(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2004 008 241 B4** 2006.09.07

(12) # Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2004 008 241.3**
(22) Anmeldetag: **19.02.2004**
(43) Offenlegungstag: **24.11.2005**
(45) Veröffentlichungstag der Patenterteilung: **07.09.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***G03F 7/00*** (2006.01)
B81C 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
G01N 13/10 (2006.01)
G12B 21/02 (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. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Universität Bremen, 28359 Bremen, DE

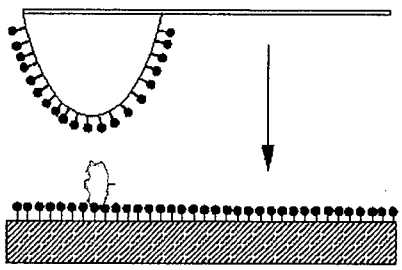
(74) Vertreter:
MÜLLER FOTTNER STEINECKE Rechtsanwälte Patentanwälte, 80335 München

(72) Erfinder:
Radmacher, Manfred, 28870 Ottersberg, DE;
Riemenschneider, Leif, 01219 Dresden, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
US 60 01 587 A
US 58 24 470 A
WO 97/06 468 A2
TAKEDA, Seiji u.a.: Lithographing of Biomolecules on a Substrate Surface Using an Enzyme-Immobilized AFM Tip. In: Nano Lett. 2003, Vol. 3, No. 11, S. 1471-1474.;

(54) Bezeichnung: **Enzymgestützte Nanolithografie**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur gezielten Beschichtung einer Sonde mit Enzym oder Effektormolekülen, umfassend das Inkontaktbringen der Sonde mit einem flachen Träger, auf dem Enzyme oder Effektormoleküle mittels eines polyvalenten Bindungspartners A an einen Bindungspartner B auf dem Träger gebunden sind, wobei zumindest ein Teil der Sonde die gleichen Bindungspartner B aufweist, und wobei das Molekül, das aus dem Enzym oder Effektormolekül und dem polyvalenten Bindungspartner A besteht, im nicht an den Bindungspartner B gebundenen Zustand mindestens zwei freie Bindungsstellen für den Bindungspartner B aufweist.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ganz allgemein ein enzymgestütztes Verfahren zur Nanolithografie und Vorrichtungen zur Durchführung solcher Verfahren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur gezielten Beschichtung einer Sonde mit Enzym oder Effektormolekülen sowie ein lithografisches Verfahren zur Strukturierung einer Oberfläche eines Trägers, wobei durch eine lokal begrenzte enzymatische Aktivität in unmittelbarer Nähe der Oberfläche diese chemisch oder physikalisch modifiziert wird, und zwar durch Positionierung eines an einer Sonde immobilisierten Enzyms oder Effektormoleküls in die unmittelbare Nähe der Oberfläche. Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur gezielten Beschichtung einer Sonde mit Enzym oder Effektormolekülen wird erreicht, dass die Sonde Enzyme bzw. Effektormoleküle vorzugsweise in einem Bereich von weniger als 100 nm, vorzugsweise weniger als 50 nm und besonders bevorzugt in einem Bereich von 10 nm oder weniger aufweist. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Sonden, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind, sowie insbesondere Rastersondenmikroskope, die erfindungsgemäße Sonden enthalten. Die erfindungsgemäßen Verfahren, Oberflächen, Träger, Vorrichtungen, Sonden und Rastersondenmikroskope können zur Herstellung von beispielsweise Nanochips und Microarrays sowie zur Speicherung und/oder Analyse von Daten, zum Einsatz in der Zellbiologie oder zur Durchführung von Mess- und Untersuchungsverfahren wie beispielsweise in der Forensik sowie der chemischen oder biologischen Analytik verwendet werden.

Stand der Technik

[0002] In der vorliegenden Anmeldung wird innerhalb des Textes auf verschiedene Publikationen unter Angabe von Autor und Datum Bezug genommen. Vollständige Literaturangaben zu diesen Publikationen können auch am Ende der Beschreibung unmittelbar vor den Ansprüchen gefunden werden. Die Offenbarungen dieser Publikationen werden hiermit durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit in diese Anmeldung einbezogen, um vollständiger den Stand der Technik zu beschreiben, der den Fachleuten zum Zeitpunkt der hier beschriebenen und beanspruchten Erfindung bekannt war.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Herkömmliche Lithografieverfahren, so wie die Fotolithografie, werden verwendet, um Strukturen von einer Größe von einigen hundert Nanometern herzustellen, sogar unter solchen Bedingungen, wie sie in den Fertigungsstrassen der Halbleiterindustrie vorherrschen. Es gibt einen konstanten Bedarf für eine Erhöhung der Auflösung bei solchen Verfahren. Mögliche Lösungswege sind die Verwendung von kürzeren Wellenlängen (UV-Licht) oder anderen Medien, wie in der Elektronenlithografie. Es ist jedoch nicht klar, wie Strukturgrößen von mehreren zehn Nanometern oder auch nur von einigen Nanometern durch eine bloße Verbesserung der gegenwärtig gebräuchlichen Technologien routinemäßig hergestellt werden können.

[0004] Eine mögliche alternative Technik, die sich unter Laborbedingungen als erfolgreich erwiesen hat, ist die Oberflächenmodifikation durch Rastersondentechniken. Beispielsweise können weiche Polymerfilme durch mechanische Interaktion einer Rasterkraftmikroskopspitze modifiziert werden (Wendel, Lorenz et al. 1995). Auch die Dip-Pen-Technologie (Piner, Zhu et al. 1999), bei der eine geeignete Tinte auf einer AFM-Spitze adsorbiert und dann lokal auf eine Probe aufgebracht wird, hat großes Interesse auf sich gezogen.

[0005] In Zukunft wird nicht nur ein Bedarf für die Oberflächenstrukturierung in sehr kleinem (Nanometer-) Maßstab, wie von der Halbleiterindustrie vorgebracht, bestehen, sondern auch für die chemische Oberflächenmodifikation z.B. in biotechnologischen Anwendungen. Die Miniaturisierung von Assays wie DNA-Chips oder Protein-Chips wird kleinere, chemisch exakt definierte Strukturen erfordern. Eine Übersicht über die bekanntesten Biochip-Systeme wird von Bowtell in Nature Genetics Supplement 21 (1999), 25-32, gegeben.

[0006] Es gibt auch einen starken Bedarf nach der Miniaturisierung von diagnostischen Geräten, von Biosensoren oder der Herstellung von chemischen „Nanoreaktoren" (lokale Bereiche, die gewisse chemische Aufgaben erfüllen können). Wenn es auch vorstellbar ist, dass konventionelle Techniken wie die UV-Lithografie Auflösungen im Zehner-Nanometerbereich erreichen wird, so ist doch nicht klar, wie der Bedarf nach chemischen Modifikationen gedeckt werden soll.

[0007] Enzyme wurden ebenfalls zur chemischen Oberflächenmodifikation beschrieben, z.B. durch Aufbringen mit einem Nanofountain Pen auf eine geeignete Oberfläche, wo ein Substrat, das von dem Enzym verdaut werden kann, fixiert wurde (Ionescu, Marks et al., 2003). Hier wurden allerdings bereits durch die Verfahrensbedingungen Oberflächenveränderungen durch selbstständige Veränderung des Substrats beobachtet. Ferner wurde das Enzym eher im Sinne eines „Etching" verwendet, d.h. des klassischen Ätzens der Oberfläche, während die enzymatische Aktivität eine untergeordnete Rolle spielte. In einer anderen Anwendung wurde im Medium präsente Phospholipase verwendet, um einen Lipidfilm zu modifizieren. Hier wurden lokale Störungen in der Ordnung des Lipidfilms, die von der mechanischen

Interaktion einer Rastersondemikroskopspitze verursacht wurden, dazu verwendet, die Probe lokal zu verändern (Grandbois, Clausen-Schaumann et al. 1998). Verfahren zur gezielten enzymgestützten Strukturierung einer Oberfläche, die den Ansprüchen beispielsweise der Chip-Industrie und Nanobiotechnologie genügen, stehen bisher allerdings nicht zur Verfügung.

[0008] Die Druckschrift US 5,824,470 A offenbart ein Verfahren zur Beschichtung einer Spitze mit Enzym, wobei die Spitze mit einem Träger in Kontakt gebracht wird und das Enzym mittels eines Spacers an die Spitze gebunden wird.

Aufgabenstellung

[0009] Der vorliegenden Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, Oberflächen und Verfahren zu deren Herstellung bereitzustellen, die den vorgenannten Anforderungen gerecht werden.

[0010] Dieses technische Problem wird mit den in den Ansprüchen gekennzeichneten sowie in der nachfolgenden Beschreibung erläuterten erfindungsgemäßen Ausführungsformen gelöst.

[0011] Die vorliegende Erfindung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beschichtung einer Sonde mit Enzym oder Effektormolekülen sowie ein Verfahren zur Strukturierung einer Oberfläche eines Trägers, wobei mit dem Verfahren erreicht wird, dass durch eine lokal begrenzte enzymatische Aktivität in unmittelbarer Nähe der Oberfläche, diese chemisch oder physikalisch modifiziert wird. Erfindungsgemäß kann das wesentliche Merkmal der lokalen enzymatischen Aktivität an der zu strukturierenden Oberfläche durch die kontrollierte Beschichtung einer Sonde mit wenigen oder gar nur einem Enzym oder Effektormolekül erreicht werden, wobei die Enzymaktivität in unmittelbarer Nähe der Oberfläche vorzugsweise an- und abgeschaltet werden kann.

[0012] Die vorliegende Erfindung umfasst die gezielte Beschichtung einer Sonde mit Enzym oder Effektormolekülen, umfassend das Inkontaktbringen der Sonde mit einem flachen Träger, auf dem Enzyme oder Effektormoleküle mittels eines polyvalenten Bindungspartners A wie Streptavidin an einen Bindungspartner B wie Biotin auf dem Träger gebunden ist, wobei zumindest ein Teil der Sonde die gleichen Bindungspartner B, in diesem Falle Biotin, aufweist.

[0013] Die Erfindung basiert auf dem Befund, dass sich unter Zuhilfenahme biologischer oder biologisch abgeleiteter Enzyme ein Verfahren zur gezielten lokalen, chemischen oder physikalischen Modifikation einer geeigneten Oberfläche erhalten lässt. Das Enzym wird dabei auf der Spitze eines Rastersondenmikroskops fixiert, wodurch die chemische oder physikalische Modifikation mit sehr hoher Auflösung durchgeführt werden kann, letztendlich auf der Basis einzelner Moleküle.

