



(10) **DE 10 2008 019 712 B4** 2012.09.13

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2008 019 712.2**
 (22) Anmeldetag: **18.04.2008**
 (43) Offenlegungstag: **22.10.2009**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **13.09.2012**

(51) Int Cl.: **C12Q 1/68 (2006.01)**
G01N 33/50 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Klapproth, Holger, Dr., 79108, Freiburg, DE;
Mohry, Sonja, 79104, Freiburg, DE

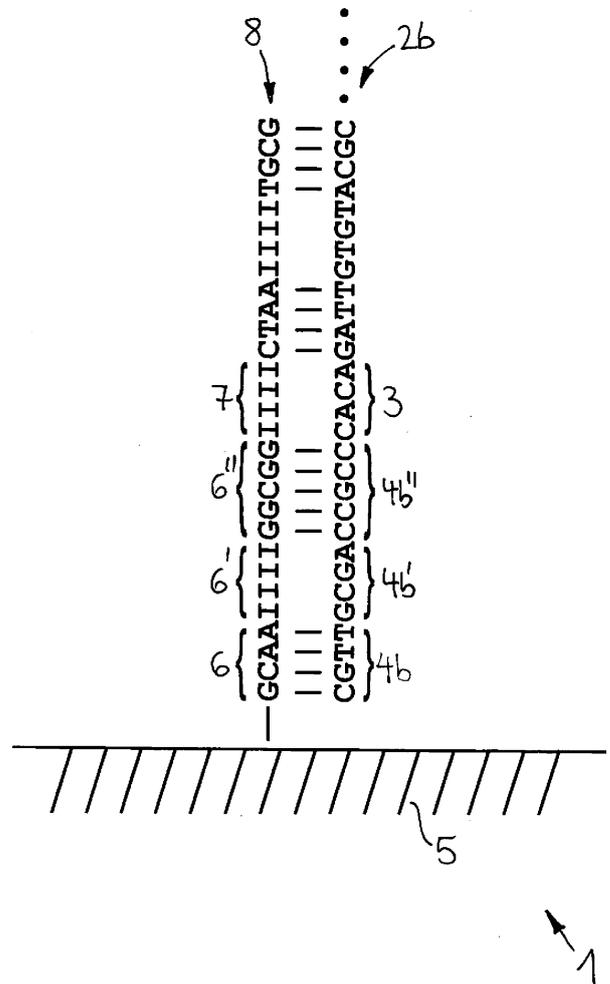
(74) Vertreter:
Huwer, Andreas, Dipl.-Ing. Dr.-Ing., 79098,
Freiburg, DE

(72) Erfinder:
gleich Patentinhaber

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
siehe Folgeseiten

(54) Bezeichnung: **Biochip und Verfahren zum Herstellen eines solchen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum Herstellen eines Biochips (1), wobei zumindest eine erste DNA-Sequenz (2a) eines ersten DNA-Moleküls und eine zweite, sich von der ersten DNA-Sequenz (2a) durch mindestens eine Mutationsstelle (3) unterscheidende DNA-Sequenz (2b) eines zweiten DNA-Moleküls bereit gestellt werden, wobei jede DNA-Sequenz (2a, 2b) in Sequenzabschnitte (4a, 4a', 4a'', 4b, 4b', 4b'') unterteilt wird, die jeweils mindestens zwei Basen aufweisen, wobei jeder Sequenzabschnitt (4a, 4a', 4a'') der ersten DNA-Sequenz (2a) jeweils mit einem ihm zugeordneten Sequenzabschnitt (4b, 4b', 4b'') der zweiten DNA-Sequenz (2b) verglichen wird, wobei auf einem Träger (5) mindestens ein Rezeptor (8) immobilisiert wird, welcher Rezeptor (8) an jeder Stelle, an der ein Sequenzabschnitt (4a, 4a', 4a'') der ersten DNA-Sequenz (2a) mit dem entsprechenden Sequenzabschnitt (4b, 4b', 4b'') der zweiten DNA-Sequenz (2b) übereinstimmt, einen zu diesem Sequenzabschnitt (4b, 4b', 4b'') komplementären Rezeptor-Abschnitt (6, 6') aufweist, und welcher Rezeptor (8) an jeder Stelle, an der ein Sequenzabschnitt (4a, 4a', ...



