

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1619/2007
(22) Anmeldetag: 10.10.2007
(45) Veröffentlicht am: 15.10.2012

(51) Int. Cl. : **G01N 33/543** (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
WO 2004111648 A2
WO 200131339 A1
US 2003198968 A1

(73) Patentinhaber:
GREINER BIO - ONE GMBH
72636 FRICKENHAUSEN (DE)

(54) **OBERFLÄCHENMODIFIKATION**

(57) Die Erfindung betrifft einen Träger aus zumindest einem Substrat, das zumindest bereichsweise eine durch Plasmapolymerisation von Einzelbausteinen hergestellte Beschichtung aufweist, wobei die Beschichtung zumindest bereichsweise einen oder mehrere Freiräume zur Aufnahme zumindest eines Lösungsmittels aufweist.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Träger aus zumindest einem Substrat, das zumindest bereichsweise eine durch Plasmapolymersation von Einzelbausteinen hergestellte Beschichtung aufweist, dessen Verwendung sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

[0002] Bei Systemen für die Mikrofluidik oder in Microarray-Produkten zur Analyse biologischer Proben kommt dem Träger bzw. der Oberfläche bzw. der Oberflächenbeschaffenheit des Trägers eine große Bedeutung zu. Analysen dieser Art sind oft sehr mühselig und zeitaufwendig und es ist daher besonders wichtig dass die hierfür verwendeten Assays empfindlich und zuverlässig sind. Insbesondere kann durch Oberflächenmodifikationen, wie zB durch Veränderung der chemischen Funktionalität, eine für die Verwendung vorteilhafte Veränderung erzielt werden.

[0003] Chemisch modifizierte Oberflächen sind beispielsweise in der pharmazeutischen Industrie zur Entwicklung biologischer Testsysteme unabdingbar, da durch die gezielte Ausrüstung der Plattform mit definierten Schichten chemischer Funktionseinheiten die Interaktion Oberfläche/Biomolekül gesteuert werden kann. Die Microarraytechnologie basiert ebenfalls auf der Nutzung chemisch modifizierter Oberflächen zur Immobilisierung von DNA (Aminoberfläche) oder Proteinen (Aldehyd-, Epoxyoberfläche) [M. Pirrung, Angew. Chem. 2002, 41, 1276. - N. Zammateo et. al., Analytical Biochemistry 2000, 280, 143. - M. Shena: Microarrays, A practical approach, Oxford University Press 1999.]

[0004] Genomanalysen beinhalten die Verwendung biologischen Materials umfassend Nukleinsäuren und Proteine, wobei viele Analysen parallel durchgeführt werden können. Üblicherweise werden Biomoleküle durch chemische Kopplung oder Adsorption immobilisiert. Zurzeit werden Arrays mit Biomolekülen hergestellt, indem Probenaliquote unter Bedingungen abgeschieden werden, die es den Molekülen erlauben, an die Arrayoberfläche zu binden oder gebunden zu werden. Alternativ oder zusätzlich können Biomoleküle auf der Arrayoberfläche synthetisiert oder direkt oder indirekt immobilisiert werden. Die Anzahl unterschiedlicher Proben, die auf einem einzelnen Array aufgebracht werden, kann sehr hoch sein. Das Aufbringen kann durch Array-Printer erleichtert werden. Arrays sind üblicherweise Einmalprodukte, wodurch es wünschenswert ist bei deren Produktion ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und ein Minimum an Fehlern zu erzielen.

[0005] Um die gewünschten Effekte zu erzielen, ist bekannt Träger mit vielen Vertiefungen oder Mikrofluidikvorrichtungen chemisch zu behandeln, um die Affinität bzw. Retention ausgewählter Moleküle auf ihrer Oberfläche zu verbessern. Dabei ist es wünschenswert, die behandelte Oberfläche mit dem Zielmolekül mit hoher Affinität und Retention zu binden ohne gleichzeitig seine biologische Aktivität negativ zu beeinflussen, sodass ein reproduzierbarer Assay durchführbar ist.

[0006] Aus der WO 01/031339 A1 ist die Anwendung der Plasmapolymersation bekannt. Dabei wird ein ultradünner ca. 200nm vernetzter Polymerfilm auf einem Substrat mit kontrollierbarer chemischer Funktionalität abgeschieden. Die Eigenschaften des Substrats bleiben dabei weitgehend unbeeinträchtigt. Plasmen oder ionische Gase werden üblicherweise durch ein elektrisches Feld angeregt. Es handelt sich um ein äußerst reaktives chemisches Milieu, das Ionen, Elektronen, neutrale Teilchen und elektromagnetische Strahlung umfasst. Bei reduziertem Druck lassen sich Bedingungen schaffen, bei denen sich die Temperatur der Elektronen deutlich von jener der Ionen und der neutralen Teilchen unterscheidet. Es wurde von H. K. Yasuda, Plasma Polymerisation, Academic Press, London 1985, beschrieben, dass organische Verbindungen (Monomere) rein oder zusammen mit anderen Gasen, z.B. Argon, polymerisieren, wobei sowohl Oberflächen in Kontakt mit dem Plasma als auch stromabwärts der Entladung beschichtet werden. Die Plasmapolymersation ist eine effektive Route zur lösungsmittelfreien Generierung dünner (>5 nm) Schichten. Die Erzeugung eines kalten Plasmas geschieht im Vakuum durch eine elektrische Entladung, durch die eine sehr reaktive Umgebung bestehend aus Ionen, Radikalen, Elektronen und metastabilen Teilchen erzeugt wird. Durch die Wahl

geeigneter Reaktionsbedingungen wie Aktivierung, Druck, Leistungseintrag, Trägergase und organische Ausgangsverbindungen (Monomere) kann eine Polymerisation der Reaktionspartner und die Abscheidung des gebildeten Plasmapolymers auf Substraten erreicht werden. Plasmapolymere unterscheiden sich meist drastisch von herkömmlichen Polymeren aufgrund des Fehlens einer kontinuierlichen Wiederholeinheit sowie einem hohen Grad der Vernetzung. Grund hierfür ist das Vorkommen einer Vielfalt an reaktiven Spezies im Plasma und einer daraus folgenden geringeren Selektivität im Vergleich zu herkömmlichen Synthesewegen. Grundbedingung für die Nutzung potentieller Monomere ist das Verbringen der meist flüssigen Vorläufer in die Gasphase unter den gewählten Reaktionsbedingungen.

