNA-Fängersonden beladen. Die Transducer haben z.B. einen Durchmesser von 180 µm und ein zweidimensionales Rastermaß von 200 × 200 µm. Das Transducer-Array besitzt mehrere 10 bis ca. 100 Positionen. Zur Realisierung von SNP-Analysen werden die Sequenzen der Fängersonden so ausgewählt, dass jeweils alle vier möglichen Nukleotid-Varianten eines SNP gespottet werden. Bei genauer Kenntnis der Schmelzbedingungen von Idealpaarung (match) und Fehlpaarung (mismatch) kann auch mit einer einzigen Art von Fängersonde gearbeitet werden. Aus der Lage der Schmelzkurve kann dann auf Match oder Mismatch geschlossen werden. Um alle 3 möglichen analytischen Situationen (1: nur Match, 2: nur Mismatch, 3: Match kombiniert mit Mismatch) sicher detektieren zu können, sind im einfachsten Fall zwei Messpositionen mit Match- bzw. Mismatch-Fängersonden erforderlich.

[0019] Zur praktischen Umsetzung der neuen Messmethode wird der Chip in eine Durchflusszelle eingebaut, die eine dünne Flüssigkeitsschicht über den Hybridisierungspositionen des Chips, die ein Transducer- oder Sensor-Array bilden, möglich macht. Die Hybridisierung mit der Analyt-DNA-Probe, insbesondere ein biotinyliertes PCR-Produkt, wird bei einer solchen Temperatur durchgeführt, bei der alle Match- aber auch Mismatch-Hybride entstehen können. Anschließend wird über die biotinylierten Ziel-DNA Streptavidin-Enzym-Konjugat angekoppelt.

[0020] Nunmehr wird eine Lösung mit dem für das Enzym spezifischen Substrat über den Sensor-Chip gepumpt. Die Pumpe wird für z.B. 5 s vorzugsweise bei konstanter Temperatur gestoppt und die Anfangssteigung des Stromanstiegs wird gemessen. Der Stromanstieg resultiert aus der Tatsache, dass das Labelenzym das Enzymsubstrat umsetzt, das daraus entstehende Reaktionsprodukt an den Transducerelektroden elektrochemisch umgesetzt wird und dadurch ein dem Reaktionsprodukt proportionaler Stromanstieg generiert wird.

[0021] Anschließend wird die Flüssigkeitspumpe wieder in Betrieb genommen (wenige µl/min) und gleichzeitig die Temperatur definiert um wenige °C, z.B. 2°C, erhöht. Nach einigen Sekunden, z.B. 20 s, wird die Pumpe abermals für z.B. 5 s gestoppt und der Stromanstieg erneut aufgezeichnet.

[0022] Obige Vorgänge werden solange wiederholt, bis alle DNA-Zielmoleküle gemäß ihrer Schmelzpunkte nacheinander von den Fängersonden abge-

trennt wurden. Die somit erhaltenen Schmelzkurven, d.h. die Stromanstiege aller Transducerpositionen als Funktion der Temperatur, werden ausgewertet.

[0023] Anhand **Fig. 1** wird die beschriebene Messmethodik verdeutlicht. In den Teilfiguren 1a, 1b, 1c ist jeweils als Abszisse die Zeit in gleicher Skalierung aufgetragen, wobei in **Fig. 1a** als Ordinate die Temperatur zwischen 50°C und 60°C und in **Fig. 1b** der Fluss in nicht skalierten Einheiten und in **Fig. 1c** das Sensorsignal (Redoxcyclingstrom) aufgetragen ist. Man erkennt, dass die Temperatur in vorgebbaren Schritten bzw. linear erhöht wird, wobei damit korreliert (synchron) der Fluss geändert wird. Vorzugsweise wird jeweils nach Einstellung einer konstanten Temperatur der Fluss geändert, insbesondere auf Null eingestellt. Sofern die Schmelztemperatur des Fänger-Ziel-DNA-Hybrides erreicht ist, wird sich die Ziel-DNA inklusive der enzymatischen Markierung unter den Gesetzen der statistischen Verteilung von der Fänger-DNA lösen und wird durch den Flüssigkeitsstrom von der jeweiligen Transducerposition entfernt und vorzugsweise in einen Abfallbehälter gespült. Die Ziel-Fänger-DNA-Hybride deren Schmelztemperatur noch nicht erreicht ist bleiben auf ihren Hybridisierungsposition erhalten. In der Waschflüssigkeit befindet sich enzymespezifisches Substrat das von den noch gebundenen Enzymlabeln zum Produkt umgesetzt wird und aufgrund des geänderten (unterbrochenen) Flusses an die Sensorelektroden diffundieren und elektrochemisch detektiert werden kann. In der **Fig. 1c** ergibt sich somit ein signifikanter Anstieg des Strommesswertes, der jeweils die intakte Hybridisierung eines Fänger/Ziel-DNA-Paares kennzeichnet. Insbesondere wird die Anfangssteigung des Stromanstiegs zur Auswertung herangezogen. Wenn die Temperatur erhöht wird und der Fluss auf den Ausgangswert zurückgeführt wird, gelangt neue Flüssigkeit zu den Hybridisierungspositionen, wobei weitere Moleküle der selben Messstelle bzw. erste Moleküle von anderen Messstellen mit höherer Schmelztemperatur aufgeschmolzen und weggespült werden.

[0024] Statt der Temperaturerhöhung in Rampenschritten entsprechend Kurve **21** kann ggf. ein Temperaturanstieg auch kontinuierlich oder nach vorgegebenem Profil entsprechend den Kurven **21'** bzw. **21''** erfolgen. Dabei braucht der Fluss entsprechend Kurve **22** nicht notwendigerweise gestoppt, sondern nur signifikant geändert werden. Es ergeben sich jeweils auf einander abgestimmten Profilkurven **21**, **22** als Variable. Wesentlich ist die Einstellung jeweils eines stationären bzw. quasistationären Zustandes. In **Fig. 1c** ist das Sensor-Signal, das beispielsweise als Stromwert gemessen wird, mit **23** und spezifische Steigungswerte des Sensorsignals mit **24** bezeichnet.

