



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 29 089 T2** 2005.12.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 874 242 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 29 089.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 303 019.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **20.04.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.10.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **23.02.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 33/551**

G01N 33/552, G01N 33/547, G01N 33/543,

G01N 33/94, G01N 33/76

(30) Unionspriorität:

97302707 21.04.1997 EP

(73) Patentinhaber:

Radox Laboratories Ltd., Crumlin, Antrim, GB

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Fitzgerald, Stephen Peter, Crumlin, IE; Lamont,
John Victor, Crumlin, IE; McConnell, Robert Ivan,
Crumlin, IE; Benchikh, El Ouard, Crumlin, IE**

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung und Apparat zur gleichzeitigen Detektion von mehreren Analyten**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Gerät zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Analyte.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Herkömmlich wurden strukturell unterschiedliche Analyte mittels spezieller Verfahren, z.B. mittels Enzymimmunoassay, Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, Gaschromatographie, enzymatischen und kolorimetrischen Verfahren analysiert. Bei diesen Verfahren handelt es sich vorwiegend um Ein-Analyt-Ein-Test-Verfahren.

[0003] Die Automatisierung analytischer Verfahren war generell auf Batch und Random Access Analyzer gerichtet, bei denen auf einzelne Testproben eine Mehrfachanalyse unter Verwendung aufeinanderfolgender individueller Testverfahren angewandt wird. Dies erfordert die Verwendung mehrerer Packungen individueller Testkits. Darüber hinaus erfordert die Analyse die Anwendung mehrerer Gerätetypen, z.B. klinisch-chemischer Analyzer, HPLC, GCMS, automatischer Immunoassay-Geräte oder Atomabsorptionsgeräte.

[0004] Ein Multianalysystem sollte ein Mittel umfassen, das die gleichzeitige Analyse mehrerer Analyte in einer Testprobe gewährleistet. Diese Analyse sollte Ergebnisse liefern, die einzelne Analyte identifizieren und die Quantifizierung jedes einzelnen Analyten in dieser Testprobe ermöglichen. Ein Multianalyt-Analyseverfahren wird oft beansprucht, jedoch sind die genannten Kriterien im allgemeinen nicht beide erfüllt.

[0005] In einem Multianalysystem umfaßt ein typisches Substrat eine Vielzahl einzelner Test-Reaktionsstellen, von denen jede einen unterschiedlichen Bindungsliganden besitzt. Die Testprobe kontaktiert jeden der Reaktionsbereiche, und eine Reihe von Detektionstechniken werden danach eingesetzt, um den vorliegenden Analyten zu identifizieren. Es ist wichtig, daß das angewandte Detektionsverfahren die Quantifizierung jedes einzelnen Analyten ermöglicht.

[0006] Die gebräuchlichste Vorgehensweise zur Herstellung von Multianalyt-Arrays von räumlich abgegrenzten Bereichen biologisch aktiver Liganden auf einem Substrat war mittels photolithographischer Techniken. Das Substrat wird mit einem photolabilen Linker beschichtet. Theoretisch sollte dieser Linker nur nach Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge gegenüber einem Bindungsliganden reaktiv werden. Eine räumliche Auflösung wird durch Plazieren einer mechanischen Maske (gewöhnlich aus Chrom gefertigt) auf dem Substrat erreicht. Das Lochmuster in der Maske legt das Muster der Bindungsbereiche auf dem Substrat fest.

[0007] Für jeden zu immobilisierenden Liganden ist die allgemeine Vorgehensweise: Bestrahlung erster Bindungsstellen, Inkubation des bestrahlten Substrats mit einem ersten zu immobilisierenden Liganden, Waschen zur Entfernung von lose gebundenem Liganden, Blockieren von nicht-reagierten Bindungsstellen, die durch den Bestrahlungsschritt aktiviert wurden, und Bestrahlung der Bereiche, an denen der zweite Bioligand immobilisiert werden soll, wobei die nachfolgenden Schritte wie für den ersten Liganden wiederholt werden. Die räumliche Auflösung wird durch Bestimmung des Bestrahlungsortes entweder mittels einer kohärenten UV-Lichtquelle von einem Laser oder mittels mehrerer mechanischer Masken und einer inkohärenten Lichtquelle vorgegeben. Dies macht die Maßnahme der Immobilisierung einer Vielzahl biologischer Liganden zu einem zeitaufwendigen Prozeß. Ein weiterer Nachteil der photolithographischen Vorgehensweise ist das Erfordernis kostspieliger mechanischer Masken oder einer Laserlichtquelle. Außerdem ist eine hohe unspezifische Bindung gegeben.

[0008] Zum Beispiel wurde die Verwendung von Arylaziden, Fluoro-Arylaziden und Benzophenonen mit einer hohen unspezifischen Bindung in Verbindung gebracht. Eine hohe unspezifische Bindung resultiert in einem hohen Assay-Hintergrund, was den dynamischen Bereich jedes Multianalyt-Assays signifikant reduziert. Die unspezifische Bindung ist weitgehend auf eine passive Absorption von Molekülen an die nicht-aktivierte photolabile Linker-Oberfläche durch ionische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte usw. zurückzuführen.

[0009] Die WO-A-9516204 beschreibt eine photolithographische Vorgehensweise zur Behebung der mit einer hohen unspezifischen Bindung einhergehenden Probleme. Bei dieser Vorgehensweise war das Oberflächen-Verbindungsmolekül Avidin, und das photolabile Molekül war Photobiotin oder ein Derivat davon. Während eine reduzierte unspezifische Bindung beansprucht wird, erfordert diese Technik nach wie vor die oben dargestellten zeitaufwendigen Abläufe. Die Immobilisierung von 20 individuellen Bioliganden würde insgesamt

80 Schritte erfordern, um dem Grunderfordernis von Bestrahlungs-, Bindungs-, Blockierungs- und Waschschritten für jeden einzelnen zu immobilisierenden Liganden nachzukommen.

[0010] Eine räumliche Auflösung wurde auch durch passive Absorption erreicht. Die US-A-5432099 offenbart zum Beispiel eine Bindung, bei welcher der Ligand durch eine Kombination von ionischen Wechselwirkungen, hydrophoben Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräften an die Substratoberfläche gebunden ist. Passive Absorptionsprozesse sind von Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Ionenstärke, sowie von der Art des verwendeten Substrats abhängig, was den Bindungsprozeß schwerer kontrollierbar macht. Der größte Nachteil dieses Ansatzes ist die Neigung eines Teils des schwach gebundenen Liganden dazu, während des Waschschriffs oder der Inkubationsschritte des Bioassays desorbiert zu werden, was eine geringe Intra-Assay- und Inter-Assay-Genauigkeit zur Folge hat.

[0011] In vielen Veröffentlichungen wurde der Crosslinker Glutaraldehyd verwendet. Dieser Linker weist viele Nachteile auf, darunter die Neigung der Proteine zur Quervernetzung, was wahrscheinlich die Funktion des Proteins verändert. Ein weiterer Nachteil ist der, daß der Kopplungsprozeß einen Reduktionsschritt einschließen sollte, der zeitaufwendig und unter Umständen sehr gefährlich ist, z.B. wenn Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel verwendet wird. Es wurden heterobifunktionelle Linker verwendet, die aber in vielen Fällen freie Sulfhydrylgruppen an dem zu bindenden Protein erfordern. Dies macht eine Modifikation des Proteins vor der Immobilisierung notwendig.

[0012] In einem Multianalyt-Assay werden sowohl qualitative als auch quantitative Ergebnisse erwünscht. Multianalyt-Assays waren zum Beispiel für Antibiotika verfügbar. Diese beruhen im wesentlichen auf mikrobiologischen Hemmstofftests, bei denen ein in der Probe vorliegendes Antibiotikum das Bakterienwachstum hemmt und eine Hemmzone ausbildet, die proportional zur Konzentration des in der Probe vorliegenden Antibiotikums ist. Dieses Verfahren läßt jedoch keine Angaben zur Identität des Antibiotikums oder keine genaue Bestimmung seiner Konzentration zu. Mikrobiologische Hemmstofftests sind auch sehr langsam; der gesamte Prozeß dauert mehrere Tage.

[0013] Chemische Screeningverfahren, wie die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) oder die Gas/Flüssigkeits-Chromatographie-Massenspektrometrie (GCMS/LCMS) tragen den Extremen der strukturellen Vielfalt/Gegensätzlichkeit jeder Antibiotikagruppe, z.B. der Penicilline, Sulfonamide, Aminoglykoside, Tetrazykline usw. nur schwer Rechnung. Außerdem erfordern chromatographische Verfahren eine aufwendige Vorbereitung der Proben, damit die Signal-Rausch-Verhältnisse derart sind, daß die geforderten Nachweisgrenzen erreicht werden können.

[0014] Erhältliche Multianalyt-Geräte umfassen das Triage-Testgerät (siehe Clinical Chemistry 38(9):1678-1684 (1992)) und das Advisor-Testgerät (siehe Clinical Chemistry 39(9):1899-1903 (1993)). Diese Geräte sind nur für die qualitative Analyse geeignet.

[0015] Das Triage-Gerät dient dem gleichzeitigen Nachweis von sieben Drogen im menschlichen Urin. Jedes Gerät kann nur eine Urinprobe analysieren. Am Ende des Verfahrens untersucht der Anwender visuell jede der drogenspezifischen Testzonen auf die Anwesenheit eines roten Balkens. Alle Schritte des Testprotokolls müssen vom Anwender manuell ausgeführt werden. Außerdem ist kein Ausdruck der Testergebnisse verfügbar.

[0016] Das Advisor-Gerät ähnelt in seiner Anwendung der des Triage-Gerätes. Das Advisor-Gerät screent fünf verschiedene Drogenklassen. Das Gerät funktioniert gemäß den Prinzipien des Agglutinationstests, mit individuellen Kanälen für jede Droge. Alle Schritte des Testprotokolls werden vom Anwender ausgeführt. Negative Proben weisen agglutinierte Partikel auf, während positive Drogenproben ein nicht-aggregiertes Partikelmuster liefern.

[0017] Die meisten Biosensoren/mikrofabrizierten Geräte für die biologische Anwendung verwendeten als Substrat Silizium. Andere verwenden Glas- oder Quarzsubstrate. Silizium hat eine äußerst kontrollierte kristallographische Struktur mit klar definierten Kristallebenen. Die Einheitlichkeit des Siliziumsubstrats macht aus ihm die ideale Wahl für die Entwicklung eines Multianalyt-Testgeräts.

[0018] Jedoch zeigen dunkle Substrate wie Silizium sogenannte Schwarzkörper-Effekte. Im Fall einer Fluoreszenzdetektion, bei der ein Fluorophor mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird, kann ein dunkles Substrat die einfallende Anregungslichtenergie absorbieren und somit die Lichtemission durch das Fluorophor verringern.

[0019] Die EP-A-0127438 offenbart die Herstellung einer Festphasenvorrichtung durch Photoaktivierung unter Verwendung einer Maske und durch Bindung eines Liganden an die auf diese Weise aktivierten Teile der Substratoberfläche. Die WO-A-9516204 offenbart ebenfalls die Herstellung einer Vorrichtung mit gemusterter Oberfläche durch selektive Bestrahlung einer lichtempfindlichen Bindungsgruppe.

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Gemäß der vorliegenden Erfindung, in einem Verfahren zur Herstellung einer Festphasenvorrichtung zur Durchführung von Multianalyt-Assays, die ein Substrat und mehrere vereinzelte Reaktionsstellen umfaßt, von denen jede einen kovalent an das Substrat gebundenen Liganden trägt, wobei die Substratoberfläche zwischen den Reaktionsstellen inert gegenüber dem Analyt ist, und das Verfahren die Aktivierung und Hydrophobierung der Oberfläche und die Applikation einer Reihe von Liganden auf die aktivierte, hydrophobe Oberfläche umfaßt, um die vereinzelten Reaktionsstellen zu bilden, wobei die Liganden in Wasser appliziert werden. Falls erwünscht, können die aktiven Bereiche zwischen den Reaktionsstellen blockiert werden.

[0021] Eine mittels diesem Verfahren erhältliche neuartige Vorrichtung ist eine Festphasen-Multianalyt-Vorrichtung, die wenig beziehungsweise keine unspezifische Bindung aufweist.

[0022] Die Liganden können über einen Linker an das Substrat gebunden werden. Es wird insbesondere bevorzugt, daß die aktivierte Oberfläche nacheinander mit einem Organosilan, einem bifunktionellen Linker und dem Liganden zur Reaktion gebracht wird. Bifunktionelle Crosslinker sind verwendet worden, um eine hocheffiziente Kopplungsschemie zwischen Organosilanen zu gewähren, die kovalent an mikrofabrizierten Silizium- oder Keramiksubstraten immobilisiert sind. Bioliganden können auf diese Weise in Multianalyt-Arrays immobilisiert werden.