[0007] So wird in der DE 603 04 163 T2 eine Oberflächenmodifikation durch Plasmapolymersation beschrieben, wodurch eine Oberfläche, die ungleichmäßig ist und lokale Oberflächenbereiche definiert, hergestellt wird. Diese Oberfläche weist eine erhöhte Affinität für biologische Moleküle, die der Oberfläche ausgesetzt sind, auf. Dies wird dadurch erreicht, dass ein Teil des Plasmas durch eine Öffnung abgezogen wird. Alternativ kann ein Plasma an der Spitze oder in einer Mikrokapillare angeregt werden.

[0008] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es einen Träger zur Immobilisierung von Nukleinsäuren bei gleichzeitiger Minimierung unspezifischer Bindungen von Proteinen sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung zur Verfügung zu stellen.

[0009] Die Aufgabe der Erfindung wird jeweils eigenständig durch einen Träger mit einer Beschichtung, wobei die Beschichtung zumindest bereichsweise Freiräume zur Aufnahme eines Lösungsmittels aufweist, und einem Verfahren, wobei die Beschichtung zumindest bereichsweise mit Freiräumen zur Aufnahme eines Lösungsmittels erzeugt wird, gelöst.

[0010] Die so generierte Schicht kann für alle Anwendungen von Vorteil sein, die Nukleinsäuren, wie DNA, RNA, PNA, LNA oder eine Mischform davon, binden wollen und dabei gleichzeitig die Anbindung von Proteinen, wie z.B. Enzyme, Antikörper, Antigene, minimiert. Dies ist bei sehr vielen Nachweisreaktionen der Fall, die Nukleinsäuren als Fängersonden einsetzen. Am häufigsten genutzte Enzyme sind Meerrettichperoxidase (HRP), Glucose-Oxidase oder Alkali-Phosphatase, wobei diese sowohl für colorimetrische als auch chemolumineszenz- und fluoreszenz- Nachweisreaktionen eingesetzt werden. Im Analysenverlauf werden zuerst Analyten, die mit einem Hapten, wie z. B. Biotin, Antigen, markiert sind, an z.B. DNA-Sonden hybridisiert. Anschließend wird gewaschen und ein Enzym, das mit einem zum Hapten komplementären Fängermolekül, z.B. Streptavidin, Antikörper, gekoppelt ist, an den Analyt-Sonden Komplex gebunden. Nach einem weiteren Waschschriff wird das Enzym Substrat zugegeben und das Reaktionsprodukt detektiert. Somit kann auf vorteilhafte Weise erzielt werden, dass nur jene Moleküle, die einen Bindungspartner mit einer spezifischen Bindungsstelle finden, am Träger adhäreren und keine Signale durch unspezifische Anlagerungen von für die Nachweis- und Detektionsreaktion erforderlichen Reaktanden gebildet werden.

[0011] Die Freiräume bzw. Hohlräume können sich sowohl in zwei- als auch in dreidimensionaler Richtung erstrecken. Es kann dadurch eine Netzstruktur gebildet werden. Vorzugsweise weist die Beschichtung eine dreidimensionale Struktur auf und bildet eine dreidimensionale Matrix bzw. wird durch die Beschichtung eine dreidimensionale Struktur gebildet, wodurch die Anbindung von Proteinen weitestgehend verhindert wird.

[0012] Weiters zeigt sich von Vorteil, dass mit dem erfindungsgemäßen Träger, der eine quellbare Beschichtung aufweist bzw. mit dem Verfahren, wobei als Beschichtung ein zumindest bereichsweise quellfähiges Plasmapolymersat erzeugt wird, eine wirtschaftliche Oberflächenfunktionalisierung zur Generierung funktioneller Schichten zur Verfügung gestellt wird, weil durch die kostengünstige Veredelung des Substrates herkömmliche Basismaterialien mit neuartigen Eigenschaften ausgerüstet werden und somit neue Applikationen erschlossen werden können.

[0013] Die quellbare Schicht kann eine Hydratschicht aufweisen bzw. kann sich eine Hydratschicht nach Aufbringen eines vorwiegend wässrigen Mediums bilden, wodurch die hohe Bin-

dungskapazität für Nukleinsäuren bei gleichzeitig minimierter Proteinanbindung erzielt wird und somit eine Reaktionsoptimierung in Hinblick auf Sensitivität, Hintergrund und auch Probenverbrauch darstellt.

[0014] Die gebildete Beschichtung weist Kontaktwinkel aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 35° und einer oberen Grenze von 65° mit Wasser als Messflüssigkeit auf, wodurch sich ein bei Kontakt mit Reaktionslösungen in einem für quellbare Materialien charakteristisches Verhalten zeigt. Beim Aufbringen der Probe auf den Träger bildet sich kurzzeitig eine stationäre Phase eines auf der hydrophilen Oberfläche sitzenden Tropfens, der anschließend rasch in die Oberfläche eindiffundiert.

