

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 510 254 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
02.03.2005 Patentblatt 2005/09

(51) Int Cl.7: B01L 3/00

(21) Anmeldenummer: 04020359.8

(22) Anmeldetag: 27.08.2004

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL HR LT LV MK

(72) Erfinder: **Wahl, Hans-Peter**
79650 Schopfheim (DE)

(74) Vertreter: **Silber, Anton**
Roche Diagnostics GmbH
Patentabteilung
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim (DE)

(30) Priorität: 30.08.2003 EP 03019811

(71) Anmelder:
• **Roche Diagnostics GmbH**
68305 Mannheim (DE)
Benannte Vertragsstaaten:
DE
• **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**
4070 Basel (CH)
Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY DK EE ES FI FR GB GR HU IE
IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR

(54) Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung von Analyten in einer Flüssigkeit

(57) Die Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit, wobei das zu untersuchende Flüssigkeitsvolumen (19,20) auf ein Substrat (1) einer Transportebene aufgebracht wird, das zu untersuchende Flüssigkeitsvolumen (19,20) auf diesem Substrat (1) an den Ort der Untersuchung bewegt wird, wobei die Flüssigkeit ausschließlich mit dem Substrat der Transportebene in Kontakt ist, die zu untersuchende Flüssigkeit am Ort der Untersuchung zu-

sätzlich mit einem sensorischen Element (21) in Kontakt gebracht wird, welches sich in einer dem Substrat gegenüberliegenden Nachweisebene befindet, und der Analyt im zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen direkt oder indirekt durch das sensorische Element bestimmt wird. Die Anmeldung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit entsprechend den erfindungsgemäßen Verfahren.

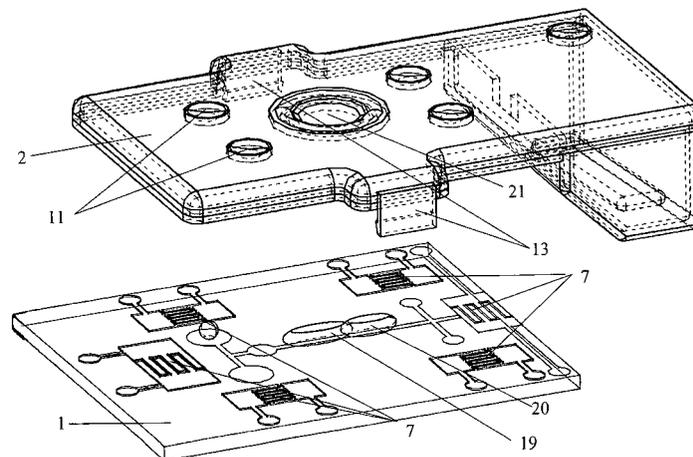


FIG 3

EP 1 510 254 A2

Beschreibung

[0001] Die Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit sowie eine Vorrichtung zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit entsprechend den erfindungsgemäßen Verfahren.

Stand der Technik

[0002] Der analytische Nachweis und die Konzentrationsbestimmung bestimmter biologisch und medizinisch relevanter Substanzen aus komplexen Proben stellt eine wichtige Grundlage der modernen medizinischen Diagnostik dar. In den letzten Jahren wurden Methoden und Verfahren entwickelt, mit immer kleiner werdenden Probenvolumina exakte analytische Ergebnisse zu erreichen, vor allem durch die Einführung mikroanalytischer Verfahren. Die in zunehmendem Maße eingesetzten "Lab-on-a-chip"-Systeme arbeiten mit Flüssigkeitsmengen im Mikro- bis Nanoliterbereich, welche in diesen Systemen an einen räumlich definierten analytischen Bereich, den Ort der Untersuchung, bewegt werden müssen. An diesen Orten erfolgt dann die eigentliche Bestimmung des Analyten, meist mit spezifischen Sensoren.

[0003] Herkömmliche "Lab-on-a-chip"-Systeme bestehen im allgemeinen aus mikrostrukturierten geschlossenen Kanälen, welche den Flüssigkeitstransport zu den eigentlichen sensorischen Elementen bewirken. Zur Bewegung der Flüssigkeiten werden zumeist mechanische Mikropumpen oder elektrokinetische Verfahren eingesetzt. So können Flüssigkeiten in diesen Kanälen beispielsweise durch Elektroosmose, hydrostatische Druckunterschiede, Kapillarkräfte oder Zentrifugalkräfte bewegt werden. Weitere Methoden, kleinste Flüssigkeitsmengen zu transportieren, sind das "Electrowetting", wie es beispielsweise in "Electrostatic Actuation of Liquid Droplets for Microreactor Applications" (Washizu M. in IEEE Transactions of Industry Applications 34(4):732-737, 1998), "Creating, Transporting, Cutting, and Merging Liquid Droplets by Electrowetting-Based Actuation for Digital Microfluidic Circuits" (Cho S. K., Moon H. Kim C.J. in Journal of Microelectromechanical Systems 12(1):70-80, 2003) oder "Micropumping by Electrowetting" (Kim C.J. in Proceedings of 2001 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, November 11-16, 2001, New York, NY) beschrieben ist, und der Transport von Flüssigkeiten auf Oberflächen mit Hilfe von akustischen Oberflächenwellen, sogenannten Surface Acoustic Waves (SAW), wie es beispielsweise in "Flatland fluidics" (Wixforth A., Scriba J. und Gauer C. in mstnews 5/02, Seite 42-43) beschrieben ist.

[0004] Die Bestimmung von Analyten in mikroanalytischen Systemen erfolgt meist mittels Sensoren, die in die Kanäle der Chips integriert sind. Die Messmethoden der eingesetzten Sensoren beruhen in den bisher ein-

gesetzten mikroanalytischen Verfahren insbesondere auf spektroskopischen Methoden wie beispielsweise Fluoreszenz- oder Absorptionsmessungen, elektrochemischen Methoden, Leitfähigkeitsmessungen, Lumineszenz- oder Elektrochemilumineszenzverfahren sowie Nachweisverfahren mittels Wellenleiter-Sensoren. Dahingegen haben sich Biosensoren, ionenselektive Elektroden und andere Sensoren, welche in der makroskopischen Routinediagnostik verbreitet eingesetzt werden, bisher in mikroanalytischen Systemen als nicht routinetauglich erwiesen. Gründe hierfür sind insbesondere die hohen Herstellungskosten solcher mikrostrukturierter Sensoren und Elektroden sowie die bisher unbefriedigenden Möglichkeiten, Flüssigkeiten durch aktives Pumpen von außen in diesen Systemen zu bewegen. Weitere mikroanalytische Vorrichtungen sind insbesondere Proteinarrays und Arrays zur Bestimmung von Nukleinsäuren. Weiterhin gibt es Sensor-Module, welche in klinischen und/oder chemischen Analysegeräten eingebaut sind. Diese sind vor allem Module für die Bestimmung von Elektrolyten und anderen Analyten wie beispielsweise Glukose oder Laktat. Diese in Laboratorien etablierten Verfahren arbeiten jedoch meist mit deutlich größeren Probevolumina.

[0005] Die üblicherweise eingesetzten mikroanalytischen Vorrichtungen sind, mit Ausnahme von Arrays für die Protein- bzw. Nukleinsäureanalytik, fast ausschließlich aus mikrofluidischen Kanälen aufgebaut. Diese geschlossenen Kanäle sind wenige Mikrometer breit und tief, aber meist sehr lang, so dass das Volumen dieser Kanäle relativ zu deren Querschnitt groß ist. Hierdurch kann in diesen Systemen ein erheblicher Anteil des Probenvolumens nicht zur Bestimmung des Analyten in den sensorischen Bereichen des Systems genutzt werden, sondern stellt nicht nutzbares Totvolumen dar. Damit sind einer weiteren Verringerung der benötigten Probenmenge in diesen Kanalsystemen prinzipielle Grenzen gesetzt. Weiterhin besitzen derartige Kanäle den großen Nachteil, dass die mit der Probe in direktem Kontakt stehende Oberfläche im Verhältnis zum Volumen sehr groß ist. Dadurch ergibt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Bestandteile der Flüssigkeit an der Oberfläche der Kanäle zurückbleiben und damit Proben, welche für spätere Messungen in dem selben Kanälen bewegt werden, verunreinigen können. Derartige Systeme können somit aufgrund der genannten Verschleppungsproblematik oft nur als Einwegartikel eingesetzt werden. Solche mikroanalytischen Systeme besitzen weiterhin den Nachteil, dass sich in Mikrokanälen Flüssigkeiten nicht oder nur sehr aufwändig miteinander mischen lassen und eventuell auftretende Luftblasen den Fluss in den Kanälen leicht zum Stillstand bringen können. Dadurch werden solche Systeme relativ stör anfällig und in der Herstellung teuer, so dass sie aus Kostengründen im Routinebetrieb mehrfach benutzt werden müssten, was aber aus obengenannten Gründen (Verschleppungsproblematik) derzeit nicht realisierbar ist.

[0006] Ionenselektive Elektroden werden zur Zeit vor allem in makroskopischen Analysesystemen, insbesondere in Elektrolyt-Analyse-Modulen klinischer und chemischer Analysesysteme, eingesetzt. Derartige makroskopische Nachweissysteme weisen erhebliche Nachteile auf. So benötigen derartige Module und Systeme neben den deutlich größeren Probenvolumina zahlreiche Schläuche, Ventile und Pumpen, welche den Fluss der Flüssigkeiten innerhalb dieser Systeme steuern. Beispielsweise müssen Luftsegmente in den Flüssigkeitsstrom eingebracht werden, um die Schläuche und die Sensoren zwischen den einzelnen Messungen und Kalibrierungen zu reinigen. Für die Steuerung der Flüssigkeitsströme werden weitere Sensoren, insbesondere Lichtschranken oder Leitfähigkeitssensoren, benötigt, um sicherzustellen, dass die Luftsegmente korrekt ein- bzw. ausgeschleust werden. Obwohl, ähnlich wie bei mikroanalytischen Systemen mit mikrofluidischen Kanälen, nur ein relativ geringes Volumen für die eigentliche Bestimmung des Analyten benötigt wird, muss in den derzeitigen Systemen ein ungefähr zwanzigmal größeres Flüssigkeitsvolumen eingesetzt werden, um eine verschleppungsfreie Messung sicherzustellen. Solche Systeme sind daher oft sehr störanfällig und wartungsintensiv. Durch die oben beschriebenen Bauweise ist es nicht möglich, handliche und mobil einsetzbare Geräte zu bauen, welche idealerweise für das Arztlabor oder eine patientennahe Diagnostik einsetzbar wären. Ein weiterer Nachteil der oben beschriebenen Geräte sind die hohen Produktionskosten, da alle Systeme und Module aus vielen unterschiedlichen Komponenten zusammengesetzt werden müssen. Im Gegensatz zu makroskopischen Analysesystemen gibt es für mikroanalytische Verfahren und Vorrichtungen bisher keine ionenselektiven Elektroden, die sich wie ihre makroskopischen Analoga im Routinebetrieb für Vielfachmessungen eignen.

[0007] Einen Spezialfall von mikroanalytischen Systemen stellen die Microarrays dar. Unter Microarrays versteht man analytische Systeme, welche auf einer Trägersubstanz viele sensorische Elemente, meist in regelmäßigen Abständen zueinander angeordnet, besitzen, so dass diese für viele simultan oder zeitlich versetzt ablaufende Bestimmungen eingesetzt werden können. Insbesondere werden Microarrays zur Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren eingesetzt. Solche Arrays lassen sich nur schwer regenerieren, so dass derartige Systeme aus den oben beschriebenen Gründen ebenfalls nicht für einen mehrfachen Gebrauch geeignet sind.

[0008] Manche Mikroarrays zur Proteinbestimmung arbeiten mit planaren Oberflächen. Diese Arrays erfordern allerdings relativ große Volumina. So muss in derartigen Systemen beispielsweise mit circa 50 Mikrolitern Probenflüssigkeit inkubiert werden, um die Bindung der Analyten mit den Nachweismolekülen zu gestatten. Um eine Verarmung der Analyten zu verhindern, muss die Probe hierbei durchgemischt werden, was ein großes

technisches Problem darstellt.

[0009] Diese Arrays sind alle zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Man setzt meist flächige Arrays mit großen Volumina ein, bei denen das Mischen während der Inkubationen ebenfalls eine technische Herausforderung darstellt. Der eigentliche Nachweis der Analyten erfolgt meist über optische Verfahren, wobei teure und komplexe optische Nachweissysteme benötigt werden, so dass diese Nachweisverfahren nur in wenigen technisch hochwertig ausgerüsteten Speziallaboratorien durchgeführt werden können.

[0010] Zur Lösung dieser technischen Probleme wurden Verfahren und Vorrichtungen beschrieben, welche einen Transport von Flüssigkeiten insbesondere in mikroanalytischen Systemen, bewirken können.

