



Herstellung von biomolekularen Arrays – eine technologische Herausforderung

Eugen Ermantraut

Clondiag Chip Technologies GmbH,
Jena

Zusammenfassung

Anordnungen von biomolekularen Sonden auf Festkörperoberflächen (Arrays) sind das Herzstück von Konzepten zum Aufbau von parallel arbeitenden miniaturisierten Analysesystemen, die die heute üblichen Verfahren beim chemisch-biologischen Screening und der molekularen Diagnostik ersetzen werden, denn – so die Erwartungen – sie werden leistungsfähiger, robuster und kostengünstiger sein. Deshalb ist die Entwicklung von Verfahren zum Aufbau von biomolekularen Arrays heute unbestritten ein in wissenschaftlich – technischer und wirtschaftlicher Hinsicht heißes Thema. Es existieren eine Reihe von unterschiedlichen Verfahren und Technologien zum Aufbau von biomolekularen Arrays – für das Design eines neuen Testsystems ist ein Vergleich der Vorteile und Grenzen wichtig.

Schlüsselwörter

Array, Technologie, Immobilisierung, Substanzklasse

Summary

Manufacturing of biomolecular Arrays – a technology challenge

Arrays of biomolecular probes immobilised onto solid phase surfaces are at the heart of the concepts for the construction of highly parallel miniaturised analysis systems which will replace the current standard approaches in chemical and biological screening and molecular diagnostics. Such systems are expected to be more efficient, more robust and lower priced. Therefore today the development of technologies for the manufacturing of biomolecular arrays is doubtless a hot topic in respect to scientific, technological and economical issues. There is a number of diverse approaches and technologies available to built up biomolecular arrays. However in terms to design a novel test system it might be valuable to compare the advantages and limitations.

Key words

Array, technology, immobilisation, substance class

Motivation

Jeder biochemische/molekularbiologische Test kann in vier elementare Schritte unterteilt werden:

- Probenvorbereitung
- Inkubation der Probe mit der(den) Sonde(n)
- Auslesen des Signals in Abhängigkeit von der biomolekularen Wechselwirkung
- Datenanalyse

In vielen Fällen gilt es, eine bestimmte Probe gegen eine Vielzahl von Sonden, die spezifische molekulare Marker darstellen, zu testen. Dies gilt insbesondere für die Nukleinsäureanalytik, ist aber auch bei Antikörper-basierten Tests von Bedeutung, deren wirtschaftliches Gewicht nicht zu vernachlässigen ist (1).

So ist denn auch die Aufteilung der Proben auf einzelne Reaktionsgefäße bzw. Flächenareale, in denen die Sonden vorzugsweise immobilisiert vorliegen, der zeitbestimmende und arbeitsaufwendige Schritt. Die Prozedur wird umso aufwendiger, je mehr Sonden zum Einsatz kommen. Gleichzeitig erhöht dies gerade häufig den analytischen Wert des durchgeführten Tests, da die Genauigkeit der Analyse zunimmt, die Menge an benötigter Probe und Reagenzien sinkt und die Geschwindigkeit, mit der ein Test durchgeführt werden kann, steigt. Dies gilt umso mehr, wenn der Test in einem miniaturisierten Format durchgeführt wird. Aufgrund der angestrebten Miniaturisierung hat sich der Begriff Biochip in Anlehnung an den Mi-