[0015] Es ist vorgesehen, dass die Beschichtung eine Dicke ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 4 nm, vorzugsweise 10 nm, und einer oberen Grenze von 300 nm, vorzugsweise 40 nm, aufweist. Zudem ist die gebildete Beschichtung defektfrei, vernetzt und langzeitstabil und beeinträchtigt nicht die geforderten Hauptcharakteristika der prozessierten Substrate, wie beispielsweise Transparenz oder Lösungsmittelbeständigkeit.

[0016] Das Material des Substrats des Trägers ist aus Kunststoff, aus einer Gruppe umfassend ein kohlenstoff- oder siliziumbasiertes Polymer, aus einer Gruppe umfassend Polystyrol (PS), Polyethylen (PE), Polyethylenterephthalat (PET, PETP, PBTP), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC), Polyamide, Nitrozellulose, Polymethylmetacrylat (PMMA), Styrolacrylnitril (SAN), Polycarbonat (PC), Cycloolefin-Copolymere (COC) wie Cyclopenten-Polyethylen-Copolymer, Cyclohexan-Polyethylen-Copolymer, Cyclohepten-Polyethylen-Copolymer sowie Cycloolefin-Polymere (COP) oder dgl., Ditanalpentoxid, Glas, Metall bzw. Kombinationen daraus, gebildet, wodurch aus dem Stand der Technik bekannte als auch neue Materialien mit Eigenschaften ausgerüstet werden können, die eine Bindung von Nukleinsäuren unter gleichzeitig keiner bzw. minimaler Proteinbindung zulassen. Besonders vorteilhaft zeigen sich auch Materialhybride aus Kunststoff und Glas.

[0017] Das Substrat kann auch als Membran ausgebildet sein, womit eine Vielfalt von Trägern modifiziert werden kann. Zudem ist das zu beschichtende Substrat nicht auf planare Grundkörper beschränkt, sondern es können auch strukturierte bzw. poröse Oberflächen beschichtet werden.

[0018] Weiters ist vorgesehen, dass die Einzelbausteine von zumindest einer Monomerspezies gebildet sind, wobei durch die Verwendung einer Spezies der Ausgangsverbindung bei Bedarf eine möglichst einheitliche Beschichtung erzielt werden kann. Die Einzelbausteinzugabe führt zur Plasmapolymerebildung.

[0019] Die Monomerspezies ist aus einer Gruppe umfassend Amine, Amide, Dialkyloxyethan ausgewählt, wobei die jeweilige Monomerspezies Reste aus einer Gruppe umfassend H, Alkyl oder Aryl aufweisen kann, wodurch eine Beschichtung mit optimalen Eigenschaften zur Bindung von Nukleinsäuren bei gleichzeitig minimierter Proteinbindung erzielt wird. Als Reste R können H, Alkyl, Aryl dienen, wobei vorzugsweise Reste mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, insbesondere 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, verwendet werden.

[0020] Vor oder während der Plasmapolymereisation kann eine Aktivierung der Oberfläche des Substrats im Plasma durchgeführt werden, wobei die Syntheseführung der Plasmapolymereisation ohne eine Vorbehandlung in einer guten Nukleinsäurebindungsfähigkeit bei gleichzeitiger Proteinabweisung resultiert. Auf vorteilhafte Weise wird mittels einer zweistufigen Synthese, bestehend aus Plasmabehandlung zur Aktivierung gefolgt von einer Plasmapolymereisation, eine Schicht abgeschieden, welche in der Lage ist, die bisherigen Limitierungen hinsichtlich Wirtschaftlichkeit und somit Nutzbarkeit in der medizinischen Diagnostik, der Bindungsfähigkeit von DNA kombiniert mit der gleichzeitigen Minimierung der unspezifischen Bindung von Proteinen zu überwinden. Die Performance bei einem zweistufigen Prozess ist deutlich besser. Durch eine vorgeschaltete Aktivierung können auch Verunreinigungen des Substrats bzw. an der Oberfläche des Substrats eliminiert werden.

[0021] Die Aktivierung kann mit einem Reaktionsgemisch umfassend ein Trägergas und ein

Reaktionsgas in einem Reaktor durchgeführt wird, wobei das Trägergas ein Inertgas und das Reaktionsgas ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Sauerstoff, Ammoniak, H_2 , N_2 , CO_2 , C_2H_2 , ist, womit kostengünstige Gase zur wirtschaftlichen Produktion plasmapolymerisierter Oberflächen verwendet werden können.

[0022] In einer Weiterbildung ist vorgesehen, dass zwischen der Aktivierung und der Plasmapolymerisation ein Spülgas, vorzugsweise ein Inertgas, dem Reaktor, insbesondere der Reaktionskammer, zugeführt wird, wodurch beispielsweise die Plasmapolymerisation störende Produkte aus der Reaktionskammer abtransportiert werden. Durch die Aktivierung der Substrate mittels Träger- und Reaktionsgase, wie z.B. O_2/Ar oder NH_3/Ar Plasmen, bei höherer Leistungseinkopplung werden auch Bindungsstellen generiert.

[0023] Die Aktivierung und/oder Plasmapolymerisation kann bei einer Leistungseinkopplung aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 W, vorzugsweise 2 W, insbesondere 5 W, und einer oberen Grenze von 2500 W, vorzugsweise 300 W, insbesondere 20 W, erfolgen. Bei einer zweistufigen Synthese erfolgt die Aktivierung vorzugsweise bei einer Plasmaleistung aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 2 W und einer oberen Grenze von 300 W und die Plasmapolymerisation bei einer Plasmaleistung aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 W und einer oberen Grenze von 80 W durchgeführt wird. Der gewählte Leistungseintrag ermöglicht die Gewährleistung der größtmöglichen Beibehaltung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Monomere.