[0014] Das hierin beschriebene Verfahren kann auf ein breites Spektrum von Enzymmolekülen angewendet werden und ermöglicht daher eine Technologieplattform, die für verschiedene Anwendungen genutzt werden kann. Enzyme sind gebräuchliche Hilfsmittel in der Diagnostik und der Biotechnologie. Die wohl bekanntesten Anwendungen sind PCRs (Polymerase-Kettenreaktionen) oder ELISAs (enzyme linked immunosorbent assays). Sie haben sogar in Produkten des täglichen Hausgebrauchs Verwendung gefunden, z.B. als Waschmittelzusätze. Erfindungsgemäß kann in zukünftigen Anwendungen das riesige Wissen über Enzyme aus diesen Gebieten genutzt und auf verfügbare Enzyme und geeignete Substrate zurückgegriffen werden.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Sonden, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind, sowie insbesondere Rastersondenmikroskope, die erfindungsgemäße Sonden enthalten.

[0016] Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Verwendungen der hier beschriebenen Verfahren, Oberflächen, Träger, Vorrichtungen, Sonden und Rastersondenmikroskope zur Herstellung von beispielsweise Nanochips und Microarrays sowie zur Speicherung und/oder Analyse von Daten, zum Einsatz in der Zellbiologie oder zur Durchführung von Mess- und Untersuchungsverfahren wie beispielsweise in der Forensik sowie in der chemischen oder biologischen Analytik.

Ausführungsbeispiel

Die Abbildungen zeigen:

[0017] Fig. 1: A. Eine Rasterkraftmikroskopspitze (Rasterelektronenmikrograph, Breite der pyramidenförmigen Spitze etwa 4 µm) wird an ihrem vordersten Ende mit einem Enzymmolekül (hellgrau) beschichtet durch Interaktion der am Enzym gebundenen Gruppen (mittelhellgrau, in diesem Fall Streptavidin, als Steckknopf dargestellt) mit den an der Spitzenoberfläche gebundenen Gruppen (dunkelgrau, in diesem Fall Biotin, doppelt konkav dargestellt).

[0018] Fig.B. Das Protein, d.h. Enzym ist mit einem Streptavidinmolekül verbunden (doppelt konkav dargestellter Komplex), der vier Bindungsstellen (Kanten) für den Liganden Biotin (als Steckknopf dargestellt) aufweist. Die Enzyme werden auf einem biotinilierten Träger fixiert (I). Die ebenfalls biotinilierte Rasterkraftmikroskopspitze wird mit der enzymbeschichteten Probe in Kontakt gebracht. Enzymmoleküle werden dann an die Spitze und an den Träger gebunden (II). Nach der Trennung der Spitze vom

Träger werden etwa 50% der doppelt gebundenen Enzym-Moleküle an der Spitze verbleiben (III). Diese Vorgehensweise ermöglicht es, dass nur das vorderste Ende der Rasterkraftmikroskopspitze beschichtet wird.

[0019] Fig. 2: Mögliche Reaktionsschemata. Die Abbildungen geben beispielhaft einige Reaktionsschemata wieder. Durch Einschalten zusätzlicher Effektormoleküle wie Co-Enzyme oder anderer Moleküle können natürlich beliebig komplizierte Reaktionsschemata erhalten werden.

[0020] Fig.A. Das Substrat (S) wird auf der Oberfläche fixiert und wird durch die enzymatische Aktivität löslich. S wird auf der Probe fixiert und das Enzym spaltet S, so dass Produkt P löslich wird und die Reste von S, die immer noch auf der Probenoberfläche sind, andere (chemische oder physikalische) Eigenschaften aufweisen als S.

[0021] Fig.B. Das Substrat (S) ist im Medium präsent und wird durch die Aktivität des Enzyms unlöslich. S wird im Medium aufgelöst und das Produkt P immobilisiert auf der Oberfläche durch chemische oder physikalische Interaktion.

[0022] Fig.C. Das Substrat ist im Medium präsent. Das lösliche Produkt P modifziert dann chemisch die auf der Oberfläche vorhandenen Moleküle D. Das Substrat ist im Medium präsent. Das lösliche Produkt P reagiert mit einem Cofaktor B, so dass ein Komplex PB entsteht. Der Komplex PB kann nun die Oberfläche physikalisch modifizieren, etwa indem er sich auf der Oberfläche anlagert (analog Schema A).

[0023] Fig.E. Das Substrat ist im Medium präsent. Das lösliche Produkt P reagiert mit einem Cofaktor B, so dass ein Komplex PB entsteht. Der Komplex PB kann nun die Oberfläche chemisch (analog Schema A) modifizieren.

[0024] Fig.F. Das Substrat ist im Medium präsent. Das lösliche Produkt P reagiert mit einem Cofaktor B, so dass eine Modifikation des Cofaktors zu B* erfolgt. Der modifizierte Kofaktor B* kann nun chemisch oder physikalisch die Oberfläche modifizieren.

[0025] Fig. 3: Das Enzym alkalische Phosphatase wurde an einer Rasterkraftmikroskopspitze fixiert. Das Substrat BCIP war präsent im umgebenden Medium.

[0026] Fig.A. Das Produkt der enzymatischen Reaktion bildet zusammen mit NBT einen nichtwasserlöslichen Komplex, der auf der Oberfläche ausfällt.

[0027] Fig.B und C.Durch langsames Annähern der Rasterkraftmikroskopspitze bis zum direkten Kontakt mit der Oberflächen können beliebige Merkmale auf der Oberfläche erzeugt werden.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0028] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Verfahren zur gezielten Beschichtung einer Sonde gemäß Anspruch 1 und ein lithografisches Verfahren zur Strukturierung einer Oberfläche eines Trägers gemäß Anspruch 11 unter Verwendung einer gezielt beschichteten Sonde, erhältlich nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei durch eine lokal begrenzte enzymatische Aktivität in unmittelbarer Nähe der Oberfläche, diese chemisch oder physikalisch modifiziert wird.

[0029] Wie vorstehend erwähnt und in den Beispielen erläutert, wird ein Verfahren zur Modifikation einer geeigneten Oberfläche mit Hilfe von biologischen oder biologisch abgeleiteten Enzymmolekülen bereitgestellt. Die Enzymmoleküle werden in die unmittelbare Nähe der Probe gebracht und modifizieren diese durch Materialablagerung, Materialentfernung oder Modifikation von Probenmolekülen. Die wesentlichen Merkmale des Verfahrens bestehen darin, dass

- eine geeignete Oberfläche direkt oder indirekt durch die chemische Aktivität eines Enzyms modifiziert wird; und
- das Enzym relativ zur Probe so positioniert wird, dass die Modifikation nur lokal stattfindet; siehe beispielsweise Fig. 3.

[0030] Der hauptsächliche Vorteil dieser Idee liegt in der Nutzung der chemischen Aktivität eines Enzyms aus der Vielzahl verfügbarer Enzyme, deren Eigenschaften sich das erfindungsgemäße Verfahren zunutze macht. Dies erlaubt die Schaffung einer Technologieplattform für viele verschiedene Anwendungen.

[0031] Das Verfahren zeichnet sich vorzugsweise dadurch aus, dass eine Auflösung von kleiner etwa 200 nm, vorzugsweise kleiner 100 nm, mehr noch bevorzugt kleiner 50 nm und insbesondere bevorzugt kleiner etwa 10 nm erhalten lassen.

[0032] Als Träger und Oberflächen kommen die in der Array- und Chip-Technologie üblichen Materialien in Betracht wie Glas, Gold sowie Kunststoffmembranen, die auch die Oberfläche selbst darstellen können. Geeignet sind insbesondere Metalle, z. B. Kupfer, Titan, Chrom, Gold und vor allem Platin. Üblicherweise ist die Trägeroberfläche derivatisiert. Glasoberflächen beispielsweise können mit Silanreagenzien behandelt werden wie Aminopropyltriethoxysilan (APTES), 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (MPTS), Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GPTS), Bis(hydroxyethyl)aminopropyltriethoxysilan (HE-APTS), Hydroxybutyramid-propyltriethoxysilan (HBPTES) und (Perfluorooctyloxy)propyltriethoxysilan (POPTS).

Vorzugweise werden Gold, Ni-NTA (Nitrilotriacetic acid), Avidin oder Biotinbeschichtete Träger aus Glas, Silizium, Siliziumoxid oder Siliziumnitrid verwendet.

[0033] Besonders bevorzugt sind mit Gold beschichtete Glasträger. Die Goldoberfläche kann beispielsweise durch verschieden funktionalisierte Alkanthiol-Monoschichten (SAMs = self assembled monolayers) wie Biotin, N-oxysuccinimidester, Epoxygruppen, Maleimidgruppen, Aminogruppen, und Oligo(ethylenglycol) beschichtet werden.

[0034] Für die Herstellung bzw. Modifizierung von Proteinchips können insbesondere weiche Träger wie PVDF, Nitrocellulose und Polystyrol verwendet werden.

[0035] Da auf Glasoberflächen eine Vielfalt von verschiedenen Molekültypen fixiert werden können, wird Glas in den erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt verwendet.

[0036] Als Oberflächen kommen insbesondere auch bereits mit Biomolekülen beladene Oberflächen in Betracht wie DNA-Chip-Formate, die auch kommerziell erhältlich sind. Die Herstellung von Arrays immobilisierter Biomoleküle, die ebenfalls im Sinne der vorliegenden Erfindung modifiziert werden können, sind beispieleweise in der deutschen Patentanmeldung DE 100 41 809 A1 beschrieben.

[0037] Aus der vorstehenden Erläuterung ergibt sich, dass ein Träger gleichzeitig auch die Oberfläche darstellen kann. Dementsprechend werden die Begriffe Träger und Oberfläche ggf. synonym verwendet.

[0038] Träger im Sinn der Anmeldung sind in der Regel Materialien mit starrer oder halbstarrer Oberfläche und in diesem Sinne als fest zu bezeichnen. Üblich sind planare Oberflächen. Die Form eines Trägers kann mannigfaltig sein und kann sich nach der Art der Verwendung richten. Es kann sich beispielsweise um Objektträger, Chips, Dipsticks, Stempel, Caps, Partikel, sphärische Körper, wie Kugeln oder Kügelchen, Membranen, Blätter, Scheiben, Folien oder Platten handeln. Auch Wafer-Formate können als Träger dienen, die gewünschtenfalls vereinzelbar sind. Die Träger können ferner mit weiteren zweckmässigen Bauteilen versehen sein, beispielsweise kann man Chips einkapseln.