Tab 1 Technologievergleich

Technology	Synthesis	Standard Protocols	miniaturisation	Integration spots/cm ²	chips/process	Anbieter/Anwender	Erste Produkte
Tip printing	-	-	- (>50µm)	x1000	-	Molecular Dynamics (Sunnyvale, Ca), Synteni (Fremont, Ca), TeleChem (San Jose, Ca), Genetix (Dorset, UK)	+
µCP/µFN	-	-	+ (<1µm)	>10 ⁶	+	IBM Research (Zurich, CH), MIT (Cambridge, MA)	-
Piezoelectric printing	+	+	- (>50µm)	x1000	-	Protogene (Palo Alto, Ca), Hyseq (Sunnyvale, Ca), Brax (Cambridge, UK), Incyte (Palo Alto, Ca), Sequenom (Hamburg, D), Biodot (Irvine, Ca), Biochip (Freiburg, D), GeSim (Dresden, D), Genetic microsystems (Woburn, MA)	+
Electro capture	-	-	+ (<1µm)	x1000	-	Nanogen (San Diego, Ca)	+
Photolitho grafica deprotection	+/-	-	+ (<10µm)	>106	+	Affymetrix (Santa Clara, Ca)	+
Photoresist lithography	+/-	+/-	+ (<1µm)	>106	+	Affymetrix (Santa Clara, Ca)	+
µWP	+	+	+ (<1µm)	>106	+	CCT (Jena,D)	-

Legende

(-)	bisher nicht gezeigt,
(+)	in bestimmten Fällen für den Einsatz geeignet,
(+/-)	Funktionsnachweis erbracht, jedoch nur bedingte Anwendbarkeit; als Produkte werden auch erste, Kunden zur Verfügung gestellte Prototypen gesehen.

krochip aus der Halbleiter- und Mikrosystemtechnik eingebürgert, die Vorteile eines solchen Formats sind zwischenzeitlich unbestritten und Gegenstand zahlreicher Übersichtsarbeiten (2,3,4,5).

Unrichtig ist die heute häufig vollzogene Unterscheidung zwischen fluidischen und Array-basierten Systemen (6), es ist eher anzunehmen, daß sich langfristig eine vollständig mikrosystemtechnisch gefertigte Lösung mit fluidischen Elementen und einer Analysenzelle, die ein Array von Sonden enthält, durchsetzen wird. Kernelement aller miniaturisierten analytischen Systeme wird ein mehr oder weniger hoch integriertes Array von biomolekularen Sonden sein.

Zwei grundsätzliche Ansätze bestimmen den heutigen Stand der Technologieentwicklung bei der Array-Erzeugung. Einerseits sind dies die technologisch weniger aufwendigen Verfahren, die es gestatten, schnell und ohne großen Aufwand einige Arrays von moderater Integrationsdichte zu erzeugen und damit dem Anwender zur Verfügung zu stellen (Entwicklungsverfahren). Andererseits werden extrem anspruchsvolle, an die Halbleitertechnik angelehnte Verfahren ent-

wickelt, die geeignet sind, effizient und mit hoher Präzision und Reproduzierbarkeit, große Stückzahlen identischer Biochips für einen breiten Markt herzustellen (Produktionsverfahren). Beide Ansätze haben ihre Bedeutung und sind komplementär. Der erste bereitet den Weg für den Zweiten. Diese Verfahren sollen im Folgenden näher erläutert werden. Weitere Probleme, die häute weitgehend ungelöst sind und kritische Punkte im Verlauf der Entwicklung und Verbreitung von Biochips sein werden sind das Chip-Packaging (wie entsteht aus einem Array ein funktionstüchtiges Analysesystem und was gehört dazu?), Chip-Lagerung (Langzeitstabilität?) und Handhabung (Ausleseverfahren und deren Zuverlässigkeit).

Die Verfahren – eine Übersicht

Die Arrays werden prinzipiell nach der Art der immobilisierten Sonden bzw. nach der Art der Herstellung der Sonden unterteilt. So existieren Arrays, die durch gezielte Deposition und Immobilisierung von ex-situ vorgefertigten Proben hergestellt wurden. Andererseits existieren Arrays, die durch in-situ Synthese der Sondenmoleküle entstanden sind. Grundsätzlich muß für beide Ansätze gewährleistet sein, daß eine hinreichend stabile Anbin-

dung der Proben an die Substratoberfläche gewährleistet ist. Interessanterweise kommt es hier zu einer Renaissance von bei der Herstellung von Chromatographiematerialien längst klassisch gewordenen Verfahren (7). Hingegen werden hier im Hinblick auf die Fertigung von Biochips die Verfahren zur Herstellung der Arrays in zwei völlig andere Kategorien unterteilt – Entwicklung und Fertigung.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die im Weiteren behandelten Verfahren. Folgende fünf Kriterien sind bei dieser Betrachtung von Bedeutung:

1. Befähigt das Verfahren zur Durchführung von Synthesen in situ?
2. Ist die Handhabung verschiedener Substanzklassen möglich?
3. Können bereits bekannte Protokolle der Immobilisierungs-/Festphasensynthesechemie verwandt werden?
4. Wo liegen die Grenzen der Miniaturisierung (kleinste strukturierte Fläche)?
5. Wie hoch ist die erreichbare Integrationsdichte (Sonden/Flächeneinheit bzw. Chips/Fertigungsprozess)?

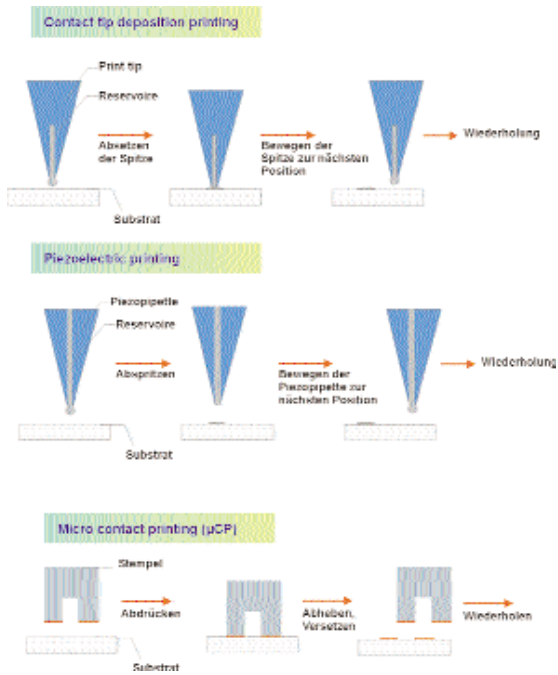


Abb 1

Contact tip deposition printing (Abbildung 1)

Ursprünglich handelt es sich um ein makroskopisches Verfahren (8), bei dem eine Nadel in eine die zu immobilisierende Sonde enthaltende Lösung getaucht wird. An der Nadel verbleibt eine bestimmte Menge an Lösung die durch Aufsetzen der Nadel auf der Substratoberfläche diese benetzen und so dort deponiert werden kann. Das Prinzip wurde 1997 von der Firma Synteni (Fremont, CA) kommerzialisiert. Heute werden Geräte mit mehreren Nadeln, die simultan in Mikrotiterplatten bestückt werden können angeboten. Die Nadeln verfügen meistens über eine Kerbe, die, vergleichbar der Feder in einem Füllfederhalter, als Depot für die Lösung wirkt (9,10). Eine interessante Variante dieser Technik, stellt das 1998 von Genetic Microsystems (Woburn, MA) vorgestellte Verfahren dar (11), bei dem ein Ring in eine die Sonden enthaltende Lösung eingetaucht wird. Begünstigt durch die Grenzflächen-spannung zwischen Lösung und Ringoberfläche bildet sich eine Lamelle, der Ring wird nun über die Oberfläche geführt, an bestimmten Stellen wird von oben durch die Lamelle eine dünne Nadel gestoßen und auf die Oberfläche aufgesetzt. So wird eine kleine Menge an Lösung auf die Oberfläche gebracht.

Heute werden bei Synteni Arrays auf einer Glasoberfläche von ca. 3.6 cm² mit ca. 10.000 verschiedenen Sonden (cDNA) erzeugt. Es ist geplant ca. 100.000 Sonden auf einer Fläche von 6.5 cm² zu immobilisieren und damit in

den Bereich von hoch integrierten (>10.000 Sonden/cm²) Arrays vorzustoßen. Geräte zum selbständigen Aufbau von Arrays mittels dieses Verfahrens werden unter anderem von der Firma Telechem Int. (San Jose, CA) angeboten. Das Verfahren wird in der Regel zur Immobilisierung von großen Molekülen (z.B. PCR-Fragmente) angewandt.