[0024] Auch durch Bildung der Beschichtung durch gepulste Plasmen wird ermöglicht die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Monomere beizubehalten.

[0025] Die zumindest eine Monomerspezies kann flüssig oder gasförmig zugeführt werden, wobei die flüssigen Monomere direkt in den Reaktor eingespritzt werden können und unter den dort gegebenen Druckbedingungen in die Gasphase übergehen oder außerhalb verdampft und als Gas eindosiert werden. Eine Vorreinigung der Monomere mittels wiederholter vorgeschalteter Entgasungs-/Begasungs- oder Einfrier-/Entgasungszyklen ist nicht notwendig.

[0026] Der Druck während der Aktivierung und/oder Plasmapolymerisation ist aus einem Bereich mit einer oberen Grenze von 1,5 mbar, vorzugsweise 0,5 mbar, und einer unteren Grenze von 0,05 mbar, vorzugsweise 0,2 mbar, ausgewählt, wodurch optimale Druckverhältnisse für die Plasmapolymerisation gegeben sind.

[0027] Die Aktivierung wird für einen Zeitraum mit einer unteren Grenze von 1 min, vorzugsweise, 5 min, und einer oberen Grenze von 15 min, vorzugsweise 10 min, und/oder die Plasmapolymerisation für einen Zeitraum mit einer unteren Grenze von 1,5 min, vorzugsweise, 10 min, und einer oberen Grenze von 60 min, vorzugsweise 20 min, durchgeführt, wodurch optimale Ergebnisse bezüglich der Bindung von Nukleinsäuren bei gleichzeitiger minimierter Proteinbindung erreicht werden.

[0028] Um die Entnahme des Trägers aus der Reaktionskammer zu erleichtern und die Geruchsbelästigung so gering wie möglich zu halten, wird der Reaktor, insbesondere die Reaktionskammer, nach der Polymerisation mit Luft gespült und die Kammer belüftet.

[0029] Im Nachfolgenden werden Ergebnisse zur Analyse des erfindungsgemäßen Gegenstands bzw. Verfahrens dargestellt:

[0030] Es zeigen:

[0031] Fig. 1 FITR-Spektrum eines gemäß Ausführungsbeispiel 1 beschichteten Cycloolefinpolymer Trägers im Vergleich zu einem unbeschichteten Träger

[0032] Fig. 2 ToF SIMS Analyse einer Tiefenprofilierung und Feststellung der Schichtdicke von Ausführungsbeispiel 1

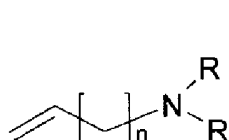
[0033] Einführend sei festgehalten, dass in den unterschiedlich beschriebenen Ausführungsbeispielen gleiche Teile mit gleichen Bezeichnungen versehen werden, wobei die in der gesamten Beschreibung enthaltenen Offenbarungen sinngemäß auf gleiche Teile mit gleichen Be-

zeichnungen übertragen werden können. Auch sind die in der Beschreibung gewählten Lageangaben, wie z.B. oben, unten, seitlich usw. auf die unmittelbar beschriebene sowie dargestellte Figur bezogen und sind diese bei einer Lageänderung sinngemäß auf die neue Lage zu übertragen. Weiters können auch Einzelmerkmale oder Merkmalskombinationen aus den gezeigten und beschriebenen, unterschiedlichen Ausführungsbeispielen für sich eigenständige, erfinderische oder erfindungsgemäße Lösungen darstellen.

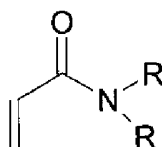
[0034] Sämtliche Angaben zu Wertebereichen in gegenständlicher Beschreibung sind so zu verstehen, dass diese beliebige und alle Teilbereiche daraus mit umfassen, z.B. ist die Angabe 1 bis 10 so zu verstehen, dass sämtliche Teilbereiche, ausgehend von der unteren Grenze 1 und der oberen Grenze 10 mit umfasst sind, d.h. sämtliche Teilbereich beginnen mit einer unteren Grenze von 1 oder größer und enden bei einer oberen Grenze von 10 oder weniger, z.B. 2 bis 9 oder 4 bis 7 oder 5 bis 6.

[0035] Das Fassungsvermögen der Reaktionskammer für nachfolgend beschriebenes und das erfindungsgemäße Verfahren umfasst zwischen $0,01 \text{ m}^3$ und $0,8 \text{ m}^3$.

[0036] Die Plasmabehandlung der Substrate mittels O_2/Ar oder NH_3/Ar Plasmen bei höherer Leistungseinkopplung dient der Aktivierung mittels Generierung von Bindungsstellen. Die sofort anschließende Reaktandenzugabe der unten aufgeführten Substanzklassen I bis III führt zur Plasmapolymerebildung. Als Reste R können H, Alkyl, Aryl dienen, wobei die Reste einer Substanzklasse entweder gleich oder verschieden sein können. In der Substanzklasse I ist n vorzugsweise zwischen 1 und 5 ausgewählt, wobei durch $n=1$ sehr gute Ergebnisse erzielt werden.



I



II



III

[0037] Zwischen dem Aktivierungsschritt und dem Polymerisationsschritt kann ein Spülgas (z. B. Argon) zur Entfernung der Reaktanden eingesetzt werden. In der bevorzugten Ausführung ist eine Reaktorspülung nicht notwendig.

[0038] Das zu beschichtende Substrat kann aus einem kohlenstoff- oder siliziumbasierten Polymer, Glas, Ditantalpentoxid, Metall oder auch Membranen bestehen und ist nicht auf planare Grundkörper beschränkt. Auch Kombinationen von Materialien sind prozessierbar.