[0023] Diese Erfindung beseitigt das Erfordernis mehrerer individueller Testreagenzkits sowie mehrerer Gerätetypen und erleichtert dadurch den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Analyte auf einer einzigen Probe. Die Erfindung stellt ein einzelnes integriertes Analysesystem bereit, das in der Lage ist, den gleichzeitigen Nachweis eines breiten Spektrums von Stoffen zu gewähren. Darüber hinaus können die Testreagenzien für eine bestimmte Analytgruppe in einem kombinierten Format bereitgestellt werden.

[0024] Als Gegenstand dieser Erfindung wird eine Vielzahl biologischer Liganden in einem räumlich-definierten Punkt- oder Linienmuster mittels mikrofluider Verteilung des Liganden auf einem chemisch aktivierten Substrat immobilisiert. Der Bioligand wird kovalent an das Substrat gebunden. Die Kopplungseffizienz des Bioliganden kann derart sein, daß die chemische Reaktion innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist. Der Immobilisierungsschritt kann sicherstellen, daß der Bioligand seine biologische Aktivität sowohl auf kurze als auch auf lange Sicht beibehält.

[0025] Diese Erfindung stellt außerdem ein integriertes Analysesystem für den gleichzeitigen Nachweis eines breiten Spektrums von Analyten im Multianalyt-Format bereit. Das Analysesystem ist für maximale Benutzerfreundlichkeit konzipiert, mit der Möglichkeit, den Multianalyt-Nachweis und die Quantifizierung von jeder Testprobe zu erhalten. Das bevorzugte Analysesystem ist eine Kombination aus einer X-Y-Translationseinheit, einer Probenbehandlungseinheit, Liquid-Handling-/Flußkontrollmitteln, einer temperaturgesteuerten Dunkelkammer, einer CCD-Kamera, sowie Bildverarbeitungs-Software. Die Translationseinheit kann mit einem Schrittmotor verbunden sein, um eine Positionierungsgenauigkeit von etwa 10 µm für die Positionierung der Vorrichtungen in jeder Stufe des Analyseverfahrens zu erreichen.

Beschreibung der Figuren

[0026] In den beiliegenden Figuren:

[0027] zeigt [Fig. 1](#) die Bildung einer ungleichmäßigen Substratoberfläche;

[0028] zeigt [Fig. 2](#) die chemische Aktivierung von Gruppen an der Oberfläche eines Substrats;

[0029] zeigen [Fig. 3](#), [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) die kovalente Immobilisierung eines Liganden an der Oberfläche eines Substrats;

[0030] zeigt [Fig. 4](#) die Verwendung von Latexpartikeln an der Oberfläche eines Substrats;

[0031] veranschaulichen [Fig. 7-Fig. 11](#) Vorrichtungen zur Aufnahme erfindungsgemäßer Chips;

[0032] sind [Fig. 12-14](#) schematische Ansichten eines Systems, das für die Analyse einer Vorrichtung der Erfindung geeignet ist; und

[0033] zeigt [Fig. 15](#) Eichkurven für Analyte, die mit Hilfe der Erfindung getestet wurden.

Beschreibung der Erfindung

[0034] Das Substrat, das in einer Vorrichtung dieser Erfindung verwendet wird, kann zum Beispiel aus Silizium, Quarz, Glas oder Keramik sein. Keramiksubstrate (Aluminiumoxid) bieten eine hervorragende Alternative zu Siliziumsubstraten, da sowohl Fluoreszenz- als auch Chemilumineszenz-Detektionstechniken erfolgreich eingesetzt werden können. Diese Ergebnisse waren unerwartet, da die Kristallographie von Keramikmaterialien aus ihnen kein Substrat erster Wahl machen würde.

[0035] Ein Keramiksubstrat kann mit einer Reihe von Korngrößen (1 bis 30 μm) hergestellt werden. Die bevorzugte Partikelgröße des in dieser Erfindung verwendeten Keramiksubstrats beträgt weniger als 20 μm , bevorzugt weniger als 10 μm . Die geringe Partikelgröße gewährt eine weit höhere Einheitlichkeit der Oberfläche, die wiederum für ein erhöhtes Leistungsvermögen von Bioassays sorgt. Weitere bedeutende Merkmale von Keramiksubstraten umfassen Oberflächentopographietoleranz, Porosität, Vakuumdichte und das Fehlen von Wasserabsorption.

[0036] Das bevorzugte Keramikmaterial besteht aus 94% Aluminiumoxid (Al_2O_3) mit einer Partikelgröße im Bereich von 4-8 μm . Das Material ist vakuumdicht und hat geschliffen eine Oberflächentopographie von 0.6 bis 0.8 μm . Die Einheitlichkeit der Oberfläche kann durch einen Polierschritt verbessert werden, so daß eine Oberfläche mit 0.4-0.5 μm Variation erhalten wird. Eine weitere Verbesserung wird durch Läppen und Polieren erreicht, so daß eine Oberfläche mit einer Variabilität von 0.05-0.1 μm erhalten wird.

[0037] Es wurde gezeigt, daß das Leistungsvermögen bestimmter Keramiksubstrate von den Eigenschaften der Korngröße abhängt. Die höhere Testleistung wurde für Keramikmaterialien mit einer Korngröße von bis zu 8 μm , z.B. 4-8 μm gezeigt. Die Ergebnisse für Materialien mit größerer Korngröße erwiesen sich als weniger zufriedenstellend. Keramiksubstrate mit Korngrößen von ungefähr 1 μm wurden evaluiert und ergaben keine verbesserten Ergebnisse im Vergleich zu denen, die mit dem 4-8 μm -Substrat erzielt wurden. Dies ist von Vorteil, da die Materialkosten für die Keramik mit sehr kleinen Partikeln wesentlich (ung. 5 mal) höher sind.

[0038] Geeignete Siliziumsubstrate werden mit einer Oxidschicht von bestimmter Dicke hergestellt, z.B. einer Toleranz von ± 2 nm für eine 100 nm-Oxidschicht. Die Oxidschicht kann 50-500 nm dick sein, bevorzugt weniger als 200 nm, noch bevorzugter in der Größenordnung von 100 nm.

[0039] Das Substrat kann als Teil einer mikrofabrizierten mikrobearbeiteten Festphasenvorrichtung gebildet sein, die für ein breites Spektrum von Paneltests für Anwendungen in der Tiermedizin und der medizinischen Diagnostik entwickelt wurde. Jede Festphasen-Testvorrichtung hat eine Reihe von Reaktionsbereichen. Jeder Reaktionsbereich ist spezifisch für einen bestimmten Analyt. Der Reaktionsbereich kann die Form eines Punktes (bzw. Flecks), eines Kanals, einer Senke, einer Vertiefung, eines Loches oder einer Kammer aufweisen. Die Reaktionsbereiche werden durch Immobilisierung von Biomolekülen auf dem Substrat hergestellt.

[0040] Typischerweise hat eine erfindungsgemäße Vorrichtung eine Fläche von bis zu 1 cm^2 . Jede Reaktionsstelle hat gewöhnlich eine Fläche von weniger als 1 mm^2 . Der Feststoff wird bevorzugt so hergestellt, daß er ein kompliziertes Netzwerk an Öffnungen, Kammern, Kanälen, Löchern, Senken usw. bereitstellt. Es kann ebenfalls vorteilhaft sein, innerhalb des Kanals oder Loches Säulen zu gestalten. Solche Unebenheiten können helfen, maximale Oberflächenwechselwirkungen zwischen gebundenen Bioliganden und Testreagenzien zu erzielen, was die Inkubationszeiten für kompetitive Immunoassays und Sandwich-Immunoassays gleichermaßen erheblich verkürzt.

[0041] Als Alternative oder in Ergänzung zu beispielsweise Senken oder Kanälen auf dem Silizium- oder Keramiksubstrat, kann die Oberfläche auch so mikrofabriziert werden, daß sie Nanoliter bis Mikroliter Mischkammern/-behälter/-kanäle einschließt. Die Siliziumoberfläche wird zum Beispiel zuerst oxidiert, um eine Oxidschicht zu bilden. Dann wird eine Photoresist-Schicht aufgetragen, von der das gewünschte Muster erzeugt wird. Nach Ausbildung des Musters auf der Oxidschicht wird der Photoresist entfernt. Das Silizium wird dann z.B. unter Verwendung von HF geätzt, und die Oxidschicht wird entfernt. Die Oxidschicht wird schließlich

gleichmäßig über den gesamten Silizium-Wafer ausgebildet.

[0042] Ein beispielhaftes Verfahren ist in [Fig. 1](#) gezeigt. In Schritt (i) wird ein Silizium-Wafer **1** oxidiert, um eine Oxidschicht **2** zu bilden; in Schritt (ii) wird eine Photoresist-Schicht **3** aufgetragen; in Schritt (iii) bewirkt die Belichtung die Bildung einer gemusterten Oxidschicht; in Schritt (iv) wird der Photoresist entfernt; in Schritt (v) wird der Wafer **1** geätzt; in Schritt (vi) wird die Oxidschicht entfernt; und in Schritt (vii) wird eine durchgehende Oxidschicht **2a** neugebildet.

[0043] Die Bioliganden werden durch kovalente Bindung immobilisiert. Passive Adsorptionswechselwirkungen reagieren empfindlich auf Änderungen von pH, Temperatur und Ionenstärke, und können in manchen Fällen eine Freisetzung schwach gebundener Liganden während der Inkubations- und Waschschrte bewirken, womit sie zu einer schwachen Testreproduzierbarkeit beitragen. Es ist natürlich erwünscht, daß der Bioligand nach dem Immobilisierungsschritt eine maximale Aktivität beibehält.

[0044] Vor jeglicher chemischer Aktivierung sollte die Oberfläche der Substrate gründlich gereinigt werden. Der erste Schritt umfaßt bevorzugt die Reinigung der Oberfläche durch Ultraschallbehandlung in einem alkalischen Reinigungsmittel, gefolgt von gründlichem Waschen mit zweifach-entionisiertem Wasser. Die Substrate werden dann mit einer Chromsäurelösung behandelt. Die Chromsäurelösung reinigt die Oberfläche zusätzlich und öffnet außerdem Epoxidgruppen an der Oberfläche, wie in [Fig. 2](#) gezeigt. Die Epoxidgruppen können auch auf andere Weise, z.B. durch 1-stündige Ultraschallbehandlung, geöffnet werden.

[0045] Die auf diese Weise gebildeten Oberflächen-Hydroxylgruppen stehen dann für die Derivatisierung zur Verfügung. Zum Beispiel umfaßt eine Reaktionsabfolge, wie in [Fig. 3](#) gezeigt, die Verwendung eines Organosilans, anschließend eines (hetero)bifunktionellen Crosslinkers Z-R-Y, um ein hochreaktives Zwischenprodukt zu bilden, und schließlich eines funktionalisierten Liganden, um eine kovalente Immobilisierung zu gewähren.

[0046] Im Einzelnen ist in Organosilanen der Formel $(\text{RO})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ jedes R ein Alkylrest oder ein anderer Kohlenwasserstoffrest, wie CH_3 oder CH_2CH_3 ; n ist eine ganze Zahl, z.B. 1 bis 18; und X ist eine funktionelle Gruppe, wie etwa Epoxycyclohexyl, NH_2 , CHO, OH, SH, p-Chlorbenzyl, m-Chlorbenzyl, Br, Cl, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, 2,3-Epoxypropoxy, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ oder p-Chlorosulfonylphenyl. Diese Organosilane können so gewählt werden, daß sie entweder eine reaktive Endgruppe bilden, die eine kovalente Bindung mit einem Biomolekül ausbilden kann, oder einen weniger reaktiven Rest wie NH_2 , bei dem eine zusätzliche Aktivierung mit einem bifunktionellen Linker notwendig ist, um eine geeignete Endgruppe zu bilden. Organosilane mit elektrophilen funktionellen Endgruppen erfordern keine Aktivierung mit einem bifunktionellen Crosslinker, da Bioliganden durch nucleophile Gruppen auf dem Bioliganden kovalent immobilisiert werden können.

[0047] Im Fall von Organosilanen, die nucleophile Gruppen aufweisen, kann jeder beliebige einer Vielzahl von bifunktionellen Crosslinkern verwendet werden, um eine äußerst reaktive chemische Gruppe bereitzustellen, über die ein Biomolekül oder Bioligand kovalent gebunden werden kann. Diese Erfindung umfaßt die Verwendung bifunktioneller Linker, die in der Massenherstellung von chemisch aktivierten Substraten verwendet werden können und stabil genug sind, um eine längerfristige Aufbewahrung vor der kovalenten Bindung des Biomoleküls oder Bindungsliganden zuzulassen. Bevorzugte Linker sind inert gegenüber normalen atmosphärischen Bedingungen, während sie zugleich reaktiv genug sind, um innerhalb sehr kurzer Zeit (typischerweise <10 Minuten) kovalente Bindungen mit funktionellen Gruppen des zu immobilisierenden Bioliganden auszubilden.