[0025] Die **Fig. 2** zeigt die Schmelzkurven **31**, **32**

von mehreren Match- (**31**) sowie mehreren Single-Base-Mismatch(**32**)- Hybridisierungspositionen für ein Faktor-V-PCR-Produkt, die an den positionsspezifischen Transducern gemäß **Fig. 1c** gemessen wurden, wobei der Stromanstieg dl/dt in nA/min als Funktion der Temperatur aufgetragen ist Die **Fig. 3** zeigt die aus **Fig. 2** normierten Messwerte [(Stromanstieg (T)/Stromanstieg (T = 40°C)) als Kurven **31'** und **32'**, so dass die einzelnen Kurven vergleichbar sind.

[0026] Beim Faktor V handelt es sich um ein Gen, das für die Blutgerinnung von Bedeutung ist.

[0027] Im Einzelnen sind in den **Fig. 2** und **3** die Anfangssteigungen der Strommesswerte (dl/dt), wie im Beispiel einer Transducer- bzw. Meßposition aus **Fig. 1c** in Abhängigkeit vom jeweils eingestellten Temperaturwert aufgetragen. Es ergeben sich signifikante, insbesondere sigmoidale, titrationskurvenähnliche Kurvenverläufe **31**, **32** für einzelne Fänger/Ziel-DNA-Paare. Wesentlich ist dabei, dass zueinander passende (match) Fänger/Ziel-DNA-Paare einen signifikant anderen Signalverlauf, bzw. eine andere Lage der Kurve entlang der Abszisse haben als nicht zueinander passende (mismatch) Fänger/Ziel-DNA-Paare. Insbesondere tritt der Schmelzvorgang und damit verbunden der Abfall der Schmelzkurve bei zueinander passenden Paaren (Match) bei höheren Temperaturen als bei nicht zueinander passenden Fänger/Ziel-DNA-Paaren (Mismatch) auf.

[0028] In **Fig. 4** ist eine allgemeine Anordnung mit einem konkret verwendeten Messaufbau, bestehend aus einem Chip mit mehreren Hybridisierungspositionen **5**, **5'**, ..., **5''** dargestellt: In **Fig. 4** ist ein sogenannter DNA-Chip mit **1** bezeichnet, wie er vom Stand der Technik bekannt ist. Ein solcher DNA-Chip **1** hat auf seiner Oberfläche **2** eine Vielzahl von Messpositionen **5**, **5'**, ..., **5''**, beispielsweise in Arrayform. An jeder Messposition **5**, **5'**, ..., **5''** sind Fänger-DNA-Moleküle immobilisiert angeordnet, beispielsweise die Fänger-DNA **100** am Immobilisierungspunkt **6**. An die Fänger-DNA **100** kann sich eine Ziel-DNA **200** anlagern. Die Ziel-DNA **200** können mit einem Label versehen werden. Das Label kann ein Enzym als biokatalytische Markierung sein, wobei die Enzymmarkierung in diesem Fall vorzugsweise ein thermostabiles Enzym beinhaltet.

[0029] Die einzelnen Messstellen für die Immobilisierung der Fänger-DNA **100** sind in allen nachfolgenden Figuren mit **5**, **5'**, ... **5''** bezeichnet. Im Chip **1**, der aus Silicium oder einem anderen Halbleitermaterial gebildet ist, können vorzugsweise bereits Verstärker- und Messstrukturen, die pauschal mit **3** bezeichnet sind, eingebracht sein. Der Chip **1** kann aber auch aus einem isolierenden Material mit metallischen Elektroden ohne integrierte Signalverarbei-

tung bestehen.

[0030] Dem Mess-Chip **1** ist eine Einrichtung **10** zur exakten Temperatureinstellung bzw. Temperaturregelung zugeordnet. Dafür kommen beispielsweise Peltierelemente oder dergleichen in Frage. Eine Temperaturmessung erfolgt auf dem Chip und/oder gegebenenfalls auf der Einrichtung zur Temperaturregelung.

[0031] Die Oberfläche **2** als Messseite des Chips **1** ist einem Strömungskanal **20** zugewandt, durch den alle für den Analysenvorgang notwendigen Substanzen, wie Ziel-DNA **200** und ggf. Markierungs-Enzym, bzw. aus einem Reservoir **40** Waschflüssigkeit mit ggf. enzimspezifischem Substrat **S** mit vorgegebenem Fluss zugeführt werden. Es ist eine Flussregelung **30**, die jeweils für ein vorgegebenes Zeitintervall einen exakten Fluss einhält und die einen definierten Fluss-Stopp gewährleistet, und weiterhin ein Aufnahme- bzw. Abfallbehälter **50** für nicht mehr benötigte Substanzen vorhanden.

[0032] Mit der anhand von **Fig. 4** beschriebenen Anordnung ist es insbesondere möglich, eine mit Enzymsubstrat **S** versehene Waschflüssigkeit unter präziser Temperaturkontrolle als dünne Flüssigkeitsschicht über den Chip zu führen. Dabei ist eine vorgebbare Flusskontrolle und eine genaue Messung sowie Auswertung möglich.

[0033] In den **Fig. 5** und **6** sind zwei Verfahrens-Zustände in allgemeiner Form dargestellt, wobei vom Chip **1**, der zugehörigen Thermostatierung **10** und dem Durchflusskanal **20** ausgegangen wird. In vergrößerter Darstellung sind die Fänger-DNA **100** und die Ziel-DNA **200** mit den einzelnen Polymorphismen und den zugehörigen Punktmutationen dargestellt. Insbesondere ist ersichtlich, dass beispielsweise bei einer Temperatur von 50°C alle Fänger **100** die Ziel-DNA **200** binden, wobei insbesondere die sogenannten Match-Bindungen A-T, G-C aber auch die Mismatch-Bindungen G//A, C//A und A//A vorhanden sind. Es ist offensichtlich, dass die Match-Bindungen stärker als die Mismatch-Bindungen sind.