[0011] Die deutsche Offenlegungsschrift DE 10117771 A1 beschreibt Verfahren und Vorrichtungen zur Manipulation kleiner Flüssigkeitsmengen mit Hilfe akustischer Oberflächenwellen. Die in der Offenlegungsschrift beschriebene Aufgabe dieser Patentanmeldung ist es, Flüssigkeiten auf einem Festkörperchip zu lokalisieren und gegebenenfalls zu durchmischen. Hierzu werden Vorrichtungen und Verfahren beschrieben, welche Flüssigkeiten mittels akustischer Oberflächenwellen über ein ebenes Substrat hin zu sogenannten funktionalisierten Bereichen bewegen können. In solchen funktionalisierten Bereichen kann beispielsweise eine chemische oder biologische Reaktion stattfinden. DE 10117771 A1 beschreibt hierzu Vorrichtungen, bei welchen sich an bestimmten Stellen direkt in/an der Oberfläche des Festkörperchips solche funktionalisierten Bereiche befinden, welche unter anderem als Sensoren in analytischen Verfahren eingesetzt werden können. Die funktionalisierten Bereiche zur Analyse der Flüssigkeit sind hierbei direkt in das Substrat des Festkörperchips integriert, auf welchem der Transport der Flüssigkeit erfolgt, d.h. die für den Flüssigkeitstransport maßgeblichen Vorrichtungen und die für die Bestimmung des Analyten in der Flüssigkeit maßgeblichen Vorrichtungen befinden sich kombiniert in einer einzigen Ebene, der Transportebene. Die Herstellung und auch die Reinigung solcher multifunktionaler Oberflächen ist jedoch nur mit großem finanziellen und technischem Aufwand möglich, so dass derartige Systeme weder als Einwegartikel noch in der Routineanalytik eingesetzt werden. Weiterhin stellen die in die Oberfläche des Trägerchips integrierten Sensoren Inhomogenitäten in der Oberfläche des Trägersubstrats dar, beispielsweise durch unterschiedliche Oberflächenbenetzungseigenschaften oder räumliche Erhebungen beziehungsweise Vertiefungen. Hierdurch wird ein gleichförmiger Transport von Flüssigkeiten über die Oberfläche des Träger-substrats stark eingeschränkt, so dass komplexe Steuerungen und/oder zusätzliche Kräfte nötig sind, um diese Inhomogenitäten auszugleichen und ein gleichmäßigen und effektiven Transport der Flüssigkeit zu ermöglichen. Weiterhin beschreibt DE 10117771 A1 Anordnungen, bei welchen sich zwei Festkörperoberflächen gegen-

überstehen und zwischen denen sich die zu untersuchende Flüssigkeit befindet und in Kontakt zu beiden Oberflächen steht. Hierbei können sich die Vorrichtungen zur Erzeugung der akustischen Oberflächenwellen und die funktionalisierten Bereiche auf den beiden unterschiedlichen Oberflächen befinden. Allerdings findet auch in derartigen Anordnungen der Transport der Flüssigkeit auf dem Substrat der Transportebene nicht unabhängig von den funktionalisierten Bereichen statt, da das Flüssigkeitsvolumen stets mit beiden Oberflächen in Kontakt steht. Bei derartigen Anordnungen treten zusätzliche Wechselwirkungen, insbesondere Oberflächeneffekte, Grenzflächeneffekte und Kapillareffekte, zwischen der Flüssigkeit und den beiden kontaktierten Oberflächen auf, so dass sich solche Anordnungen in der Regel nicht zum Transport von Flüssigkeiten über das Substrat eignen, sondern vor allem zur Durchmischung einer Flüssigkeit eingesetzt werden können.

[0012] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen. Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, mikroanalytische Verfahren und Vorrichtungen bereitzustellen, die den Bedürfnissen einer kostengünstigen und benutzerfreundlichen Routineanalytik gerecht werden und welche sich zu einer mehrmaligen Wiederverwendung eignen.

Erfindungsgemäße Lösung

[0013] Die erfindungsgemäße Lösung der im Stand der Technik beschriebenen Nachteile bisheriger mikroanalytischer Verfahren und Vorrichtungen und Gegenstand der Erfindung sind Verfahren und Vorrichtungen zur Bestimmung von Analyten in Flüssigkeiten, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die zu untersuchende Flüssigkeit auf ein Substrat aufgebracht wird und das zu untersuchende Flüssigkeitsvolumen auf der ebenen Oberfläche des Substrats, der sogenannten Transportebene, an der Ort der Untersuchung bewegt wird, wobei die Flüssigkeit während des Transportes ausschließlich mit dem Substrat der Transportebene in Kontakt steht. Die Bewegung kann insbesondere durch Verfahren wie akustische Oberflächenwellen oder Elektrowetting bewirkt werden. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens ein sensorisches Element und optional weitere analytische Einheiten besitzen, welche sich getrennt vom Substrat der Transportebene in einer zweiten dem Substrat gegenüberliegenden Ebene, der sogenannten Nachweisebene, befinden. Diese Nachweisebene ist derartig ausgebildet, dass die Flüssigkeitsvolumina während ihrer Bewegung an den Ort der Untersuchung oder von dort weg nicht mit der Nachweisebene in Kontakt stehen oder von dieser in ihrer Bewegung gestört werden. Somit kann mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen eine gleichförmige und ungestörte Bewegung des Flüssigkeitsvolumens auf der Transportebene gewährleistet

werden. Die Nachweisebene weist an der Stelle, welche den Ort der Untersuchung darstellt, spezielle Ausformungen oder Vorrichtungen auf, welche nur an diesem definierten Ort der Untersuchung einen Kontakt zu der zu untersuchenden Flüssigkeit herstellen und so eine Bestimmung von Analyten in der Flüssigkeit ermöglichen. Diese Kontaktfläche kann insbesondere derartig ausgeformt sein, dass sie eine permanente Verringerung des Abstands des sensorischen Elements beziehungsweise der Nachweisebene von der Transportebene an den Orten der Untersuchung besitzt, oder dass das sensorische Element beziehungsweise die Nachweisebene beweglich ausgebildet ist, so dass das sensorische Element dann temporär mit dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen in Kontakt gebracht werden kann, wenn sich dieses am Ort der Untersuchung befindet.

[0014] Weiterhin können die Transportebene und die Nachweisebene zu einer Vorrichtung verbunden sein, welches in ein externes Gerät gegeben werden kann. Das externe Gerät kann insbesondere zur Ansteuerung der Bewegungen der zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumina dienen, elektrische und/oder fluidische Kontakte zu der erfindungsgemäßen Vorrichtung herstellen und ist gegebenenfalls in der Lage, einen Teil der analytischen Einheit aufzunehmen.

[0015] Eine bevorzugte Ausführungsform besteht aus einer geschlossenen Vorrichtung, welche das Substrat der Transportebene als Bodenfläche beinhaltet und einem Deckel, welcher vorzugsweise Seitenwände aufweist, so dass eine geschlossene Vorrichtung aufgebaut werden kann. Der Deckel kann weiterhin Öffnungen zur Flüssigkeitsapplikation aufweisen, die mit einer Abdeckung, insbesondere einem durchstechbaren Septum, verschlossen sind. In den Deckel des Gehäuses ist mindestens ein sensorisches Element integriert. Der Deckel entspricht somit in den meisten Fällen der Nachweisebene der Vorrichtung. Das sensorische Element kann hierbei direkt am Ort der Untersuchung in/ander der Transportebene zugewandten Oberfläche des Deckels integriert/aufgebracht sein.

[0016] In anderen Ausführungsformen wird der beweglich ausgebildete sensorische Element am Ort der Untersuchung zur Bestimmung des Analyten kurzzeitig aus einer Transportposition in eine Messposition bewegt. Die Transportposition entspricht einer räumlichen Lage des sensorischen Elements, in welcher es nicht in Kontakt mit dem Flüssigkeitsvolumen steht, so dass der Transport des Flüssigkeitsvolumens über die Transportebene nicht vom sensorischen Element beeinflusst wird. Die Messposition entspricht einer räumlichen Lage des sensorischen Elements, in welcher der Abstand zur Transportebene im Vergleich zur Transportposition verringert ist und das sensorische Element in Kontakt mit dem Flüssigkeitsvolumen steht, so dass die Bestimmung des Analyten mittels des sensorischen Elements durchgeführt werden kann. Das Substrat der Transportebene kann weiterhin Vorrichtungen zur Erzeugung ei-

ner Bewegung der zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumina besitzen, insbesondere interdigitale Elektroden zur Erzeugung akustischer Oberflächenwellen oder Elektroden, wie sie bei auf Elektrowetting beruhenden Verfahren verwendet werden. Die Vorrichtungen, welche die für eine Flüssigkeitsbewegung erforderlichen Kräfte erzeugen, müssen jedoch im Fall des Transports durch akustische Oberflächenwellen nicht unbedingt direkt auf dem Substrat der Transportebene angebracht sein, sondern es ist auch möglich, dass die Vorrichtungen zur Erzeugung dieser Kräfte sich außerhalb des Substrats befinden, beispielsweise als Bestandteil einer externen Ansteuerungsvorrichtung. In diesem Fall werden die extern erzeugten Kräfte dann in die Transportebene eingekoppelt, beispielsweise mittels elektrischer Felder oder mechanischer Schwingungen. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn Einweg-Vorrichtungen eingesetzt werden sollen, weil dann auf aufwändige Vorrichtungen zur Erzeugung einer Bewegung auf der Transportebene selbst verzichtet werden kann, was eine deutliche Produktionskostensenkung bewirkt.

[0017] Das Unterteilen der erfindungsgemäßen Vorrichtungen in eine Ebene, welche der Bewegung der zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen dient (Transportebene), und eine Ebene, welche der analytischen Untersuchung der Flüssigkeitsvolumen dient (Nachweisebene), erlaubt einerseits eine ungestörte Bewegung der Flüssigkeitsvolumina auf dem Substrat der Transportebene und andererseits die Herstellung dieser beiden Ebenen in zwei unterschiedliche Prozessen. Diese beiden Herstellverfahren müssen hierbei nicht kompatibel sein. So kann beispielsweise die Transportebene unabhängig von der Nachweisebene hergestellt werden. Erst bei der Endmontage werden diese beiden in der Herstellung jeweils kritischen Elemente zusammengebracht, vorzugsweise in Form einer geschlossenen Vorrichtung. Durch Öffnungen im Gehäuse können verschiedene zu untersuchende Flüssigkeitsvolumina, aber auch Kalibrationslösungen, Referenzlösungen, Spül- oder Reinigungslösungen, Lösungen mit standardisierten Analytkonzentrationen, sogenannte Standards, oder Reagenzien, auf die Transportebene aufgebracht werden, beispielsweise mittels Pipettieren oder Injektion. Weiterhin können die Flüssigkeitsvolumina auch mittels angekoppelter fluidischer Systeme, beispielsweise Kapillaren und Dispenser, auf die Transportebene aufgebracht werden. Durch entsprechende Ansteuerung der Vorrichtungen, welche die zur Bewegung der Flüssigkeitsvolumina nötigen Kräfte erzeugen, ist man in der Lage, die Flüssigkeitsvolumina an jedem beliebigen vordefinierten Ort auf dem Substrat der Transportebene, insbesondere zum Ort der Untersuchung, zu transportieren.

[0018] Die erfindungsgemäße Vorrichtung besitzt in einer bevorzugten Ausführungsform zusätzlich einen Abfallbehälter, der über eine Blende mit der Vorrichtung verbunden ist und damit zum geschlossenen Bereich der Vorrichtung gehört. Die Flüssigkeiten, die über

durch die Blende in den Abfallbehälter transportiert werden, können durch diese von Transport- und Nachweisebene getrennt werden, so dass ein Rückfluss in den sensorischen Bereich und somit eine Beeinträchtigung nachfolgender Messungen vermieden wird.

[0019] Bei der Bestimmung von Analyten in Flüssigkeiten werden oft sehr kleine Mess-Signale erzeugt, welche durch umgebende Einflüsse und Störgrößen leicht verfälscht werden können. Deshalb sind in vorteilhaften Ausführungsformen der Erfindung die sensorischen Bereiche beziehungsweise die gesamte Vorrichtung gegen solche externen Störeinflüsse abgeschirmt, vorzugsweise mittels eines Faradayschen Käfigs, um die Signale von störenden elektrischen Einflüssen frei zu halten oder mittels einer strahlungsverringernenden Umhüllung, um direktes Licht beziehungsweise Streulicht von optischen Detektoren fern zu halten.

[0020] Analyte, die mit einem erfindungsgemäßen Verfahren beziehungsweise den entsprechenden Vorrichtungen bestimmt werden können, sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung alle Teilchen, die in der Analytik von Interesse sind, insbesondere in der klinischen Diagnostik. Insbesondere umfasst der Begriff "Analyte" Atome, Ionen, Moleküle und Makromoleküle, insbesondere biologische Makromoleküle wie Nukleinsäuren, Peptide und Proteine, Lipide, Metabolite, Zellen und Zellfragmente. Die Analyten können hierbei sowohl frei als auch an Teilchen, insbesondere künstlich hergestellte Teilchen wie beispielsweise sogenannte "beads", gebunden vorliegen.

[0021] Flüssigkeiten im Sinne der vorliegenden Anmeldung können reine Flüssigkeiten und homogene oder heterogene Mischungen wie beispielsweise Dispersionen, Emulsionen oder Suspensionen sein. Insbesondere können in den Flüssigkeiten Atome, Ionen, Moleküle und Makromoleküle, insbesondere biologische Makromoleküle wie Nukleinsäuren, Peptide und Proteine, Lipide, Metabolite oder auch biologische Zellen oder Zellfragmente enthalten sein. Bevorzugte zu untersuchende Flüssigkeiten biologischer Herkunft sind Blut, Plasma, Serum, Urin, cerebrospinale Flüssigkeit, Tränenflüssigkeit, Zellensuspensionen, Zellüberstände, Zellextrakte, Gewebeaufschlüsse oder ähnliches. Flüssigkeiten können aber auch Kalibrationslösungen, Referenzlösungen, Spül- oder Reinigungslösungen, Reagenzlösungen oder Lösungen mit standardisierten Analytkonzentrationen, sogenannte Standards, sein. Flüssigkeitsvolumina im Sinne der vorliegenden Anmeldung können prinzipiell jede Form und Größe aufweisen, liegen vorzugsweise jedoch in Form runder oder abgeflachter Tropfen mit Volumina im Bereich von 100 nl bis 10 µl vor. Insbesondere sind auch Flüssigkeitsvolumina in länglicher Form möglich, die mehrere nebeneinander liegende sensorische Elemente überdecken können.

[0022] Sensorische Elemente im Sinne vorliegenden Anmeldung sind alle Systeme zur Bestimmung von Analyten, welche analytspezifische chemische, bioche-

mische, biologische oder physikalische Größen bzw. deren Veränderungen bestimmen können. Der Begriff sensorisches Element ist in Rahmen der vorliegenden Anmeldung nicht auf eine rein technische Definition eines Sensors zu beschränken, sondern ist umfassend auf alle Systeme zu beziehen, welche den Nachweis eines Analyten auf direkte oder indirekte Weise ermöglichen können.