[0039] Erfindungsgemäß beinhaltet der Begriff „Modifikation" insbesondere die hier beschriebenen Ausführungsformen wie Ablagerung, Entfernung oder tatsächliche Modifikation des Substrats. Die Modifikation der Oberfläche kann mit sehr hoher Auflösung durchgeführt werden, wobei letztendlich ein Enzymmolekül immer nur eine molekulare Modifikation an einer einzelnen Stelle durchführt. Die Modifikation der Oberfläche kann direkt durch die Aktivität des Enzyms erfolgen oder indirekt, so dass die enzymatischen Produkte selbst die Oberfläche modifizieren.

[0040] Wenn nicht anders angegeben, wird der Begriff Enzym im herkömmliche Sinne verwendet. Unter einem Enzym wird u.a. ein chemisch aktives Molekül verstanden, das ein Substratmolekül modifiziert und dabei eines oder mehrere Produktmoleküle produziert. Ein Enzym kann das Substratmolekül chemisch modifizieren, kann es in mehrere Untermoleküle aufspalten oder eine Kombination aus beidem ausführen. Die chemische Modifikation des Substratmoleküls wird direkt oder indirekt zu einer chemischen oder physikalischen Modifikation der Probe führen. Da diese Modifikation nur lokal stattfindet, wird dieser Vorgang erfindungsgemäß enzymgestützte Nanolithografie genannt.

[0041] Unter Effektormolekülen werden üblicherweise Stoffe verstanden, die sowohl die Enzymreaktion anregen oder hemmen können. Effektoren sind normalerweise nicht an der Reaktion selbst beteiligt, können diese nach dem Verständnis für die vorliegende Erfindung aber auslösen. Sie können je nach ihrer Wirkung auch als Aktivator oder Inhibitor bezeichnet werden.

[0042] Erfindungsgemäß werden unter dem Begriff „Effektormolekül" auch Cofaktoren wie NADPH verstanden, sowie allgemein Moleküle, die eine enzymatische Reaktion auslösen können, beispielsweise durch Bindung an das Enzym, wodurch dieses eine Aktivierung erfährt, d.h. enzymatisch aktiv wird. Dementsprechend kann das Effektormolekül ein Cofaktor, ein Substrat, ein Katalysator oder ebenfalls ein Enzym sein. Cofaktoren werden auch als Coenzyme bezeichnet.

[0043] In diesem Zusammenhang kommen als Effektormoleküle auch Vitamine als Bestandteile von Coenzymen in Betracht, beispielsweise Thiamin (Vitamin B1) bzw. Thiamindiphosphat als Coenzym der oxidativen Decarboxylierung, Riboflavin (Vitamin B2), das mit Nicotinsäure, Nicotinamid, Folsäure und Pantothensäure den B2-Komplex bildet, Pyridoxin (Vitamin B6), das bei Transaminierungen und Decarboxylierungen benötigt wird, Cobalamin (Vitamin B 12), das bei Isomerasen eine Rolle spielt, Ascorbinsäure (Vitamin C) als H-Donor bei Oxidoreduktasen, und Biotin (Vitamin H) als CO-Gruppenüberträger.

[0044] Im Falle der Verwendung von an einer Sonde immobilisierten Effektormolekülen werden im Verfahren bevorzugt allosterische Enzyme, beispielsweise im Medium auf der Oberfläche, verwendet, die zusätzlich zu ihrem katalytischen Zentrum noch Bindungsstellen besitzen, an denen das Effektormolekül reversibel binden kann.

[0045] Einige Punkte sind wesentlich für die Durchführung des Verfahrens. Beispielsweise müssen Enzym und Substrat in unmittelbare Nähe der Oberfläche gebracht (Abstand im Bereich von nm oder Zehntel-nm) und relativ zueinander positioniert werden. Dies kann dadurch erreicht werden, dass das Enzym oder ein Effektormolekül an eine Sonde immobilisiert wird.

[0046] Das Enzym oder Effektormolekül kann chemisch auf einem Kügelchen (Glas, Latex oder andere Materialien) oder an der Spitze eines Rastersondenmikroskops (Rastertunnelmikroskop, Rasterkraftmikroskop, SNOM oder andere) fixiert werden. Das Kügelchen oder die Spitze kann durch externe Kräfte positioniert werden, z.B. elektrische, magnetische, optische Steuerungskräfte (magnetic or optical traps) oder andere, oder durch ein Mikropositionierungsgerät (Piezo-Konverter, mikrotechnologisch hergestellte elektromechanische Wandler und so weiter) relativ zur Probe. Immobilisierung des Enzyms oder Effektormoleküls kann durch kovalente Bindung, durch chemische Bindung oder durch physikalische Adsorption erfolgen.

[0047] Kovalente Bindungen können beispielsweise erreicht werden mit Silan- oder Thiolchemie, chemische Bindungen könnten spezifische biologische Interaktionen wie die Ligand-Rezeptor-Interaktionen zum Einsatz bringen (z.B. Biotin-Streptavidin, Antikörper-Antigen und der gleichen). Physikalische Fixierung kann sich elektrostatischer Kräfte, Van-der-Waals-Kräfte, hydrophober Kräfte und dergleichen bedienen. Fixierung kann auch durch Kombination der oben beschriebenen Verfahren erreicht werden.

[0048] Demnach ist in einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Sonde ein Mikro- oder Nanopartikel und umfasst vorzugsweise Latex-, Glas-, Polystyrol- oder Silika-Kügelchen. Solche Kügelchen können beispielsweise mit Biotin oder Streptavidin beschichtet werden. Diese Kügelchen können mit einer sogenannten optischen Pinzette lokal positioniert werden. Diese Technik beruht auf sogenannten optische Fallen; siehe beispielsweise Ashkin 1970, 1997. Ein neuerer Typ einer dreidimensionalen Falle (single-beam gradient force trap) wurde in Ashkin, 1986, beschrieben.

[0049] Eine optische Pinzette beruht auf der Tatsache, dass kleine transparente dielektrische Objekte (mit $n_{Objekt} > n_{Umgebung}$) durch eine Kraft in den Fokus eines fokussierten Laserstrahls befördert werden; siehe beispielsweise Hegner, 2002. Als dielektrische Objekte kommen wie oben erwähnt Mikropartikel aus Polystyrol, Glas- oder Silikakügelchen in Betracht, die ihrerseits Träger für Biomoleküle, d.h. erfindungsgemäß Enzyme oder Effektormoleküle sein können. Der Aufbau einer optischen Einzelstrahl-Pinzette sowie von mechanischem Zubehör wie einer Flüssigkeitszelle und eines mechanischen Verstelltisches sind dem Fachmann bekannt. Dies gilt auch für Steuerungsprogramme, beispielsweise in LabView, um den Piezotisch relativ zur optischen Falle bewegen zu können und um die optische Falle zu kalibrieren; siehe beispielsweise die Diplomarbeit „Aufbau einer optischen Pinzette" von Andy Sischka, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld (Juni 2002).

[0050] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Sonde die Spitze eines Rastersondenmikroskops.

[0051] Allen Rastersondenmikroskopen gemeinsam ist die Notwendigkeit der präzisen Steuerung des Abstandes zwischen Sonde und Probenoberfläche und der lateralen Rasterbewegung mit einer Auflösung im Nanometerbereich und deutlich besser. Diese Bewegungspräzision lässt sich durch Piezoelemente realisieren. Diese bestehen aus Piezokeramik, die die Eigenschaft hat, dass sie sich bei angelegter Spannung kontrahiert oder elongiert.

[0052] Rastersondenmikroskope werden in vielen Fällen zur lokalen Oberflächenmodifikation verwendet. Die wohl bekanntesten Fälle sind das Kratzen oder Hämmern von Löchern in einen weichen Polymerfilm durch Rasterkraftmikroskopie (Wendel, Lorenz et al., 1995), die Dip-Pen-Technologie (Piper, Zhu et al., 1999), bei der eine an eine Spitze adsorbierte Tinte langsam auf eine Probe aufgebracht wird, oder die lokale Elektrooxidation einer leitenden Probe durch den Elektronenstrom in einem Rastertunnelmikroskop.

[0053] In einer neueren Veröffentlichung wurden Experimente beschreiben, bei denen ein an einer Rasterkraftmikroskopspitze fixiertes Enzym zur Modifikation einer geeigneten Oberfläche verwendet wurde. Hier wurde die spezifische Bindung des Substratmoleküls an das Enzymmolekül dazu benutzt, das Substrat aus der Probe zu entfernen (Takeda, Nakamura et al., 2003). Im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung wurde in diesen Experimenten allerdings nur die spezifische Enzym-Substrat-Bindung ausgenutzt und sozusagen das Substrat (Peptid) von der Oberfläche runter gebürstet. Im Gegensatz dazu beruht das erfindungsgemäße Verfahren auf der Nutzung der chemischen, d.h. enzymatischen Aktivität des Enzyms. Mit anderen Worten, das Produkt der chemischen Reaktion, die das Enzym beschleunigt, wird genutzt um die Zieloberfläche zu modifizieren.

[0054] Ein weiterer gravierender Unterschied gegenüber der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass bei dem von Takeda et al. verwendeten Kraftmikroskop keine gezielte Beschichtung der Spitzenoberfläche mit Enzym erfolgte und durch die Vielzahl von gebundenen Enzymmolekülen keine ausreichen-

de lokale Begrenzung der Enzymaktivität erreicht wurde. Ferner wurde von den Autoren auch nicht auf die Notwendigkeit einer lokalen Begrenzung der Enzymaktivität hingewiesen, geschweige denn Maßnahmen empfohlen, wie die zu erreichen sei.

[0055] Rastersondenmikroskope, die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden können, umfassen das Rastertunnelmikroskop (STM), Scanning Near – field Optical Mikroskop (SNOM), und besonders bevorzugt das Rasterkraftmikroskop (AFM), das für die in den Beispielen beschriebenen Experimente verwendet wurde.

[0056] Beim AFM tastet eine Sonde die atomare Hügellandschaft des zu untersuchenden Probeobjektes ab. Die Sonde besteht aus einer Spitze, die aus wenigen Atomen gebildet wird (im Idealfall sitzt an der Spitze der Spitze ein einziges Atom), die an einem beweglichen dünnen "Balken" montiert ist.