[0034] Speziell in **Fig. 6** ist ein Zustand mit einer Thermostatierung von beispielsweise 60°C dargestellt, wobei bei dieser Temperatur die Mismatch-Bindungen aufgeschmolzen sind, so dass anschließend die Mismatch-Ziel-DNA gewegewaschen werden. Die gewegewaschenen Ziel-DNA-Moleküle können bis zum Abfallbehälter **50** gespült werden. Es ist aber auch ausreichend, die gewegewaschenen Ziel-DNA-Moleküle nur eine geringe Distanz von den Mess-Position zu entfernen, sodass sie von keiner Messposition mehr detektiert werden können.

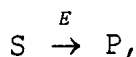
[0035] Das Aufschmelzen der Mismatch-Bindungen kann positionsspezifisch in Abhängigkeit von der

Temperatur detektiert und ausgewertet werden. Dafür sind in den **Fig. 7/8** einerseits und in den **Fig. 9/10** andererseits zwei alternative Messmöglichkeiten dargestellt.

[0036] Die **Fig. 7** und **8** gehen aus von den **Fig. 4** bzw. **5/6**, wobei die Ziel-DNA **200** mit einem Fluoreszenz-Label **F** versehen sind. Bei solcher fluoreszenzmarkierter Ziel-DNA **200** ist eine optische Auslesung möglich. Die optischen Signale **75** werden mit einem in den **Fig. 7** und **8** nicht im Einzelnen dargestellten Spektrometer positionsgenau erfasst und ausgewertet.

[0037] Aus dem Vergleich der **Fig. 7** und **8** ergibt sich deutlich, dass bei Überschreiten der Schmelztemperatur, beispielsweise bei der Temperatur von 60°C, die Mismatch-Bindungen geschmolzen sind und die diesbezüglichen Ziel-DNA **200** einschließlich der Fluoreszenz-Label **F** weggespült sind. Insofern ergibt sich bei den Mismatch-Positionen ein reduziertes Signal.

[0038] Bei der alternativen enzymatisch/elektrochemischen Messung wird eine enzymatisch katalysierte Reaktion zur Bildung eines Produktes **P** ausgenutzt, für die folgende Gleichung gilt:



wobei **S** ein Enzymsubstrat, **E** ein Enzymlabel und **P** das Reaktionsprodukt bedeuten.

[0039] In der **Fig. 9** sind die Ziel-DNA **200** mit dem Enzym-Label **E** versehen, wobei durch die Pfeile die enzymatisch katalysierte Reaktion und die Diffusion der Reaktionsprodukte **P** an die elektrischen Messpositionen angedeutet ist. An den Messpositionen **5**, **5'**, ..., **5''** des Chips **1** befinden sich elektrochemische Signalaufnehmer bzw. Transducer **95**, **95'**, wobei in Verbindung mit den bereits erwähnten Signalverarbeitungsstrukturen **3** im Silicium des Chips **1** unmittelbar ein solches elektrisches Signal wie z.B. ein Strom erfasst werden kann, welches ein Maß für die Konzentration des Reaktionsproduktes **P** darstellt.

[0040] Entsprechend den **Fig. 7** und **8** sind in **Fig. 9** und **10** wiederum die beiden Zustände bei einer Temperatur von 50°C und einer Temperatur von 60°C gezeigt. Es ergeben sich somit im ersten Zustand durch Umsetzung von **S** in **P** an allen Messpositionen vergleichsweise große elektrische Signale und im zweiten Zustand reduzierte bzw. keine Signale an den Mismatch-Positionen, jedoch ein vergleichsweise großes elektrochemisches Signal an der Match-Position. Die gewegewaschenen Ziel-DNA-Moleküle können wiederum bis zum Abfallbehälter **50** gespült werden. Es kann aber auch ausreichend sein, die gewegewaschenen Ziel-DNA-Moleküle nur um eine geringe Distanz von den Mess-Positionen zu entfernen, so

dass sie von keiner der vorhandenen Messpositionen mehr detektiert werden können.

[0041] Ein besonderer Vorteil des enzymatisch/elektrochemischen Verfahrens besteht in der Tatsache, dass es im Gegensatz zu z.B. optischen Verfahren weitgehend unabhängig von einem Hintergrundsignal ist, da der Stromanstieg dI/dt zur Auswertung herangezogen wird und nicht das absolute Stromsignal selbst. Dadurch ist es nicht nötig, dass die enzymmarkierte Ziel-DNA, sowie durch sie generiertes Reaktionsprodukt P bis in den Abfallbehälter zu spülen. Es muss lediglich die messpositionsspezifische Aufkonzentration des Reaktionsproduktes P durch kurzzeitiges Spülen abgebaut werden. Dadurch ist es auch ausreichend, bei den folgenden Spülvorgängen die Waschflüssigkeit lediglich hin- und herzupumpen und es wird somit eine Einsparung von Waschflüssigkeit ermöglicht, was insbesondere bei integrierten und miniaturisierten Ausführungsformen von Vorteil ist.

[0042] Die Stromsignale entsprechen den Peaks in **Fig. 1c**, wobei in den **Fig. 2** und **3** deren Anfangssteigungen dI/dt entsprechend den Geraden **24**, **24'**, **24''**, ... aus **Fig. 1c** ausgewertet werden.