[0048] Der bifunktionelle Linker kann zum Beispiel sein Phosgen, Triphosgen, N,N-Disuccinimidylcarbonat, Xylylendiamin, 1,6-Diaminohexan, 1,12-Diaminododecan, 1,6-Diisocyanatohexan, 1,12-Diisocyanatododecan, 1,4-Phenylendithioisocyanat, Cyanurchlorid, Terephthaldehyd, p-Nitrobenzoylchlorid, Sulfanilsäure, 2-Fluoromethyl-Pyridinium-p-Toluolsulfonat, 3-Aminophenylborsäure, p-Bromphenylborsäure, Diethylpyrocarbonat, Ethylchlorformiat, p-Bromanilin, p-Bromphenylhydrazid, p-Brombenzaldehyd, das 1,2-Ethylenglykol von p-Brombenzaldehyd, N,N'-Carbonyldiimidazol, Terephthaloylchlorid, Epichlorhydrin, 1,4-Diiodbenzen, 1,4-Dibrombenzen oder ein N-Hydroxysuccinimidderivat, z.B. von p-Aminobenzoessäure, p-Brombenzoessäure, p-Bromphenyllessigsäure, p-Bromethylbenzoessäure, p-Brommethylbenzoessäure, p-Formylbenzoessäure, p-Hydroxymethylbenzoessäure, 1,2-Ethylenglykol von p-Formylbenzoessäure, p-Bromphenylpropionsäure oder p-Hydroxyphenylpropionsäure. Ein photolabiler Crosslinker kann verwendet werden, um mit einem Organosilan zu reagieren, das eine nucleophile oder elektrophile Endgruppe aufweist. Der Crosslinker ist beispielsweise das N-Hydroxysuccinimid von p-Azidobenzoessäure oder p-Aminobenzophenon.

[0049] Anstelle von oder zusätzlich zu der Verwendung von bifunktionellen Linkern ist es ebenfalls vorteilhaft,

eine Schicht von Latexpartikeln kovalent zu immobilisieren. Der Durchmesser der Latexpartikel beträgt bevorzugt weniger als 500 nm und noch bevorzugter weniger als 150 nm. Die Latexpartikel können eine Reihe funktioneller Gruppen aufweisen, z.B. $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CHO}$, p-Chlorphenyl, p-Chlorstyryl, $-\text{N}=\text{NH}$, $-\text{NH}-\text{NH}_2$ oder $-\text{NH}_2$. Die Latexpartikel können in einer Konzentration von ungefähr 0.5 bis 1 % (Gew/Vol), mit oder ohne Vorliegen eines bifunktionellen Linkers wie oben beschrieben, mit Substraten inkubiert werden, die mit dem geeigneten Organosilan modifiziert wurden.

[0050] [Fig. 4](#) zeigt zwei Reaktionsgleichungen für die Immobilisierung von Latex. Beide können durch Aktivierung des Latex mit einem zweiten Linker und Immobilisierung eines Biomoleküls, oder durch direkte kovalente Immobilisierung von beispielsweise einem Antikörper, nachvollzogen werden.

[0051] Eine Alternative zur Verwendung von Polystyren-Latex-Partikeln ist die kovalente Immobilisierung von Bioliganden an Polyethylenglykolderivaten, die bereits mit einem silanisierten Substrat verankert sind. Zum Beispiel werden PEG-Derivate mit zwei elektrophilen Gruppen, wie etwa Epoxid oder Carbonylimidazol, auf einem Substrat der Wahl mit einem Silan zur Reaktion gebracht, das eine terminale NH_2 -Gruppe aufweist, wie etwa APTES. Eine geeignete Reaktionsabfolge ist in [Fig. 5](#) dargestellt.

[0052] Es kann ebenfalls von Vorteil sein, den Bioliganden direkt an die Silanschicht zu immobilisieren, um somit das Erfordernis der Aktivierung des Silans mit Polymermaterialien oder bifunktionellen Linkern zu umgehen. Die Organosilane sollten empfänglich gegenüber einem nucleophilen Angriff durch eine chemische Gruppe (z.B. NH_2 , SH , OH oder $\text{NH}=\text{NH}_2$) auf dem Bioliganden sein. Organosilane, die für eine direkte Bindung des Bioliganden geeignet sind, können funktionelle Halogenid-, Epoxy-, Isocyanat-, Aldehyd- oder Tosylatgruppen besitzen. Eine derartige Reaktion ist in [Fig. 6](#) gezeigt, in der E eine elektrophile Gruppe auf dem Organosilan ist. Beispiele für E sind Br , Cl , $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{NCO}$, $-\text{CHO}$ und p-Chlorosulfonylphenyl.

[0053] Organosilane, die elektrophile Gruppen, z.B. Glycidoxo, besitzen, haben außerdem den Vorteil, weniger zur Polymerisation während des Silanisierungsvorgangs zu neigen, was auf das Fehlen von nucleophilen, für den Angriff der Methoxy- oder Ethoxyfunktion des Organosilans bereitstehenden Gruppen zurückzuführen ist. Die Substratoberfläche sollte somit kein polymerisiertes Organosilan enthalten.

[0054] Die Chemie der Oberflächen erlaubt es, aufgrund der schnellen Kinetik der Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen der chemisch funktionellen Gruppe auf der Oberfläche und einer geeigneten chemischen Gruppe, die in einer sterisch günstigen Position auf dem zu immobilisierenden Biomolekül vorhanden ist, eine räumliche Auflösung zu erreichen. Das Biomolekül wird bevorzugt durch einen Mikrofluid-Dispenser in Form eines einzelnen Tröpfchens oder einer Reihe von Tröpfchen, die eine Linie bilden, mit der Substratoberfläche in Kontakt gebracht. Das Dosiervolumen ist von der Größenordnung 1 bis 100 nl, bevorzugt weniger als 50 nl, z.B. näher an 10 nl. Die Schnelligkeit der Ausbildung der kovalenten Bindungen ist derart, daß die kovalente Immobilisierung innerhalb von Minuten erreicht wird, bevor das (die) verteilte Tröpfchen oder Linie auf der Oberfläche verdampft. Die Positionierungsgenauigkeit, der das Tröpfchen oder die Flüssigkeitslinie unterliegen, sollte eine Toleranz von $\pm 20 \mu\text{m}$ haben.

[0055] Die Liganden werden in Wasser appliziert und die Oberfläche ist hydrophob, um jegliche laterale Diffusion des (der) verteilten Tröpfchens oder Linie zu verhindern. Diese Eigenschaft trägt zu einer hervorragenden Spotqualität und Reproduzierbarkeit bei und ermöglicht die kovalente Immobilisierung einer größeren Anzahl an Spots von Biomolekülen pro Flächeneinheit.

[0056] Die vorliegende Erfindung bewältigt die Probleme, die mit der herkömmlichen Photolithographie einhergehen, indem sie die Bildung von räumlich abgegrenzten Spots von Bioliganden ermöglicht, ohne UV-Licht oder eine mechanische Maske erforderlich zu machen. Wie oben angegeben, kann eine räumliche Auflösung durch Mikrodispensiertechniken erreicht werden. Ein bedeutender Faktor ist die schnelle Kinetik der kovalenten Bindungsreaktion, um eine hochwirksame Bindung des Bioliganden in einem räumlich abgegrenzten Bereich sicherzustellen, was die seitliche Abweichung des immobilisierten Bioliganden unterbindet.

[0057] Nicht-reagierte chemische Gruppen auf dem Substrat können dann z.B. unter Verwendung von dem Fachmann bekannten "Blocking"-Molekülen blockiert werden. Geeignete derartige Moleküle umfassen Proteine wie Casein, Rinderserumalbumin, Lactalbumin usw. oder niedermolekulare Blocker wie Glycin, Glutamin usw.

[0058] Es können auch photolabile Linker verwendet werden. Zum Beispiel wird das Organosilan auf der Substratoberfläche im Dunkeln mit einem photolabilen Linker (z.B. Benzophenon; Arylazide usw.) zur Reaktion ge-

bracht. Die Oberfläche wird dann mit den Bioliganden wie gewünscht gespottet, und die kovalente Bindung wird nach einer kurzen Bestrahlung mit UV-Licht oder einer längeren Bestrahlung mit sichtbarem Licht erreicht. Die verbleibenden Bereiche der Substratoberfläche werden in Gegenwart von UV-Licht oder sichtbarem Licht unter Verwendung von Blockern von der Art der oben beschriebenen Moleküle blockiert.

[0059] Die Substrat-immobilisierten Biomoleküle können z.B. durch Inkubation für kurze Zeit (1 Stunde) in einer Zuckerlösung (z.B. Trehalose) und anschließende Trocknung 16 Stunden bei 37°C stabilisiert werden. Die stabilisierten Substrate können dann mit Trockenmittel in Folienbeuteln versiegelt und aufbewahrt werden. Die immobilisierten Biomoleküle sind über mehr als 6 oder 12 Monate stabil, z.B. bis zu 2 Jahre und mehr bei einer Lagerung zwischen + 2 und + 8°C.

[0060] Die Vorrichtungen können in eine Reihe verschiedener Träger platziert werden, die Merkmale umfassen, welche die Wirksamkeit der Mischung der Testreagenzien steuern. Das Fließen flüssiger Testreagenzien kann durch Kapillarität, Zentrifugalkraft, Vakuumkraft oder elektroosmotischen Fluß erreicht werden. Der Gebrauch von elektroosmotischem Fluß kann das Erfordernis von Ventilen vermeiden, so daß keine beweglichen mechanischen Teile verwendet werden.

[0061] Geschlossene Kanäle können gebildet werden, indem eine Glasplatte auf die mikrofabrizierte Oberfläche gebondet wird. Die Biomoleküle werden vor dem Bonden der Glasplatte kovalent auf der Oberfläche immobilisiert. Viele Bondverfahren, z.B. anodisches Bonden, gehen mit erhöhten Temperaturen einher, die ein Biomolekül zerstören können. Deshalb sollten Bondtechniken nicht denaturierend für immobilisierte Biomoleküle sein. Ein geeignetes Verfahren ist indirektes Bonden, z.B. wenn der Wafer durch einen geeigneten Kleber, z.B. Epoxyleber, an eine Glasplatte gebondet wird.

[0062] Die Anordnungen können dann in einen geeigneten Träger platziert werden. Verschiedene solcher Träger sind in den [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) veranschaulicht. Beispielsweise sind die Dimensionen der in [Fig. 8](#) gezeigten Anordnung 48.62 mm × 48.62 mm mit Vertiefungen mit einem Innendurchmesser von 10 mm und einem Außendurchmesser von 12.82 mm. Der Mittenabstand der Vertiefungen beträgt 15.36 mm.

[0063] Die Anordnungen können Merkmale umfassen, um die Mischung von Testreagenzien, Proben usw. zu verbessern. Dies ist in [Fig. 9](#) veranschaulicht, in welcher die Anordnung einen Reagenzzugabeort **11**, Reagenzkanäle **12** und Testreaktionsstellen **13** umfaßt.

[0064] In [Fig. 10](#) umfaßt die Anordnung Reagenzreservoirs **21**, eine Verteilereinrichtung **22**, Reagenzverteilerkanalteststellen **23** und ein großes Reservoir **24**. [Fig. 11](#) zeigt eine 4-Kanal-Teststruktur mit ähnlichen Bauteilen.

[0065] Diese Erfindung stellt ein komplett integriertes System für den gleichzeitigen quantitativen Nachweis von Analyten mit einer Vielfalt von Molekulargewichten, struktureller Diversität und Polarität bereit. Analytengruppen sind den Anforderungen entsprechend für die klinisch/tierärztliche Diagnose oder für Drogenscreening verfügbar.

[0066] Die Liganden werden in Abhängigkeit von den Analyten gewählt. Dies gehört zu den Fähigkeiten und Kenntnissen des Fachmanns. Geeignete Analyte umfassen:

Antibiotika, z.B. Tetrazykline, Sulfonamide, Ionophore, Aminoglykoside, Penicilline oder Fluoroquinolone;
Hormone, z.B. luteinisierendes Hormon (LH), Prolaktin (PL), Follikelstimulierendes Hormon (FSH) oder Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH);
Kardiale Marker, z.B. Myoglobin, Carbonanhydrase, Troponin I, Glykogenphosphorylase BB, CK-MB, Fettsäurebindungsprotein oder Troponin T;
Marker für Infektionskrankheiten;
Allergiemarker;
Drogen;
Enzyme;
Viren;
Nukleotide; und
Peptide.

[0067] Eine Gruppe dient zum Beispiel dem Nachweis von Sulfonamid-Antibiotika.

[0068] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zum gleichzeitigen quantitativen Nachweis von beispielsweise bis

zu 20 individuellen Sulfonamiden bereit. Weitere Beispiele umfassen Herz-, Fertilitäts- und Infektions-Erkrankungsgruppen.

[0069] Die Erfindung ermöglicht es, gleichzeitig bis zu beispielsweise 20 Analyte nachzuweisen, die keine strukturelle Ähnlichkeit aufzuweisen brauchen. Probenmatrizes, die getestet werden können, umfassen Serum, Plasma, Urin, Galle, Fäzes, Gewebe, Wasser und Nahrung. Das benötigte Probenvolumen ist sehr gering, üblicherweise $<1.5 \mu\text{l}/\text{Analyt}$. Die Testreagenzien, z.B. enzymmarkierte Antikörper, enzymmarkierte Haptene, fluoreszenzmarkierte Antikörper und fluoreszenzmarkierte Haptene, können alle in einem einzigen Reagenzreservoir enthalten sein, wodurch die "Liquid-Handling"-Anforderungen drastisch reduziert werden.