(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

US	6 197 503	B1
EP	0 826 778	A1

**EHLEN, T. & DUBEAU, L.: Detection of ras
point mutations by polymerase chain reactions
using mutation-specific, inosine-containing
oligonucleotide primers. Biochem. Biophys. Res.
Commun. (1989) 160 (2) 441-7**

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betritt einen Biochip, der einen Träger aufweist, auf dem mindestens ein Rezeptor immobilisiert ist. Außerdem bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zum Herstellen eines solchen Biochips.

[0002] Ein derartiges Verfahren ist aus US 6 197 503 B1 bekannt. Dabei wird ein Biochip hergestellt, indem auf einem Träger ein Rezeptor immobilisiert wird, der eine DNA-Sequenz aufweist, die für eine dazu komplementäre, nachzuweisende DNA-Sequenz bindungsspezifisch ist. Eine Probe, von der vermutet wird, dass sie die nachzuweisende DNA-Sequenz enthält, wird mit einem optischen Marker markiert, der dazu geeignet ist, an die DNA-Sequenz zu binden. Danach wird die so markierte Probe derart mit dem Biochip in Kontakt gebracht, dass die DNA-Sequenz an den Rezeptor bindet, wenn sie in der Probe enthalten ist. Dann wird die Trägeroberfläche gespült, um Bestandteile der Probe, die nicht an einen Rezeptor gebunden sind, zu entfernen. Anschließend wird die Trägeroberfläche mit einer optischen Anregungsstrahlung bestrahlt, die den Marker zu Aussendung einer Fluoreszenzstrahlung anregt. Diese wird mit Hilfe eines optischen Sensors detektiert, um die DNA-Sequenz nachzuweisen.

[0003] Insbesondere beim Nachweis von Bakterien kann es vorkommen, dass die zu untersuchende DNA-Sequenz eines Bakteriums mindestens eine Mutationsstelle aufweist, die dazu führt, dass die DNA-Sequenz nicht an den Rezeptor bindet. Derartige Mutation können bei Bakterien in zahlreichen Varianten, beispielsweise an unterschiedlichen Stellen des DNA-Strangs und/oder mit unterschiedlichen Basen an den Mutationsstellen des DNA-Strangs auftreten. Damit mit Hilfe des Biochips sowohl das unmutierte Bakterium als auch mögliche, Mutationen aufweisende Varianten des Bakteriums oder sogar eine Klasse von Bakterien mit ähnlich aufgebauter DNA untersucht werden können, müssen auf dem Biochip ein Vielzahl von unterschiedlichen, jeweils für eine Variante der DNA-Sequenz bindungsspezifischen Rezeptoren immobilisiert werden. Dabei muss für jede nachzuweisende Variante mindestens eine Messung durchgeführt werden. Der Nachweis einer Klasse von miteinander verwandten Bakterien ist deshalb mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Ungünstig ist dabei vor allem, dass Bakterien oder Viren ständig neue Varianten bilden, so dass die Biochips, die zu deren Nachweis verwendet werden, entsprechend angepasst werden müssen.

[0004] Aus EP 0 826 778 A1 ist ferner ein Sonden-Oligonukleotid zum Nachweis von zwei rRNA-Sequenzvarianten von Bifidobacterium bekannt. Die beiden Sequenzvarianten unterscheiden sich durch eine Mutationsstelle voneinander, an der meistens

die Base Cytosin oder Thymin angeordnet ist. Das Sonden-Oligonukleotid hat an einer Stelle, die der Mutationsstelle der Sequenzvarianten des Bifidobacteriums entspricht, einen Platzhalter, der durch eine einzige Inosin-Base gebildet ist. Die übrigen Basen des Sonden-Oligonukleotids sind jeweils komplementär zu denen den entsprechenden Basen der beiden Sequenzvarianten.

[0005] Bei einem aus EHLEN, T. & DUBEAU, L.: Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1989) 160(2) 441-7 bekannten Verfahren wird eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, bei der drei zu amplifizierende Basensequenzen H-RAS, K-RAS, N-RAS jeweils mehrere Sequenzabschnitte aufweisen, die jeweils durch ein Basentriplett gebildet sind. Bei den 2.-6. und 8.-11. Basentriplets unterscheidet sich jeweils die Base einer zu amplifizierenden Basensequenz an der dritten Codonstelle von der entsprechenden Base der beiden anderen zu amplifizierenden Basensequenzen. An den Stellen, an denen sich die Basentriplets voneinander unterscheiden, weist der PCR-Primer jeweils genau eine Inosin-Base auf.