[0043] Neben den beiden Beispielen mit einer Detektion über optische oder enzymatische Label ist auch eine labelfreie Detektion der gebundenen Ziel-DNA **200** möglich. Bei der optischen labelfreien Detektion werden die intrinsischen Veränderungen der UV-Absorption beim Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge erfasst. Bei der elektrischen labelfreien Detektion wird dagegen der Prozess einer intrinsischen Guanin-Oxidation ausgenutzt. Eine weitere labelfreie Detektion kann mittels elektrochemischer Impedanzmethoden erfolgen. Weiterhin ist auch eine labelfreie Detektion durch Messungen der Massenänderung, d.h. gravimetrisch, z.B. über akustische Methoden wie Oberflächenwellen-Sensoren (SAW's) möglich.

[0044] Bei den Labelverfahren ist auch der Einsatz von magnetischen Labeln in Kombination mit Magnetfeld-Sensoren möglich.

[0045] Bei den beschriebenen Methoden ist wesentlich, dass die Messung und zugehörige Auswertung automatisierbar ist. So können gelt werden. In Abhängigkeit davon erfolgt das jeweilige Flussprofil, bei dem zunächst bei Einstellung einer vorgegebenen Temperatur einerseits die aufgeschmolzenen Mismatch-Bindungen weggespült werden und andererseits die Detektion der positionsspezifischen gebundenen Ziel-DNA bei „nicht bewegter“ Waschflüssigkeit erfolgt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von DNA-Punktmutationen (SNP-Analyse) unter Ausnutzung einer Bindung (Hybridisierung) von nachzuweisender Ziel-DNA an auf einem DNA-Chip positionsspezifisch immobilisierter Fänger-DNA, wobei ein definierter zeitlicher Ablauf erfolgt, mit folgenden Verfahrensschritten:

a) Eine Waschflüssigkeit wird mit geregelter Fließgeschwindigkeit über den DNA-Chip geleitet,
 b) die Temperatur an den Hybridisierungspositionen wird definiert verändert,
 c) die Fänger/Ziel-DNA-Hybride werden temperaturabhängig aufgeschmolzen und durch strömende Waschflüssigkeit von den Hybridisierungspositionen entfernt,
 d) unter der aktuellen Temperatur noch gebundene Ziel-DNA wird positionsspezifisch detektiert und die Signale werden ausgewertet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrensschritte a) bis d) wiederholt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Fließgeschwindigkeit innerhalb bestimmter Zeitintervalle Null ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Zeitintervall der „nicht bewegten“ Waschflüssigkeit die Detektion der positionsspezifisch gebundenen Ziel DNA durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperaturveränderung in einer stetigen Erhöhung besteht.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die stetige Temperaturerhöhung als Funktion der Zeit linear ist.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die stetige Temperaturerhöhung als Funktion der Zeit in Rampen mit Haltezeiten erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass während der Haltezeiten der Fluss über den DNA-Chip gestoppt wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der gebundenen Ziel-DNA labelfrei (markierungsfrei) erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die labelfreie Detektion optisch erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch ge-

kennzeichnet, dass die optische Detektion die intrinsische Veränderung der UV-Absorption beim Aufschmelzen von DNA-Doppelsträngen nutzt.

12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die labelfreie Detektion elektrisch erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die labelfreie Detektion mittels der intrinsischen Guanin-Oxidation erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die labelfreie Detektion mittels elektrochemischer Impedanzmethoden erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die labelfreie Detektion gravimetrisch erfolgt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der gebundenen Ziel-DNA unter Ausnutzung eines Labels (Markierung) erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mittels eines optischen Labels erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mittels eines magnetischen Labels erfolgt.

19. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mittels eines enzymatischen Labels erfolgt.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Waschflüssigkeit Enzymsubstrat enthält.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym im verwendeten Temperaturbereich stabil (aktiv) ist.

22. Verfahren nach den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das enzymatische Label eine Reaktion katalysiert die optisch detektierbar ist.

23. Verfahren nach den Ansprüchen 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das enzymatische Label eine Reaktion katalysiert die elektrochemisch detektierbar ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem elektrochemischen Detektionsverfahren um eine mittels Redoxcycling verstärkte Strommessung handelt.

25. Verfahren nach den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung der Konzentration des Substrates oder Produktes detektiert und ausgewertet wird.

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung und Darstellung des Sensorsignals (Detektionssignal) als Funktion der Temperatur erfolgt.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Normierung der Schmelz-Kurve auf eine bestimmte Temperatur erfolgt.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung rechnergesteuert wird.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung softwaremäßig durchgeführt wird.

30. Anordnung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 29, umfassend wenigstens einen DNA-Chip (1) und zugehörige Messmittel, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Einrichtung (10) zur Temperatursteuerung und/oder -regelung, eine Einrichtung (20) zum Anströmen der Chip-Oberfläche (2) mit einer Waschflüssigkeit mit einer Einrichtung (30) zur Flusskontrolle und dass Mittel (1 – 5, 75, 95) zur Detektion der Aufschmelzvorgänge vorhanden sind.

31. Anordnung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass der DNA-Chip (1) Transducer (5, 5', ...; 95) als Teile eines Arrays zur Immobilisierung von DNA-Fängersonden (100) auf der Chip-Oberfläche (2) bildet.

32. Anordnung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Waschflüssigkeit ein Enzymsubstrat (S) enthält.

33. Anordnung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass Enzymlabel (E) als Markierung für die Ziel-DNA (100) vorhanden sind.

34. Anordnung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Enzymlabel (E) thermostabil sind.

35. Anordnung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung (10) zur Temperatursteuerung und -regelung ein zeitlich vorgebbares Temperaturprofil einstellt.

36. Anordnung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung (30) zum Anströmen des DNA-Chips (1) mit Waschflüssigkeit mit vor-

gegebenem Flussprofil in Abhängigkeit von der eingestellten Temperatur regelbar ist.

37. Anordnung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionsmittel (**1 – 5, 95**) zur elektrochemischen Detektion des enzymatischen Umsatzes ausgebildet sind.