[0057] Fährt man mit dieser feinen Spitze an die Oberfläche heran, so wirkt in erster Näherung ein Lennard-Jones-Potenzial zwischen dem vordersten Atom der Spitze und dem Oberflächenatom, d.h., abstandsabhängig wirkt auf die Spitze in einem größeren Abstand zuerst eine anziehende und dann eine abstoßende Kraft. Beim Abtasten der Oberfläche wird die Kraft der Spitze konstant gehalten. Die dadurch veränderte Biegung des "Balkens" wird mit einem Sensor registriert. Als Sensor kann ein Rasterkraftmikroskop, üblicherweise jedoch ein abgelenkter Laserstrahl verwendet werden. Rastersondenmikroskope sind dem Fachmann bekannt. Neuere Entwicklungen dazu sind beispielsweise in der europäischen Patentanmeldung EP 0 896 201 A1 beschrieben.

[0058] Wie in den Abbildungen der Fig. 2 gezeigt, kann das Substratmolekül, das vom Enzym chemisch modifiziert wird, an der Oberfläche oder im umgebenden Medium präsent sein. In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Substrat des Enzyms auf der Oberfläche immobilisiert. In einer alternativen Ausführungsform liegt das Substrat in einem Medium auf der Oberfläche vor. Es ist aber auch möglich, beide Ausführungsformen ggf. mit unterschiedlicher Gewichtung zu kombinieren.

[0059] Üblicher Weise ist das Substratmolekül im umgebenden Medium präsent, um eine konstante Menge an verfügbarem Substrat zu gewährleisten. Zur Entfernung von Material aus der Oberfläche wird vorzugsweise das Substrat auf der Probe präsentiert, und das Enzym kann Teile des Substratmoleküls abspalten (z.B. Lysozym kann Teil eines fixierten Polysaccharids abspalten). Andere Ausführungsformen sind allerdings auch akzeptabel. Zum Beispiel kann Glukoseoxidase lokal Wasserstoffperoxid produzieren, welches dann eine geeignete Oberfläche chemisch modifiziert.

[0060] Wie vorstehend erwähnt, kann das Enzym im Verfahren in einem Medium auf der Oberfläche vorliegen, insbesondere dann, wenn das Effektormolekül auf der Sonde gebunden ist.

[0061] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist das Enzym auf dem Apex der Spitze gebunden; siehe auch die Beispiele.

[0062] Wie bereits vorstehend erwähnt, ist es wichtig, dass die enzymatische Aktivität lokal und ggf. zeitlich begrenzt wird. Beispielsweise kann die Aktivität des Enzymmoleküls über eine externe Steuerung an- und ausgeschaltet werden. In dieser Ausführungsform kann, wenn auch weniger bevorzugt, die gesamte Sonde, beispielsweise die gesamte Rasterkraftmikroskopspitze mit Enzym oder Effektormolekülen beschichtet sein, wobei die Aktivität des Enzyms an der Oberfläche durch ein externes Signal gesteuert wird. Ein geeignetes externes Signal kann beispielsweise durch ein elektrisches oder magnetisches Feld, Oberflächenladung, pH-Änderung, Ionengradienten oder optisches Signal vermittelt werden; siehe auch die vorstehenden Ausführungen zur optischen Pinzette oben.

[0063] Somit ist jedes Signal geeignet, mit dem erreicht werden kann, dass nur Enzymmoleküle in der unmittelbaren Nähe der zu modifizierenden Probe aktiv sind. Eine mögliche Vorgehensweise ist, diese aktivierenden Bedingungen nur in der Nähe der Oberfläche zu schaffen. Beispielsweise kann ein photoaktivierbares Enzymmolekül durch das evaneszente Feld einer totalen internen Lichtreflexion an der Probe/Medium-Grenzlinie aktiviert werden. In einer anderen Ausführungsform kann durch lokale Oberflächenladungen (oder Oberflächenpotenzial) ein Oberflächen-pH-Wert geschaffen werden, der sich vom pH-Wert im Medium unterscheidet. Da die meisten Enzyme eine pH-abhängige Aktivität aufweisen, kann dieses Verfahren derart angepasst werden, dass das Enzym nur in der Nähe der Probenoberfläche aktiv ist. Ein einfacher Weg zur An- und Ausschaltung der Aktivität des Enzyms liegt beispielsweise in einer Verfügbarkeit oder Nicht-Verfügbarkeit des Substrats. Dies kann einfach durch ein im Medium gelöstes Substrat, das durch ein Medium ohne Substrat ersetzt werden kann, erreicht werden. Allerdings kann die Aktivität des Enzyms auch durch externe Reize modifiziert werden (elektrische oder magnetische Felder, Bestrahlung mit Licht oder elektromagnetischen Wellen, Temperatur, pH-Wert). Dasselbe gilt für die Aktivität des Substrats oder für molekulare Gruppen, die auf der Oberfläche modifiziert werden sollen. Eine standardisierte Vorgehensweise, um das Substrat nach einem externen Reiz verfügbar zu machen, ist die Verwendung von vorübergehend inaktiven Verbindungen, die durch die Bestrahlung

mit Licht aktiviert werden (beispielsweise "caged compounds" wie caged-ATP, caged-CA, etc.).

[0064] Alternativ, oder zusätzlich, kann die lokale Aktivität des Enzyms in der Nähe der Oberfläche dadurch erreicht werden, dass die Sonde nur an einer bestimmten Stelle, im Falle der Raster- kraftmikroskopspitze nur am vordersten Ende, mit aktiven Enzym- oder Effektormolekülen beschichtet wird siehe beispielsweise Fig. 1. Dementsprechend ist bevorzugt, dass lediglich der Apex der Sondenspitze mit Enzym oder Effektormolekülen versehen ist. Besonders bevorzugt trägt der Apex der Sondenspitze lediglich ein Enzym oder Effektormolekül.

[0065] Wie vorstehend bereits erwähnt, beruht die Strukturierung, d.h. Modifikation einer Oberfläche auf der enzymatischen Aktivität eines Enzyms, d.h. ein Enzymmolekül transformiert ein Substratmolekül S in ein Produktmolekül P. Um diese chemische Reaktion zur Oberflächenmodifikation nutzbar zu machen, sind mehrere Konzepte vorstellbar; siehe beispielhaft die Abbildungen in Fig. 2.

[0066] In einer Ausführungsform des Verfahrens resultiert die Modifikation der Oberfläche aus der Präzipitation eines Produkts der enzymatischen Reaktion, während in einer anderen Ausführungsform die Modifikation der Oberfläche aus der Modifikation des Substrats auf der Oberfläche resultiert.

[0067] Es ist offensichtlich, dass weitere Reaktionsschemata verwendet werden können. Der gemeinsame Grundgedanke ist, dass eine lokale enzymatische Reaktion in ihrer Nähe eine Probenoberfläche durch Hinzufügen von Molekülen oder durch Entfernen oder Modifikation von Molekülen auf der Probenoberfläche modifiziert. Dies kann direkt vom Enzym durchgeführt werden oder indirekt vom Produkt der enzymatischen Reaktion. Das Enzym oder das aktive Produkt können zusätzliche Coenzyme oder Helfermoleküle zur Erfüllung dieser Aufgabe benötigen.

[0068] Für das Verfahren sind grundsätzlich alle Arten von Enzymen verwendbar, wie Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen. In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Enzym ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Oxidoreductasen, Glucoseoxidasen, Transferasen, Kinasen, Hydrolasen, Carbonsäureesterhydrolasen, Lipasen, Ribonucleasen, Hyaluronidasen, Invertasen, Amylasen, Beta-Galactosidasen, Proteinasen und Polymerasen. Besonders bevorzugt werden das Enzym alkalische Phosphatase, Glucoseoxidase, DNA oder RNA-Polymerase, oder ein katalytischer Antikörper verwendet.

[0069] Die Substrate und ggf. notwendigen Cofaktoren von Enzymen sind dem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise Nukleotide, Aminosäuren, oder Vorstufen zu Farbstoffen, insbesondere dann, wenn es sich um metabolisierende Enzyme, d.h. Produkt „aufbauende" Enzyme handelt. Im Falle von anabolischen Reaktionen kann das Substrat beispielsweise Nukleinsäuren, Peptide, Polypeptide, Zucker, oder Farbstoffe umfassen.

[0070] Beispielhaft seien folgende enzymatische Reaktionen genannt:
Die Oberfläche ist mit Phospholipid beschichtet. Das Enzym Phospholipase spaltet das Phospholipid in zwei separate Moleküle, die löslich werden und von der Oberfläche entfernt werden.

[0071] Das Enzym alkalische Phosphatase dephosphoryliert p-Nitrophenylphosphate, und das Produkt bindet auf Grund von elektrostatischen Interaktionen an eine geladene Oberfläche.

[0072] Das Enzym Glukoseoxidase oxidiert Glukose und produziert Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid oxidiert geeignete Moleküle auf der Oberfläche.

[0073] Das Enzym alkalische Phosphatase dephosphoryliert das Substrat BCIP/NBT, das Produkt wird unlöslich und fällt auf einer geeigneten Oberfläche aus; siehe auch die Beispiele.

[0074] Wie vorstehend beschrieben, kann das Enzymmolekül durch die in der Biotechnologie verfügbaren Toolkits chemisch gebunden werden. Im nachfolgenden Beispiel wurde beispielsweise ein Phosphatasemolekül verwendet, an das ein Streptavidinmolekül kovalent gebunden war. Streptavidin weist vier Bindungsgruppen für Biotin auf. Die Rasterkraftmikroskopspitze wurde kovalent mit einem biotinilierten Silan beschichtet. Nach einem erfindungsgemäßen Verfahren führte das Eintauchen der Rasterkraftmikroskopspitze in eine Streptavidin-Enzym-Komplex-Lösung dazu, dass die Rasterkraftmikroskopspitze ausschließlich am vordersten Ende der Spitze mit Enzymmolekülen beschichtet war; siehe Beispiel 1 und Fig. 1.

[0075] Gemäß einem der vorstehend beschriebenen Verfahren sind Träger erhältlich, die, wie vorstehend beschrieben und in den Beispielen gezeigt, im Nanometerbereich genau strukturiert sind.

[0076] Ferner sind Vorrichtungen erhältlich, die diese Träger enthalten. Entsprechende Vorrichtungen umfassen Chips, Microarrays, diagnostische Vorrichtungen, Biosensoren oder Nanoreaktoren. Diese Träger bzw. deren Oberflächen können natürlich je nach beabsichtigter Anwendung weiter modifiziert werden, beispielsweise in Gehäuse eingebaut werden und/oder mit konventionellen Verfahren mit Molekülen, beispielsweise Biomolekülen, beladen werden.