[0070] In Sandwich-Assays, z.B. von luteinisierendem Hormon, Follikelstimulierendem Hormon, Prolaktin, Thyreoidea-stimulierendem Hormon usw. wird die Probe zusammen mit einem Assaypuffer zugegeben und für eine kurze Zeit von üblicherweise weniger als 30 und bevorzugt weniger als 10 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift, wird der Cocktail aus markierten Detektionsantikörpern zugegeben und über einen weiteren Zeitraum inkubiert. Dieser Zeitraum beträgt üblicherweise erneut weniger als 30 und bevorzugt weniger als 10 Minuten. Die Vorrichtung wird dann gewaschen, um ungebundenen Marker zu entfernen, und das Signal wird quantifiziert.

[0071] Es kann für bestimmte Assays vorteilhaft sein, in die mikrofabrizierte Vorrichtung eine Möglichkeit zur Entfernung potentieller Störfaktoren, wie der Rheumafaktor-Interferenz, einzugliedern. Die Entfernung von Rheumafaktor kann erreicht werden, indem die Testprobe mit einer Fläche mit immobilisiertem Immunglobulin in Kontakt gebracht wird, zum Beispiel bevor die Testprobe den Reaktionsbereich kontaktiert.

[0072] Ein weiteres Beispiel ist die HAMA (humane Anti-Maus-Antikörper)-Interferenz; diese Antikörper können ernste Probleme in der Durchführung von Assays verursachen, die monoklonale Maus-Antikörper verwenden. Die herkömmliche Lösung, um dem Problem zu entgegnen, ist die Aufnahme kostspieliger Additive in die Testreagenzien. Diese Erfindung hat den Vorteil, die HAMA-Interferenz zu beseitigen, indem die Probe zur Beseitigung dieser Antikörper mit Bereichen auf der mikrofabrizierten Vorrichtung in Kontakt gebracht wird, bevor die Probe mit dem Reaktionsbereich in Kontakt kommt.

[0073] Allgemeiner können auf einem Teil der Vorrichtung Liganden bereitgestellt werden, die Kontaminanten binden. Dies ist besonders nützlich, wo eine definierte Beschichtung der Oberfläche der Vorrichtung, z.B. in Kanälen, zugelassen ist. Die Fähigkeit, interferierende Komponenten zu entfernen, erhöht die Genauigkeit der erzielten Ergebnisse.

[0074] Die Detektionsmarker können auch auf der Oberfläche von Dendrimern immobilisiert werden. Dendrimere sind polymerer Natur, durch die wiederholte Verknüpfung kleiner Baumoleküle synthetisiert. Sie sind bei Aldrich Chemie in einer Reihe von Molekulargewichten mit einer Auswahl an funktionellen Endgruppen, z.B. NH_2 oder COOH , kommerziell erhältlich. Heterobifunktionelle Linker können dann in Verbindung mit konventioneller Kopplungschemie verwendet werden, um die Detektionsmarker-Konjugate fertigzustellen. Für kleine Haptene, z.B. β -Agonisten, anabolische Steroide oder Antibiotika, wird bevorzugt ein kleines Dendrimer (bevorzugt nicht mehr als 16 Oberflächengruppen) mit einem großen Dendrimer (üblicherweise mehr als 64 Oberflächengruppen) verknüpft. Das niedermolekulare Hapten (weniger als 1,000 Dalton) wird mit den chemischen Gruppen auf dem kleinen Dendrimer verknüpft, gefolgt von der kovalenten Bindung des Detektionsmarkers. Das Dendrimer-Konjugat kann durch Dialyse und Gelpermeationschromatographie gereinigt werden.

[0075] Entsprechend bestimmten Testgruppen enthalten die Testreagenzien mehrere Komponenten (z.B. enzymmarkierte Antikörper, fluoreszenzmarkierte Antikörper, Latex-immobilisierte Antikörper, Dendrimer-Antikörper-Fluorophor-Konjugate, Dendrimer-Antikörper-Enzym-Konjugate, enzymmarkierte Haptene, fluoreszenzmarkierte Haptene usw.). Die möglichen Testgruppen sind sehr mannigfaltig und können auf Grundlage der klinischen Diagnostik (oder tierärztlichen Diagnostik) den Anforderungen entsprechend gewählt werden. Zum Beispiel dient eine gewünschte Gruppe dem Nachweis von Infektionskrankheiten (z.B. Hepatitis, HIV, Syphilis usw.). Andere Gruppen umfassen Fertilitätshormone, kardiale Marker, Allergieproteine usw. Ebenso wie klinische Parameter können umfangreiche Gruppen von Arzneimittelnrückständen nachgewiesen werden.

[0076] Die vorliegende Erfindung erlaubt den Nachweis individueller Verbindungen, wie etwa Antibiotika. Zum Beispiel kann auf einer Vorrichtung mit 1 cm^2 Oberfläche, üblicherweise in einem Zeitraum von Minuten, ein quantitatives Ergebnis für bis zu 20 Antibiotika gleichzeitig erhalten werden, mit einer Empfindlichkeit, welche die für HPLC/GCMS-Verfahren übertrifft und vergleichbar mit der für konventionelle Einparameter-Immunoassays ist. Diese Vorgehensweise kann ohne weiteres auf anabolische Steroide, Beta-Agonisten, Beta-Blocker,

Pestizide, therapeutische Medikamente usw. ausgedehnt werden.

[0077] Für die Analyse können Chemilumineszenz, Biolumineszenz oder Fluoreszenz geeignet sein. Das Detektionssystem ist bevorzugt eine Charged-Coupled Device (CCD)-Kamera, die so ausgestattet ist, daß sie sowohl Fluoreszenz- als auch Chemilumineszenzlicht messen kann. Die CCD-Kamera sammelt das von den Testbereichen auf der mikrofabrizierten Vorrichtung erzeugte Lichtsignal und konvertiert dieses in relative Lichteinheiten (RLUs).

[0078] Fluoreszenz-basierte Nachweissysteme können direkt abgelesen werden, indem geeignete optische Filter für den Marker-Fluorophor verwendet werden.

[0079] Ein geeignetes Chemilumineszenz-Reagenz ist Luminol, das bei einer Wellenlänge von 433-445 nm analysiert werden kann. Chemilumineszenz kann auch basierend auf dem Nachweis von mit alkalischer Phosphatase markierten Biomolekülen unter Verwendung von 1,2-Dioxetan beobachtet werden.

[0080] Um den Nachweis von Analyten zu erleichtern, verwendet diese Erfindung bevorzugt ein Chemilumineszenz-Detektionssystem, das eine CCD einsetzt. Eine "back-illuminated" Kamera wird bevorzugt, um die Einfangeffizienz bei der Wellenlänge des durch die chemilumineszente Lichtreaktion erzeugten Lichts (etwa 433-445 nm im Fall von Luminol) zu verbessern.

[0081] Das gesamte System kann von einem Personal Computer betrieben werden, wo ein spezielles Programm den X-Y-Tisch, die Verteilereinheit, die Probenbehandlung, die Temperaturkontrolle, die Inkubationszeiten und die CCD-Kamera steuert. Die [Fig. 12-14](#) zeigen den Aufbau eines derartigen Systems.

[0082] [Fig. 12](#) veranschaulicht schematisch die Interaktion eines Personal Computers (PC) mit zwei Steuereinheiten **31**, **32**. Die Einheit **31** kommuniziert mit einem unter **33** dargestellten CCD-Bildgebungssystem. Die Einheit **32** kommuniziert mit einer Verteilereinheit und einem X-Y-Verschiebungstisch mit Probenteller, die unter **34** beziehungsweise **35** dargestellt sind.

[0083] [Fig. 13](#) ist eine schematische Darstellung des X-Y-Verschiebungstisches. Diese Abbildung zeigt eine Proben-Plattform **41**, die an einem Linearaktuator **42** befestigt ist. Die X-Y-Verschiebung wird von Schrittmotoren **43**, **44** gesteuert, die mit entsprechenden Antrieben **45**, **46** verbunden sind. Die Verschiebung wird durch "Home Position"-Sensoren **47**, **48** limitiert.

[0084] Die Lichtempfindlichkeit von markierten biologischen Molekülen und bestimmten unmarkierten biologischen Molekülen kann es erforderlich machen, die Assays unter Lichtausschluß durchzuführen. Der Lichtausschluß wird erreicht, indem das Gehäuse lichtdicht hergestellt wird. Die lichtdichte Ausstattung ist außerdem bevorzugt temperaturgesteuert, z.B. innerhalb $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ oder bevorzugt $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, um eine zufriedenstellende Assay-Präzision und Genauigkeit zu gewährleisten.

[0085] [Fig. 14](#) zeigt das Gerät in perspektivischer, Teilgrundriss- und seitlicher Querschnittsansicht. [Fig. 14A](#) zeigt insbesondere den Reagenzspeicherbehälter **51**, eine lichtdichte Tür **52** und ein Kameragehäuse **53** mit abnehmbarer Abdeckung **54**.

[0086] Der größte Teil der Kamera kann sich außerhalb des Gehäuses befinden. Die Kameralinse ist in eine Öffnung in dem Gehäuse plaziert.

[0087] [Fig. 14B](#) zeigt die Proben auf einem Probenteller **55** im Grundriss, sowie einen Abfallbereich **56** und einen Bildgebungsbereich **57** im Grundriss. Die Kamera **53** ist über diesen Bereichen positioniert. [Fig. 14C](#) zeigt zusätzlich zu dem Behälter **51**, der Kamera **53**, dem X-Y-Tisch **41** und dem Schrittmotor **43** eine Dosierpumpe **58**.

[0088] Der Aufbau des in [Fig. 14](#) gezeigten Systems basiert auf 3x3 Probenrack-Haltern, von denen jeweils 20 gehalten werden können. Dies bedeutet, daß wenn sich auf 1 cm² der mikrofabrizierten Vorrichtung jeweils 20 individuelle Reaktionsbereiche befinden, gleichzeitig insgesamt 3600 Analysen an einer einzigen Probe durchgeführt werden können. Alternativ können 180 Proben gleichzeitig auf 20 verschiedene Testparameter hin untersucht werden.

[0089] Wie oben angegeben, kann der Analyt markiert werden. Der Ligand kann ebenfalls markiert werden und somit eine Analyse durch fraktionale Besetzung ermöglichen.

[0090] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

Beispiel 1 Sulfonamid-Assay

[0091] In diesem Beispiel wurden 12 individuelle Antikörper, von denen jeder für ein einzelnes Sulfonamid spezifisch ist, durch kovalente Bindung durch Kontaktwechselwirkungen auf separate Bereiche eines flachen Keramik(Aluminiumoxid)-Substrats mit chemisch modifizierter Oberfläche immobilisiert. Ein Multianalyt-Assay wurde unter Verwendung der Ausführungsform eines kompetitiven Immunoassays durchgeführt.

[0092] Im Einzelnen wurden Keramik-Substrate (1 cm × 1 cm) durch Ultraschallbehandlung unter Verwendung eines alkalischen Reinigungsmittels (RBS35, 5% Vol/Vol) gefolgt von zweifach-entionisiertem Wasser gereinigt, und wurden dann 16 Stunden in 6M HCl gegeben. Die Chips wurden dann für 1 Stunde in ein Ultraschallbad in Chromsäure gegeben.

[0093] Die Substrate wurden gründlich mit zweifach-entionisiertem Wasser und Aceton gewaschen und dann 2 Stunden bei 120°C in einem Ofen getrocknet. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Substrate unter Verwendung des Organosilans γ -Glycidoxypolytrimethoxysilan (10% Vol/Vol) in wasserfreiem Toluol, 4-Dimethylaminopyridin (1.25 g/l) und Triethylamin (1 % Vol/Vol) silanisiert. Diese Mischung wird 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt und dann über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Die Substrate wurden mit Toluol und Aceton gewaschen, bevor sie 4 Stunden bei 120°C getrocknet wurden.

[0094] Nach dem Trocknungsschritt werden die Substrate in Behälter gegeben und bei Raumtemperatur aufbewahrt bis sie für das Spotten von Sulfonamid-Antikörpern benötigt werden. Die Sulfonamid-Antikörper werden unter Verwendung eines BIODOT XY3000-Dispensers gespottet. Bei den 12 getesteten Sulfonamiden handelte es sich um Sulfadoxin, Sulfamethizol, Sulfachlorpyridazin, Sulfamethoxypyridazin, Sulfamerazin, Sulfapyridin, Sulfisoxazol, Sulfathiazol, Sulfamethazin, Sulfaquinoxalin, Sulfadimethoxin und Sulfadiazin.