[0006] Aufgabe der Erfindung ist es, einen Biochip der eingangs genannten Art zu schaffen, der es ermöglicht, auf einfache Weise mehrere unterschiedliche, sich durch mindestens ein Mutationsstelle voneinander unterscheidende DNA-Sequenzen nachzuweisen. Außerdem besteht die Aufgabe, ein Verfahren zum Herstellen eines solchen Biochips bereitzustellen.

[0007] Diese Aufgabe wird bezüglich des Verfahrens mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und bezüglich des Biochips mit den Merkmalen des Anspruchs 5 gelöst.

[0008] Der Rezeptor weist also an der oder den Stellen, an der bzw. an denen die nachzuweisenden DNA-Sequenzen unterschiedlich sind, einen Platzhalter auf, an den die DNA-Basen, die an der betreffenden Stelle oder den betreffenden Stellen der DNA-Sequenz angeordnet sind, nicht binden. In Erstreckungsrichtung der Basenkette des Rezeptors hat der Platzhalter etwa die gleichen räumlichen Abmessungen wie die an den entsprechenden Stellen der nachzuweisenden DNA-Sequenzen angeordneten Basen. Somit können mehrere unterschiedliche DNA-Sequenzen, die sich durch mindestens eine Mutationsstelle voneinander unterscheiden, jeweils spezifisch an den Rezeptor binden. In vorteilhafter Weise ist es mit Hilfe des erfindungsgemäßen Biochips möglich, mit nur einem einzigen Versuch zu überprüfen, ob in einer Probe mindestens eine der unterschiedlichen DNA-Sequenzen enthalten ist.

[0009] Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist die Neutralbase Inosin. Unterschiedliche Varianten einer DNA-Sequenz können dann noch besser nachgewiesen werden. Durch den Einbau der Inosin-Base in den Rezeptor wird außerdem ein eventuell vorhandener Bereich, der eine Selbsthomologie des Rezeptors verursachen kann, aufgelöst, so dass der Rezeptor dann keine Sekundärstruktur mehr ausbildet.

[0010] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist mindestens ein Sequenzabschnitte eine Anzahl von jeweils mindestens vier DNA-Basen auf, wobei der Platzhalter eine dieser Anzahl entsprechende Anzahl von Neutralbasen hat. Dadurch wird berücksichtigt, dass gewöhnlich in drei aufeinander folgenden DNA-Basen einer DNA-Sequenz die Information für eine Aminosäure verschlüsselt ist.

[0011] Vorteilhaft werden die DNA-Sequenzen derart gewählt, dass sie sich durch mindestens zwei Mutationsstellen voneinander unterscheiden und dass zwischen diesen Mutationsstellen eine Folge von mindestens drei und vorzugsweise mindestens vier aufeinander folgenden DNA-Basen vorhanden ist, die bei der ersten DNA-Sequenz und der zweiten DNA-Sequenz übereinstimmen. Der Rezeptor weist bevorzugt eine zu der Folge komplementäre Basenfolge auf. Durch die derart modifizierten Rezeptoren wird nun gewährleistet, dass die gesuchten DNA-Stränge mit deutlich höher Energie an die Rezeptoren binden als andere, ähnliche, nicht gesuchte Sequenzen. Der gesuchte DNA-Abschnitt stellt erfindungsgemäß den komplementären Bereich zu den im Rezeptor vorhandenen Basen A, T, G und C dar.

[0012] Nachfolgend sind Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigt

[0013] [Fig. 1](#) einen Biochip, an dessen Rezeptor eine erste DNA-Sequenz hybridisiert ist, und

[0014] [Fig. 2](#) den Biochip, wobei jedoch an den Rezeptor eine zweite DNA-Sequenz hybridisiert ist.

[0015] Bei einem Verfahren zum Herstellen eines Biochips **1** werden DNA-Sequenzen **2a**, **2b** von mindestens zwei, in der Zeichnung nicht näher dargestellten DNA-Molekülen bereitgestellt, die sich durch Mutationen voneinander unterscheiden. Eine erste DNA-Sequenz **2a** ist in einem ersten DNA-Molekül und eine zweite DNA-Sequenz **2b** in einem zweiten DNA-Molekül enthalten.