Vorteilhaft ist der vergleichsweise geringe Aufwand, mit dem Arrays von cDNA erzeugt werden können. Die Geräte sind frei verfügbar und es existiert ein weitverzweigter Support und vielfältiges Zubehör. Minimale Spotgrößen, die reproduzierbar erreicht werden können, liegen im Bereich von ca. 50µm, der Abstand zwischen den Spots sollte aufgrund der Übersprechwahrscheinlichkeit im Bereich der Spotgröße liegen. Auf einer Fläche von 1 cm² können unter Umständen bis zu 15.000 Sonden deponiert werden. Es ist nicht bekannt, ob auf die beschriebene Art und Weise eine Synthese durchgeführt werden könnte, der Aufbau ist aber hierfür kritisch, da aufgrund der offenen Bauweise und durch die Notwendigkeit, die Oberfläche bei jedem Schritt zu berühren die Syntheseausbeute sicher gering sein dürfte.

Piezoelectric printing (Abbildung 1)

Das Ablegen von Proben mit Hilfe von piezoelektrischen Dispensern und auch Pipetten ist aufgrund seiner potentiellen chemischen Universalität ein sehr interessantes Verfahren. Daß diese Behauptung nur bedingt gültig ist, wird jeder nachvollziehen können, der schon

einmal versucht hat, einen HP-Drucker mit Lexmark-Tinte zu betreiben. Die Druckköpfe stellen hochspezialisierte optimierte Lösungen dar, die nur mühevoll die Anwendung alternativer Lösungsmittel und entsprechend visköser Lösungen gestatten. Dennoch gelang es mittels dieses Verfahrens synthetisch in-situ Oligonukleotide aufzubauen (12). Bei Incyte Pharmaceuticals (Palo Alto, CA) werden Integrationsdichten von bis zu 10.000 spots/cm² erreicht. Grundsätzliche Probleme treten durch das Übersprechen von spots, verursacht vor allem durch Satellitentropfen aber auch den Dampfdruck der gelösten Moleküle. Zusätzlich ist bei kleinen Tropfen das Verdampfungsproblem akut, was die Durchführung eines definierten chemischen Protokolls erschwert. Eine Steigerung der Immobilisierungsgenauigkeit und damit der Reproduzierbarkeit ist durch den Einsatz von in ihrer Benetzbarkeit strukturierten Trägern zu erwarten. So versucht Protogene (Palo Alto, CA) diesem Umstand durch Einsatz von Substraten mit hydrophilen Spots, die von hydrophoben Barrieren voneinander getrennt werden, zu begegnen (13). Durch die Zusammenarbeit von Motorola Inc., Packard Instruments, dem Argonne National Lab in den Vereinigten Staaten und dem Engelhardt Institut in Rußland soll eine neue Plattform für den Einsatz von piezobasierten Pipettiersystemen entstehen. Es handelt sich um kleine photolithographisch strukturierte Kissen aus Poly-Acrylamid, die aufgrund ihres Gelcharakters eine größere Bindungskapazität für Sonden haben und das Verdunstungsproblem reduzieren (14).


Abb 2

Ähnliche Substrate werden auch von der Firma Quantifoil (Jena, D) gefertigt (15).

MicroContactPrinting (μ CP)
(Abbildung 1) /
microFluidic Networks (μ FN)
(Abbildung 2)