[0095] Es wurden Dosiervolumina von ung. 20 nl für jeden Sulfonamid-Antikörper verwendet. Die 12 Sulfonamid-Antikörper, die 12 getrennte Bereiche auf dem 1 cm² Substrat bildeten, wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Substrate wurden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (pH 7.2), die 2% (Gew/Vol) Casein enthielt, gewaschen und dann in dem gleichen Puffer bei + 2-8°C über Nacht blockiert. Nach Waschen in PBS mit PEG300 (0.05% Vol/Vol), wurden die Vorrichtungen in einen Träger gegeben.

[0096] Multi-Sulfonamid-Standards (200 µl) und ein Cocktail aus Sulfonamid-Meerrettichperoxidase-Konjugaten (100 µl) wurden sachgerecht in die die Vorrichtung enthaltenden Reaktionsvertiefungen gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Standards enthielten 5, 10, 50 und 100 ng/ml von jedem der 12 Sulfonamide.

[0097] Danach wurden die Multi-Sulfonamid-Vorrichtungen mit PBS/PEG-Puffer gewaschen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen, und 300 µl Chemilumineszenz-Substrat [Luminol (1.4 mM)/Harnstoff-Wasserstoffperoxid (9.6 mM)] wurden pro Vorrichtung eingeführt. Die Vorrichtungen wurden unter Verwendung einer CCD-Kamera mit einer Belichtungszeit von bis zu 4 Minuten abgebildet. Für jedes der 12 Sulfonamide wurden Standardkurven erhalten. Eichkurven für jedes der 12 Sulfonamide sind in [Fig. 15](#) graphisch dargestellt. Der auf der Y-Achse aufgetragene % B/B₀-Wert stellt die durch jeden einzelnen Sulfonamid-Standard erzeugten % des Nullstandard RLU (relative Lichteinheit)-Werts (auf der X-Achse als log₁₀ aufgetragen) dar.

Beispiel 2 Hormon-Assay

[0098] In diesem Beispiel wurde ein Multianalyt-Assay für 3 Hormone mit hohem Molekulargewicht, z.B. Prolaktin (PL), Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH). Dieses Beispiel stellt einen Multianalyt-Assay für einen Sandwich-Immunoassay dar. Es wurde keine signifikante Kreuzreaktivität beobachtet, wenn die drei Hormone in der gleichen Gruppe bestimmt wurden.

[0099] Die Schritte der chemischen Vorbehandlung und Silanisierung erfolgten genau wie in Beispiel 1 beschrieben. Individuelle monoklonale PL-, FSH- oder LH-Antikörper (ung. 20 nl verteilter Antikörper) wurden an vereinzelter Bereichen des chemisch modifizierten Substrates immobilisiert. Die Multianalyt-Assays wurden sowohl auf Silizium- als auch auf Keramiksubstraten mit einer Epoxidoberfläche wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

[0100] In dem Assay wurden 150 µl eines Multi-LH/PL/FSH-Serum-Standards und 150 µl eines Verdün-

nungs-Assaypuffers zu der Vorrichtung gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 300 µl eines einfach-konjugierten Cocktails aus LH-HRPO/PL-HRPO/FSH-HRPO-Konjugaten zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Vorrichtung gewaschen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen, und das Chemilumineszenz-Reagenz [Luminol (1.4 mM)/Harnstoff-Wasserstoffperoxid (9.6 mM)] wurde eingeführt. Die Vorrichtungen wurden unter Verwendung einer CCD-Kamera mit einer Belichtungszeit von bis zu 4 Minuten abgebildet. Nach der Verarbeitung der Bilder, wurden für jedes der Hormone Standardkurven aufgetragen.

Beispiel 3 Sulfonamid-Assay

[0101] Im Gegensatz zu Beispiel 1 wurde auch ein Multisulfonamid-Assay mit Mikrokanälen durchgeführt. Die Vorrichtung ist in [Fig. 11](#) veranschaulicht. In diesem Beispiel sind die Reagenzzugabe-Reservoirs **21** 2 × 2 mm lang und 300 µm tief (Vol. 1.2 µl), die Kanäle **23** sind jeweils 5 mm lang, 200 µm breit und 100 µm tief (Vol. 100 nl), und das Reservoir **24** ist 1.9 × 8.6 mm lang und 300 µm tief (Vol. 4.9 µl).

[0102] Die chemische Modifizierung auf der Oberfläche erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Antikörper wurden zu jedem der Kanäle gegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Substrate wurden dann wie für Beispiel 1 blockiert und gewaschen.

[0103] Ein Multi-Sulfonamidstandard (200 µl) und Sulfonamid-Meerrettich-Peroxidase-Konjugate (100 µl) wurden gemischt. 1 µl des resultierenden Reagenz wurde in jedes der Reservoirs gegeben, die den mit Antikörper beschichteten Kanal für jedes Sulfonamid versorgen. Die Standards enthielten entsprechend 10 oder 100 ng/ml aller Sulfonamide.

[0104] Der Reagenzfluß erfolgte mittels Kapillarität. Nach einer Inkubation von 2 Minuten wurde das Substrat 5 Mal mit PBS/PEG gewaschen, und das Chemilumineszenz-Reagenz [Luminol (1.4 mM)/Harnstoff-Wasserstoffperoxid (9.6 mM)] wurde zugegeben.

[0105] Die Vorrichtungen wurden unter Verwendung einer CCD-Kamera mit einer Belichtungszeit von bis zu 4 Minuten abgebildet. Die % B/B₀-Werte für die 4 Sulfonamidkurven sind in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1

<u>Sulfonamid</u>	% B/B ₀		
	0 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml
Sulfamethazin	100	14	7
Sulfamethoxypyridazin	100	28	15
Sulfaquinoxalin	100	56	24
Sulfamerazin	100	40	22

[0106] Der Nutzen dieser Erfindung gegenüber der Photolithographie wurde durch das Ausmaß an unspezifischer Adsorption von biologischen Molekülen auf einem photolabilen (Benzophenon-behandelten) Substrat gezeigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Maus-IgG	Bestrahlung durch UV-Lampe (10 Minuten)	Graustufenmittelwert (RLU)	
v	v	22368	24022
v	X	17586	20531

[0107] Maus-IgG wurden mit einem anti-Maus HRPO-Konjugat unter Verwendung einer Chemilumineszenz-Detektion durch eine CCD-Kamera nachgewiesen. Die Silizium- oder Keramiksubstrate, die immobilisierte Benzophenon-photolabile Linker aufweisen, sollten kein Maus-IgG binden, wenn sie unter Lichtausschluß zur Reaktion gebracht werden. Dennoch tritt eine unspezifische Bindung auf, da ungefähr 80% der Graustufenmittelwert RLU, die bei Durchführung der Maus-IgG-Bindung unter UV-Licht erzielt wird, auf passive Bindungswechselwirkungen zurückzuführen sind. Ein Array biologischer Moleküle, die gemäß dieser Erfindung durch kovalente Wechselwirkungen immobilisiert wurden, ist nachweislich deutlicher ausgeprägt.

[0108] Der Hinweis auf kovalente Bindung wird in den nachstehend besprochenen Beispielen erbracht. In erster Linie wurden Keramiksubstrate mit APTES silanisiert und dann mit Biotin-LC-Sulfo-NHS zur Reaktion gebracht. Das Kontroll-Keramiksubstrat wurde nicht mit APTES silanisiert, weshalb keine terminalen nucleophilen NH_2 -Gruppen vorhanden waren, um mit dem Succinimidylester des Biotinderivates zu reagieren. Die Substrate wurden dann mit einem Avidin-FITC-Konjugat zur Reaktion gebracht und die Fluoreszenz mittels CCD-Kamera bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3

[Biotin-LC-NHS]	RLU APTES Substrat (Belichtung 1 Sekunde)	RLU Kontrollsubstrat (Belichtung 1 Sekunde)
0	2,448	NS
100 µg/ml	8,881	NS
500 µg/ml	7,922	NS

NS = Kein Fluoreszenzsignal detektiert.

[0109] Dies zeigt deutlich eine spezifische Immobilisierung von Biotin-LC-NHS. Die Höchstkonzentration an immobilisiertem Biotin-LC-NHS betrug ungefähr 100 µg/ml, da das RLU-Ergebnis für 500 µg/ml Substrat nicht zunahm.

[0110] In einem weiteren Beispiel wurden APTES-silanisierte Keramiksubstrate mit einem Dihydrazid-Linker zur Reaktion gebracht. Sulfonamid-Antikörper wurden mit Natriumperiodat behandelt, um ihnen eine Reaktivität gegenüber dem Hydrazid-Linker zu verleihen. Kontroll-Sulfonamid-Antikörper wurden lediglich gegen Natriumacetatpuffer pH 5.5 dialysiert. Die RLU-Ergebnisse sind in den Tabellen 4 (nicht behandelt) und 5 (mit dem Periodat-Verfahren behandelt) dargestellt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß der Hydrazid-Linker erfolgreich an die Keramikoberfläche gebunden wurde. Die Kontroll-Antikörper (keine Periodat-Aktivierung) ergaben im Vergleich zu den kovalent-immobilisierten Sulfonamid-Antikörpern sehr schlechte Standardkurven.

[0111] Die %-Werte der auf kovalenten oder passiven Wechselwirkungen beruhenden Bindung werden in Tabelle 6 verglichen. Die RLU-Werte für die Null- und 10 ng/ml Standards sind in Tabelle 7 gegeben. Kovalente Wechselwirkungen trugen im Durchschnitt 81.8% zu der Gesamtbindung bei, was deutlich auf eine kovalente Bindung der Sulfonamid-Antikörper hinweist.

Tabelle 4

SULFONAMID	0 ng/ml	10 ng/ml	% B/B ₀	100 ng/ml	% B/B ₀
Sulfadoxin	2825	1456	51	NS	-
Sulfamethizol	3531	1257	36	NS	-
Sulfachlorpyridazin	6476	1585	24	NS	-
Sulfamethoxypyridazin	1099	928	84	NS	-
Sulfamerazin	2177	1137	52	1224	56
Sulfisoxazol	4879	1108	23	NS	-
Sulfathiazol	2932	814	28	NS	-
Sulfamethazin	NS	NS	-	NS	-
Sulfaquinoxalin	1041	828	79	968	93
Sulfadimethoxin	804	NS	-	781	97

Tabelle 5

SULFONAMID	0 ng/ml	10 ng/ml	% B/B ₀	100 ng/ml	% B/B ₀
Sulfadoxin	10520	3240	31	2135	20
Sulfamethizol	17141	5689	33	4882	28
Sulfachlorpyridazin	24944	7565	30	2096	8
Sulfamethoxypyridazin	14082	10509	74	5687	40
Sulfamerazin	12594	5521	43	3240	26
Sulfisoxazol	24419	6686	27	2270	9
Sulfathiazol	14279	4602	32	2353	16
Sulfamethazin	3644	2810	77	2213	61
Sulfaquinoxalin	10575	6112	58	5588	53
Sulfadimethoxin	5526	2554	46	1983	36

Tabelle 6

Sulfonamid	Prozentanteil der Sulfonamid-Antikörper-Bindung	
	Kovalente Wechselwirkungen	Passive Wechselwirkungen
Sulfadoxin	73,1	26,9
Sulfamethizol	79,4	20,6
Sulfachlorpyridazin	74,0	26,0
Sulfamethoxypyridazin	92,2	7,8
Sulfamerazin	82,7	17,3
Sulfisoxazol	80,0	20,0
Sulfathiazol	79,4	20,6
Sulfamethazin	-	-
Sulfaquinoxalin	90,2	9,8
Sulfadimethoxin	85,4	14,6
Mittelwert	81,8	18,2

Tabelle 7

Sulfonamid	RLU			
	Kovalent		Passiv	
	0	10 ng/ml	0	10 ng/ml
Sulfadoxin	32756	11121	1950	904
Sulfamethizol	39020	11132	2783	1359
Sulfachlorpyridazin	39632	8434	4410	1051
Sulfamethoxypyridazin	29489	13408	1793	770
Sulfamerazin	28455	11077	2011	988
Sulfisoxazol	38486	5774	4083	1031
Sulfathiazol	28837	8087	2010	675
Sulfamethazin	11331	7535	802	574
Sulfaquinoxalin	13838	8716	951	548
Sulfadimethoxin	13062	5832	910	581

Kovalente Immobilisierung:

Direktes Spotten auf eine Glycidoxysilan-Oberfläche.

Passive Immobilisierung:

Direktes Spotten auf eine mit Dichlordimethylsilan umgesetzte Oberfläche.

[0112] Das kovalente Verfahren führt im Vergleich zum passiven Verfahren eindeutig zu besseren Ergebnissen. Die Ergebnisse des passiven Verfahrens können durch eine Säurevorbehandlung der Sulfonamid-Antikörper ungefähr um das Zweifache erhöht werden, aber dies liegt immer noch unter der kovalenten Vorgehensweise.

[0113] Es wurde auch eine Bestätigungsanalyse mittels Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) auf die chemisch modifizierten Silizium- und Keramiksubstrate angewandt. Von zwei willkürlichen Bereichen jeder Substratprobe wurden Übersichtsspektren aufgenommen, aus denen ihre chemischen Oberflächenzusammensetzungen bestimmt werden. Siehe Ergebnisse in Tabelle 8 (in Atom-% angegeben).