[0016] Die DNA-Sequenzen **2a**, **2b** können beispielsweise experimentell ermittelt werden, indem in den DNA Molekülen enthaltene DNA-Ketten oder Abschnitte davon mit an sich bekannten Methoden ana-

lysiert werden. Es ist aber auch möglich, die DNA-Sequenzen aus einer Gen-Datenbank zu entnehmen.

[0017] Zum Vergleichen der DNA-Sequenzen **2a**, **2b** werden diese jeweils in Sequenzabschnitte **4a**, **4a'**, **4a''**, **4b**, **4b'**, **4b''** unterteilt, die jeweils eine Länge von einer Base aufweisen. Ein erster Sequenzabschnitt **4a** der ersten DNA-Sequenz **2a** wird mit einem ersten Sequenzabschnitt **4b** der zweiten DNA-Sequenz **2b** verglichen. Dabei werden die ersten Sequenzabschnitte **4a**, **4b** so gewählt, dass einander zugeordnete Sequenzabschnitte **4a**, **4b** der DNA-Sequenzen **2a**, **2b** möglichst gut übereinstimmen.

[0018] Wenn der erste Sequenzabschnitt **4a** der ersten DNA-Sequenz **2a** mit dem ersten Sequenzabschnitt **4b** der zweiten DNA-Sequenz **2b** übereinstimmt, wird auf einem Träger **5** ein erster, zu dem ersten Sequenzabschnitt **4a** komplementärer Rezeptor-Abschnitt **6** immobilisiert. Wenn die ersten Sequenzabschnitte **4a**, **4b** nicht übereinstimmen, wird auf dem Träger **5** als erster Rezeptor-Abschnitt **6** eine Inosin-Base immobilisiert. Der Träger **5** kann beispielsweise aus Glas oder Silizium bestehen.

[0019] Danach wird ein zweiter Sequenzabschnitt **4a'** der ersten DNA-Sequenz **2a** mit einem zweiten Sequenzabschnitt **4b'** der zweiten DNA-Sequenz **2b** verglichen. Bei Übereinstimmung der zweiten Sequenzabschnitte **4a'**, **4b'** wird an den ersten Abschnitt **6** ein zweiter Rezeptor-Abschnitt **6'** gebunden, der zu den zweiten Sequenzabschnitten **4a'**, **4b'** komplementär ist. Stimmen die zweiten Sequenzabschnitte **4a'**, **4b'** dagegen nicht überein, wird an die erste Rezeptor-Base **6** als zweiter Rezeptor-Abschnitt **6'** Inosin gebunden. An der Mutationsstelle **3** wird also ein Platzhalter **7** in den Rezeptor **8** eingebaut. Das Binden des zweiten Rezeptor-Abschnitts **6'** an den ersten Rezeptor-Abschnitt **6** erfolgt mit Hilfe eines an sich bekannten Syntheseschrittes.

[0020] Anschließend werden in entsprechender Weise weitere Sequenzabschnitte **4a''**, **4b''** miteinander verglichen, wobei jeweils bei Übereinstimmung eine zu den Sequenzabschnitten **4a''**, **4b''** komplementärer Rezeptor-Abschnitt **6''** und bei Nichtübereinstimmung Inosin an den im vorherigen Schritt synthetisierten Rezeptor-Abschnitt **6** angefügt wird.

[0021] Der Rezeptor mitsamt der Inosinbase(n) kann in einem Syntheselabor hergestellt werden (www.biomers.net).

[0022] Wie in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) erkennbar ist, umfassen die ersten Sequenzabschnitte **4a**, **4a'**, **4a''**, die zweiten Sequenzabschnitte **4b**, **4b'**, **4b''** und die Rezeptor-Abschnitte **6**, **6'**, **6''** jeweils eine Folge von mindestens vier DNA-Basen. Deutlich ist erkennbar, dass in den Rezeptor **8** an Mutationsstellen **3**, an denen sich die DNA-Sequenzen **2a**, **2b** jeweils durch

mindestens eine Base voneinander unterscheiden jeweils eine Folge von vier oder fünf Inosin-Basen eingebaut wird. An den übrigen Stellen ist der Rezeptor **8** jeweils komplementär zu den entsprechenden Stellen der DNA-Sequenzen **2a**, **2b**.