Das μ CP ist heute ein wichtiges und vielversprechendes Verfahren bei der (insbesondere chemischen) Strukturierung von Substratoberflächen. Hierbei wird in Analogie zum „Contact tip deposition Printing“ ein Silikonstempel zur Übertragung von Material auf eine gegebene Oberfläche benutzt. Solche Stempel können bereits heute reproduzierbar mit Strukturen von $<50\text{nm}$ erzeugt werden und eröffnen damit eine völlig neue Größenordnung der Miniaturisierung von Arrays (16). Gleichwohl sind die bis heute erzielten Ergebnisse bei der Anwendung des μ CP zur Deposition von biomolekularen Sonden auf Substratoberflächen ernüchternd (17), dies ist sicher auch dadurch begründet, dass das μ CP ein kontaktierendes Verfahren ist und damit inherent die Gefahr einer Verschleppung von Kontaminanten und der Beschädigung der soeben erzeugten Oberfläche gegeben ist. Deshalb stellen die unmittelbar hieraus abgeleiteten μ FN's eine interessante Alternative dar. Die Miniaturisierungsmöglichkeiten der Strukturierung sind hier beträchtlich. Es werden auf einer Oberfläche Kapillaren erzeugt, indem ein mit kleinen Riefen bzw. Kanälen versehener Silikonstempel auf die Oberfläche gesetzt wird, von der Seite werden die Kapillaren mit einer, die Sonde enthaltenden Lösung gefüllt.

Diese wird durch Kapillarkräfte in das Innere des Stempels gezogen, hierbei wird die Oberfläche des Substrats benetzt – ist sie entsprechend vorpräpariert, erfolgt die Immobilisierung (18). Allgemein weisen auf Flüssigkeitstransport durch Kapillaren basierende Verfahren große verfahrenstechnische Probleme auf. Insbesondere treten Schwierigkeiten durch das Verstopfen der erwähnten Kapillaren auf. Das Verfahren ist auch hinsichtlich der verwendbaren Lösungsmittel limitiert, wird aber bei größeren Strukturen erfolgreich zur Immobilisierung von Immunglobulinen eingesetzt (19).

Photolithographische Entschützung (Abbildung 2)

Hierunter werden zwei Verfahren zusammengefasst, die zur in-situ Synthese von hoch integrierten ($>10^6$ Sonden/ cm^2) Arrays von der Firma Affymetrix (Santa Clara, Ca) entwickelt wurden (20).

In ersten Fall wird eine speziell entwickelte Festphasen-Synthesechemie mit lichtempfindlichen Schutzgruppen verwendet. Zur strukturierten Synthese werden die in der Photolithographie üblichen Masken verwendet, die dem Synthesalgorithmus folgend zuvor hergestellt wurden. Die Oberfläche des Substrats liegt geschützt vor. Mittels einer geeigneten Maske wird ein Muster auf die Oberfläche projiziert, es erfolgt im belichteten Bereich die Entschützung. Hiernach wird die Oberfläche mit dem nachfolgenden Phosphoramiditbaustein zur Reaktion gebracht. Nach einigen Zyklen kann auf diese Weise eine große Anzahl von unterschiedlichen Oligonucleotiden

erzeugt werden. Affymetrix bietet heute eine Vielzahl von Oligonucleotid-Arrays im Chipformat ($1.24 \times 1.24 \text{ cm}$) an mit einer maximalen Dichte von 65.000 Oligonucleotiden/ cm^2 . Das Verfahren erlaubt eine Miniaturisierung bis in den Bereich einiger $10 \mu\text{m}$. Mit den verwendeten Reagenzien werden Ausbeuten von bis zu 95% /Syntheseschritt erreicht (21). Häufig liegt die Ausbeute unterhalb dieses Wertes, was den Einsatz von Standard-Phosphoramiditen wünschenswert macht (mit diesen werden bei Einsatz von piezoelektrischen Depositionsverfahren bis zu 99% ige Ausbeuten erreicht).