38. Anordnung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionsmittel (**1 – 5, 95**) zur Messung von Strömen und/oder Potentialen ausgebildet sind.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

FIG 1

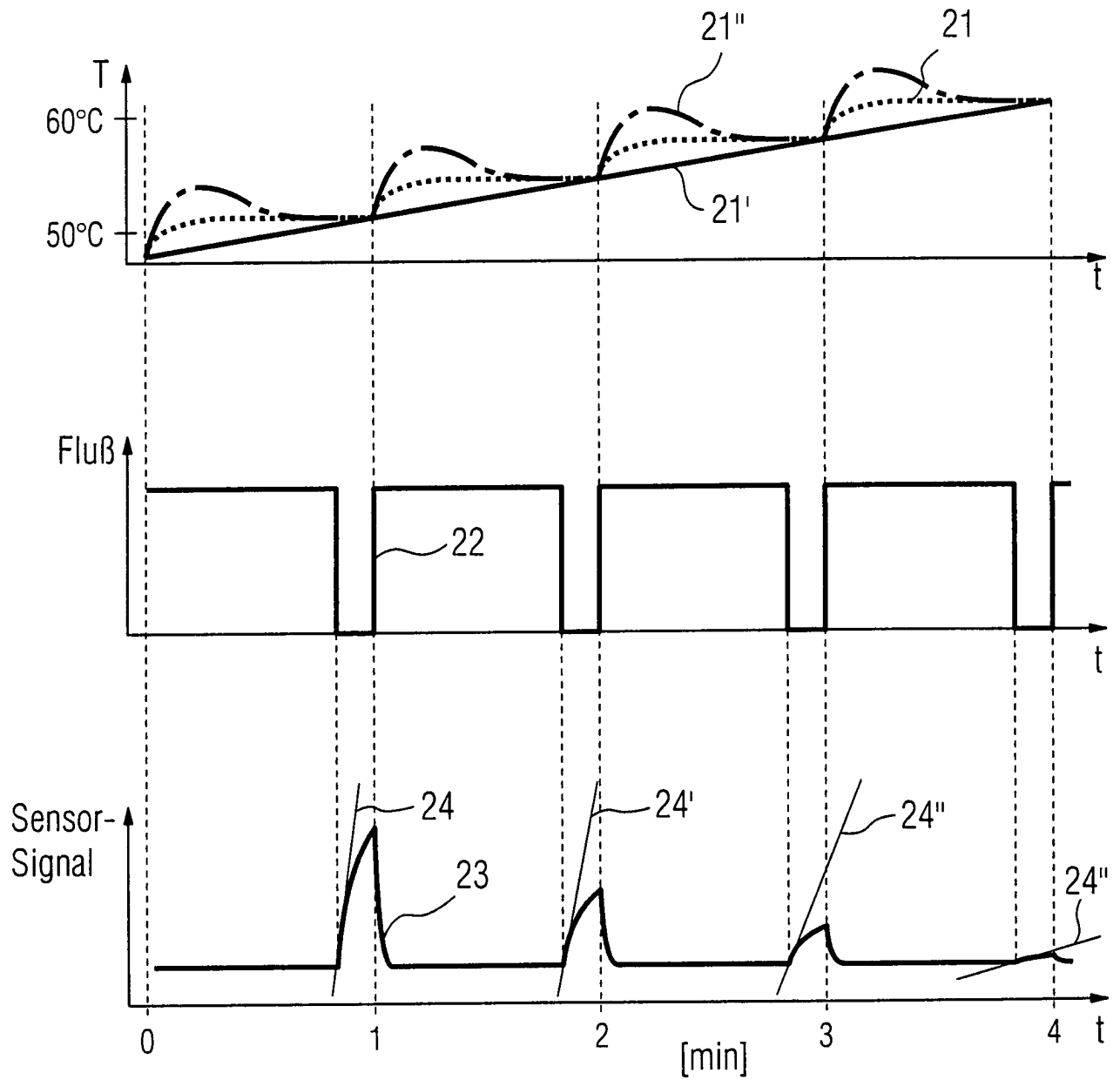


FIG 2

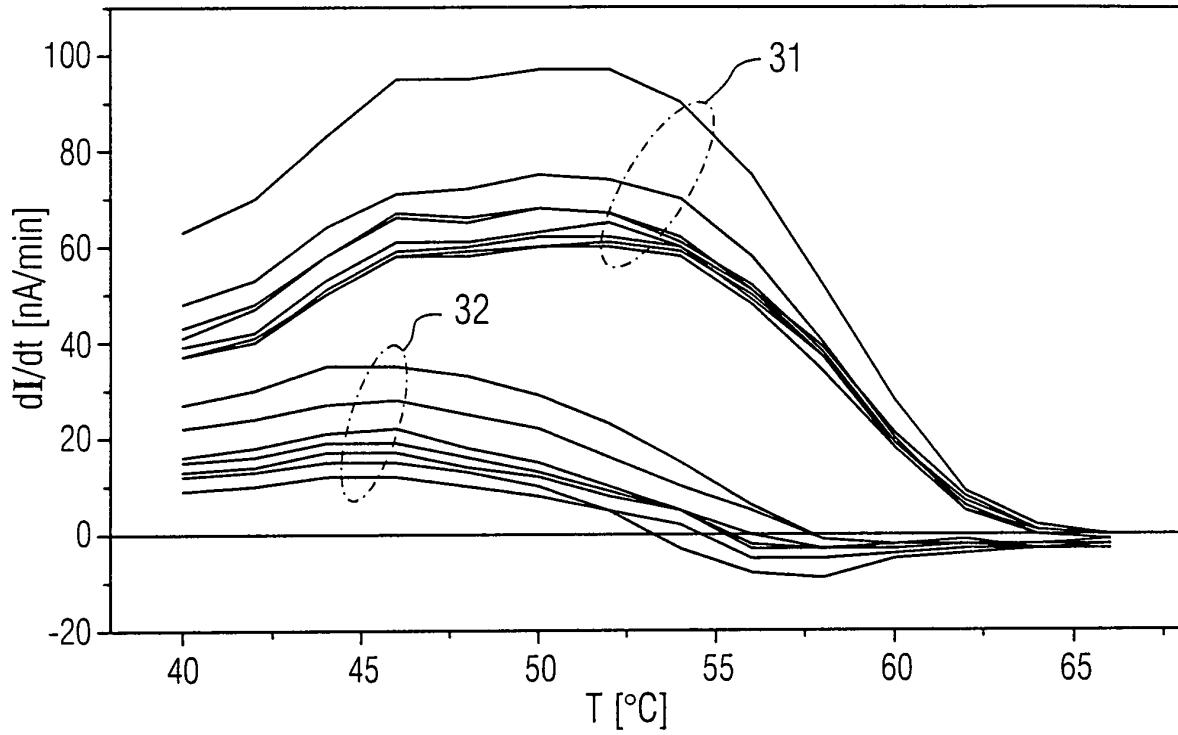


FIG 3