Bevorzugt umfassen die vorgenannten Vorrichtungen einen DNA- oder Protein-Chip. Sogenannte Genchips können beispielsweise für forensische Anwendungen genutzt werden. Ferner ist es beispielsweise mit dem Verfahren möglich, sogenannte PISA (Protein in situ Arrays) herzustellen, die heutzutage lediglich in der konventionellen Multiwell-Größenordnung verwendet werden können.

[0077] Wie bereits vorstehend beschrieben, wird in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Sonde verwendet, bei der nur eine kleine kontrollierte Fläche, beispielsweise nur der vorderste Teil einer Rasterkraftmikroskopspitze oder der Tangentialbereich eines Kügelchens mit Enzym- oder Effektormolekülen beschichtet ist, um eine Auflösung im Nanometerbereich zu erreichen. Dies kann nicht mit Standardtechniken wie Pipettieren oder Maskierung und dergleichen erreicht werden.

[0078] Erfindungsgemäß wurde ein neues Verfahren gefunden, wie man Enzyme oder Effektormoleküle von einem flachen Träger sammeln kann durch Inkontaktbringen der Sonde mit diesem Träger; siehe auch Beispiel 1. In einem zweiten Schritt wird die Sonde dann zu der zu modifizierenden Probenoberfläche bewegt.

[0079] Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur gezielten Beschichtung einer Sonde mit Enzym oder Effektormolekülen, umfassend das Inkontaktbringen der Sonde mit einem flachen Träger, auf dem Enzyme oder Effektormoleküle mittels eines polyvalenten Bindungspartners A an einen Bindungspartner B auf dem Träger gebunden sind, wobei zumindest ein Teil der Sonde die gleichen Bindungspartner B aufweist.

[0080] Grundsätzlich kann jedwede Sonde wie bereits vorstehend beschrieben verwendet werden. Besonders bevorzugt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist, dass lediglich der Apex der Sondenspitze beschichtet wird. Dabei ist natürlich ganz besonders bevorzugt, dass die Sonde mit lediglich einem einzigen Enzym oder Effektormolekül belegt wird.

[0081] Üblicherweise werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren Bindungspartner A mit jeweils mindestens zwei freien Bindungsstellen für Bindungspartner B verwendet. Typische Bindungspartner sind dabei Streptavidin und Biotin oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente sowie entsprechende Antigene.

[0082] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Sonden, die gemäß einem der vorstehend beschriebenen Verfahren erhältlich sind, bevorzugt dabei Sonden von Rastersondenmikroskopen. Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung auch Rastersondenmikroskope, die eine erfindungsgemäße Sonde enthalten. Erfindungsgemäße Sonden, insbesondere solche, die nur ein Enzym oder Effektormoleküle aufweisen, können beispielsweise auch in der Zellbiologie eingesetzt werden, z.B. zur Untersuchung der Aktivität von Enzymen oder anderen Molekülen auf der Membran von Zellen.

[0083] Wie bereits aus dem Stand der Technik ersichtlich, ergeben sich für die erfindungsgemäßen Verfahren, Träger bzw. Oberflächen, Vorrichtungen, Sonden und Rastersondenmikroskope eine Fülle von Einsatzmöglichkeiten und Verwendungen, beispielsweise zur Herstellung von Nanochips oder Microarrays, um nur zwei zu nennen. Weiterhin seien beispielhaft folgende Anwendungen genannt:
Diagnostik, Therapiewahl und Therapiekontrolle von Tumor- und Stoffwechselerkrankungen;
Untersuchung der genetischen Prädisposition (SNPs), insbesondere die Detektion von Mutationen, auch im forensischen Bereich; Genexpressionskontrolle; Sequenzierung, insbesondere Sequenzierung durch Hybridisierung; mikrobiologische Anwendungen wie in Bakteriologie und Virologie, beispielsweise zur Differenzierung verschiedener Stämme; ELISA-Anwendungen mit immobilisierten Antikörpern, Antigenen, Rezeptoren und Liganden in der klinischen Chemie bis hin zur Lebensmittelchemie und Umweltanalytik; Allergiediagnostik mit immobilisierten Allergene; High Throughput Screening von Substanzbibliotheken; Informations- und Kommunikationstechnik; und dergleichen mehr.

[0084] Die erfindungsgemäßen Verfahren, Träger bzw. Oberflächen, Vorrichtungen, Sonden und Rastersondenmikroskope können insbesondere zur Speicherung und/oder Analyse von Daten, Zellmanipulation, oder zur Durchführung von Mess- oder Untersuchungsverfahren verwendet werden. Ferner kommen der Einsatz in jüngster Techniken wie bioMEMS (siehe dazu beispielsweise „Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization", Second Edition, Marc J Madou, University of California, Irvine, California, USA, (2002) ISBN: 0849308267), uTAS (siehe dazu beispielsweise das „uTAS Virtual Journal", das ausschließlich in elektronischem Format verfügbar ist und Mikro-Total-Analyse Systeme (uTAS) zum Gegenstand hat, und über die Internetseite des Verlags ELSEVIER einsehbar ist).

[0085] Die vorliegende Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen erläutert.

BEISPIELE

Beispiel 1: Gezielte Beschichtung einer Sonde eines Rasterkraftmikroskops.

[0086] Zur ausschließlichen Beschichtung nur des vordersten Endes der Rasterkraftmikroskopspitze präparierten wir eine flache Probe, die ebenfalls mit

biotiniliertem Silan beschichtet war. Zu dieser Probe fügten wir Enzym hinzu, so dass die Probe beschichtet war. Bei Inkontaktbringen der biotinilierten Rasterkraftmikroskopspitze mit dieser Probe können die Biotingruppen am vordersten Ende der Rasterkraftmikroskopspitze wegen der Polyvalenz von Streptavidin auch an Streptavidinmoleküle binden. Auf Grund geometrischer Beschränkungen ist es tatsächlich vorstellbar, dass Streptavidin an maximal zwei Biotingruppen an der Oberfläche bindet und folglich die beiden anderen Bindungsstellen der Rasterkraftmikroskopspitze zugewandt sein müssen.

[0087] Die Immobilisierung von streptavidinisierten Proteinen am Apex einer Rastersondenspitze und Vorbereitung einer geeigneten Oberfläche kann beispielsweise wie folgt vorgenommen werden:

Reinigung

1. Reinigung der Oberfläcµhe eines Stücks oxidierten Silizium Wafers (CrysTec S3012) in einer Mischung von konz. Schwefelsäure (Riedel de Haen – C8029) und 30 prozentiger Wasserstoffperoxidlösung (Merck 8.22287.1000) (Verhältnis 3:1) im Ultraschallbad für 15 min.
2. Spülen des Wafers mit deionisiertem Wasser (MilliPore® Qualität).
3. Bestrahlen einer AFM-Spitze (Veeco Nanoprobe NP-STT) mit UV-Licht zum Aufbrechen organischer Verschmutzungen auf der Oberfläche.

Silanisierung

4. Ansetzen einer Mischung aus:
– 9 ml Methanol p.A. (Riedel de Haen – 32213)
– 80 µl (mikroliter) konz. Essigsäure (Fluka 45731)
– 370 µl deionisiertem Wasser
– 230 µl N-2-aminoethyl-3-aminopropyltrimethoxysilan (Merck 8.19172.0100)
5. Einlegen des Wafers und der AFM-Spitze in diese Mischung für 30 min.
6. Herausnehmen und zweifaches Waschen des Wafers und der AFM-Spitze in Methanol.
7. Trocknen des Wafers und der AFM-Spitze mit Stickstoffgas.
8. Erhitzen des Wafers und der AFM-Spitze in einem Ofen bei 120°C für 3 min.

Ausbringen des Biotin-Linkers

9. Ansetzen einer Lösung von
– 4 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (Fluka 41640)
– 1 µg (mikrogramm) biotin-N-hydroxysuccinimid-ester (NHS-Biotin) (Sigma H1759) 10. Einlegen des Wafers und der AFM-Spitze in diese Mischung für 2 h.
11. Herausnehmen und zweifaches Waschen des Wafers und der AFM-Spitze in Ethanol (Riedel de Haen 32205).
12. Trocknen des Wafers und der AFM-Spitze mit Stickstoffgas.

Immobilisierung streptavidinisierter alkaliner Phosphatasen auf der Wafer-Oberfläche

13. Der biotinisierte Wafer wird in einer 0.2 nmol Lösung von alkaliner Phosphatase (Sigma 52890) für 10 min inkubiert.
14. Spülen mit deionisiertem Wasser.
15. Inkubieren in einer 5 mmol Lösung von p-Nitrophenylphosphat (pNNP) (Sigma N4665) in 40 mmol TRIS Puffer p.A. (Roth 4855.2) und 1 mmol Magnesiumchlorid (Sigma M2670) für 10 min auf einem Rührtisch.
16. Spülen mit deionisiertem Wasser.

Immnobilisierung streptavidinisierter alkaliner Phosphatasen auf der AFM-Spitze

17. Einbau der biotinisierten AFM-Spitze und des präparierten Wafers in ein Rasterkraftmikroskop.
18. Annähern der AFM-Spitze an die Oberfläche des Wafers.
19. Langsames Bewegen der AFM-Spitze über die Oberfläche ~100 nm/s) über eine Strecke von ~50 µm. Hierbei binden sich einzelne streptavidinisierte alkaline Phosphatasen an die AFM-Spitze.

[0088] Da dasselbe Streptavidinmolekül nun an den Träger und die Spitze gebunden ist, ist es bei Abziehen der Spitze zu 50% wahrscheinlich, dass Streptavidin an die Spitze gebunden bleiben wird. Da das Enzym kovalent and Streptavidin gebunden ist, werden wir folglich aktives Enzym an unserer Rasterkraftmikroskopspitze ansammeln. Wegen der Größe der Moleküle und der in dieses Konzept involvierten Zwischenräume ist es möglich, nur das vorderste Ende der Rasterkraftmikroskopspitze zu beschichten. Wir können abschätzen, dass maximal die vordersten 10 nm der Rasterkraftmikroskopspitze beschichtet sein dürften.

Beispiel 2: Strukturierung einer Oberfläche mit der Rasterkraftmikroskopspitze aus Beispiel 1.

[0089] Zur Erzeugung der in den Fig. 3B und Fig. 3C gezeigten Strukturen wurde die, nach der oben beschriebenen Prozedur, funktionalisierte AFM-Spitze in ein AFM eingebaut (Asylum Research MFP 3D). Als zu strukturierende Oberfläche kam Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar) zum Einsatz.