Deshalb wurde von Affymetrix in Zusammenarbeit mit dem IBM Forschungszentrum in Almaden ein weiteres Verfahren vorgestellt (22). Dieses beruht auf der Nutzung einer Photorealist-Technik, die gestatten sollte, die bei der herkömmlichen DNA-Festphasensynthese verwendeten Reagenzien zu benutzen und eine Auflösung im Bereich der Grenzen der optischen Photolithografie zu erreichen ($<1 \mu\text{m}$). Hierbei wird die zuvor mit einem Starter-Phosphoramidit beschickte Oberfläche (damit ist die Substratoberfläche chemisch geschützt) mit einer in der Halbleiter- und Mikrosystemtechnik üblichen Photoresistschicht bedeckt. Diese Schicht wird mittels einer photolithographischen Maske belichtet und hiernach entwickelt. Dadurch wird im Photoresist ein Muster von Fenstern geöffnet, die es dem Entschützungsmittel gestatten, an die Oberfläche zu gelangen. An diesen Stellen erfolgt die Entschützung. Der Resist wird abgelöst und die Ober-

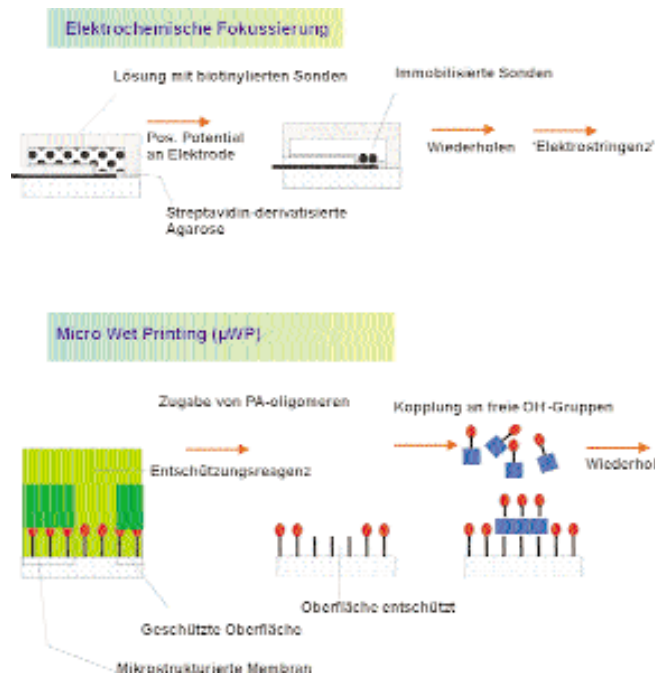


Abb 3

fläche dem nachfolgenden Phosphoramiditbaustein ausgesetzt. Da das Verfahren nur sehr mäßige Synthesausbeuten liefert, wurde eine Pufferschicht zwischen Substratoberfläche und Photoresist eingeführt, um die Wechselwirkung zwischen Resist und den wachsenden Oligonukleotidketten zu minimieren, wodurch die optische Auflösung der Resistschicht leidet, damit war es jedoch möglich, die chemische Ausbeute des Verfahrens auf >90%/ Schritt zu steigern. Veränderungen und Weiterentwicklungen bei den hierbei verwendeten Resist-Materialien werden mit Sicherheit Verbesserungen hinsichtlich der Ausbeute bei der Synthese von Oligonukleotiden gestatten. Der Reiz des Verfahrens besteht unter anderem auch darin, daß die komplette in der mikrosystemtechnik etablierte Maschinerie und in der Festphasensynthese erprobte Chemie zum Einsatz kämen. Eine interessante Variante dieser Verfahren, die den Einsatz von photolithographischen Masken obsolet macht, besteht im Einsatz eines LCD-Projektors zur Belichtung von Arealen auf lichtempfindlichen chemisch präparierten Substraten (23).

Elektrochemische Fokussierung (Abbildung 3)

Ein Silizium-Chip (1cm x 1cm) mit 25 Platinelektroden, die mit einer Schicht mit Streptavidin derivatisierter Agarose bedeckt wurden, wurde von Nanogen (San Diego, Ca.) erzeugt. Durch sukzessives Anlegen eines positiven Potentials an einzelne Elektroden wurden gezielt biotinylierte Oligonukleotide an vorgesehenen Stellen immobi-

lisiert. Durch Anlegen des Potentials bei Zugabe von Probenlösung kann die Hybridisierungseffizienz deutlich gesteigert werden. Eine interessante Anwendung ist hierbei auch die Möglichkeit eines „elektrostringenten“ Waschens (24). Zwischenzeitlich existieren Anordnungen mit bis zu 1000 Elektroden.