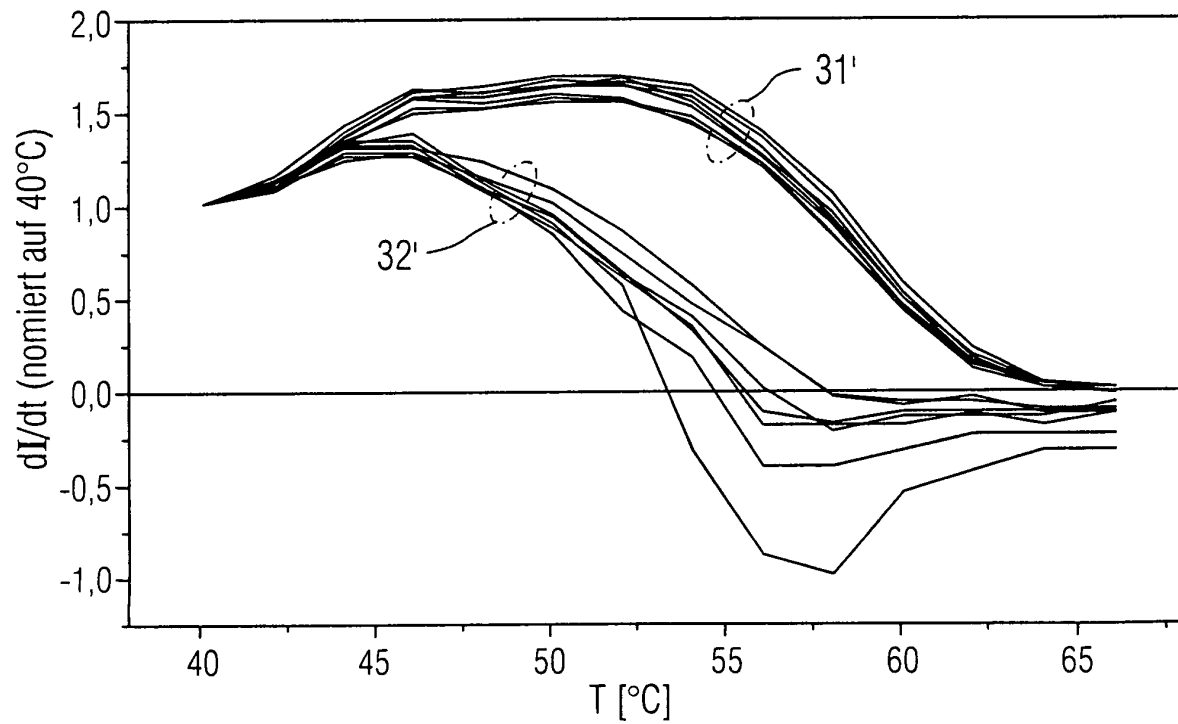


FIG 4

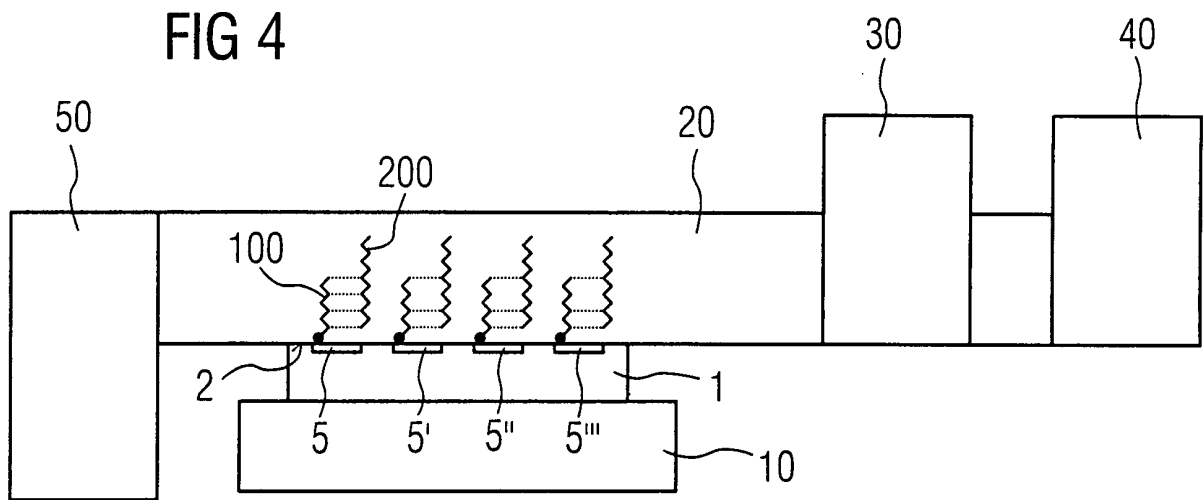


FIG 5

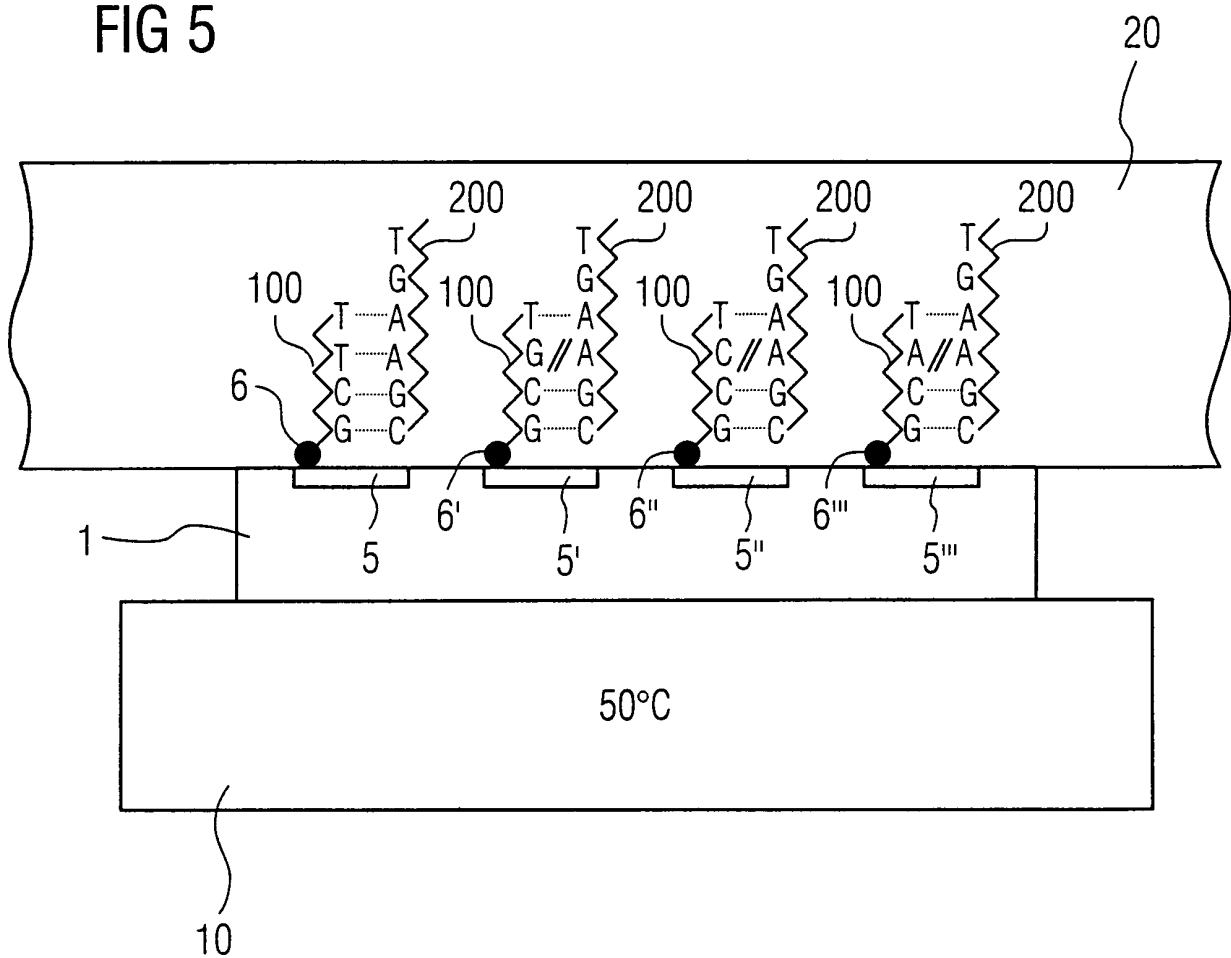


FIG 6

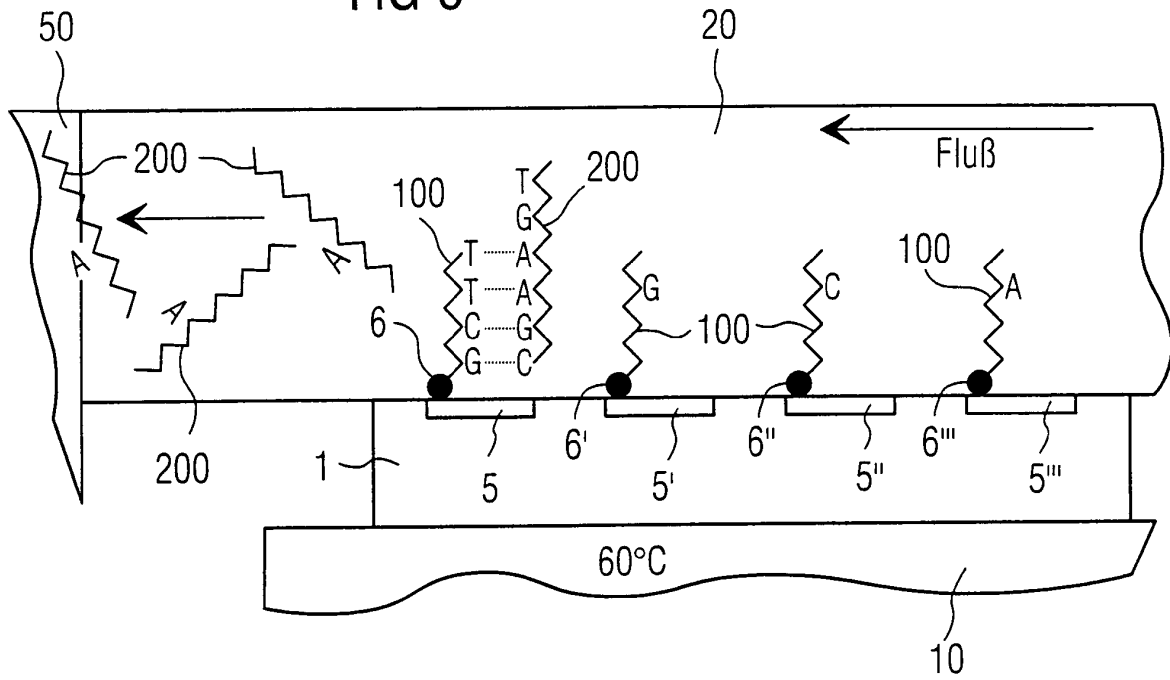