[0039] Das Trägergas kann Argon oder ein anderes Inertgas sein; Reaktionsgase können Sauerstoff, Ammoniak, H_2 , N_2 , CO_2 oder ähnliche Vertreter sein.

[0040] Die Plasmaleistung erstreckt sich bevorzugt auf den Bereich von 0,1 W bis 2500 W, vorzugsweise 2 W bis 300 W, in besonders bevorzugter Ausführung von 5 W bis 20 W.

[0041] Plasmaquellen, wie aus dem Stand der Technik bekannt, können genutzt werden.

[0042] Die flüssigen Monomere können direkt in den Reaktor eingespritzt werden oder als Aerosole eingebracht werden und unter den dort gegebenen Druckbedingungen in die Gasphase übergehen oder außerhalb verdampft und als Gas eindosiert werden. Eine Vorreinigung der Monomere mittels wiederholter vorgeschalteter Entgasungs-/Begasungs- oder Einfrier-/Entgasungszyklen ist nicht notwendig.

[0043] Die Druckbereiche während der Polymerisation liegen bevorzugt zwischen 0,05 mbar und 1,5 mbar, in einer bevorzugten Ausführung zwischen 0,2 mbar und 0,5 mbar.

[0044] Die Schichtabscheidung resultiert abhängig vom Grundkörper in einer hydrophilen Ober-

fläche mit bevorzugten Kontaktwinkelbereichen von 35° bis 65° mit Wasser als Messflüssigkeit.

[0045] Die Reaktionszeit der Aktivierung kann im Bereich von 1 min bis 15 min liegen; in bevorzugter Ausführung im Bereich von 5 min bis 10 min.

[0046] Die Reaktionszeiten der Plasmapolymerisation liegen im Bereich von 1,5 min bis 60 min und in einer bevorzugten Ausführung im Bereich von 10 min bis 20 min.

[0047] Die Schichtdicke der Plasmapolymere beträgt 4 nm bis 300 nm, in bevorzugter Ausführung 10 nm bis 40 nm.

[0048] Nach der Polymerisation wird die Reaktionskammer für einen Zeitraum von 1 min bis 5 min mit Luft gespült, die Kammer belüftet und die beschichteten Grundkörper entnommen.

[0049] Abhängig von der Dimensionierung des Reaktors bzw. der Reaktionskammer kann es erforderlich sein, die oben angeführten Werte entsprechend auf die gewählte Dimensionierung anzupassen, was im routinemäßigen Ermessens des Fachmanns liegt.

[0050] Die resultierenden Schichten zeichnen sich bei Kontakt mit Reaktionslösungen in einem für quellbare Materialien charakteristischen Verhalten aus, indem sich bei Tropfenaufgabe kurz (1-2 sec) eine stationäre Phase eines auf der Oberfläche sitzenden Tropfens bildet, der im Anschluss schnell in die Oberfläche eindiffundiert. Dieses Quellen generiert eine Hydratschicht, die eine Adhäsion von Proteinen verhindert und bsp. für nasschemisch Polyethylenglykol (PEG) bzw. Polysaccharid versetzte Oberflächen gut dokumentiert ist (K. Emoto, Anal. Chem. 1996, 68, 3751 - C. Brink, Colloid Surf 1992, 66, 149 - Y.S. Lin, Colloids and Surf. B: Biointerfaces 1994, 3, 49 - E. Uchida, Langmuir 1994, 10, 481). Eine Mischung von PEG Derivaten mit Hydrophilic Lipophilic Balance Klassifizierungen zwischen 5 und 8 mit Basispolymeren, wie Polystyrol, ist in WO 1998/017407 A1 zur Erreichung einer Proteinabweisung dokumentiert.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 1:

[0051] Argon 5.6, NH₃ und N,N-Dimethylacrylamid werden wie vom Hersteller, z.B. Aldrich, Fluka, bezogen eingesetzt. Grundkörper aus Polystyrol, Cycloolefinpolymer und Glas werden in der Reaktionskammer platziert und der Druck auf 0,1 mbar reduziert. Es erfolgt die Dosierung von Argon und NH₃ unter einer Druckeinstellung auf 0,5 mbar und die Leistungseinkopplung von 180 W für 10 min. Nach dem Stoppen des Aktivierungsprozesses wird der Druck auf 0,1 mbar geregelt, durch Zugabe von Argon und N,N-Dimethylacrylamid auf 0,35 mbar erhöht und die Plasmapolymerisation bei einer Leistungsstufe von 15 W für 15 min durchgeführt.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 2:

[0052] Argon 5.6, NH₃ und N,N-Dimethylallylamin werden wie vom Hersteller bezogen eingesetzt. Grundkörper aus Polystyrol, Cycloolefinpolymer und Glas werden in der Reaktionskammer platziert und der Druck auf 0,1 mbar reduziert. Es erfolgt die Dosierung von Argon und NH₃ unter einer Druckeinstellung auf 0,5 mbar und die Leistungseinkopplung von 100 W für 10 min. Nach dem Stoppen des Aktivierungsprozesses wird der Druck auf 0,1 mbar geregelt, durch Zugabe von Argon und N,N-Dimethylallylamin auf 0,5 mbar erhöht und die Plasmapolymerisation bei einer Leistungsstufe von 15 W für 20 min durchgeführt.

AUSFÜHRUNGSBEISPIEL 3:

[0053] Argon und Dimethoxyethan werden wie vom Hersteller bezogen eingesetzt. Grundkörper aus Polystyrol, Cycloolefinpolymer und Glas werden in der Reaktionskammer platziert und der Druck auf 0,1 mbar reduziert. Es erfolgt die Dosierung von Argon und Dimethoxyethan unter einer Druckeinstellung auf 0,6 mbar und die Leistungseinkopplung von 6 W für 40 min.