[0023] So sind insbesondere auch spezifische Bindungspartner des Analyten, insbesondere markierte Bindungspartner, welche den Nachweis des Analyten durch eine spezifische Wechselwirkung mit diesem ermöglichen (z.B. Antikörper, Nukleinsäuren mit komplementären Sequenzen, Komplexbildner) oder spezifische Reaktionspartner des Analyten, welche mit diesem eine spezifische Reaktion eingehen und so mittels Nachweis der entsprechenden Reaktionsprodukte oder -edukte indirekt zur Bestimmung des Analyten dienen (z.B. Substrate, Enzyme), als sensorische Elemente aufzufassen. Diese sensorischen Elemente liegen erfindungsgemäß am Ort der Untersuchung, vorzugsweise in immobilisierter Form, vor und ermöglichen dort den spezifischen Nachweis des Analyten. Es ist auch möglich, dass dort die für die Bestimmung des Analyten benötigten Reagenzien in trockenchemischer Form gebunden vorliegen. Es ist zu beachten, dass der physikalische Ort des Nachweises mittels eines physikalischen oder chemischen Sensors nicht unbedingt mit den sensorischen Elementen am Ort der Untersuchung übereinstimmen muss, insbesondere bei indirekten Nachweisverfahren. So erfolgt beim Nachweis von peptidischen Analyten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper der Nachweis der entstehenden Fluoreszenzstrahlung durch einen optischen Sensor, der bei geeigneter Ausführungsform der Erfindung auch außerhalb der eigentlichen erfindungsgemäßen Vorrichtung liegen kann, während der Nachweis des Analyten durch die Antikörper als sensorische Elemente nur am Ort der Untersuchung stattfindet. Sensorische Elemente können jedoch auch herkömmliche Sensoren, insbesondere elektrochemische Sensoren, Biosensoren, optische Sensoren wie Absorptions- oder Fluoreszenzdetektoren sowie immunologische Sensoren wie Optoden, Wellenleitersensoren und Evaneszenzfeld-Laserspektrometrie-Sensoren, sein. Weiterhin sind Sensoren eingeschlossen, welche physikalische Größen bestimmen können, wie beispielsweise Sensoren, welche die Viskosität, die Dichte oder die Masse einer Flüssigkeit bestimmen. Dies ist bei Reaktionen, bei denen sich im Verlauf einer analytspezifischen Reaktion diese Eigenschaften der Flüssigkeit ändert, besonders von Interesse. Als Beispiele sind hier Gerinnungsreaktionen oder Methoden, welche die Anlagerung von Analytmolekülen mittels der dadurch hervorgerufenen Massenänderung detektieren, zu nennen.

[0024] Sensoren können in allen möglichen geometrischen Ausführungsformen vorliegen, insbesondere als spitze Sensoren, als flächige Sensoren oder als

Dickschichtsensoren. Besonders bevorzugt sind spitze Sensoren, da bei diesen beim Wegbewegen des Sensors lediglich ein minimales Restvolumen der zu untersuchenden Flüssigkeit an diesem anhaftet und somit Verschleppungsartefakte weitgehend vermieden werden können.

[0025] Im Falle von Analyten, die direkt in dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen mit sensorischen Elementen bestimmt werden können, bewegt man erfindungsgemäß das Flüssigkeitsvolumen zum Ort der Untersuchung. Dies kann vorzugsweise dadurch geschehen, dass man zunächst einzelne Flüssigkeitsvolumina erzeugt und diese Flüssigkeitsvolumina zum Ort der Untersuchung bewegt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für Vielfachmessungen und einen Einsatz im Routinebetrieb. In diesem Fall werden mehrere zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumina nacheinander an den jeweiligen Ort der Untersuchung bewegt. Ist eine einzelne Bestimmung beendet, so wird das bereits untersuchte Flüssigkeitsvolumen vom Ort der Untersuchung wegbewegt und kann für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen oder in einen Abfallbehälter gesammelt werden. An den freigewordenen Ort der Untersuchung kann nun ein anderes Flüssigkeitsvolumen bewegt werden, wobei der Wegtransport des bereits untersuchten Flüssigkeitsvolumens und der Hintransport des zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumens gleichzeitig oder zeitlich nacheinander erfolgen können. Entsprechende Verfahrensschritte können ebenfalls mit Kalibrationslösungen, Referenzlösungen, Spül- oder Reinigungslösungen, Reagenzlösungen oder Lösungen mit standardisierten Analytkonzentrationen durchgeführt werden.

[0026] Im Falle von Analyten, die nicht direkt in der zu untersuchenden Flüssigkeit mit Sensoren bestimmt werden können, benötigt man oft noch zusätzliche Reagenzien, um die Analyten bestimmen zu können.

[0027] Solche Verfahren sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Analyten indirekt durch den Nachweis einer spezifischen Wechselwirkung mit einem Bindungspartner, insbesondere einem markierten Bindungspartner in Form von Immunoassays oder Nachweisverfahren mittels Polymerasenkettenreaktionen, oder einer spezifische Reaktion des Analyten mit Nachweisreagenzien, insbesondere in Form chemischer oder enzymatischer Reaktionen, oder einer spezifischen Veränderung einer physikalischen oder chemischen Größe, insbesondere der Viskosität, erfolgt. Zur Bestimmung des Analyten bringt man beispielsweise ein Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit und ein Volumen der Reagenzlösung in Kontakt, indem man diese Flüssigkeitsvolumina, beispielsweise durch geeignet angesteuerte akustische Antriebs-Oberflächenwellen, aufeinanderzubewegt, so dass sie sich letztendlich zu einem gemeinsamen Flüssigkeitsvolumen vereinigen. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die vereinten Flüssigkeitsvolumina anschließend durchmischt werden, um eine möglichst rasche und vollstän-

dige Reaktion des Analyten mit den Reagenzien und somit eine möglichst genaue Bestimmung des Analyten zu ermöglichen. Zur Durchmischung können insbesondere geeignet angesteuerte akustische Oberflächenwellen eingesetzt werden. Die Kontaktierung und Vermischung der Flüssigkeitsvolumina kann direkt am Ort der Untersuchung erfolgen oder auch zuvor in einem anderen Bereich der Vorrichtung, so dass in letzterem Fall, eventuell nach Einhaltung einer bestimmten Reaktionszeit, diese Mischung zum Ort der Untersuchung bewegt wird.

[0028] Zur Bestimmung des Analyten benötigte Reagenzlösungen sowie Kalibrationslösungen, Referenzlösungen, Spül- oder Reinigungslösungen oder Lösungen mit standardisierten Analytkonzentrationen können durch spezielle Öffnungen in die Vorrichtung gegeben werden, insbesondere durch ein bereits vorhandenes Probenauftrags-Septum oder durch ein eigens dafür vorgesehenes Septum. Die oben beschriebene Auftragung der Lösungen muss nicht zwangsläufig durch Pipettieren oder Injektion durch ein Septum erfolgen, sondern es können in weiteren Ausführungsformen der Erfindung Flüssigkeiten in Behältern innerhalb oder außerhalb des Gehäuses bereit gehalten werden, welche zu gegebenen Zeitpunkten beispielsweise mit Hilfe eines Mikrodispensers oder Piezodispensers in das Gehäuse gebracht oder dort freigesetzt werden. Dies hat den Vorteil, dass alle Flüssigkeiten, die zur Bestimmung des Analyten benötigt werden, bereits in einer Vorrichtung vorhanden sein können und nur noch die zu untersuchende Flüssigkeit zugeführt werden muss. Insbesondere kann das Aufbringen zusätzlicher Reagenzlösungen über einen auf dem Deckel des Gehäuses angebrachten Behälter erfolgen, der mittels eines Dispensers mit der Kammer verbunden ist.

[0029] Die Flüssigkeitsvolumina liegen vorzugsweise in Form runder oder abgeflachter Tropfen vor, aber es sind auch Volumina in länglicher Form möglich, die mehrere nebeneinander liegende sensorische Elemente überdecken können. Diese Ausgestaltungsform kann dann besonders gut eingesetzt werden, wenn mehrere sensorische Elemente gleichzeitig mit dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen in Kontakt stehen müssen, wie dies beispielsweise bei der elektrochemischen Messung von Elektrolyten nötig ist. Hierzu verwendet man im allgemeinen eine oder mehrere Messelektroden und eine Referenzelektrode mit einem Referenzelektrolyten. Bewegt man ein Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit und ein Volumen eines Referenzelektrolytlösung aufeinander zu und bringt sie in Kontakt, so erfolgt die Durchmischung der beiden Flüssigkeitsvolumina ohne zusätzliche durchmischende Kräfte zunächst rein diffusiv und somit sehr langsam. Dies ist besonders vorteilhaft, weil sich zu diesem Zeitpunkt direkt nach dem Kontaktieren der Flüssigkeitsvolumina die beiden Teilvolumina in einer elektrischen leitenden Verbindung befinden, ohne sich effektiv zu durchmischen. Vorzugsweise befindet sich das Flüssigkeitsvolumen der zur un-

tersuchenden Flüssigkeit in Kontakt zu einer oder mehreren Messelektroden und das den Referenzelektrolyten enthaltende Flüssigkeitsvolumen in Kontakt zur Referenzelektrode, so dass nach dem Einschwingen der Mess-Signale eine exakte Bestimmung des Analyten erfolgen kann.

[0030] Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist vorzugsweise in ein geschlossenes Gehäuse eingebaut, welches für einen mehrfachen Gebrauch geeignet ist. Durch diese geschlossene Bauform wird ein Verdampfen von Flüssigkeiten und somit eine Verfälschung der Konzentration des Analyten verhindert. Des Weiteren ist in einer bevorzugten Ausführungsform ein Abfallgefäß enthalten, in welches bereits untersuchte Flüssigkeiten sowie Reagenzlösungen, Kalibrationslösungen, Referenzlösungen, Spül- oder Reinigungslösungen und Lösungen mit standardisierten Analytkonzentrationen nach ihrem Gebrauch transportiert werden. Der Abfallbehälter kann insbesondere so ausgebildet sein, dass diese bereits genutzten Flüssigkeiten nicht mehr an die Orte der Untersuchung gelangen können und/oder andere Analytbestimmungen verfälschen können. Dies kann beispielsweise durch eine mechanische Blende erreicht werden. Weiterhin können die bereits genutzten Proben adsorbiert werden, beispielsweise mittels eines Vlieses oder Schwammes. Dadurch ist sichergestellt, dass die Luftfeuchte in der erfindungsgemäßen Vorrichtung konstant hoch gehalten und so die Verdampfung der kleinen Flüssigkeitsvolumina verhindert wird, ohne dass nachfolgende Bestimmungen von Analyten durch vorhergehenden Bestimmungen beeinflusst werden.

[0031] In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäße Vorrichtungen oder Teile der Vorrichtungen derartig ausgestaltet, dass die Vorrichtungen oder Teile der Vorrichtungen, insbesondere sensorische Elemente, für einen einmaligen Einsatz vorgesehen sind. Diese Ausführungsform eignet sich besonders zur Bestimmung von Analyten, bei denen Verschleppungsprobleme auftreten können.

[0032] Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Ausführungsformen, welche als modulares Baukastensystem sowohl für einfache als auch mehr- und vielfache Bestimmungen von Analyten in Flüssigkeiten geeignet sind. Besonders vorteilhaft für diese Ausführungsformen ist es, dass die Transportebene und die Nachweisebene mit unterschiedlichen Materialien und Methoden hergestellt werden können und erst zur Durchführung der Bestimmung von Analyten zusammengeführt werden müssen. Weiterhin müssen Transportebene und Nachweisebene nicht direkt miteinander verbunden sein, beispielsweise durch Abstandshalter oder ein gemeinsames Gehäuse, sondern können zunächst unabhängig voneinander vorliegen und erst zur eigentlichen Bestimmung des Analyten in gemeinsamen Kontakt zu dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen gebracht werden. Insbesondere sind Ausführungsformen vorteilhaft, bei denen das Substrat der Transportebene als vielfach verwendbares Substrat

eingesetzt wird, welches den Transport vieler Flüssigkeitsvolumen zu den entsprechenden Orten der Untersuchung bewirkt, und die Nachweisebene für einen einmaligen Gebrauch vorgesehen ist, insbesondere bei sensorischen Elementen, welche auf nicht reversiblen Reaktionen beruhen und somit nur einmal zu benutzen sind. Beispiele hierfür sind auf optischen Nachweisverfahren beruhende Glukosesensoren oder Sensoren, welche auf immunologischen Methoden oder DNA-Hybridisierung beruhen. Hier kann die Nachweisebene so ausgebildet sein, dass sie nur ein sensorisches Element enthält und zu jeder Bestimmung ausgetauscht wird, während die Transportebene zur Bewegung vieler Flüssigkeitsvolumina für viele Analytbestimmungen eingesetzt werden kann. Die Nachweisebene kann aber auch so ausgebildet sein, dass sie mehrere sensorischen Elemente enthält, welche jedes für sich nur einmal eingesetzt werden können und welche sich an verschiedenen voneinander getrennten Orten der Bestimmung befinden, so dass zu jeder Analytbestimmung ein anderes sensorisches Element genutzt wird. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, dass damit mehrere Analytbestimmungen mit nur einmal nutzbaren sensorischen Elementen nacheinander in der gleichen Vorrichtung durchgeführt werden können.