[0023] In [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) ist noch erkennbar, dass der Rezeptor **8** zwischen zwei Platzhaltern **7** jeweils ein Tupel, bestehend aus mindestens vier DNA-Basen aufweist.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Biochips (**1**), wobei zumindest eine erste DNA-Sequenz (**2a**) eines ersten DNA-Moleküls und eine zweite, sich von der ersten DNA-Sequenz (**2a**) durch mindestens eine Mutationsstelle (**3**) unterscheidende DNA-Sequenz (**2b**) eines zweiten DNA-Moleküls bereit gestellt werden, wobei jede DNA-Sequenz (**2a**, **2b**) in Sequenzabschnitte (**4a**, **4a'**, **4a''**, **4b**, **4b'**, **4b''**) unterteilt wird, die jeweils mindestens zwei Basen aufweisen, wobei jeder Sequenzabschnitt (**4a**, **4a'**, **4a''**) der ersten DNA-Sequenz (**2a**) jeweils mit einem ihm zugeordneten Sequenzabschnitt (**4b**, **4b'**, **4b''**) der zweiten DNA-Sequenz (**2b**) verglichen wird, wobei auf einem Träger (**5**) mindestens ein Rezeptor (**8**) immobilisiert wird, welcher Rezeptor (**8**) an jeder Stelle, an der ein Sequenzabschnitt (**4a**, **4a'**, **4a''**) der ersten DNA-Sequenz (**2a**) mit dem entsprechenden Sequenzabschnitt (**4b**, **4b'**, **4b''**) der zweiten DNA-Sequenz (**2b**) übereinstimmt, einen zu diesem Sequenzabschnitt (**4b**, **4b'**, **4b''**) komplementären Rezeptor-Abschnitt (**6**, **6'**) aufweist, und welcher Rezeptor (**8**) an jeder Stelle, an der ein Sequenzabschnitt (**4a**, **4a'**, **4a''**) der ersten DNA-Sequenz (**2a**) nicht mit dem entsprechenden Sequenzabschnitt (**4b**, **4b'**, **4b''**) der zweiten DNA-Sequenz (**2b**) übereinstimmt, einen Platzhalter (**7**) aufweist, der für keine der DNA-Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin bindungsspezifisch ist, wobei der Platzhalter (**7**) eine der Anzahl der Basen der Sequenzabschnitte entsprechende Anzahl von Neutralbasen aufweist und derart gewählt wird, dass der Abstand der an den Platzhalter (**7**) beidseits angrenzenden Basen des Rezeptors (**8**) etwa dem Abstand der Basen entspricht, die an die dem Platzhalter (**7**) zugeordneten, nicht übereinstimmenden Sequenzabschnitte (**4a**, **4a'**, **4a''**, **4b**, **4b'**, **4b''**) der ersten DNA-Sequenz (**2a**) und der zweiten DNA-Sequenz (**2b**) jeweils beidseits angrenzen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Neutralbase Inosin ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Sequenzabschnitte (**4a**, **4a'**, **4a''**, **4b**, **4b'**, **4b''**) eine Anzahl von jeweils mindestens vier DNA-Basen aufweist, und wobei der Platzhalter (**7**) eine dieser Anzahl entsprechende Anzahl von Neutralbasen hat.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die DNA-Sequenzen (**2a**, **2b**) derart gewählt werden, dass sie sich durch mindestens zwei Mutationsstellen (**3**) voneinander unterscheiden und dass zwischen diesen Mutationsstellen (**3**) eine Folge von mindestens drei und vorzugsweise mindestens vier aufeinander folgenden DNA-Basen vorhanden ist, die bei der ersten DNA-Sequenz (**2a**) und der zweiten DNA-Sequenz (**2b**) übereinstimmen.

5. Biochip (**1**), mit einem Träger (**5**) auf dem mindestens ein Rezeptor (**8**) immobilisiert ist, der eine Basen-Sequenz aufweist, die mehrere, jeweils mindestens eine Base enthaltene Rezeptor-Abschnitte (**6**, **6'**) und mindestens einen, aus mehreren Neutralbasen bestehenden Platzhalter (**7**) aufweist, der für keine der DNA-Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin bindungsspezifisch ist und derart gewählt ist, dass der Abstand von beidseits an den Platzhalter (**7**) angrenzenden Basen des Rezeptors (**8**) etwa dem Abstand entspricht, den zwei durch einen aus mindestens zwei DNA-Basen bestehenden Sequenzabschnitt einer DNA-Sequenz voneinander beabstandete DNA-Basen haben.