[0054] Durch die hergestellten Freiräume ist die Proteinabweisung von erfindungsgemäß hergestellten Oberflächen um ein vielfaches höher als bei herkömmlich hergestellten, wie beispielsweise im Stand der Technik, beschriebenen Oberflächen. Die Bindungseigenschaften der funktionalisierten Oberfläche werden mit Hilfe eines kompetitiven ELISA Tests überprüft, wobei

sich eine um den Faktor 10 niedrigere Bindungseigenschaft für erfindungsgemäße Oberflächen im Vergleich zu herkömmlichen Oberflächen nachweisen lässt.

[0055] Weiters konnte eine verbesserte DNA Immobilisierung der aus den erfindungsgemäßen Verfahren resultierenden Schichten gezeigt werden, wodurch einerseits der Nukleinsäureverbrauch der zu immobilisierenden Sonden und andererseits der Probenverbrauch sinken. Die Bindungskapazität für DNA ist um mindestens 40 % bis 60 % höher als bei unfunktionalisierten oder aus dem Stand der Technik bekannten funktionalisierten Oberflächen.

[0056] Das weitgehend intakte Strukturmotiv $C(=O)N$ ist anhand der für Amide charakteristischen Carbonylbande bei 1680 cm^{-1} nachweisbar, wie im FITR Spektrum in Fig. 1 gezeigt wird, wobei der Peak bei 1680 cm^{-1} aus der erfindungsgemäßen funktionalisierten Oberfläche des Trägers resultiert, wohingegen unfunktionalisierte Oberflächen keinen Peak bei 1680 cm^{-1} zeigen.

[0057] Eine Tiefenprofilierung und Feststellung der Schichtdicke anhand der chemischen Schichtzusammensetzung mittels ToF SIMS liefert in der bevorzugten Ausführung des Beispiels 1 eine Schichtdicke von ca. 11 nm, wie in Fig. 2 dargestellt ist. Zur Ermittlung der Elementverteilung als Funktion der Tiefe werden Tiefenprofile erstellt. Bei der ToF-SIMS Tiefenprofilierung im so genannten "Dual-Beam-Mode" wird die Probenoberfläche mit einem Ionenstrahl (hier: Cs^+) kontinuierlich zerstäubt, während ein zweiter Ionenstrahl (hier: Bi^{3+}) zur Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung des so entstandenen Kraterbodens verwendet wird. Die zur Profilierung erforderliche massive Zerstäubung verursacht Schädigungen des Festkörpermateri als Funktion der Tiefe erfasst werden kann.

[0058] Auch Ergebnisse aus XPS Untersuchungen an Proben der Ausführungsbeispiele zeigen eine deutlich veränderte Zusammensetzung im Vergleich mit unbeschichteten Referenzen. Für die Messungen wurde ein PHI Quantera SXP Gerät verwendet: Anregungsstrahlung: $AlK\alpha$; Analysespot: $200 \times 200\text{ }\mu\text{m}^2$.

[0059] In der nachfolgenden Tabelle 1 wird der Vergleich der Elementkonzentrationen in Atomprozent von transparentem und weißem Polystyrol (PS) angeführt und zusätzlich die Konzentrationsverhältnisse angegeben. Die Ergebnisse für beide Proben sind einander sehr ähnlich. Insgesamt werden in den obersten ca. 10 nm der Proben 11,6 Atomprozent (At%) N und 13,7 At% O (transparentes Polystyrol) bzw. 15,8 At% N und 16,6 At% O (weißes Polystyrol) gefunden.

	C	O	N	C/O	C/N
PS, transparent	74.7	13.7	11.6	5.4	6.4
PS, weiß	67.7	16.6	15.8	4.1	4.3

Tab.1: prozentuale Anteile der chemischen Verschiebungen des C 1s Peaks

[0060] Nachfolgende Tab. 2 zeigt die prozentualen Anteile der chemischen Verschiebungen des C1s Peaks; (C1s aliphatisch/aromatisch: 284,8 eV; C-O/C-N: 286,2 eV; C=O/O-C-O: 287,5 eV)

[0061] Der Sauerstoff O 1s-Peak wird bei 531 eV gefunden (entsprechend O-C-Bindungen) und der N 1s-Peak bei 399,5 eV (entsprechend N-C-Bindungen).

[0062] Vergleicht man die beiden Tabellen, so kann man schließen, dass ca. 33% des Kohlenstoffs (entsprechend 24 At%) sind nicht als C-C gebunden sind. Bei 13 At% O und 11 At% N können daher praktisch kaum Bindungen von C zu 2 Sauerstoffen vorhanden sein. Somit ist das $C(=O)N$ Strukturmotiv auch nach der Plasmapolym erisation weiterhin bestimmend und eine Fragmentierung des Monomers weitgehend ausgeschlossen.

	C-C/C-H aliphatisch/aromatisch	C-O/C-N	C=O/O-C-O
PS, transparent	67	20	13
PS, weiß	68	16	16

Tab. 2: prozentuale Anteile der chemischen Verschiebungen des C 1s Peaks

[0063] Das Vorhandensein einer modifizierten Oberflächenschicht kann somit durch unterschiedliche Analysen bestätigt werden.