[0090] Als umgebenes Medium wurde 40 mM TRIS Puffer (Roth 4855.2) mit 1mM Magnesiumchlorid (Sigma M2670) genutzt, der im Verhältnis 1:1 mit dem Substrat BCIP/NBT (Sigma 6404) gemischt ist.

[0091] Die an der Spitze immobilisierte alkaline

Phosphatase (Sigma 52890) setzt dabei das in Lösung befindliche Substrat so um, dass es unlöslich wird. Zum Erzeugen der Punktstruktur (Fig. 3C) wurde die AFM-Spitze für jeden Punkt für 20 s mit der Glimmeroberfäche in Kontakt gebracht. Nach dem "Schreiben" wurde derselbe Bereich im Tapping-Modus abgebildet. Zum Erzeugen der zusammenhängenden L-förmigen Struktur (Fig. 3B) wurde die AFM-Spitze in Kontakt gebracht und mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/s bewegt. Dieser Bereich wurde anschließend ebenfalls im Tapping-Modus abgebildet.

Literatur

Ashkin, A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. Phys. Rev. Lett. 24, Seite 156-159, (1970).
Ashkin, A. Trapping of atoms by resonace radiation pressure. Phys. Rev. Lett. 40, Seite 729-732, (1978).
Ashkin, A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu, Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. Opt. Lett. 11, Seite 288-290, (1986).
Ashkin, A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. Biophys. J. 61, Seite 569-582, (1992).
Ashkin, A. Optical Trapping and manipulating of neutral particles using lasers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, Seite 4853-4860, (1997).
Grandbois, M., H. Clausen-Schaumann, et al. (1998). "Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2." Biophys. J. 74: 2398-2404.
Hegner, M. Optics: the light fantastic. Nature (England), Sep 12 2002, 419(6903) p125-7
Ionescu, R. E., R. S. Marks, et al. (2003). "Nanolithography using protease etching of protein surfaces." Nanoletters 3(12): 1639-1642.
Piner, R. D., J. Zhu, et al. (1999). ""Dip-Pen" Nanolithography." Science 283: 661-663.
Takeda, S., C. Nakamura, et al. (2003). "Lithographing of biomolecules on a substrate using an enzyme-immobilized AFM tip." Nanoletters 3(11): 1471-1474.
Wendel, M., H. Lorenz, et al. (1995). "Sharpened electron beam deposited tips for high resolution atomic force microscope lithography and imaging." Appl. Phys. Lett. 67(25): 3732-3734.

Patentansprüche

1. Verfahren zur gezielten Beschichtung einer Sonde mit Enzym oder Effektormolekülen, umfassend das Inkontaktbringen der Sonde mit einem flachen Träger, auf dem Enzyme oder Effektormoleküle mittels eines polyvalenten Bindungspartners A an einen Bindungspartner B auf dem Träger gebunden sind, wobei zumindest ein Teil der Sonde die gleichen Bindungspartner B aufweist, und wobei das Molekül, das aus dem Enzym oder Effektormolekül und dem polyvalenten Bindungspartner A besteht, im nicht an den Bindungspartner B gebundenen Zustand mindestens zwei freie Bindungsstellen für den Bindungspartner B aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sonde ein Mikro- oder Nanopartikel ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Mikro- oder Nanopartikel Latex-, Glas- oder Silika-Kügelchen umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Sonde die Spitze eines Rastersondenmikroskops ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Rastersondenmikroskop ein Rastertunnelmikroskop oder Rasterkraftmikroskop ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem lediglich der Apex der Sondenspitze beschichtet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Bindungspartner A Streptavidin und Bindungspartner B Biotin ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Sonde mit lediglich einem Enzym oder Effektormolekül belegt wird.

9. Sonde, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis B.

10. Lithographisches Verfahren zur Strukturierung einer Oberfläche eines Trägers, wobei durch eine lokal begrenzte enzymatische Aktivität in unmittelbarer Nähe der Oberfläche, diese chemisch oder physikalisch modifiziert wird und ein an einer Sonde gemäß Anspruch 9 immobilisiertes Enzym oder Effektormolekül in die unmittelbare Nähe der Oberfläche positioniert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Substrat des Enzyms auf der Oberfläche immobilisiert ist.

12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Substrat in einem Medium auf der Oberfläche vorliegt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Enzym in einem Medium auf der Oberfläche vorliegt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Enzym auf dem Apex der Sondenspitze gebunden ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei das Effektormolekül ein Cofaktor, ein Sub-

strat, ein Enzym oder ein Katalysator ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, wobei die Aktivität des Enzyms an der Oberfläche durch ein externes Signal gesteuert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das externe Signal durch ein elektrisches oder magnetisches Feld, Oberflächenladung, pH-Änderung, Ionengradienten, oder optisches Signal vermittelt wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei lediglich der Apex der Sondenspitze mit Enzym oder Effektormolekülen versehen ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei der Apex der Sondenspitze lediglich ein einziges Enzym oder Effektormolekül trägt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 19, wobei die Modifikation der Oberfläche aus der Präzipitation eines Produkts der enzymatischen Reaktion resultiert.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 20, wobei die Modifikation der Oberfläche aus der Modifikation des Substrats auf der Oberfläche resultiert.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 21, wobei das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Oxidoreductasen, Glucoseoxidasen, Transferasen, Kinasen, Hydrolasen, Carbonsäureesterhydrolasen, Lipasen, Ribonucleasen, Hyaluronidasen, Invertasen, Amylasen, beta-Galactosidasen, Proteinasen und Polymerasen.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 22, wobei das Enzym alkalische Phosphatase, Glucoseoxidase, DNA oder RNA-Polymerase, oder ein katalytischer Antikörper ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 23, wobei das Substrat Nukleotide, Aminosäuren, oder Vorstufen zu Farbstoffen umfasst.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 23, wobei das Substrat Nukleinsäuren, Peptide, Polypeptide, Zucker, oder Farbstoffe umfasst.

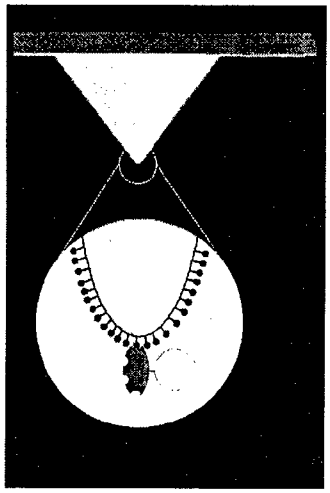
26. Rastersondenmikroskop, enthaltend eine Sonde nach Anspruch 9.

27. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 10 bis 25, einer Sonde nach Anspruch 9 oder eines Rastersondenmikroskops nach Anspruch 26 zur Herstellung von Nanochips oder Microarrays, zur Speicherung und/oder Analyse von Daten, Zellmanipulation, oder zur Durchführung von Mess- oder Untersuchungsverfahren.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

A



B

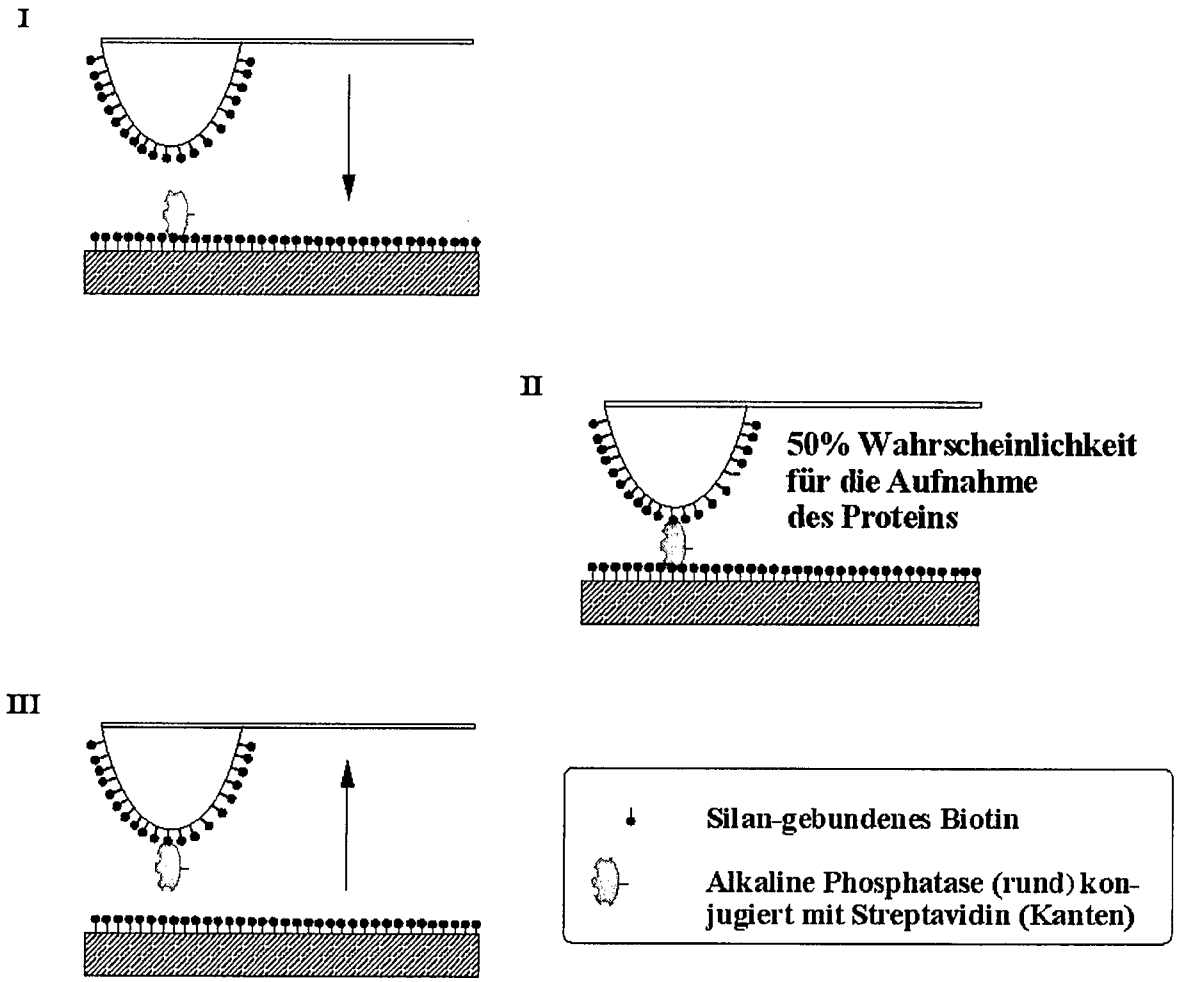
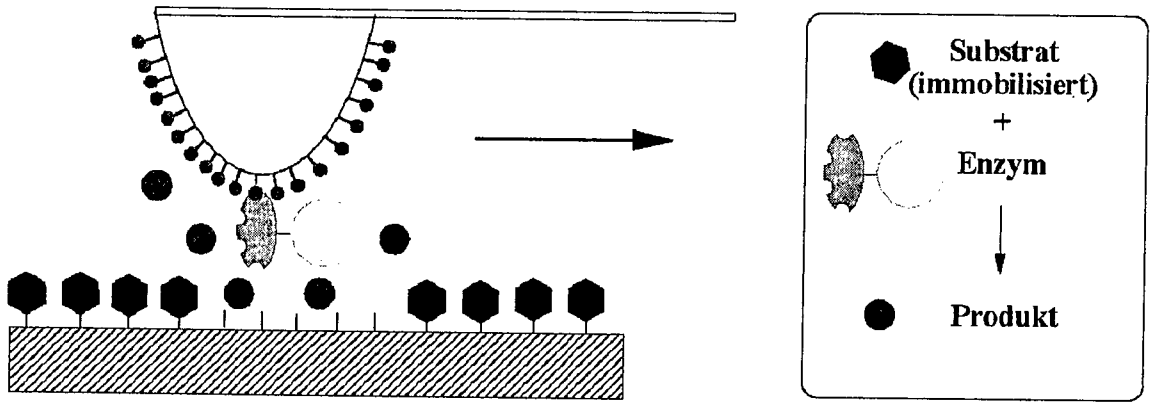