[0033] In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Vorrichtung derartig ausgestaltet, dass Verfahren zur Bestimmung von Analyten in Flüssigkeiten eingesetzt werden, welchen einen oder mehrere trockenchemische Schritte beinhalten. Ein Beispiel hierfür ist die reflektrometrische Glukosebestimmung auf Teststreifen. Trockenchemische Verfahren sind Verfahren, welche mindestens ein Reagenz in trockener Form enthalten. Hierbei muss gewährleistet sein, dass eine möglichst geringe Feuchtigkeit in der Vorrichtung herrscht. Dies kann insbesondere dadurch erreicht werden, dass in der Vorrichtung oder in damit in Verbindung stehenden Bauteilen wie beispielsweise einem Abfallbehälter, ein feuchtigkeitsund/oder flüssigkeitsabsorbierendes Mittel, wie beispielsweise Silicagel, enthalten ist, wobei das feuchtigkeits- und/oder flüssigkeitsabsorbierende Mittel durch eine Membran oder ein Vlies umhüllt sein kann. Dadurch ist man in der Lage, auch feuchtigkeitsempfindliche Reagenzien zur Bestimmung von Analyten in Flüssigkeiten einzusetzen. Solche in trockener Form vorliegenden Reagenzien können insbesondere in Form eines Spots am Ort der Bestimmung vorliegen oder im Falle einer indirekten Beteiligung an der Bestimmung des Analyten an anderen Orten der Vorrichtung fixiert sein. Sollen solche Vorrichtungen, welche mit trockenchemischen Reagenzien arbeiten, für mehrere Bestimmungen eingesetzt werden, können beispielsweise mehrere Spots an unterschiedlichen Stellen in der Vorrichtung angebracht werden, welche unabhängig voneinander mit verschiedenen zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumina in Kontakt gebracht werden können. So ist man in der Lage, trockenchemische Reagenzien auch in mehrfach nutzbaren Vorrichtungen

unterzubringen, ohne dass die trockenchemischen Reagenzien für die weiteren Bestimmungen durch die in den vorhergehenden Bestimmungen eingesetzten Flüssigkeitsvolumina geschädigt werden. Hierbei sind verschiedene Ausführungsformen eingeschlossen. So kann beispielsweise ein Auftragsort vorgesehen sein, an welchem mehrere zu untersuchende Flüssigkeitsproben aufgebracht werden, und mehrere räumlich voneinander getrennte Orte der Untersuchung, welche alle die gleiche Nachweismethode anwenden, so dass an den verschiedenen Orten der Untersuchung Analytbestimmungen in identischer Weise durchgeführt werden. Dies ist besonders dann vorteilhaft, wenn auf einer Vorrichtung mehrere identische Analytbestimmungen hintereinander durchgeführt werden sollen. In einer weiteren Ausführungsform können mehrere Auftragsorte und mehrere Orte der Untersuchung, welche alle die gleiche Nachweismethode anwenden, enthalten sein. Dies ist besonders dann vorteilhaft, wenn auf einer Vorrichtung mehrere identische Analytbestimmungen gleichzeitig durchgeführt werden sollen. In einer weiteren Ausführungsform können ein Auftragsort und mehrere Orte der Untersuchung, welche den Nachweis unterschiedlicher Analyten ermöglichen, enthalten sein. Dies ist besonders dann vorteilhaft, wenn aus einer Probe mehrere unterschiedliche Analyten bestimmt werden sollen. Hierbei wird die Probe vorzugsweise zunächst in mehrere Flüssigkeitssegmente aufgeteilt, welche dann anschließend an die verschiedenen Orte der Untersuchung transportiert werden können. In einer weiteren Ausführungsform können auch mehrere Auftragsorte und mehrere Orte der Untersuchung, welche den Nachweis unterschiedlicher Analyten ermöglichen, enthalten sein.

[0034] Der Kontakt des sensorischen Elements beziehungsweise der Nachweisebene zum zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen erfolgt erfindungsgemäß nur am Ort der Untersuchung. Die Nachweisebene kann in diesem Bereich so ausgeformt sein, dass sie eine permanente Verringerung des Abstands des sensorischen Elements von der Transportebene am Ort der Untersuchung besitzt, oder dass das sensorische Element beziehungsweise die Nachweisebene beweglich ausgebildet ist, so dass das sensorische Element nur dann mit dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen in Kontakt gebracht wird, wenn sich dieses am Ort der Untersuchung befindet. Hierzu sind insbesondere folgende Lösungen möglich.

[0035] Die Vorrichtung kann derartig ausgeformt sein, dass der Abstand zwischen Nachweisebene und Transportebene am Ort der Untersuchung permanent verringert ist, vorzugsweise dadurch, dass die sensorischen Elemente aus der eigentlichen Nachweisebene in Richtung der Transportebene herausragen. Insbesondere ist der Abstand zwischen Nachweisebene und Transportebene außerhalb des sensorischen Bereichs größer als die vertikale Ausdehnung der Flüssigkeitsvolumina, innerhalb des sensorischen Bereichs, d.h. am Ort

der Untersuchung, kleiner oder gleich der vertikalen Ausdehnung der Flüssigkeitsvolumina. Hierdurch ist eine Bewegung der Flüssigkeitsvolumina außerhalb der sensorischen Bereiche möglich, welche nicht von den sensorischen Elementen oder der Nachweisebene beeinflusst wird. Eine Wechselwirkung der Flüssigkeitsvolumina mit den sensorischen Elementen tritt hingegen ausschließlich an den Verengungen an den Orten der Untersuchung auf. Hier erfolgt die eigentliche Bestimmung der Analyten, wobei das jeweilige Flüssigkeitsvolumen seine Position während der Bestimmung vorzugsweise nicht verändert. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass während der Analytbestimmung die Vorrichtungen zur Erzeugung der Kräfte, welche die Bewegung der Flüssigkeitsvolumina hervorrufen, ausgeschaltet werden. Nach Beendigung der Bestimmung des Analyten können nun wieder Kräfte angelegt werden, welche die Flüssigkeitsvolumina von den Orten der Untersuchung wegbewegen, beispielsweise in einen Abfallbehälter oder zu einen weiteren Ort der Untersuchung, wobei die Bewegung nach Verlassen der Untersuchung wieder ausschließlich in Kontakt mit der Transportebene erfolgt. Vorteilhaft im Rahmen dieser Ausführungsform ist, dass solche permanenten Verengungen des Abstands von Nachweisebene und Transportebene ohne zusätzlichen technischen Aufwand und damit kostengünstig durch geeignete Topologien der Nachweis- und/oder Transportebene erzeugt werden können. Solche Topologien können Spitzen, Erhebungen, Rampen und ähnliche sein.

[0036] Die Vorrichtung kann weiterhin derartig ausgeformt sein, dass der Abstand zwischen dem sensorischen Element beziehungsweise der Nachweisebene und der Transportebene am Ort der Untersuchung temporär verringert werden kann. Hierzu befindet sich das sensorische Element beziehungsweise die Nachweisebene zunächst während der Bewegung der Flüssigkeitsvolumina über die Transportebene in einem Abstand von dieser, der größer als die vertikale Ausdehnung der Flüssigkeitsvolumina ist. Dies entspricht der zuvor beschriebenen Transportposition. Dadurch ist eine nicht von den sensorischen Elementen oder der Nachweisebene beeinflusste Bewegung der Flüssigkeitsvolumina an den Ort der Untersuchung möglich ist. Befindet sich das zu untersuchende Flüssigkeitsvolumen am Ort der Untersuchung, wird die Bewegung des Flüssigkeitsvolumens beendet und durch geeignete Verfahren der Abstand des sensorischen Elements beziehungsweise der Nachweisebene zum zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen derartig verkürzt, dass es zum unmittelbaren Kontakt zwischen Flüssigkeitsvolumen und sensorischem Element kommt. Insbesondere können hierbei zur Verringerung des Abstands die Nachweisebene und die Transportebene zeitweise aufeinander zubewegt werden, beispielsweise mittels eines elektrischen Antriebes. In anderen Ausführungsformen wird nicht die ganze Nachweisebene auf die Transportebene zubewegt, sondern lediglich die sensori-

5 schen Bereiche, beispielsweise durch beweglich angebrachte Sensorelektroden, welchen zur Bestimmung des Analyten durch externe Antriebe mit dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen in Kontakt gebracht werden. Dies entspricht der zuvor beschriebenen Mes-
 10 sposition. Nach der Analytbestimmung wird die Nachweisebene beziehungsweise das sensorische Element wieder vom Flüssigkeitsvolumen in die Transportposition wegbewegt und es werden Kräfte angelegt, welche das Flüssigkeitsvolumen von den Orten der Unter-
 15 suchung wegbewegen, beispielsweise in einen Abfallbehälter oder zu einen weiteren Ort der Untersuchung, wobei die Bewegung nach Verlassen der Untersuchung wiederum ausschließlich in Kontakt mit der Transporte-
 20 bene erfolgt.

[0037] Die erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen können weiterhin zur Bestimmung von Analyten durch die Messung physikalischer und physikalisch-chemischer Parameter eingesetzt werden. Beispielsweise können sie zur Bestimmung globaler Gerinnungsparameter wie der Prothrombinzeit oder der akti-
 25 vierten partiellen Thromboplastinzeit eingesetzt werden. Diese Messung kann einerseits über elektrochemische Reaktionen mit den entsprechenden elektrochemischen Sensoren erfolgen, wie sie beispielsweise in der US-Patentschrift US 6,352,630 beschrieben sind. Andererseits kann die Bestimmung auch über eine Viskositätsmessung erfolgen. Dieses kann neben den be-
 30 kannten Verfahren, beispielsweise optischen Verfahren oder Verfahren mit magnetischen Partikeln, insbesondere auch mit Sensoren erfolgen, welche auf akustischen Oberflächenwellen basieren. Die Vorrichtung kann mehrmals verwendet werden, wenn nach Errei-
 35 chen des notwendigen Mess-Signals die Vorrichtung regeneriert wird, vorzugsweise mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Reagenzien, welche das Ausbilden der vollständigen Gerinnung verhindern. Diese Reagenzien können in flüssiger Form ebenfalls mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen auf der
 40 Transportebene, insbesondere mittels akustischer Oberflächenwellen, zu dem Reaktionsgemisch befördert werden und nach Mischen mit diesem in einen Abfallbehälter transportiert werden.

[0038] Die erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen können weiterhin zur Durchführung homogener oder heterogener Immunoassays eingesetzt werden. Bei homogenen Immunoassays kann die Reaktion insbesondere über die Messung der Trübung bzw. der optischen Dichte mittels optischer Sensoren erfolgen. Weiterhin kann der Sensor als Wellenleiter ausgebildet
 45 sein, insbesondere im Falle einer Messung der Reaktion mittels Evaneszenzfeld-laserspektrometrischer Verfahren. Bei heterogenen Immunoassays können insbesondere spezifische Antikörper eingesetzt werden, welche beispielsweise an magnetische Partikel gebunden sind. Die Assays werden dann in einer dem Fachmann
 50 bekannten Weise durchgeführt.

[0039] Die Vorrichtung kann weiterhin derartig ausge-

formt sein, dass analytischspezifische Nachweisreaktionen mit einem oder mehreren Separationsschritten oder Waschschriften durchgeführt werden können. Hierzu werden ein oder mehrere zu trennende Substanzen mit einer spezifischen Markierung oder Sonde versehen, beispielsweise durch Bindung an Magnetpartikel oder markierte Antikörper. Die hierbei nötige Trennung der Substanzen, beispielsweise von gebundenem und ungebundenem Analyten im Rahmen einer sogenannten bound-free-separation, erfolgt im Falle einer magnetischen Markierung insbesondere dadurch, dass an einem bestimmten Ort der Vorrichtung von aussen ein Magnetfeld angelegt wird, welches die magnetischen Partikel mit den daran gebundenen Substanzen festhält und damit ein Waschen der Partikel bzw. einem Medienwechsel ermöglicht. Diese Reagenzien und Medien können ebenfalls in flüssiger Form auf der Transportebene, insbesondere mittels akustischer Oberflächenwellen, befördert werden. Insbesondere können sie zunächst an den Ort der bound-free-Trennung transportiert und nach erfolgten Waschschriften entweder am gleichen Ort oder einem anderen Ort der Messung durchgeführt werden. Die Messung kann dort mit den bekannten Sensoren (Fluoreszenzsensoren, Lumineszenzsensoren oder anderen) durchgeführt werden. Dies ermöglicht insbesondere die Durchführung eines kompletten Immunoassays in einer einzigen geschlossenen Vorrichtung. Die Vorrichtung kann mehrmals verwendet werden, wenn nach Erreichen des notwendigen Messsignals die Vorrichtung analog den oben genannten Verfahren gereinigt beziehungsweise regeneriert wird. Die verbrauchten Reagenzien können in einen Abfallbehälter überführt werden.

[0040] Die erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen können weiterhin in Methoden zur Bestimmung von Analyten eingesetzt werden, welche auf biologischen oder chemischen Vervielfältigungsreaktionen beruhen. Für gentechnische Bestimmungen oder DNA-Vergleiche von Lebewesen stehen oft nur Spuren von zellulärem Material zur Verfügung, weshalb zur Bestimmung dieser Moleküle Methoden nötig sind, welche Nukleinsäuren in vitro in ausreichenden Mengen vervielfältigen. Hier ist insbesondere die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) zu nennen, mit der man DNA-Fragmente aus winzigen Spuren des Ausgangsmaterials beliebig oft und in kurzer Zeit vervielfältigen kann. Ein Zyklus einer PCR besteht aus drei diskreten Temperatur-Schritten: 1. Denaturierung: Beim Erhitzen auf ca. 95°C schmilzt die zu amplifizierende DNA auf und man erhält Einzel-Stränge. 2. Annealing: Durch rasches Abkühlen auf ca. 55°C wird die Reassoziaton der Einzel-Stränge verhindert und die Primer (2 verschiedene Oligonukleotide mit gegensinniger Orientierung) lagern sich an entsprechend komplementäre Strangabschnitte der DNA. 3. Extension: Die DNA-Polymerase verlängert bei ca. 72°C von Primer ausgehend den Strang und vervollständigt so durch den Einbau von Nukleotiden den Einzelstrang zum Dop-

pelstrang. Diese neuen Moleküle dienen im nächsten Zyklus wieder als Vorlage. Es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung der Ausgangs-DNA und in mehreren, meist 20 bis 50, Zyklen wird das Material vielfach identisch kopiert.