MicroWetPrinting (µWP) (Abbildung 3)

Dieses Verfahren wird bei Clondia Chip Technologies Co. (Jena, D) entwickelt und soll die Vorteile von naßchemisch arbeitenden Systemen, die den Einsatz unterschiedlicher und etablierter Synthese- und Immobilisierungsstrategien gestatten, und der hoch parallel arbeitenden photolithographischen Verfahren kombinieren. Es basiert auf dem Einsatz einer Membran, die strukturiert ist und an durch den Synthesalgorithmus bzw. die Immobilisierungsabsicht bestimmten Stellen Fenster aufweist. Diese Membran wird auf der Oberfläche positioniert abgelegt und mit dem Reagenz der Wahl beschickt, an den durch die Fenster bestimmten Stellen kommt das Reagenz mit der Oberfläche in Kontakt. Unter entsprechend eingestellten Bedingungen kommt es zur chemischen Reaktion. Durch Kombination der Membran mit einem Kanalsystem ist die simultane Deposition von verschiedenen Sonden möglich. Es wurden bereits Oligonukleotide, als auch lange PCR-Fragmente immobilisiert, ebenso die in-situ Synthese von DNA-Oligonukleotiden durchgeführt, hierbei wurden Ausbeuten über 98%/Syntheseschritt er-

reicht. Es wurden Spots mit einer Kantenlänge von 2µm erzeugt (25, 26). Das Verfahren steckt in den Kinderschuhen, das Potential ist erkennbar, die Möglichkeit zur reproduzierbaren Herstellung der Masken wird den Erfolg der Methode bestimmen.

Zusammenfassung

In Anbetracht der Vielzahl von heute zur Verfügung stehenden Verfahren gibt es für jeden experimentellen Ansatz auch ein passendes Verfahren zum Aufbau eines adequate Arrays. Unternehmen wie Affymetrix, Molecular Dynamics, Incyte und Nanogen arbeiten gezielt und erfolgreich an der Etablierung ihrer jeweiligen Plattform als quasi-Standard. Im Hinblick auf den voraussehbaren Bedarf an Array-basierten Systemen scheint jedoch der Bedarf nach einem Verfahren, daß in chemisch universeller Weise die Handhabung einer Vielzahl von Substanzklassen als Sondenmaterial gestattet und zugleich die Vorteile der massiven Fertigung im mikrosystemtechnischen Kontext bietet, ungedeckt. Keines der heute bekannten Verfahren erlaubt die Prozessierung von Substraten im Wafer-Maßstab bei Einsatz von herkömmlicher Chemie.

So deckt auch kein heute verfügbares Verfahren alle drei der folgenden kritischen Punkte vollständig ab:

- Begrenzte Verwendbarkeit bestimmter chemischer Verfahren (Synthese, Immobilisierung);
- Parallelität der Fertigung eingeschränkt durch Einsatz kleiner Substrate;

· Miniaturisierungspotential limitiert.

Natürlich hoffen wir bei CCT, daß sich unser Verfahren durchsetzen wird.