Tabelle 8

Probe	Bereich	C	O	Si	Al	N	Cl	Ca
Silizium-Substrat (unbehandelt)	1	21,9	52,7	25,4	-	-	-	-
	2	23,0	51,0	26,0	-	-	-	-
mit APTES silanisieretes Silizium-Substrat	1	55,5	23,3	10,5	-	10,2	0,5	-
	2	55,6	22,5	10,9	-	10,5	0,5	-
FITC- behandeltes APTES- Silizium-Substrat	1	51,3	25,6	13,0	-	7,2	2,9	-
	2	52,5	25,0	12,3	-	7,5	2,7	-
Keramik-Substrat (unbehandelt)	1	27,2	46,3	11,3	13,3	-	1,4	0,5
	2	27,1	46,6	9,6	14,8	-	1,1	0,7
APTES- silanisieretes Keramik-Substrat	1	47,0	31,6	13,4	2,6	5,4	-	-
	2	45,9	31,7	13,7	3,3	5,3	-	-
FITC- behandeltes APTES- Keramik-Substrat	1	52,0	29,3	11,3	2,4	5,0	-	-
	2	51,0	30,6	11,7	2,3	4,5	-	-

[0114] Die Ergebnisse der atomaren Zusammensetzung zeigen eine sehr gute Umsetzung der Silizium- und Keramik-Ausgangssubstrate mit APTES-Organosilan mit einer guten Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Oberflächenzusammensetzung für die zwei auf jeder Probe getesteten Bereiche. Die FITC-markierten Substrate zeigten eine Markierung von 70% und 77% des Siliziums beziehungsweise der Keramik.

[0115] Quantitative Verfahren der Fluoreszenzmessung an einem dunklen Siliziumsubstrat wurden mit jenen an einem weißen Keramik(Aluminiumoxid)-Substrat verglichen. Die RLU-Ergebnisse der CCD-Detektion für

Fluoreszenzmoleküle (FITC), die kovalent an jedes Substrat gebunden sind, wurden mit dem quantitativen Verfahren verglichen, nachdem die FITC-Moleküle mittels dem Verfahren von Hook et al (Langmuir 1991, Vol 7, 142-151) "gestrippt" wurden.

Tabelle 9

Substrat	CCD Belichtungszeit (Sek)	Graustufen- mittelwert		Anzahl "gestrippter" FITC- Moleküle/Substrat
		Seite 1	Seite 2	
Keramik	0,1	7483	7063	$4,548 \times 10^{15}$
Silizium	10	753	612	$1,412 \times 10^{16}$

[0116] Die quantitative Analyse der Fluoreszenzmarkierung, die mittels "Strippen" der FITC-Markierung vom Substrat und Messung des Signals mittels CCD-Kamera erhalten wurde (Tabelle 9) zeigt, daß sich trotz des 1000-fach höheren Signals für Keramik im Vergleich zu Silizium bedeutend mehr FITC-Moleküle auf dem Siliziumsubstrat befinden.

[0117] Ein weiteres Beispiel für diese Erscheinung ist durch die Ergebnisse in Tabelle 10 gegeben, die aus einem Prolaktin-Assay stammen, der an Silizium- und Keramik-Substraten unter Verwendung fluoreszenter Latexpartikel, die an einen Prolaktin-Detektionsantikörper als Detektionssystem gebunden sind, vorgenommen wurde. Es sind die RLU-Werte dargestellt (20 Sek Belichtung).

Tabelle 10

[Prolaktin]	RLU	
	Silizium-Substrat	Keramik-Substrat
Standard		
550 MIU/ml	814	8594
2200 MIU/ml	799	16735

[0118] Die Leistungsfähigkeit von Keramik liefert mit diesem Fluoreszenz-Detektionsverfahren bessere Ergebnisse als Silizium. Ferner kann das Problem des Schwarzkörper-Effekts auf Silizium unter Verwendung von Fluoreszenz gelöst werden, indem Chemilumineszenz als Detektionsmethode eingesetzt wird. Im Vergleich zwischen identischen an Silizium und Keramik ausgeführten FSH-Assays mittels Chemilumineszenz-Detektion erforderte das erstere eine 2 mal längere Belichtungszeit als Keramik, um zu dem selben RLU-Wert zu gelangen.

[0119] In dieser Beschreibung gelten folgende Abkürzungen:

APTES = Aminopropyltriethoxysilan
 CK-MB = Creatinkinase MB-Untereinheit
 HRPO = Meerrettich-Peroxidase
 LC-Sulfo-NHS = langkettiges Sulfo-N-Hydroxysuccinimid
 FITC = Fluoreszein-Isothiocyanat

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Festphasenvorrichtung zur Durchführung von Multianalyt-Assays, die ein Substrat und mehrere diskrete Reaktionsstellen umfaßt, von denen jede einen kovalent an das Substrat gebundenen Liganden trägt, wobei die Substratoberfläche zwischen den Reaktionsstellen inert gegenüber

dem Analyt ist, und das Verfahren folgende Schritte aufweist:

Aktivierung und Hydrophobierung der Oberfläche; und

Applikation einer Reihe von Liganden auf die aktivierte, hydrophobe Oberfläche, um die vereinzelt Reaktionsstellen zu bilden, wobei die Liganden in Wasser appliziert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, in dem die Oberfläche des Substrates nicht gleichförmig ist, wodurch durch die Wechselwirkung zwischen Ligand und Analyt ein verstärktes Signal erreicht werden kann.

3. Verfahren nach Anspruch 2, in dem die Oberfläche des Substrates eine Anordnung von Reaktionskanälen, Gärten, Säulen, Flecken, Kammern, Erhebungen, Löchern oder Vertiefungen umfaßt.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem das Substrat aus Keramik, Glas, Quarz oder Silizium ist.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem die Vorrichtung eine Oberfläche von weniger als 1 cm² hat.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem die Oberfläche jeder Reaktionsstelle weniger als 1 mm² beträgt.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, das außerdem eine Blockierung der aktivierten Oberfläche zwischen den Reaktionsstellen umfaßt.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem die Applikation der Liganden einen einleitenden Schritt der Kontaktierung der aktivierten Oberfläche mit einem Organosilan umfaßt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, in dem das Organosilan die Formel (RO)₃Si-(CH₂)_n-X hat, wobei jedes R eine Hydrocarbylgruppe, n eine ganze Zahl, und X eine funktionellen Gruppe ist.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, das die Verwendung eines bifunktionellen Crosslinkers umfaßt, um die kovalente Bindung biologischer Liganden an das Organosilan zu erleichtern.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, in dem ein photolabiler Crosslinker verwendet wird, um mit dem Organosilan zu reagieren, das eine nucleophile oder elektrophile Endgruppe besitzt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, das eine Derivatisierung der Oberfläche mit Makromolekülen, wie etwa Polystyrol-Latex-Partikeln, Dendrimeren oder Polyethylen-Glykol-enthaltenden chemischen Gruppen umfaßt, welche die kovalente Bindung der Liganden erleichtern.

13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, das außerdem eine Applikation von Liganden umfaßt, die Materialien binden, deren Gegenwart den Assay eines Analyts beeinträchtigt.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

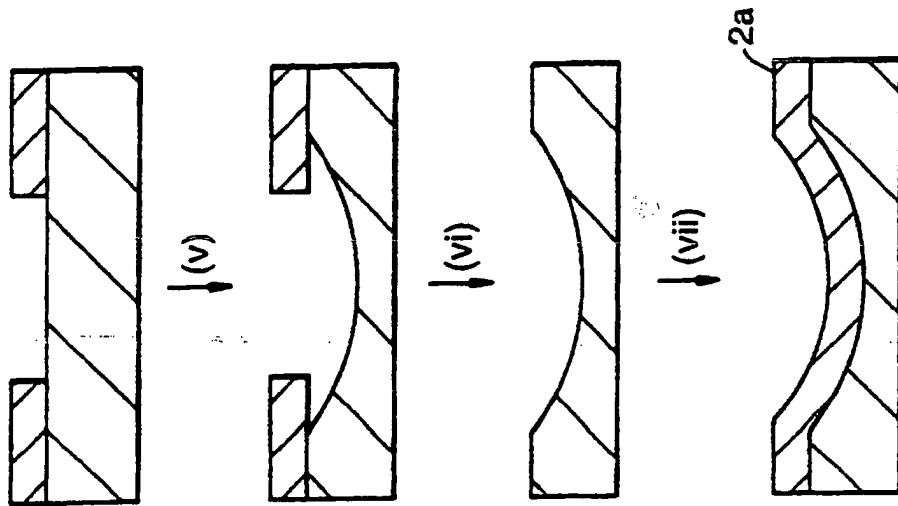


Fig. 1.

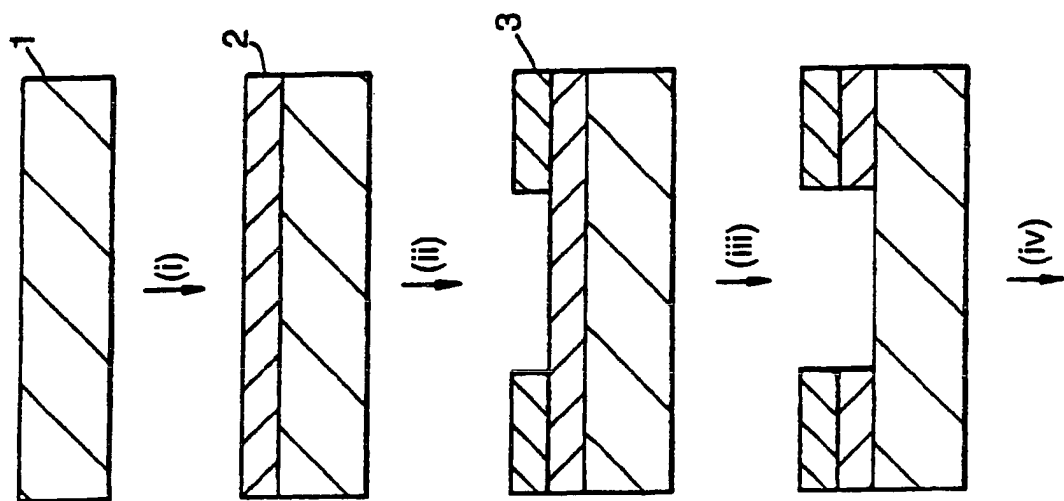


Fig.2.

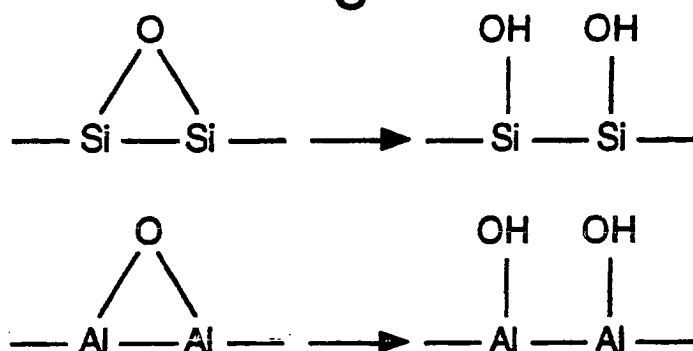


Fig.3.

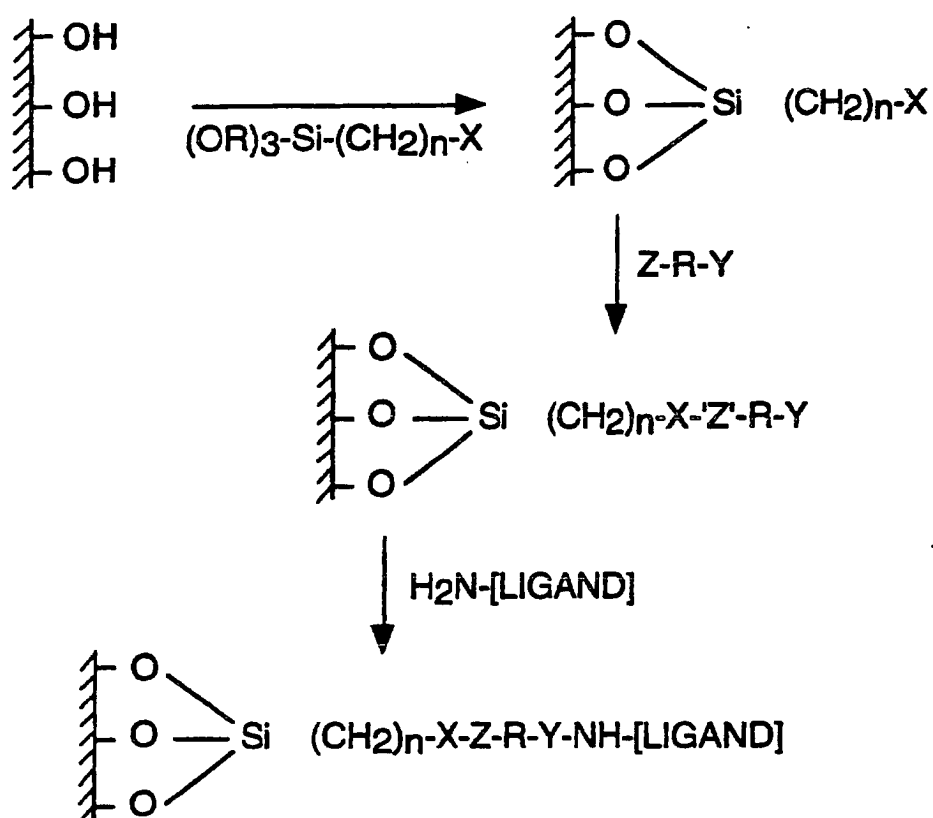


Fig.4.