[0041] Die erfindungsgemäße Vorrichtungen können derartig ausgebildet sein, dass sie sich zur Durchführung eines derartigen PCR-Testes eignen. Insbesondere die Durchführung der Temperatursteuerung kann in der Vorrichtung auf verschiedene Arten umgesetzt werden. Die Vorrichtung ist aufgrund ihrer mikroskopischen Größe besonders geeignet, Volumina im Mikro- und Nanoliterbereich in kürzester Zeit auf die gewünschte Temperatur einzustellen, was die Zykluszeiten der Vervielfältigungsschritte verkürzt. Bei solch kleinen Flüssigkeitsvolumina ist es insbesondere notwendig, die vorliegenden flüssigen Reaktionsgemische am Verdampfen zu hindern. Dazu sind verschiedene Massnahmen geeignet. Insbesondere kann die wässrige Phase (das eigentliche PCR-Reaktionsgemisch) mit einem mit dieser wässrigen Phase nicht mischbaren Medium, welches eine höheren Siedepunkt als Wasser hat, beispielsweise Mineralöl, überschichtet werden. In anderen Ausführungsformen kann durch eine geeignete Wahl des inneren Volumens der Vorrichtung erreicht werden, dass sich schnell ein entsprechender Dampfdruck aufbaut, welcher ein weiteres Verdampfen der Reaktionslösung verhindert, insbesondere wenn das die Flüssigkeit umgebende Volumen sehr klein ist. In anderen Ausführungsformen kann dies dadurch erreicht werden, dass die Reaktion bei sehr hoher Luftfeuchte bzw. Dampfsättigung durchgeführt wird. Das zyklische Ansteuern und Anpassen der Temperatur des Reaktionsgemisches kann auf verschiedene Arten erfolgen. Insbesondere kann die gesamte Vorrichtung oder bestimmte Teile der Vorrichtung, welche das Reaktionsgemisch enthalten, von außen erwärmt oder abgekühlt werden. Hierbei werden durch die erfindungsgemäßen Vorrichtungen sehr schnelle Temperaturwechsel erreicht, da vorzugsweise das Volumen der zu temperierenden Flüssigkeit sehr klein sein kann und die Vorrichtung aus Materialien bestehen kann, welche eine sehr hohe Wärmeleitfähigkeit besitzen. In weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsformen sind in der Vorrichtung verschieden temperierte Zonen enthalten, wobei die Temperaturerzeugung und -regulation mit dem Fachmann bekannten Methoden erzielt werden kann. Insbesondere können in der Nachweisebene Heiz- oder Kühlelemente angebracht sein. Diese werden von aussen derartig angesteuert, dass die für die PCR-Amplifikation benötigten verschiedenen Temperaturen an verschiedenen Orten der Vorrichtung permanent oder temporär eingestellt sind. Diese auf eine bestimmte Temperatur eingestellten Bereiche beziehungsweise die Heizelemente gelten im Sinne der Erfindung als Orte der Untersuchung beziehungsweise sensorische Elemente, da nur an diesen Orten durch die temperierenden Elemente die spezifische Amplifikationsreaktion zum

Nachweis des Analyten stattfinden kann. Somit können auch die Heizelemente beziehungsweise die Nachweisebene in allen zuvor beschriebenen Ausführungsformen ausgeführt sein. Besonders bevorzugt sind hierbei Ausführungsformen, bei welchen die unterschiedlichen Temperaturzonen durch Verringerungen des Abstandes zwischen Transportebene und Deckel definiert sind, wobei sich die Heizelemente an diesen Stellen mit reduziertem Abstand befinden und das Reaktionsgemisch an diesen Stellen in direkten Kontakt zum Deckel beziehungsweise zu den sich dort befindlichen Heizelementen befindet. Mit Hilfe der Transportebene kann nun zur Durchführung der DNA-Amplifikation das Reaktionsgemisch an die jeweiligen vortemperierten Bereiche in der Vorrichtung bewegt werden. Die Wärmeabgabe erfolgt vorzugsweise deckelseitig durch direkten Flüssigkeitskontakt mit zusätzlicher Durchmischung des Reaktionsgemisches beispielsweise durch akustische Oberflächenwellen oder durch Elektrowetting, doch sind auch Ausführungsformen denkbar, die ohne zusätzliche Durchmischung des Reaktionsgemisches oder mit nicht direkter Wärmeübertragung oder mit seitlicher oder bodenseitiger Wärmeinspeisung arbeiten. Der Nachweis von Analyten mittels PCR-Methoden kann auf verschiedene Weisen durchgeführt werden. Insbesondere kann dies durch sogenannte "real time PCR"-Verfahren in einem Fachmann bekannter Weise durchgeführt werden, wobei die in diesen Verfahren eingesetzte Messung der Fluoreszenz bei Wahl eines möglichst transparenten Materials entweder von der Seite der Transportebene oder der Seite der Nachweisebene erfolgen kann. Weiterhin kann auch eine sogenannte Endpunkt-PCR in einem Fachmann bekannter Weise durchgeführt werden, wobei am Ende der Reaktion das Produkt in einem Detektionsbereich bewegt wird, an dem die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen vorliegen, welche dort als spezifische Templatesonden immobilisiert worden sind. Dieser Bereich kann vorteilhafterweise ebenfalls temperiert werden, um eine spezifische Hybridisierung sicher zu stellen. Die Detektion erfolgt dann mit dem Fachmann bekannten Verfahren, wobei sich generell jede bekannte post-PCR-Detektionsmethode eignet.

[0042] Die Erfindung wird durch die nachfolgend beschriebenen, beispielhaften Figuren näher erläutert.

[0043] Die Bezugszeichen in den Figuren bedeuten:

- 1 Substrat der Transportebene
- 2 Deckel
- 3 elastischer Bereich des Deckels
- 4 Abfallbehälter
- 5 Saugvlies
- 6 Abfalltropfen
- 7 Transducer-Elemente
- 8 Magnet
- 9 Heizelement
- 10 Lüfter
- 11 Septum
- 12 Elektrischer Kontakt der Transducer-Elemente

- 13 Verschluss
- 14 Ionenselektive Elektrode
- 15 Referenzelektrode
- 16 Blende
- 5 17 Elektrischer Kontakt der ionenselektiven Elektrode
- 18 bevorzugte Bewegungsbahnen
- 19 zu untersuchende Flüssigkeitsprobe
- 20 Referenzelektrolytlösung
- 10 21 Ort der Untersuchung
- 22 Reagenzbehälter
- 23 Elektrischer Kontakt der Referenzelektrode
- 24 Dosiereinrichtung
- 25 Düse
- 15 26 Welle
- 27 Anregungslicht
- 28 Fluoreszenzlicht
- 29 Schrittmotor
- 30 Sensorische Elektroden zur Viskositätsbestimmung
- 20

Figur 1 zeigt eine Aufsicht auf eine Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Bestimmung von Analyten, beispielsweise Ionen, mit Hilfe von integrierten ionenselektiven Elektroden geeignet ist.

Figur 2 zeigt eine Schnittansicht der Vorrichtung aus Figur 1 entlang der dort gezeigten Linie A-A.

Figur 3 zeigt eine Explosionszeichnung einer Vorrichtung entsprechend Figuren 1 und 2.

Figur 4 zeigt eine erweiterte Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, wie sie in Figur 1 und 2 dargestellt ist.

Figur 5 zeigt eine Schnittansicht einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Bestimmung von Analyten, beispielsweise Ionen, mit Hilfe von Dickschichtelektroden (thick film electrodes) geeignet ist.

Figur 6 zeigt eine Schnittansicht einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Durchführung von PCR-Reaktionen, insbesondere zur Bestimmung von Analyten mittels real time-PCR, geeignet ist.

Figur 7 zeigt eine erweiterte Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung am Beispiel einer Erweiterung von Figur 6, mit welcher die Durchführung von Waschschritten in einer geschlossenen Vorrichtung möglich ist.

Figur 8 zeigt eine Aufsicht auf eine Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Bestimmung von Analyten mittels einer Visko-

sitätsmessung geeignet ist.

Beschreibung der Figuren

[0044]

Figur 1: Figur 1 zeigt eine Aufsicht auf eine Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Bestimmung von Analyten, beispielsweise Ionen, mit Hilfe von integrierten ionenselektiven Elektroden geeignet ist. Die Transportebene wird durch ein ebenes Substrat (1) verwirklicht. In der dargestellten Ausführungsform wird der Flüssigkeitstransport durch akustische Oberflächenwellen bewirkt. Hierzu sind in den Randbereichen des Substrates (1) mehrere interdigitale Transducer-Elemente (7) auf einem piezoelektrischen Element angeordnet, welche mittels der zugehörigen elektrischen Kontakte (12) angesteuert werden und die zum Transport notwendigen akustischen Oberflächenwellen erzeugen. Weiterhin enthält die Vorrichtung einen Deckel (2), welcher sich in einem bestimmten Abstand vom Substrat (1) befindet und am Ort der Untersuchung (21) die sensorischen Elemente, im vorliegenden Beispiel drei ionenselektiven Elektroden (14) und die Referenzelektrode (15), enthält und somit der Nachweisebene entspricht. Der Abstand der beiden Ebenen wird im vorliegenden Fall durch die Verschlüsse (13) festgelegt. Die Flüssigkeitsvolumina (im vorliegenden Beispiel die zu untersuchende Flüssigkeitsprobe (19) und eine Referenzelektrolytlösung (20)) können nach Aufgabe durch eines der dargestellten Septen (11) an den Ort der Untersuchung (21) bewegt werden. Der Ort der Untersuchung ist im vorliegenden Falle derartig ausgestaltet, dass in diesem Bereich der Abstand zwischen dem Substrat (1) der Transportebene und dem Deckel (2) durch eine lokale Absenkung des Deckels verringert ist. Am Ort der Untersuchung gelangt so die zu untersuchende Flüssigkeit (19) bzw. die Referenzlösung (20) mit ionenselektiven Elektroden (14) und der Referenzelektrode (15) in Kontakt. Die Signale der Elektroden werden mittels der zugehörigen elektrischen Kontakte (17) und (23) einer Auswerteeinheit zugeführt. Nach der Bestimmung der Potentiale zwischen den ionenselektiven Elektroden (14) und der Referenzelektrode (15) werden nun die vereinten Flüssigkeitsvolumina (19) und (20) mittels akustischer Oberflächenwellen in den Abfallbehälter (4) bewegt, welcher im vorliegenden Fall mit ei-

nem Saugvlies (5) zur Flüssigkeitsaufnahme ausgestattet ist und durch eine Blende (16) von der Transportebene getrennt ist. Zur Veranschaulichung der Bewegungswege der Flüssigkeitsvolumina sind bevorzugte Bewegungsbahnen (18) dargestellt.

Figur 2: Figur 2 zeigt eine Schnittansicht der Vorrichtung aus Figur 1 entlang der dort gezeigten Linie A-A. Die zu untersuchende Flüssigkeitsprobe (19) wird durch ein Septum (11) auf das Substrat (1) der Transportebene gegeben. Mittels durch Transducer-Elemente (7) erzeugter akustischer Oberflächenwellen wird die zu untersuchende Flüssigkeit an den Ort der Untersuchung (21) bewegt, welcher sich durch eine Absenkung des Deckels (2) in Richtung des Substrates (1) der Transportebene auszeichnet. Dort sind im vorliegenden Beispiel drei ionenselektiven Elektroden (14) als sensorische Elemente angebracht, welche zur Herstellung eines direkten Kontakts zur zu untersuchenden Flüssigkeit zusätzlich aus dem Deckel (2) hervorstehen. Die Referenzelektrolytlösung (20) wird in gleicher Weise durch ein anderes Septum auf das Substrat der Transportebene gebracht und unter die Referenzelektrode (15) bewegt. Beide Flüssigkeitsvolumina (19) und (20) kommen am Ort der Untersuchung in Kontakt und sind somit leitend verbunden, ohne dass es zunächst zu einer Durchmischung kommt. Nach erfolgter Messung wird das vereinte Flüssigkeitsvolumen durch eine Blende (16) in einen Abfallbehälter (4) bewegt und dort in Form eines Abfalltropfens (6) von einem Saugvlies (5) aufgenommen.

Figur 3: Figur 3 zeigt eine Explosionszeichnung einer Vorrichtung entsprechend Figuren 1 und 2. Zu besserer Illustration wurde in dieser Zeichnung das Substrat (1) der Transportebene vom Deckel (2) getrennt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die im Deckel integrierten Elektroden am Ort der Untersuchung (21) und die zugehörigen Leiterbahnen und Kontakte nicht dargestellt. In dieser Figur ist deutlich zu sehen, dass das Substrat (1) die Transportebene darstellt, auf welcher die Flüssigkeitsvolumina bewegt werden und welches die Transducer-Elemente (7) enthält, welche die Kräfte zum Transport der Flüssigkeitsvolumina (19) bzw. (20) erzeugen. Funktionell davon getrennt ist der Deckel (2) welcher die sensorischen Elemente am Ort der Untersuchung (21) enthält. Die beiden funktionell unter-

schiedlichen Teile (1) und (2) der Vorrichtung werden durch Verschlüsse (13) miteinander verbunden. Diese Verschlüsse gewährleisten, dass das Substrat der Transportebene und der Deckel funktionell voneinander getrennt sind, d.h. sich in einem Abstand voneinander befinden, in dem sie sich nicht maßgeblich in ihren jeweiligen Funktionen gegenseitig beeinflussen. Insbesondere ist der Abstand außerhalb des Ortes der Untersuchung so groß, dass die Flüssigkeitsvolumina nur mit dem Substrat der Transportebene in Kontakt stehen und sich auf diesem unbeeinflusst von den sensorischen Elementen im Deckel bewegen können. Andererseits befinden sich die Flüssigkeitsvolumina an den Orten der Untersuchung mit den sensorischen Elementen in engem Kontakt, ohne dass ein Transport gewünscht wird. Dieser Kontakt kann sowohl durch permanente als auch temporäre Verringerungen des Abstands zwischen Deckel bzw. den sensorischen Elementen am Ort der Untersuchung hervorgerufen werden.

Figur 4: Figur 4 zeigt eine erweiternde Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, wie sie in Figur 1 und 2 dargestellt ist. In dieser Ausführungsform ist zusätzlich ein Reagenzbehälter (22) enthalten, welcher die Referenzelektrolytlösung enthält. Über eine Dosiereinrichtung (24), beispielsweise einen piezoelektrischen Mikrodispenser, kann das entsprechende Volumen der Referenzelektrolytlösung durch eine Düse (25) in die geschlossene Vorrichtung eingebracht werden. Analog können auch andere Flüssigkeiten, beispielsweise Kalibrierlösungen oder Reinigungslösungen in die Vorrichtung eingebracht werden. Hierzu können auch mehrere Reagenzbehälter mit der Vorrichtung verbunden sein.