Fig. 1

A


Substrat
(immobilisiert)
+
Enzym
Produkt

B

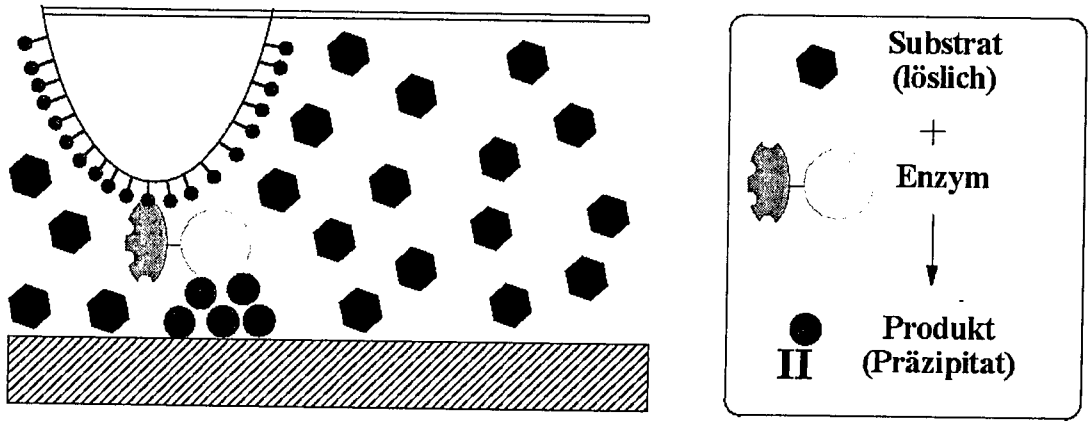
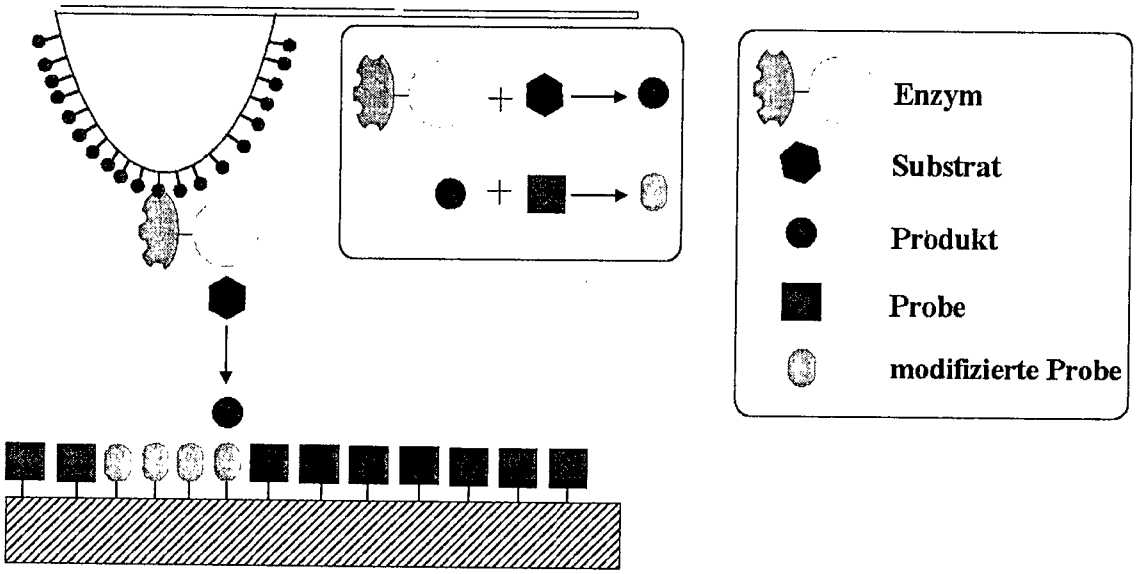

Substrat
(löslich)
+
Enzym
II
Produkt
(Präzipitat)

Fig. 2

C



D

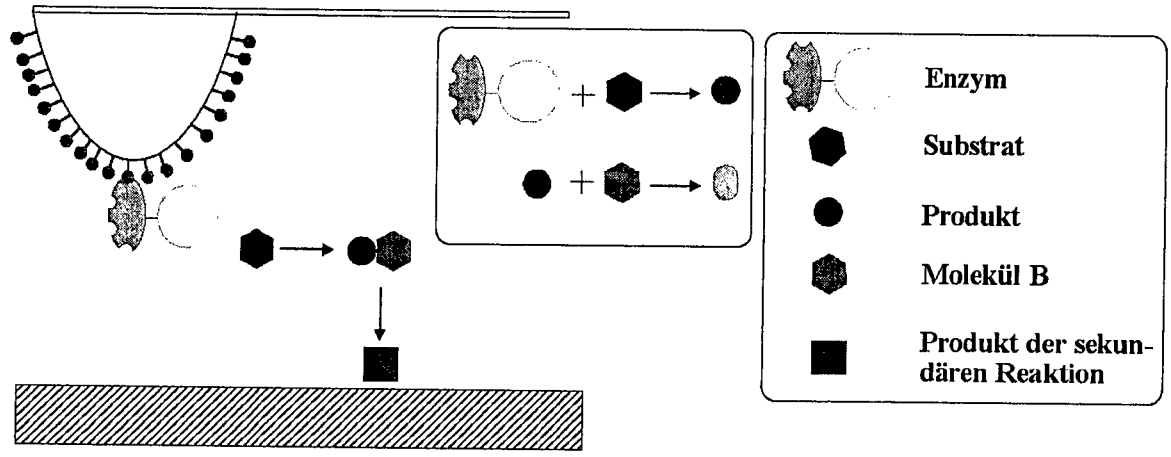
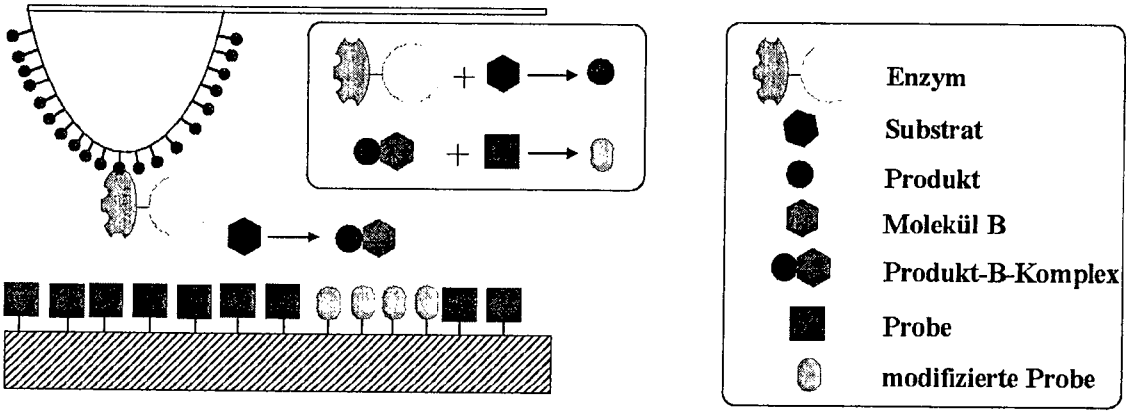


Fig. 2 (Fortsetzung)

E



F

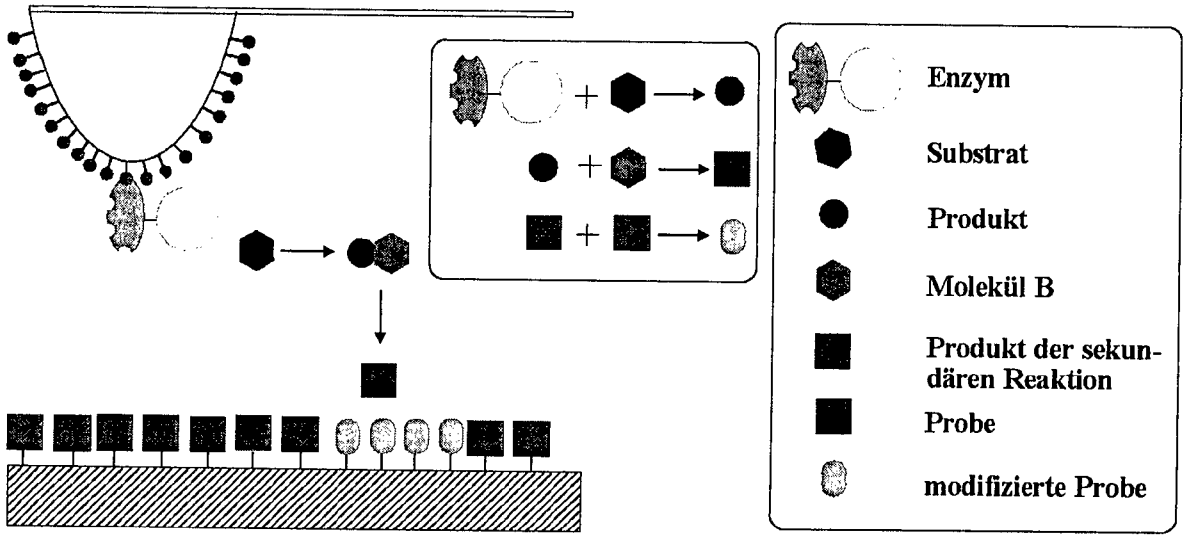


Fig. 2 (Fortsetzung)