6. Biochip (**1**) nach Anspruch 5, wobei der Platzhalter (**7**) mindestens eine Neutralbase aufweist, insbesondere Inosin.

7. Biochip (**1**) nach Anspruch 5 oder 6, wobei der Platzhalter (**7**) aus einer Sequenz von vier Neutralbasen besteht.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

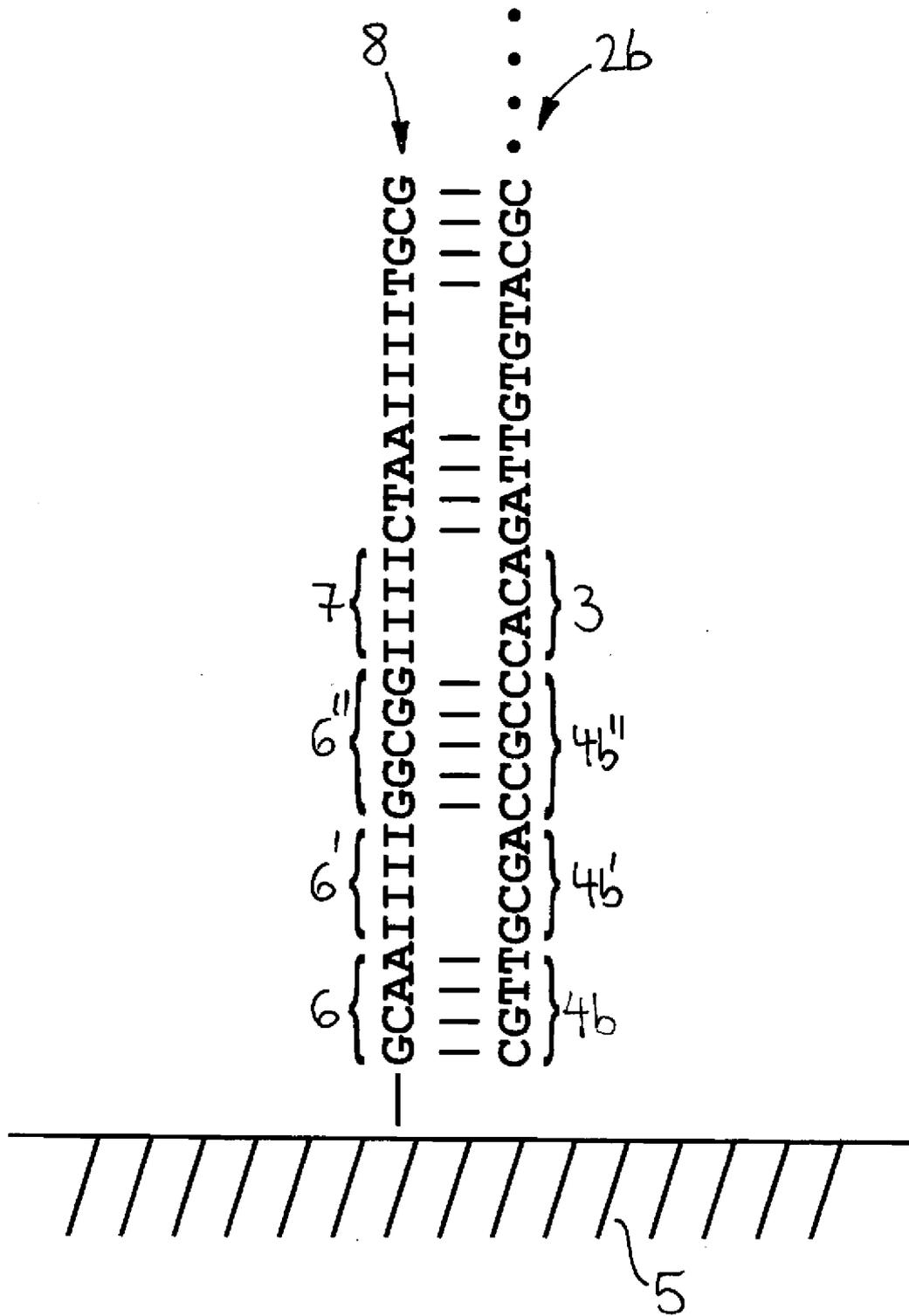


Fig. 1



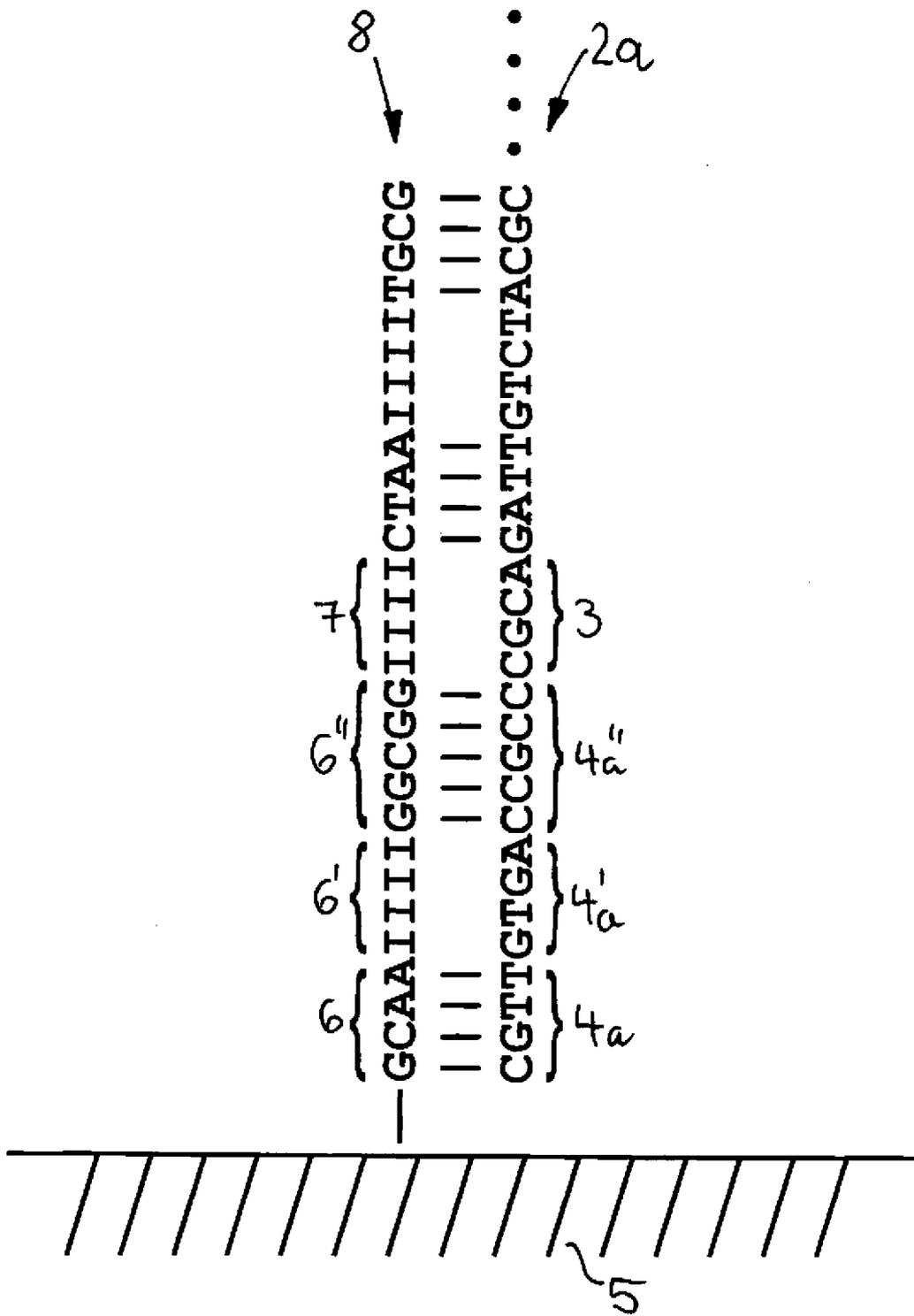


Fig. 2