Figur 5: Figur 5 zeigt eine Schnittansicht einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Bestimmung von Analyten, beispielsweise Ionen, mit Hilfe von Dickschichtelektroden (thick film electrodes) geeignet ist. Der prinzipielle Aufbau der Vorrichtung entspricht Figuren 1 und 2. Die Sensorelektroden (14) und (15) sind in dieser Ausführungsform nicht als stiftförmige Elektroden ausgebildet, sondern in Form von Dickschichtelektroden mit einer Dicke im Mikrometerbereich auf die Unterseite des Deckels (2) aufgebracht. Die Kontaktierung der Dickschichtelektroden (14) mit der zu untersuchenden Flüssigkeitsprobe (19) bezie-

hungsweise die Kontaktierung der Dickschichtelektrode (15) mit der Referenzelektrolytlösung (20) erfolgt in dieser Ausführungsform insbesondere durch ein räumlich begrenztes Absenken des Deckels im Bereich des Ortes der Untersuchung (21). Hierzu sind in der vorliegenden Ausführungsform bestimmte Bereiche (3) des Deckels elastisch ausgebildet, so dass der Bereich des Deckels, der die sensorischen Elektroden enthält, zur Bestimmung des Analyten auf das Substrat (1) der Transportebene zu bewegt werden kann und die Kontaktierung zwischen den Dickschichtelektroden und den Flüssigkeitsvolumina erfolgen kann. Solche elastischen Bereiche können beispielsweise durch sogenannte Hart-/Weichspritzgießverfahren, wie sie in der Europäischen Patentschrift EP 0 779 226 beschrieben sind, erhalten werden. In der vorliegenden Ausführungsform erfolgt das Absenken des sensorischen Bereiches (21) durch einen Schrittmotor (29), welcher über eine Welle (26) im Bereich der sensorischen Elektroden mit der Oberseite des Deckels verbunden ist und so den sensorischen Bereich auf das Substrat der Transportebene hin- beziehungsweise davon wegbewegen kann. Dieser Bereich kann nach der Messung wieder vom Substrat der Transportebene wegbewegt werden, um so einen Abtransport der Flüssigkeiten in den Abfallbehälter (4) zu ermöglichen. In weiteren, nicht dargestellten Ausführungsformen kann auch der ganze Deckel auf die andere Ebene zur Bestimmung des Analyten zu bewegt werden oder die Dickschichtelektroden befinden sich an Bereichen des Deckels, die permanent einen verringerten Abstand zum Substrat der Transportebene aufweisen.

Figur 6: Figur 6 zeigt eine Schnittansicht einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Durchführung von PCR-Reaktionen, insbesondere zur Bestimmung von Analyten mittels real time-PCR, geeignet ist. Der prinzipielle Aufbau der Vorrichtung entspricht Figuren 1 und 2, allerdings können aufgrund der unterschiedlichen Nachweistechniken sensorische Elektroden und die entsprechenden Kontaktierungen in dieser Ausführungsform entfallen. Stattdessen befinden sich im Deckel (2) mehrere Heizelemente (9), welche auf unterschiedliche Temperaturen eingestellt werden können und welche die darunter befindliche PCR-Reaktionsgemische auf die Temperatur einregeln, die für den entspre-

chenden Reaktionsschritt der PCR benötigt wird. Überschüssige Wärme kann mittels Kühleinrichtungen, hier durch einen Lüfter (10) verwirklicht, abgeführt werden. Die Wärmeabgabe erfolgt vorzugsweise deckel- 5
seitig durch direkten Flüssigkeitskontakt mit zusätzlicher Durchmischung des Reaktions-
gemisches, doch sind auch Ausführungsfor- 10
men denkbar, die ohne zusätzliche Durch-
mischung des Reaktionsgemisches oder mit
nicht direkter Wärmeübertragung oder mit
seitlicher oder bodenseitiger Wärmeeinspei-
sung arbeiten. In der dargelegten Ausführ- 15
ungsform befinden sich die Heizelemente
(9) in permanent abgesenkten Bereichen
(21) des Deckels, so dass der direkte Kon-
takt zum Reaktionsgemisch und damit ein
sehr schneller Temperaturexaustausch nur an
diesen spezifischen Stellen erfolgen kann, 20
ohne dass andere Bereiche der Vorrichtung
dadurch übermäßig erwärmt werden. Ana-
log zu den zuvor genannten Ausführungen
sind jedoch die dort genannten Variationen
der Bauweise der Vorrichtung, insbesonde- 25
re temporär absenkbare Heizelemente,
ebenfalls möglich. Das Reaktionsgemisch
wird zur Durchführung der PCR in einer be-
stimmten Reihenfolge über die Transporte-
bene bewegt und kommt in den Bereichen
der Heizelemente mit diesen in Kontakt, so 30
dass dort die für den jeweiligen Reaktions-
schritt nötige Temperatur erreicht wird. Für
den nächsten PCR-Zyklus wird das Reakti-
onsgemisch wieder in die Anfangsposition
transportiert und die Schritte der unter- 35
schiedlichen Temperaturen werden erneut
durchlaufen. Der Nachweis des Analyten,
insbesondere einer spezifischen Nuklein-
säure, erfolgt in einer dem Fachmann be-
kannten Weise. In der dargestellten Vorrich- 40
tung erfolgt der Nachweis der Nukleinsäuren
mittels fluoreszenzoptischer Verfahren.
Hierbei wird das Anregungslicht (27) für die
real time-PCR-Sonden von unten eingestrahlt
und das emittierte Fluoreszenzlicht 45
(28) wird auch von unten wieder vermessen.
Dies ist durch die vorliegende Bauform be-
dingt und insbesondere bei anderen Anord-
nungen der Heizelemente oder indirekter
Temperaturübertragung oder dem Einsatz 50
transparenter Materialien können die Strah-
lengänge auch anders verlaufen. Es ist wei-
terhin auch möglich, die Heizelemente ring-
förmig zu gestalten, so dass die optische Be-
stimmung durch die Öffnung in der Ringmitte 55
erfolgen kann.

Figur 7: Figur 7 zeigt eine erweiterte Ausführungs-

form einer erfindungsgemäßen Vorrichtung
am Beispiel einer Erweiterung von Figur 6,
mit welcher die Durchführung von Wasch-
schritten in einer geschlossenen Vorrichtung
möglich ist. Hierzu werden die Stoffe, insbe-
sondere die Analyten, für welche ein Medi-
enwechsel durchgeführt werden soll, zu-
nächst in dem Fachmann bekannter Weise
an magnetische Partikel gebunden. Ansch-
ließend wird das Flüssigkeitsvolumen
mit den derartig behandelten Stoffen an ei-
nen bestimmten Ort innerhalb der Vorrich-
tung bewegt, welcher sich unterhalb eines
horizontal beweglichen Magneten (8) befin-
det. Wird der Magnet nun abgesenkt (in der
Figur dargestellt), erfahren die magneti-
schen Partikel und an die gebundenen Stoffe
eine Anziehungskraft und werden durch
den Magneten an der Unterseite des Dek-
kels festgehalten. Das Flüssigkeitsvolumen
kann nun wegtransportiert werden, ohne
dass die an die Magnetpartikel gebundenen
Stoffe ebenfalls wegtransportiert werden.
Anschließend kann ein anderes Flüssig-
keitsvolumen anderer Zusammensetzung
an diese Stelle bewegt werden. Wird nun der
Magnet wieder nach oben bewegt, nimmt
die magnetische Anziehungskraft zwischen
Magnet und den magnetischen Partikeln mit
den gebundenen Stoffen ab, so dass sich
die Stoffe wieder im neuen Flüssigkeitsvolu-
men verteilen können. Nach diesem Wasch-
schritt kann nun das Flüssigkeitssegment
weitere Reaktionsschritte durchlaufen, ins-
besondere wie sie im Zusammenhang mit
der Beschreibung von Figur 6 ausgeführt
sind.

Figur 8: Figur 8 zeigt eine Aufsicht auf eine Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, welche zur Bestimmung von Analyten mittels einer Viskositätsmessung geeignet ist. Der prinzipielle Aufbau der Vorrichtung entspricht Figur 1. Die Veränderung der Viskosität des sich in Position (21) befindenden Reaktionsgemisches kann über die Zeit mit Hilfe der Elektroden (30) mittels einer Bestimmung der Beeinflussung akustischer Oberflächenwellen verfolgt werden, wie es beispielsweise in WO 01/20781 beschrieben wird. Hieraus kann die Gerinnungszeit einer Probe bestimmt werden. Nach der Reaktion wird ein Regenerationsreagenz über die bevorzugten Bewegungsbahnen (18) geschickt. Auch dieses wird in den Abfallbehälter transportiert. Die Vorrichtung ist so bereit für eine weitere Messung.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit, wobei
- a) ein zu untersuchendes Flüssigkeitsvolumen auf ein Substrat einer Transportebene aufgebracht wird,
- b) das zu untersuchende Flüssigkeitsvolumen auf dem Substrat der Transportebene an einen Ort der Untersuchung bewegt wird,
- c) das zu untersuchende Flüssigkeitsvolumen am Ort der Untersuchung zusätzlich mit einem sensorischen Element in Kontakt gebracht wird, welches sich in einer dem Substrat der Transportebene gegenüberliegenden Nachweisebene befindet,
- d) der Analyt im zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen durch das sensorische Element bestimmt wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Flüssigkeitsvolumen in Schritt b) ausschließlich mit dem Substrat der Transportebene in Kontakt steht.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Analyt direkt durch ein spezifisches sensorisches Element bestimmt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Analyt indirekt durch eine spezifische Nachweisreaktion oder Wechselwirkung am Ort der Untersuchung bestimmt wird.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bestimmung des Analyten durch Einsatz analytspezifischer Elektroden, insbesondere ionenselektiver Elektroden oder Gaselektroden, durch amperometrische oder potentiometrische Sensorelektroden oder durch direkte optische Verfahren erfolgt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bestimmung des Analyten indirekt durch den Nachweis einer spezifischen Wechselwirkung mit einem Bindungspartner oder einer spezifische Reaktion des Analyten mit Nachweisreagenzien erfolgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Flüssigkeitsvolumen mittels Verfahren, welche auf akustischen Oberflächenwellen oder Elektrowetting beruhen, bewegt wird.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kontakt des sensorischen Elements mit dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen durch eine permanent vorhandene Veränderung des Abstands des sensorischen Elements oder der Nachweisebene von der Transportebene am Ort der Untersuchung erzielt wird.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** zur Bestimmung des Analyten der Kontakt des sensorischen Elements mit dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen durch eine temporäre Veränderung des Abstands des sensorischen Elements oder der Nachweisebene von der Transportebene.
9. Vorrichtung zur Bestimmung von Analyten in einer Flüssigkeit, welche ein Substrat einer Transportebene, über welches das zu untersuchende Flüssigkeitsvolumen von einer Probenauftragsstelle an einen Ort der Untersuchung bewegt wird, und mindestens ein sensorisches Element zu Bestimmung des Analyten, welches sich in einer der Transportebene gegenüberliegenden Nachweisebene befindet, enthält, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Flüssigkeitsvolumen während der Bewegung zum Ort der Untersuchung ausschließlich mit dem Substrat der Transportebene in Kontakt steht und nur zur Bestimmung des Analyten zusätzlich mit dem sensorischen Element in Kontakt gebracht wird.
10. Vorrichtung gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** in der Vorrichtung zusätzliche Elemente integriert sind, welche die für die Bewegung der Flüssigkeitsvolumen nötigen Kräfte erzeugen und auf das Flüssigkeitsvolumen übertragen können.
11. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Vorrichtung in einer geschlossenen Bauform ausgeführt ist, welche zusätzlich eine oder mehrere Proben- oder Reagenzauftragezonen und/oder einen Abfallbehälter aufweist.
12. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kontakt des sensorischen Elements mit dem zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumen durch eine permanent vorhandene Veränderung des Abstands des sensorischen Elements oder der Nachweisebene von der Transportebene am Ort der Untersuchung erzielt wird.

13. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 9 oder 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass zur Bestimmung des Analyten der Kontakt
des sensorischen Elements mit dem zu untersu- 5
chenden Flüssigkeitsvolumen durch eine temporäre
Veränderung des Abstands des sensorischen
Elements oder der Nachweisebene von der Trans-
portebene, insbesondere am Ort der Untersu-
chung, erzielt wird, vorzugsweise durch temporäre 10
Annäherung des sensorischen Elements an das
Substrat der Transportebene.
14. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass zum Nachweis des Analyten mittels molekular- 15
biologischer Amplifikationsverfahren zusätzliche
temperierbare Bereiche in die Nachweisebene in-
tegriert sind und diese temperierten Bereiche der-
artig ausgestaltet sind, dass zur Temperaturanpas-
sung des Reaktionsgemisches der Kontakt des 20
temperierten Bereichs mit dem Reaktionsgemisch
durch
- a) eine permanent vorhandene Veränderung
des Abstands der Nachweisebene von der 25
Transportebene in den temperierten Bereichen
oder
- b) eine temporäre Veränderung des Abstands
des temperierten Bereiches oder der gesamten 30
Nachweisebene von der Transportebene er-
zielt wird.