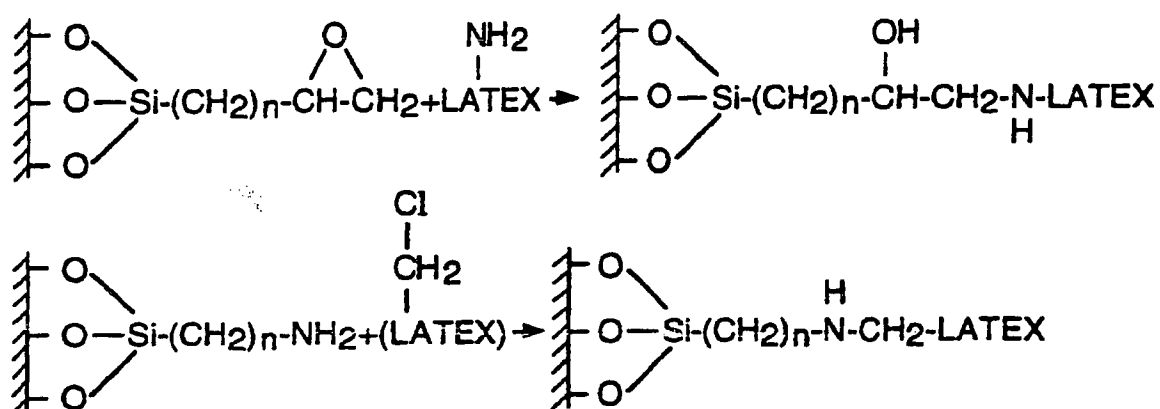


Fig.5.

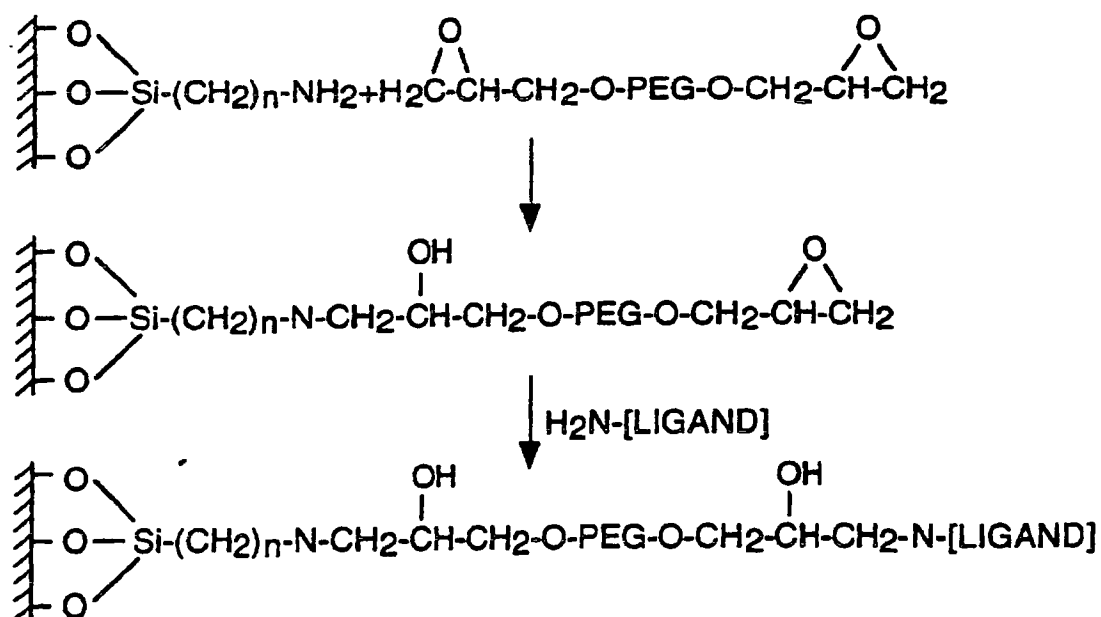


Fig.6.

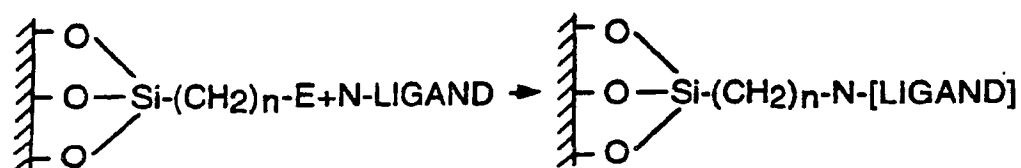


Fig.7.

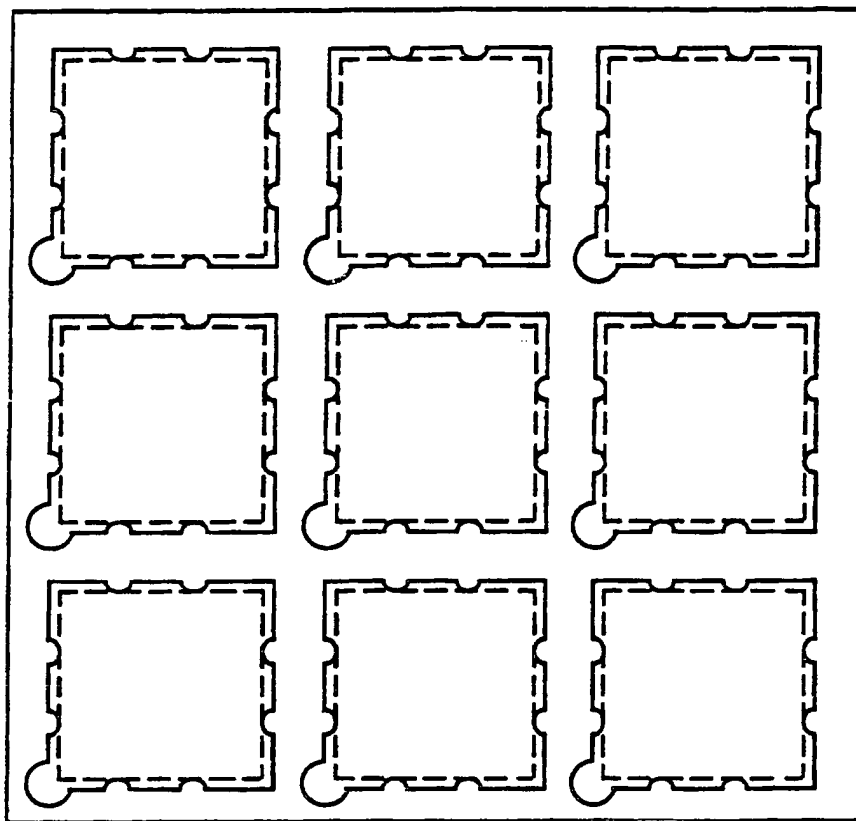


Fig.8.

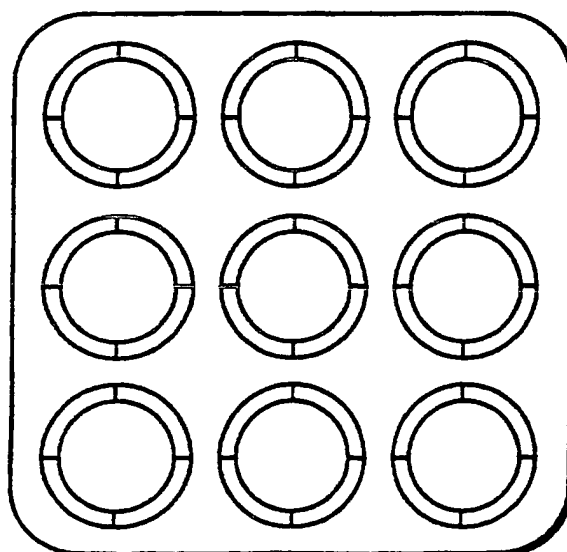


Fig.9.

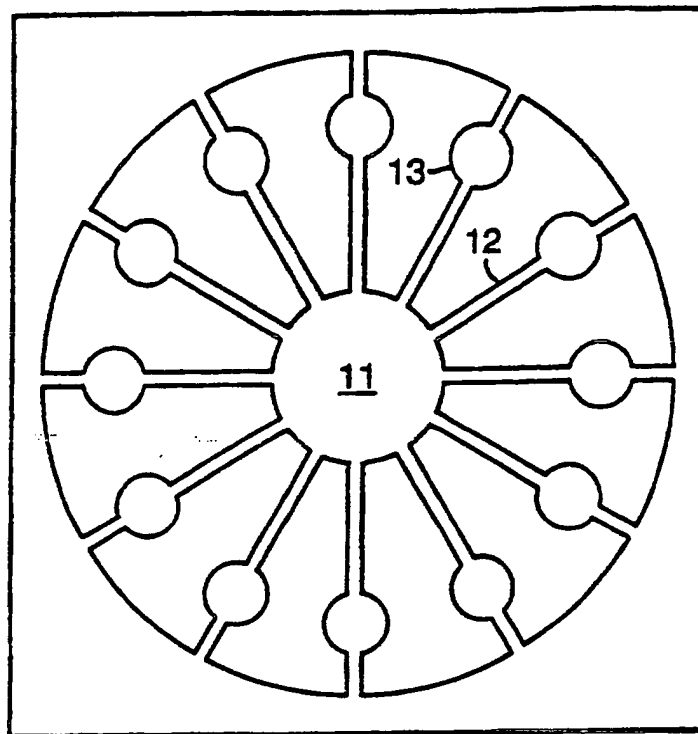


Fig.10.

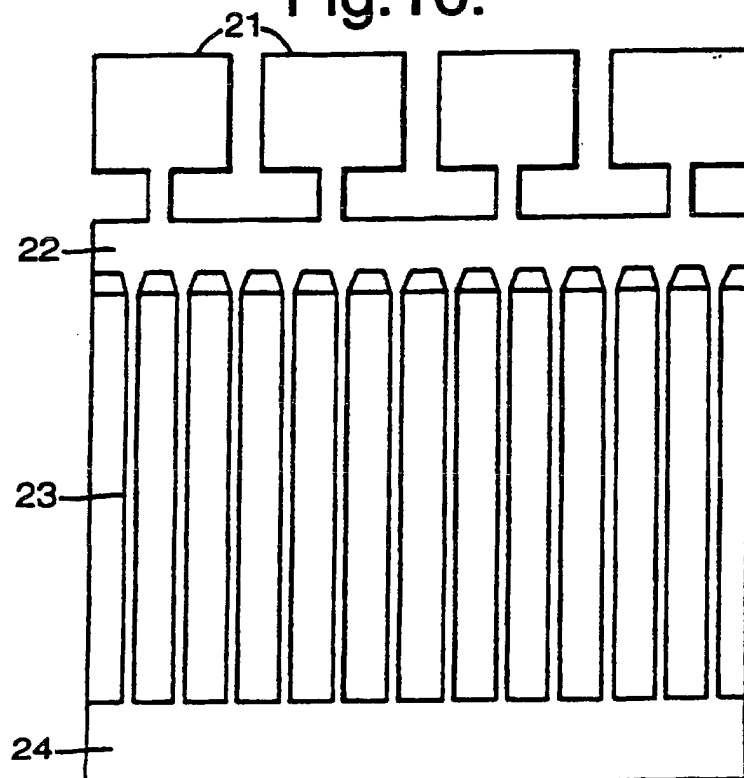
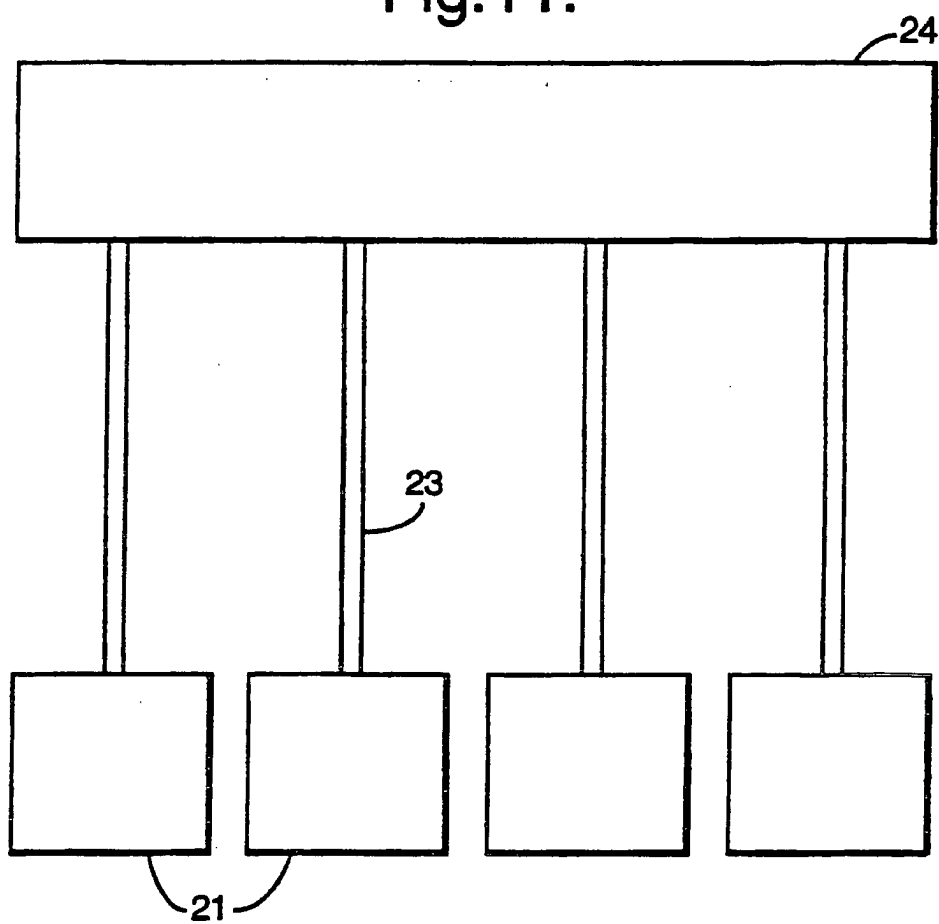


Fig.11.