FIG 7

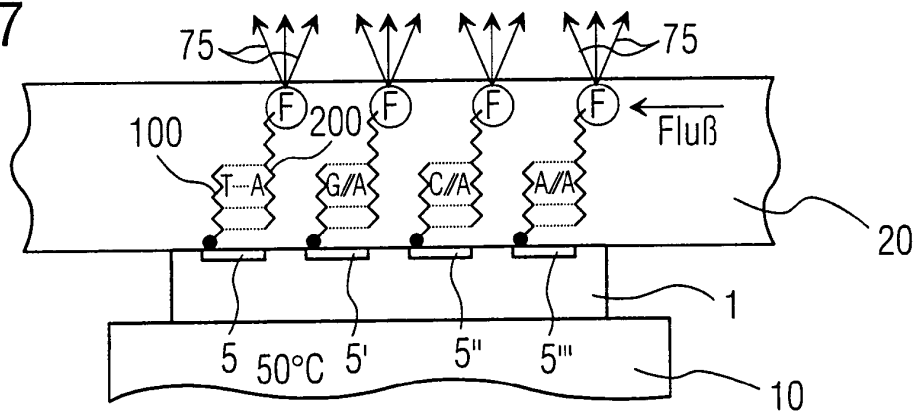


FIG 8

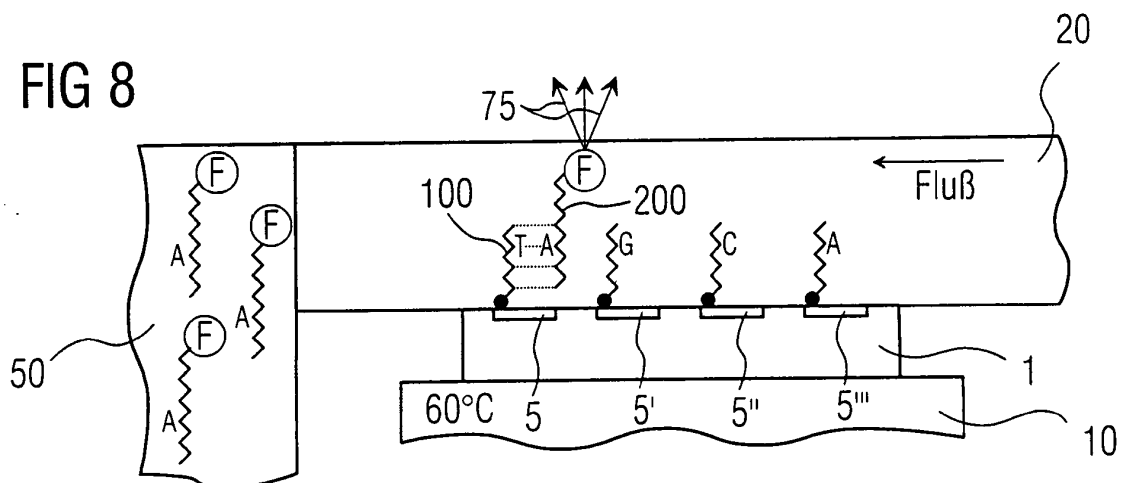


FIG 9

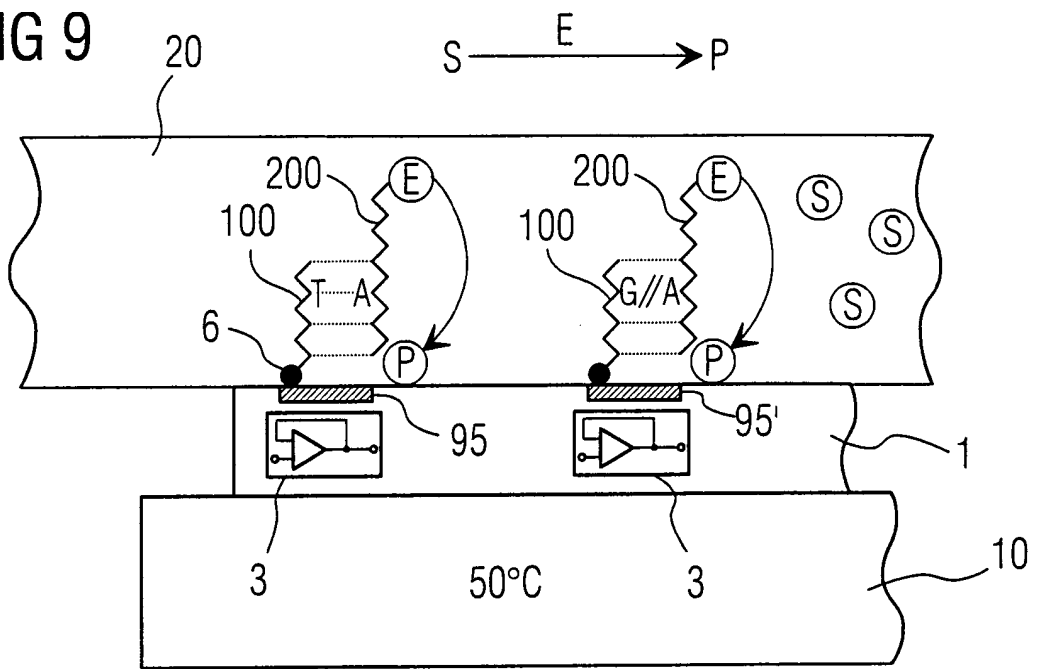


FIG 10