35

40

45

50

55

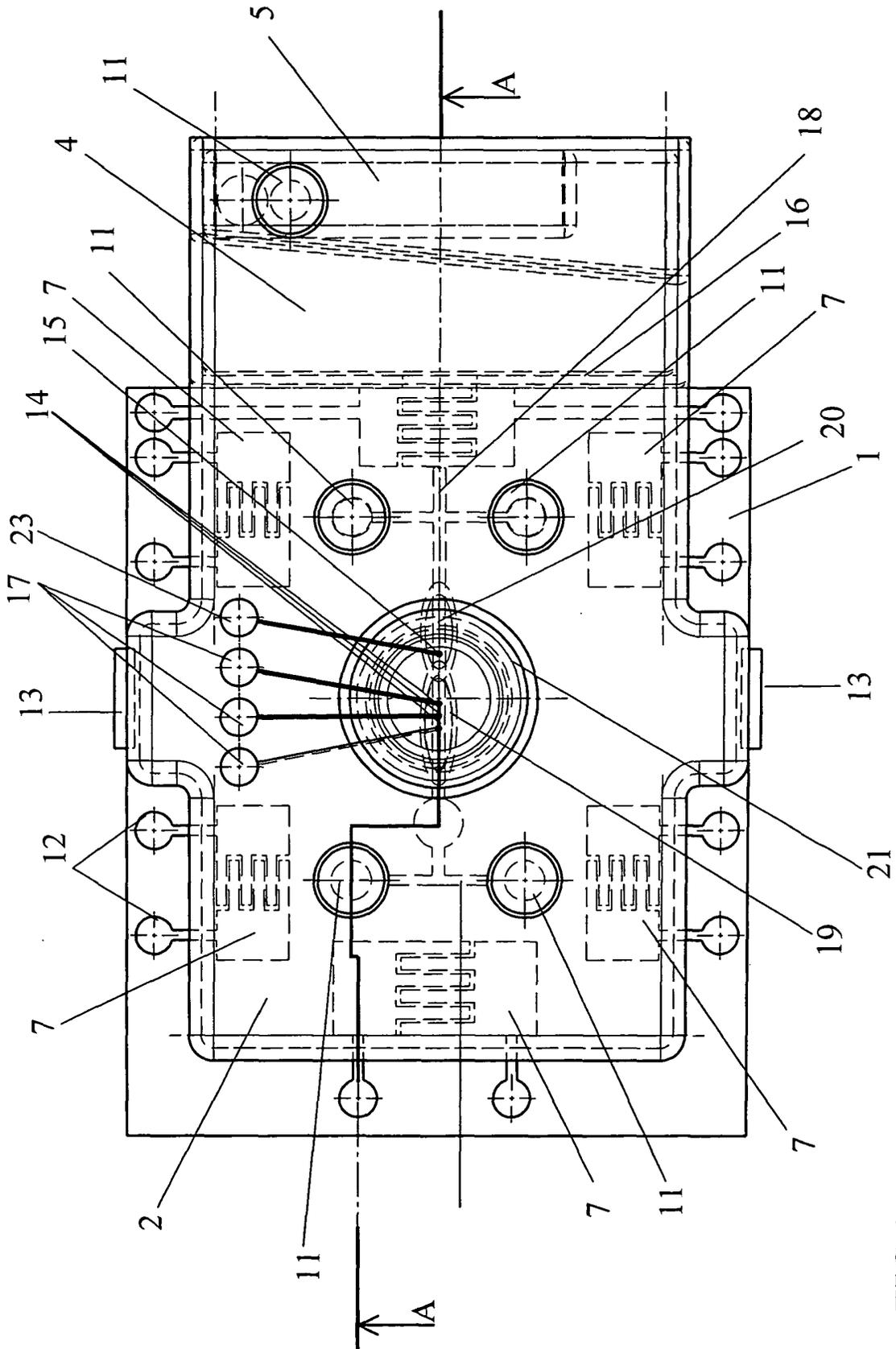


FIG 1

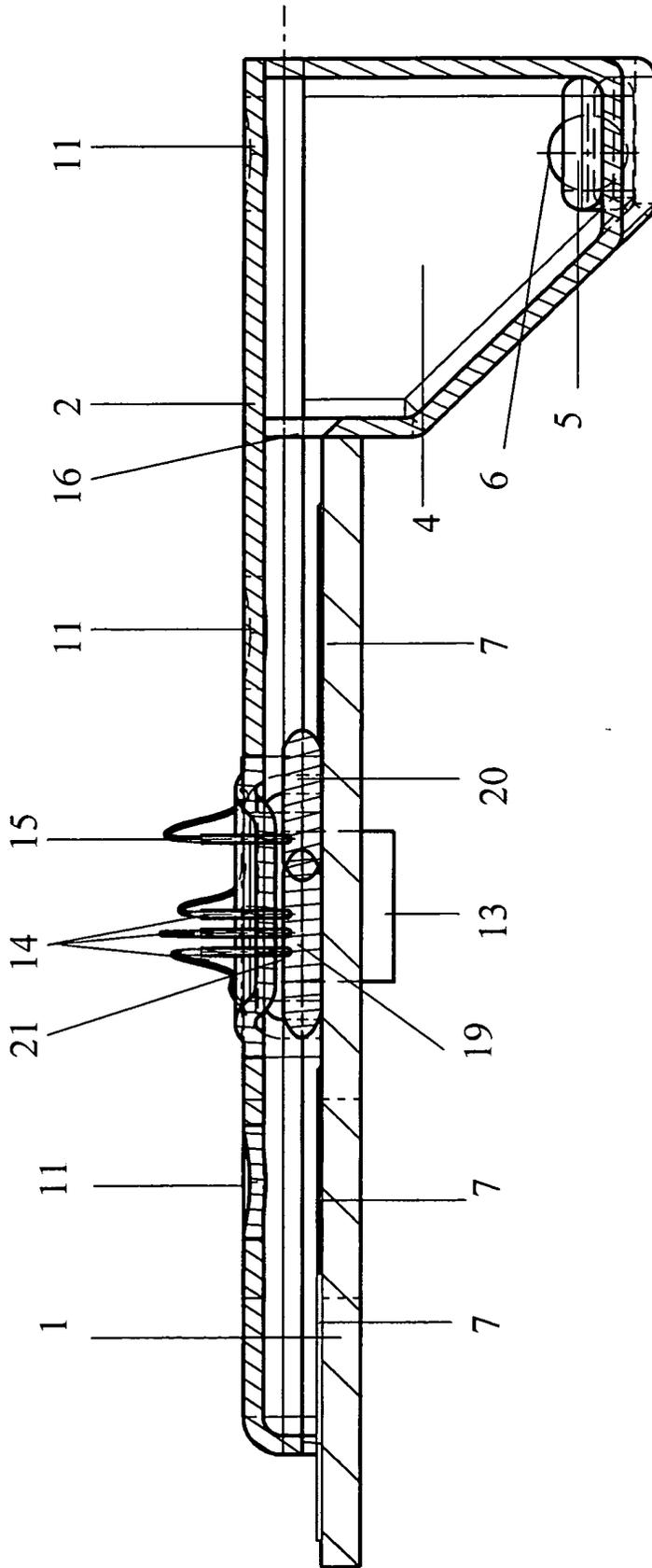


FIG 2

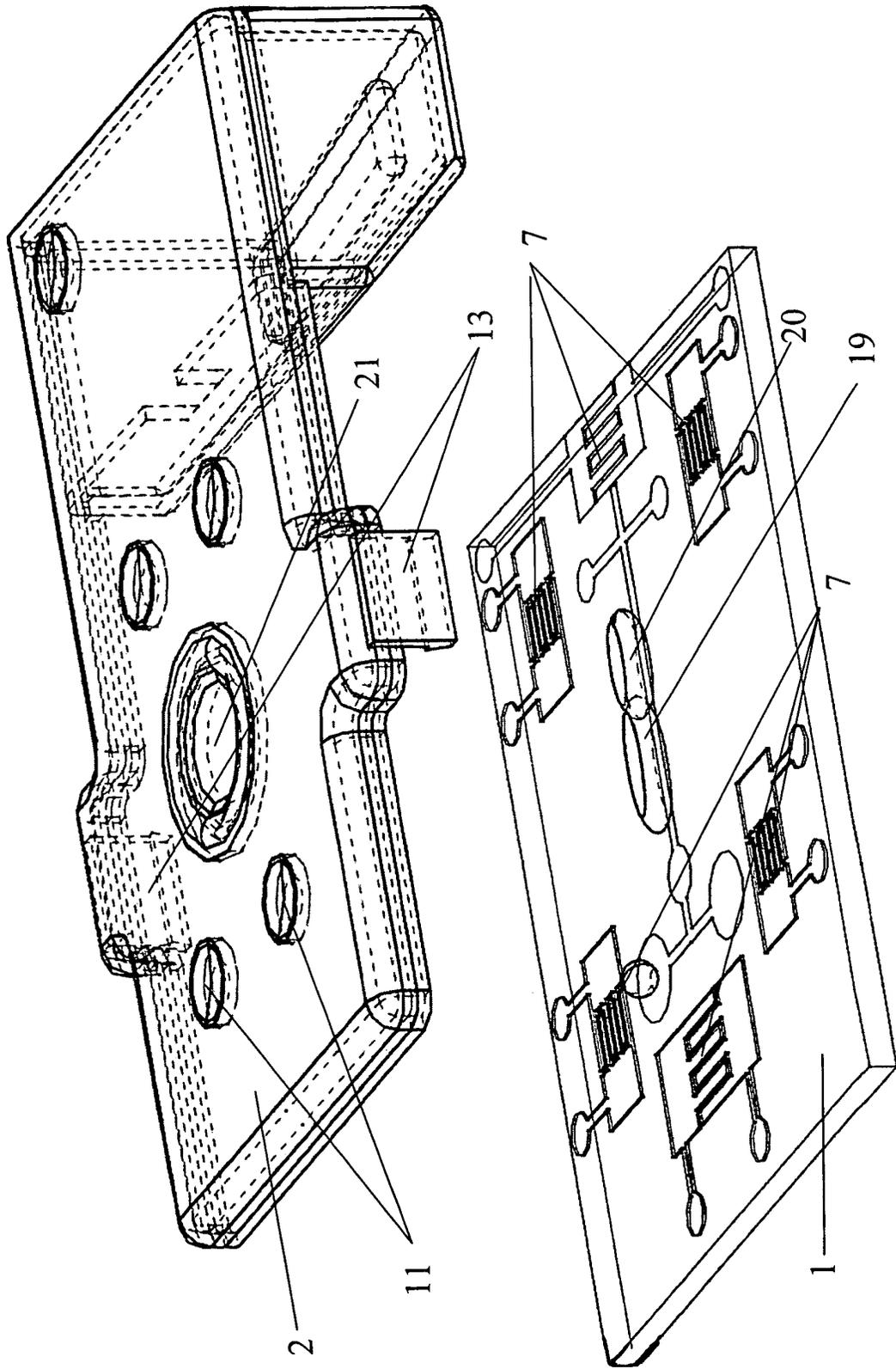


FIG 3

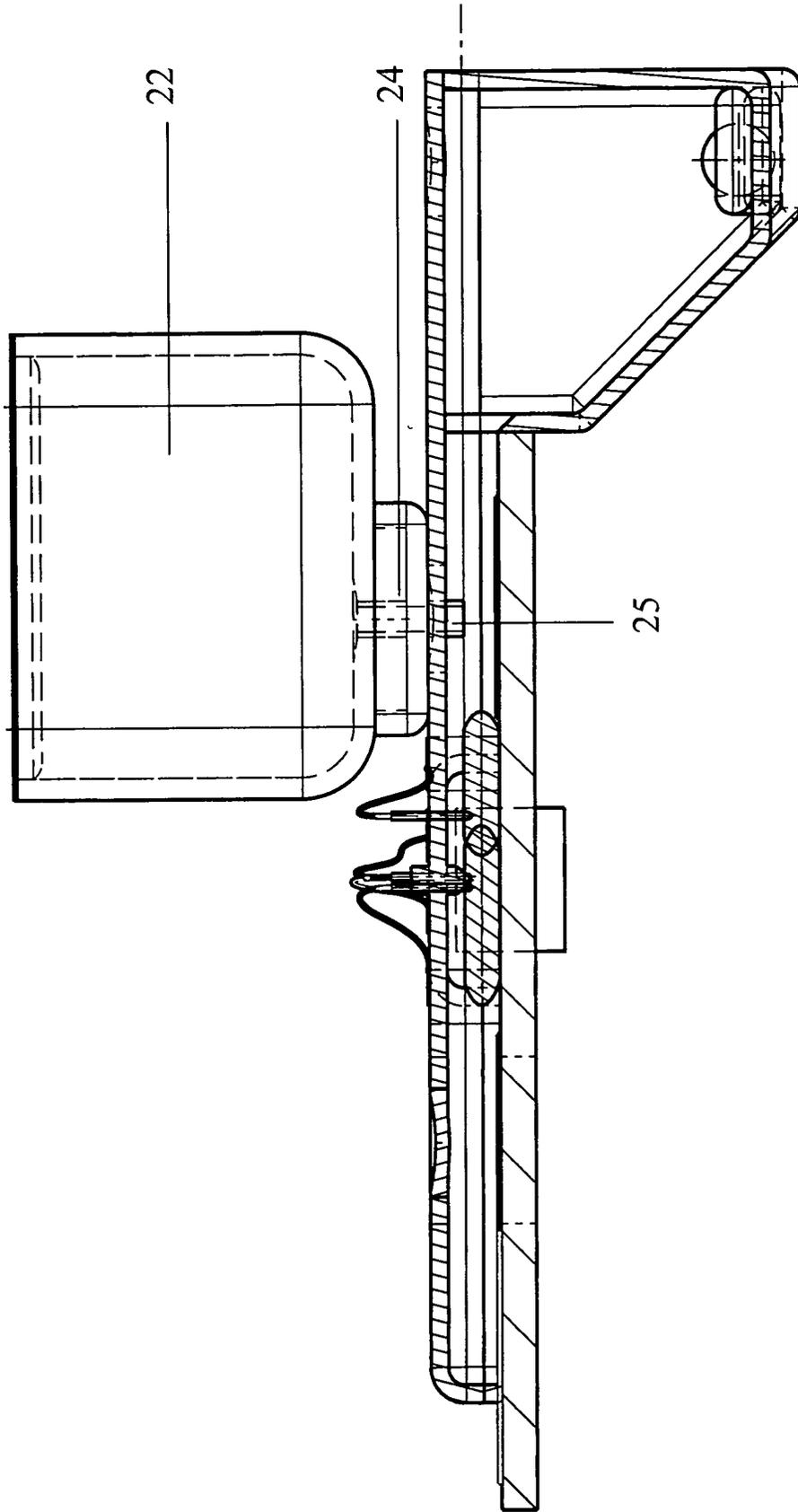
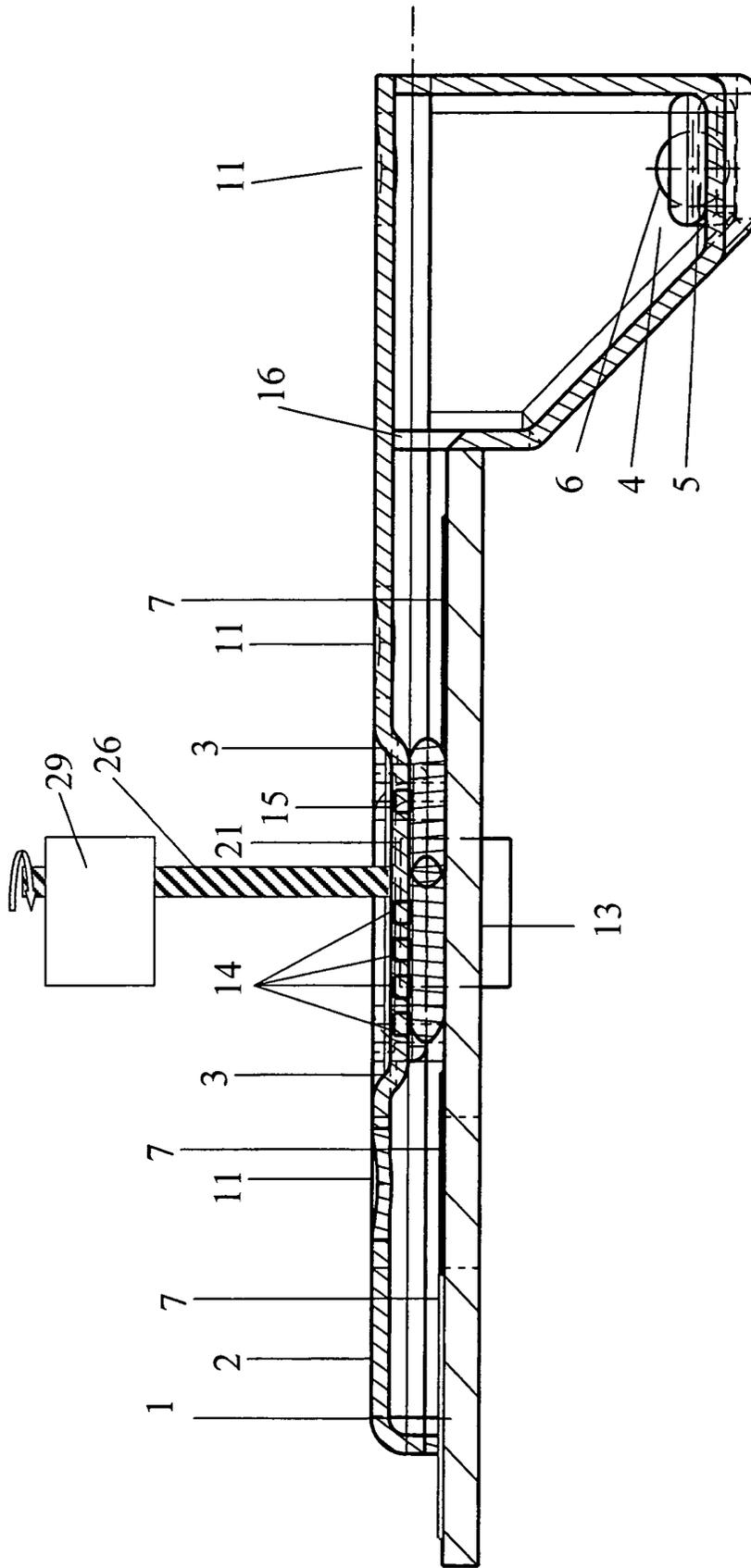