[0064] Die erfindungsgemäßen Träger können beispielsweise für Arraysysteme zum Nachweis von Analyten oder für mikrofluidische Strukturen verwendet werden. Typische Anwendungsmöglichkeiten sind Nukleinsäure-Hybridisierungsarrays mit Signalerzeugung, wobei hier mit aus dem Stand der Technik bekannten Methoden ein Blockierungsschritt, der die proteinbindenden Stellen der Oberfläche des Trägers mit einer nicht-proteinbindenden Schicht bedeckt, durchgeführt werden muss, weil sonst ein Signal durch den Hintergrund resultieren würde. Dieser Blockierungsschritt entfällt durch den erfindungsgemäßen Träger.

[0065] Durch die Erhöhung der Nukleinsäurebindungskapazität an die Oberfläche des erfindungsgemäßen Trägers kann auch eine Verbesserung der Empfindlichkeit von Nukleinsäure-Hybridisierungsassays erreicht werden und somit die Nachweisgrenze verbessert werden.

[0066] Auch für Immunoassays eignet sich der erfindungsgemäße Träger, weil es zu keiner unspezifischen Bindung von Proteinen an die Oberfläche kommt und dadurch ein störender Hintergrund für das Signal verhindert werden kann.

[0067] Durch das erfindungsgemäße Verfahren können auch Oberflächen, insbesondere Kunststoffoberflächen hydrophilisiert werden, sodass ein Transport von Proben in Mikrokanälen ermöglicht wird. Das Verfahren erlaubt die Modifikation von Oberflächen mit Vertiefungen, wodurch es sich auch für strukturierte Oberflächen eignet.

[0068] Die den eigenständigen erfinderischen Lösungen zugrunde liegende Aufgabe kann der Beschreibung entnommen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur zumindest bereichsweisen Modifikation einer Oberfläche eines Trägers aus zumindest einem Substrat durch Abscheiden einer Beschichtung mittels Plasmapolymersation, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Beschichtung zumindest bereichsweise mit Freiräumen zur Aufnahme zumindest einer Lösung erzeugt wird indem vor oder während der Plasmapolymersation eine Aktivierung der Oberfläche des Substrats im Plasma bei einer höheren Leistungseinkopplung als der Plasmapolymersation durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass zumindest bereichsweise ein quellfähiges Plasmapolymersat erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass durch die Beschichtung eine dreidimensionale Struktur gebildet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivierung mit einem Reaktionsgemisch umfassend ein Trägergas und ein Reaktionsgas in einem Reaktor durchgeführt wird, wobei das Trägergas ein Inertgas und das Reaktionsgas ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Sauerstoff, Ammoniak, H₂, N₂, CO₂, C₂H₂, ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass zwischen der Aktivierung und der Plasmapolymersation ein Spülgas dem Reaktor, insbesondere der Reaktionskammer, zugeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Spülgas ein Inertgas ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivierung und/oder Plasmapolymerisation bei einer Leistungseinkopplung aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 2 W und einer oberen Grenze von 300 W erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivierung und/oder Plasmapolymerisation bei einer Leistungseinkopplung aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 2 W, insbesondere 5 W, und einer oberen Grenze von 300 W, insbesondere 20 W, erfolgt und die Aktivierung vorzugsweise bei einer Plasmaleistung aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 2 W und einer oberen Grenze von 300 W und die Plasmapolymerisation bei einer Plasmaleistung aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 0,1 W und einer oberen Grenze von 80 W durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Beschichtung durch gepulste Plasmen abgeschieden wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Plasmapolymerisation durch Zugabe zumindest einer Monomerspezies durchgeführt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zugabe der zumindest einen Monomerspezies flüssig und/oder gasförmig erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Druck während der Aktivierung und/oder Plasmapolymerisation aus einem Bereich mit einer oberen Grenze von 1,5 mbar, vorzugsweise 0,5 mbar, und einer unteren Grenze von 0,05 mbar, vorzugsweise 0,2 mbar, ausgewählt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivierung für einen Zeitraum mit einer unteren Grenze von 1 min, vorzugsweise, 5 min, und einer oberen Grenze von 15 min, vorzugsweise 10 min, durchgeführt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Plasmapolymerisation für einen Zeitraum mit einer unteren Grenze von 1,5 min, vorzugsweise, 10 min, und einer oberen Grenze von 60 min, vorzugsweise 20 min, durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Reaktor, insbesondere die Reaktionskammer, nach der Polymerisation mit Luft gespült und die Kammer belüftet wird.
16. Träger hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 aus zumindest einem Substrat, das zumindest bereichsweise eine durch Plasmapolymerisation von Einzelbausteinen hergestellte Beschichtung aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Beschichtung eine hohe Bindungskapazität für Nukleinsäuren bei gleichzeitig minimierter Proteinanbindung aufweist.
17. Träger nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Beschichtung zumindest bereichsweise quellbar ist.
18. Träger nach Anspruch 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Beschichtung zumindest bereichsweise eine dreidimensionale Struktur aufweist.
19. Träger nach einem der Ansprüche 16 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass die quellbare Schicht eine Hydratschicht bildet.
20. Träger nach einem der Ansprüche 16 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass die gebildete Beschichtung Kontaktwinkel aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 35° und einer oberen Grenze von 65° mit Wasser als Messflüssigkeit aufweist.
21. Träger nach einem der Ansprüche 16 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Beschichtung eine Dicke ausgewählt aus einem Bereich mit einer unteren Grenze von 4 nm, vorzugsweise 10 nm, und einer oberen Grenze von 300 nm, vorzugsweise 40 nm, aufweist.