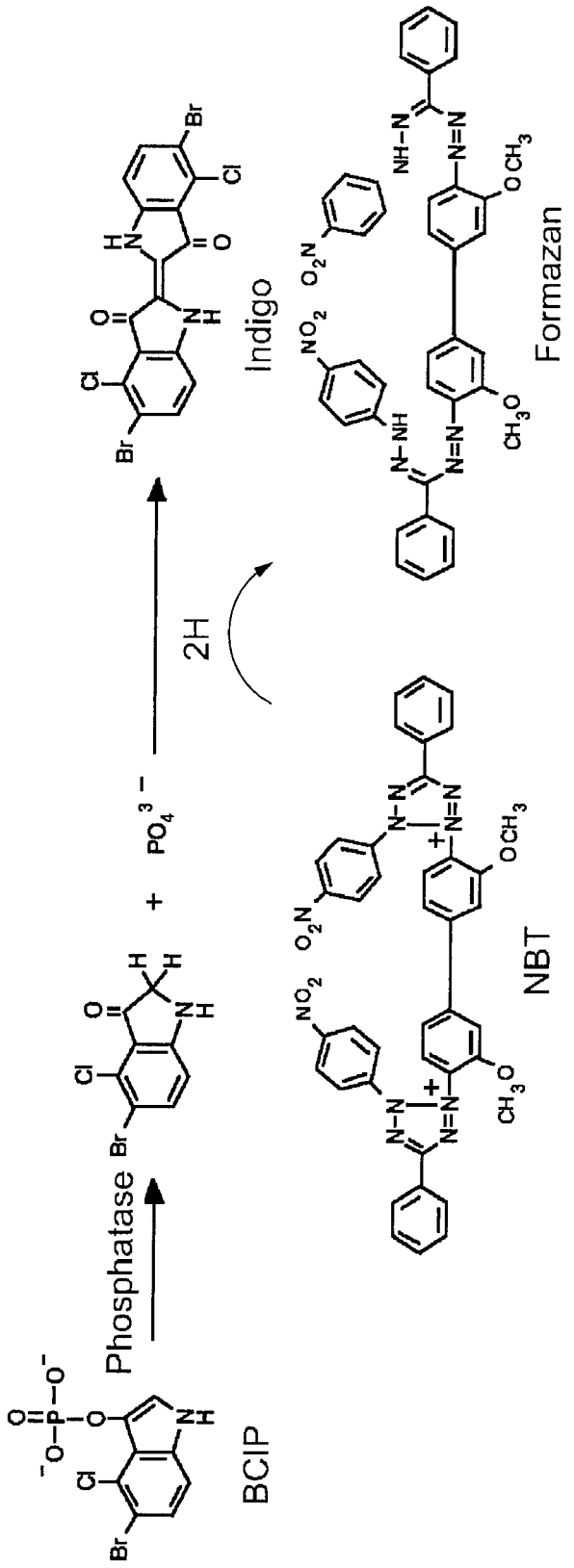


Fig. 3

B

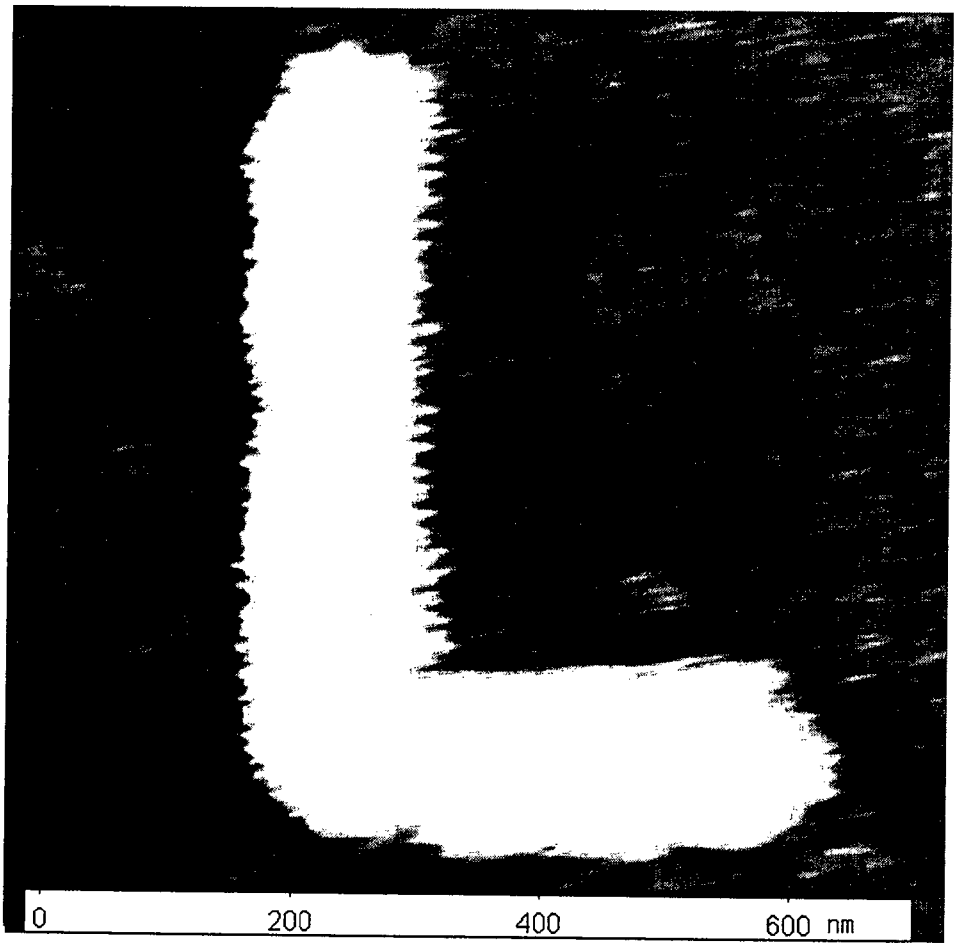


Fig. 3 (Fortsetzung)

C

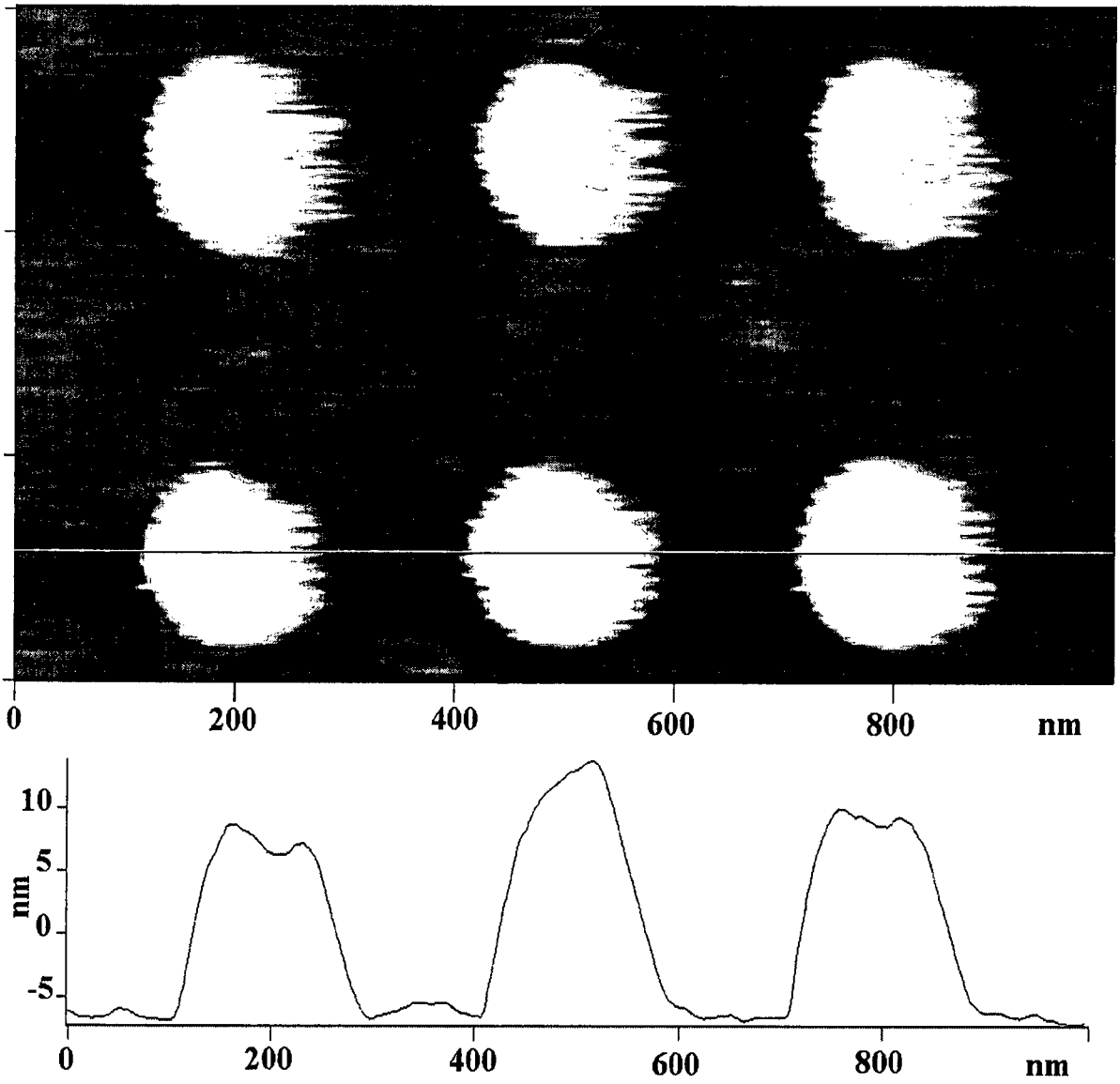


Fig. 3 (Fortsetzung)