Literatur

1. Diagnostic Market & Technology Trends, in: Theta Reports No. 705, 1997
2. A.Marshall, J.Hodgson (1998), DNA-Chips: An Array of possibilities, Nature Biotechnology, Vol.16
3. G.Ramsay (1998) DNA chips: state of the art, Nature Biotechnology, Vol.16
4. A.M.Castellino (1997), When the chips are down, Genome Research, 7:943-946
5. M.Shena, R.A.Heller, T.P.Theriault, K.Konrad, E.Lachenmaier, R.W.Davis (1998), MicroArrays: biotechnology's discovery plattform for functional genomics, TIBTECH, Vol.16
6. M.N.Murray, C.A.Butler, S.Adkins, I.Smith, J.Walton (1997), BioChips, Lehman Brothers Research Reports, Biotechnology
7. E.M.Southern, U.Maskos (1994), Parallel synthesis and analysis of large numbers of related chemical compounds: applications to oligonucleotides, J.of Biotech. 35, 217-227
8. G.G.Lennon, H.Lehrach (1991), Trends Genet. 7, 314-317
9. M.Shena, D.Shalon, R.W.Davis, P.O.Brown (1995), Science 270, 467-470
10. D.Shalon, S.J.Smith, P.O.Brown (1996), Genome Research 6, 639-645
11. S.D.Rose (1998), J.Ass.Lab.Autom. Vol.3, No.3, 53-56
12. A.P.Blanchard (1998), Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol.20, 111-124, Plenum Press
13. A.P.Blanchard, R.J.Kaiser, L.E.Hood (1996), Biosens. Bioelectron. 11, 687-690
14. D.Proudnikov, E.Timofeew, A. Mirzabekov (1998), Analytical Biochemistry 259, 34-41
15. E.Ermantraut K.Wohlfart, T.Schulz, M.J.Köhler (1997), Neuartige Schichten für die Mikrosystemtechnik und Mikrostrukturierung sowie ihre Verwendung, DE 197 05 909.0-51 (PCT/EP97/04582)
16. A.Kumar, G.M.Whitesides (1993), Appl.Phys. Lett., 63,2002
17. F.Morhard, R.Dahint, M.Grunze (1998), „In situ detection of cells and biochemical reactions by optical diffraction“ in Proceedings of μ TAS'98, 469-472, Kluwer Scientific Publishing
18. E.Delamarche (1997), Patterned Delivery of Immunoglobulins to Surfaces Using Microfluidic Network, Science Vol. 279
19. F.S.Ligler, C.A. Rowe, S.Balderson, M.Feldstein, J.P. Golden (1998), „Fluorescence Array Biosensor – Biochemistry and Application“ in Proceedings of μ TAS'98, 217-221, Kluwer Scientific Publishing
20. G.Wallraff, J.Labadie, P.Brock, R.DiPietro, T.Nguyen, T.Huynh, W.Hinsberg, G. McGall (1997), DNA Sequencing on a Chip, Chemtech, February, 22-32
21. G.McGall, A.D. Barone, M.Diggelmann, S.P.A.Fodor, E.Gentalen, N.Ngo (1997), The efficiency of light directed oligonucleotide synthesis of DANN-Arrays on glass substrates, J.Am.Chem.Soc., Vol. 119, No.22
22. G.McGall, J.Labadie, P.Brock, G.Wallraff, T.Nguyen, W.hinsberg (1996), light directed synthesis of high density oligonucleotide Arrays using semiconductor photoresists, PNAS, Vol. 93, 13555-13560
23. H.R.Garner (1999), MicroArray robotics and instrumentation systems, in Proc. Of Lab Chips and MicroArrays for Biotechnical Applications, CHI
24. M.J.Heller, E.Tu (1993), Active programmable electronic devices for biomolecules, US Pat. 5605662
25. E.Ermantraut, K.Wohlfart, T.Schulz, S. Wölfl und M.J.Köhler (1997) Verfahren zur Herstellung von strukturierten, selbstorganisierten molekularen Monolagen einzelner molekularen Spezies, insbesondere von Substanzbibliotheken, DE 197 06 570.8
26. E.Ermantraut, T.Schulz, J.Tuchscheerer, S.Wölfl, H.-P.Saluz, E.Thallner, J.M.Köhler (1998), „building highly diverse substance libraries by micro wet printing“ in Proceedings of μ TAS'98, 217-221, Kluwer Scientific Publishing

Korrespondenzadresse

Eugen Ermantraut
CCT (Clondiag Chip Technologies GmbH)
Löbstedter Str. 105
D-07743 Jena, Germany
Tel.: 0049-3641-5947-0
Fax.:0049-3641-5947-20
eugen@clondiag.com

Anzeige

AGowa 1/3 quer neu 2 C