FIG 4



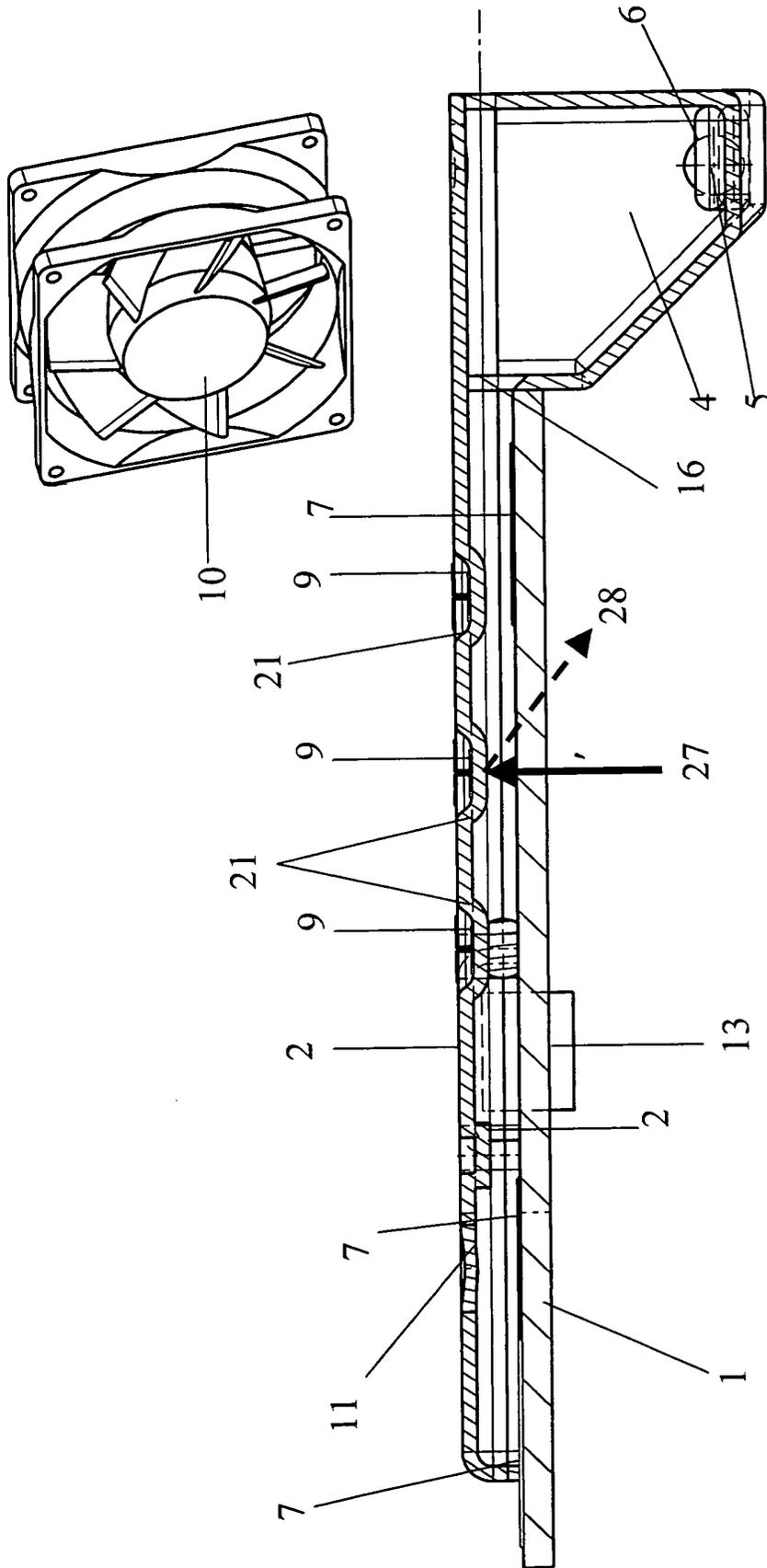


FIG 6

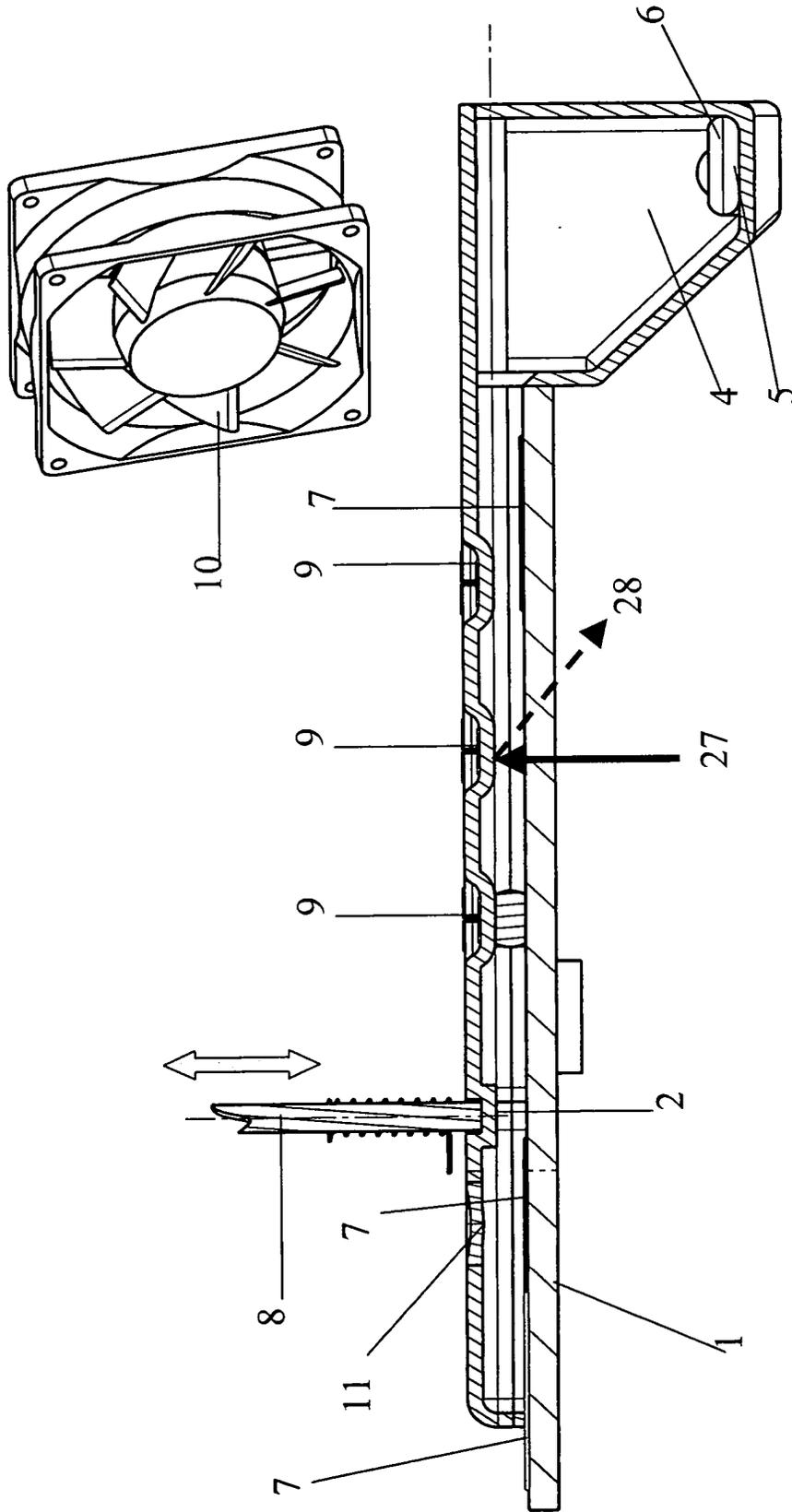


FIG 7

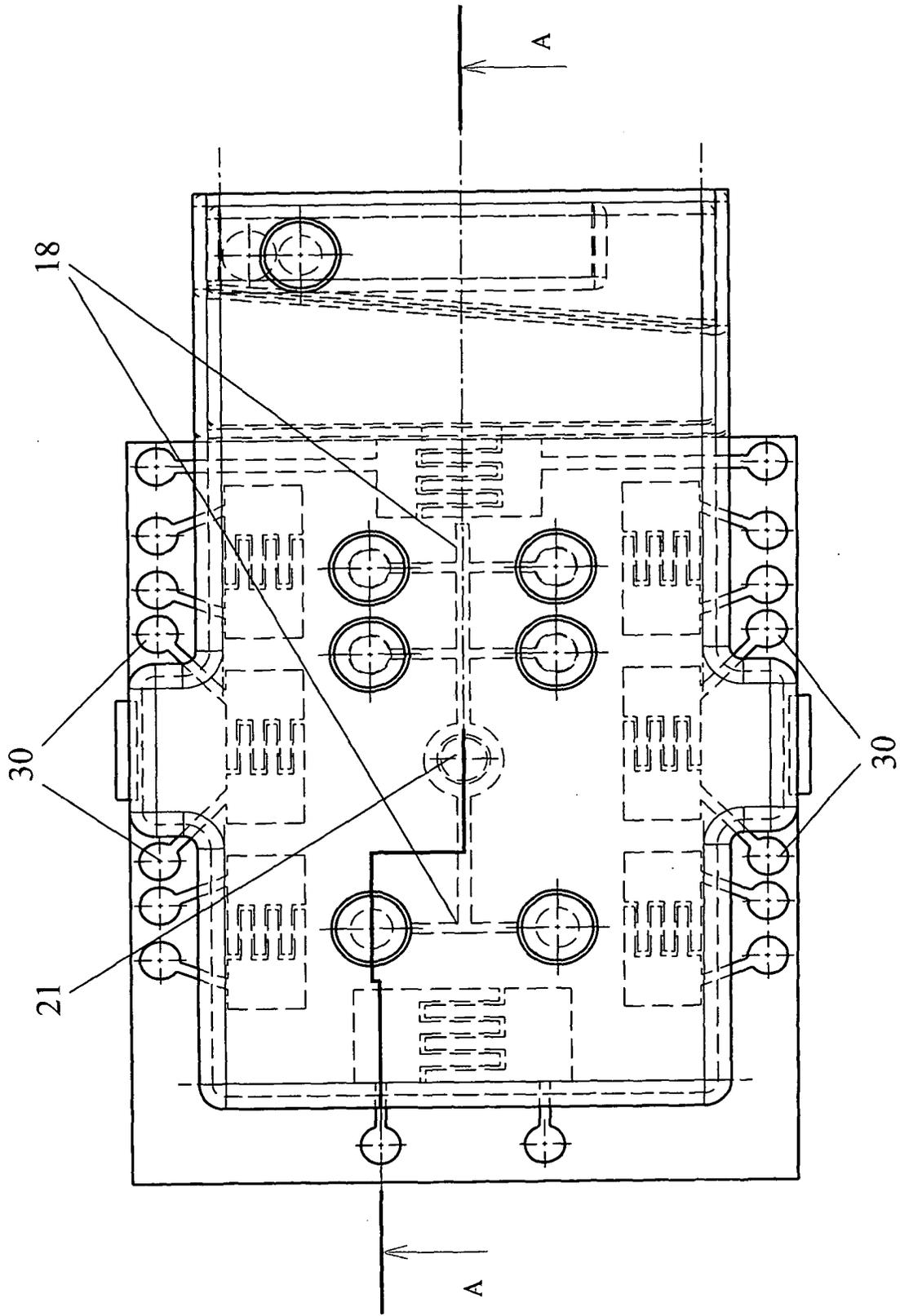


FIG 8