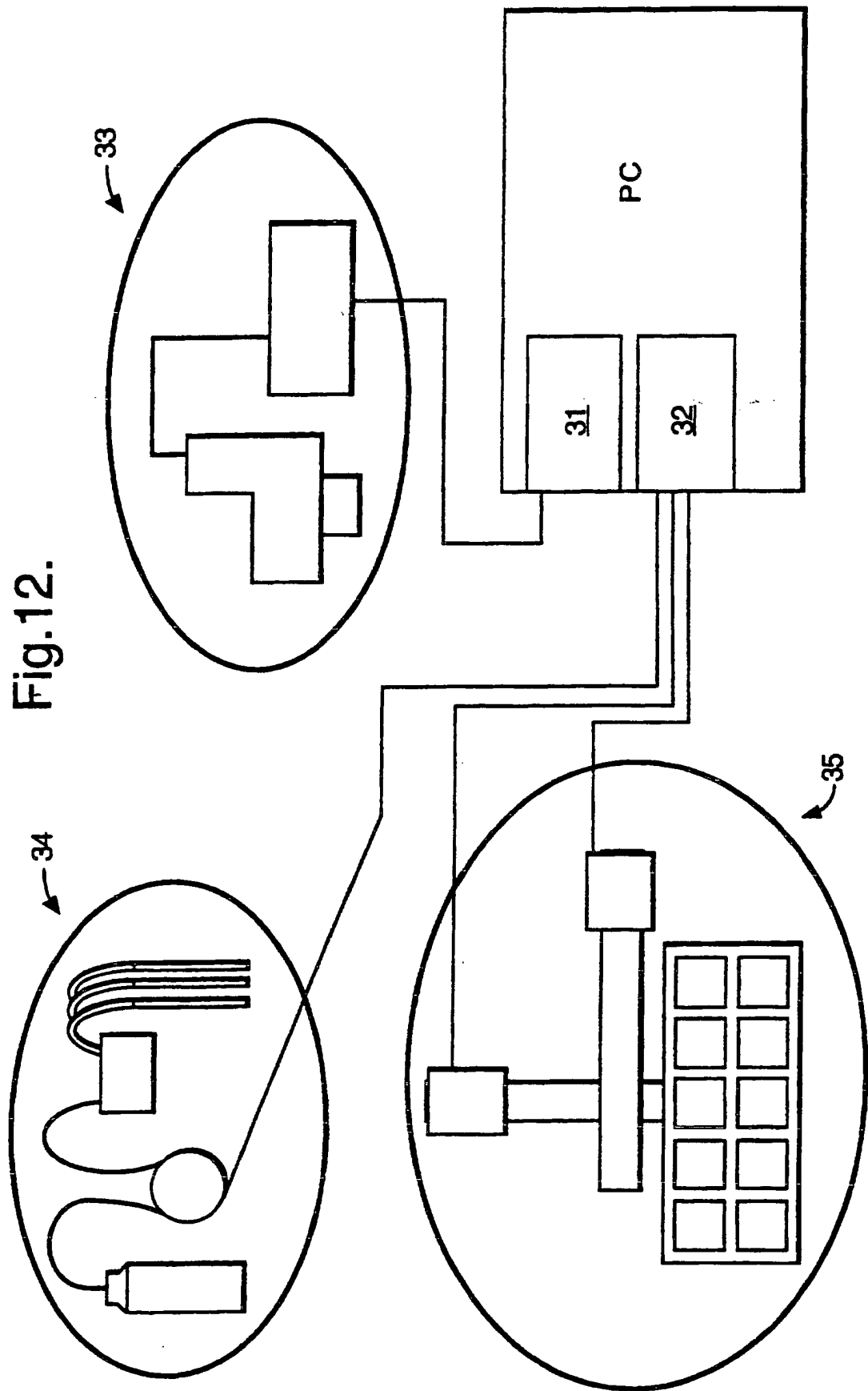


Fig.13.

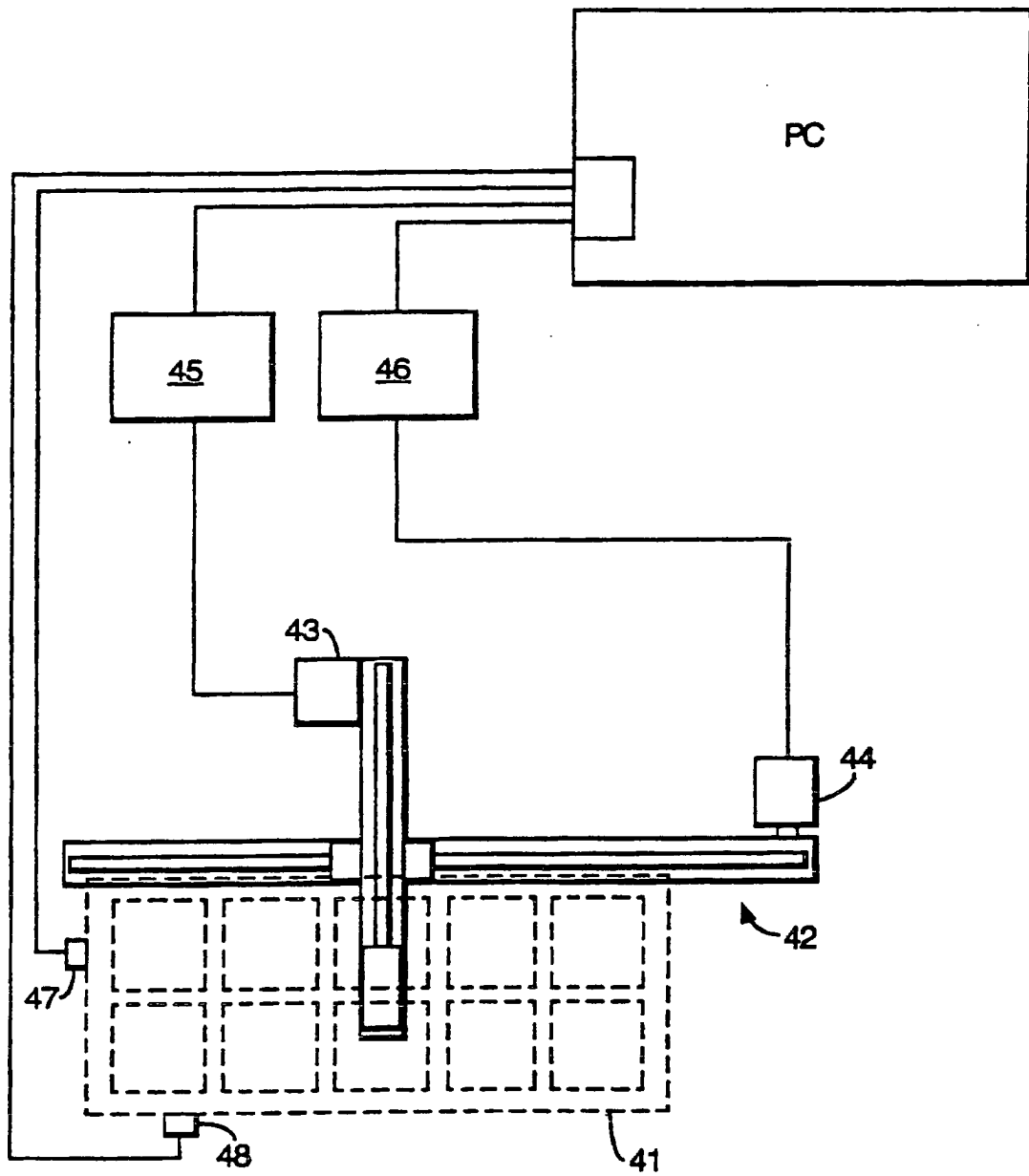


Fig.14A.

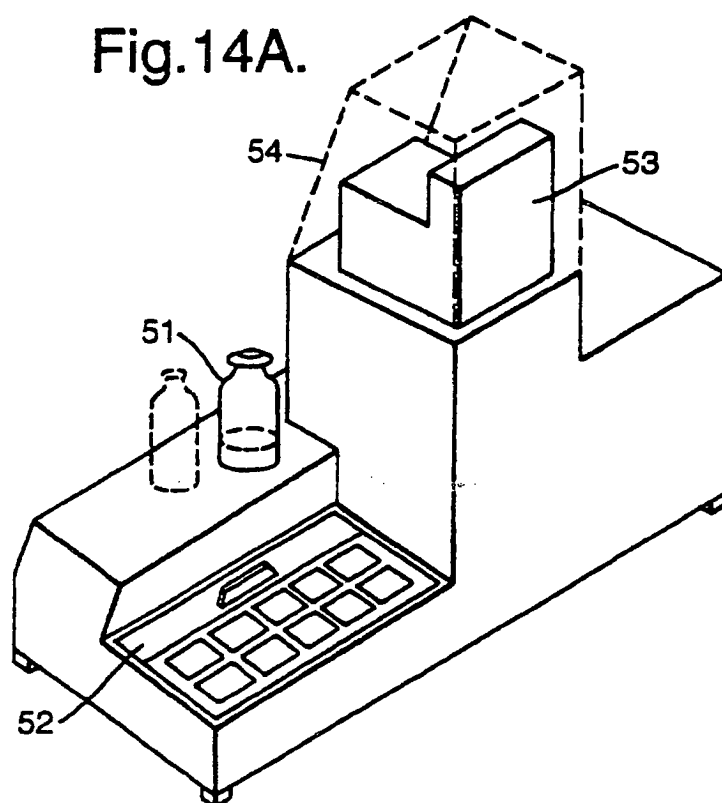


Fig.14B.

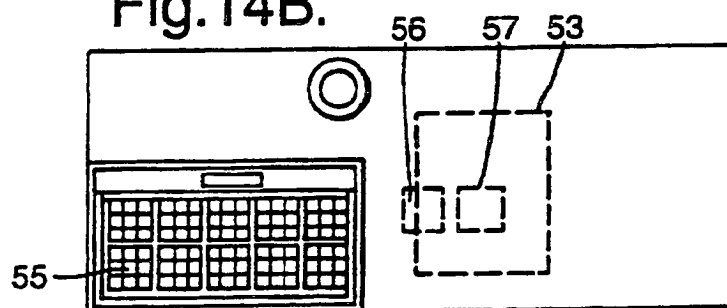


Fig.14C.

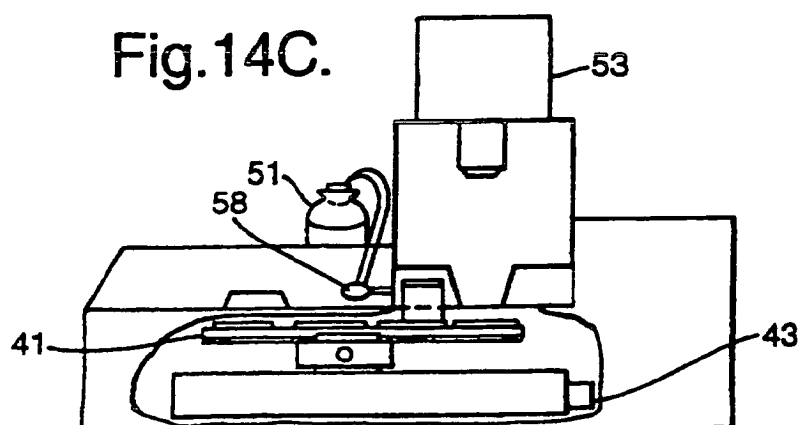


Fig.15.