22. Träger nach einem der Ansprüche 16 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Material des Substrats vorzugsweise aus Kunststoff, aus einer Gruppe umfassend ein kohlenstoff- oder siliziumbasiertes Polymer, aus einer Gruppe umfassend Polystyrol (PS), Polyethylen (PE), Polyethylenterephthalat (PET, PETP, PBTP), Polypropylen (PP), Polyvinylchlorid (PVC), Polyamide, Nitrozellulose, Polymethylmetacrylat (PMMA), Styrolacrylnitril (SAN), Polycarbonat (PC), Cycloolefin-Copolymere (COC) wie Cyclopenten-Polyethylen-Copolymer, Cyclohexan-Polyethylen-Copolymer, Cyclohepten-Polyethylen-Copolymer sowie Cycloolefin-Polymere (COP) oder dgl., Ditanalpentoxid, Glas, Metall bzw. Kombinationen daraus, gebildet ist.
23. Träger nach einem der Ansprüche 16 bis 22, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Substrat als Membran ausgebildet ist.
24. Träger nach einem der Ansprüche 16 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Einzelbausteine von zumindest einer Monomerspezies gebildet sind.
25. Träger nach einem der Ansprüche 16 bis 24, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Monomerspezies aus einer Gruppe umfassend Amine, Amide, Dialkyloxyethan ausgewählt ist.
26. Träger nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Monomerspezies Amine Reste aus einer Gruppe umfassend H, Alkyl oder Aryl aufweist.
27. Träger nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Monomerspezies Amide Reste aus einer Gruppe umfassend H, Alkyl oder Aryl aufweist.
28. Träger nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Monomerspezies Dialkyloxyethan Reste aus einer Gruppe umfassend H, Alkyl oder Aryl aufweist.
29. Verwendung des Trägers nach einem der Ansprüche 16 bis 28 für Arraysysteme zum Nachweis von Analyten.
30. Verwendung des Trägers nach einem der Ansprüche 16 bis 28 für mikrofluidische Bauteile.

Hierzu 2 Blatt Zeichnungen

Fig.1

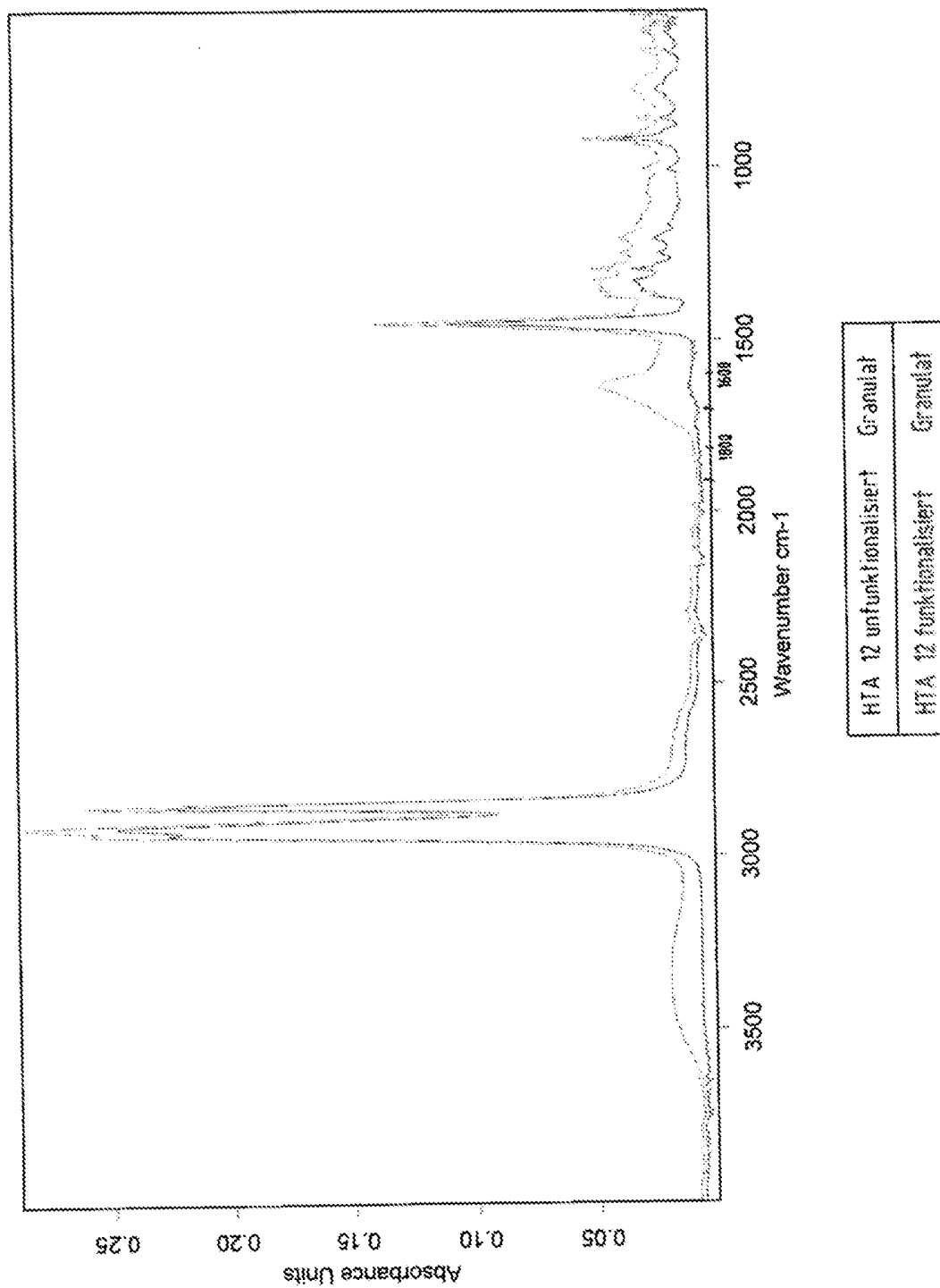


Fig.2

