(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 11 2006 000 743 T5** 2008.06.05

(12) # Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2006/104839**
in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2006 000 743.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2006/010574**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.03.2006**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **05.10.2006**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **05.06.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***B01L 3/00*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
11/091,065 **28.03.2005** **US**

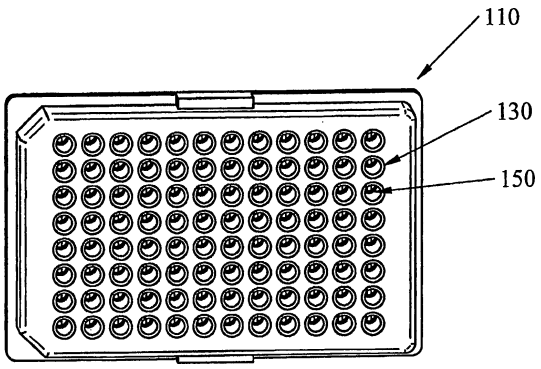
(71) Anmelder:
MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, Calif., US

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(72) Erfinder:
Fuller, Chris K., Oakland, Calif., US; Sugarman, Jeffrey H., Los Altos, Calif., US

(54) Bezeichnung: **Probenplatte mit mehreren Vertiefungen mit integrierten Impedanzelektroden und Verbindungsanordnung**

(57) Hauptanspruch: Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen mit:
A. einer Vielzahl von Kammern zum Aufnehmen separater Proben in einer ebenen Anordnungskonfiguration, wobei die Kammern eine Bodenfläche haben und die Kammern aus einer oberen Platte, die eine Vielzahl von Durchgangsbohrungen enthält, und einer unteren Platte ausgebildet sind,
wobei die untere Platte eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche hat,
wobei die obere Platte eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche hat,
wobei die obere Oberfläche der unteren Platte dichtend an der unteren Oberfläche der oberen Platte befestigt ist.
B. Einer Vielzahl funktional äquivalenter Impedanzmesselektroden, die flach auf der Bodenfläche von jeder der Vielzahl von Kammern und auf der oberen Oberfläche der unteren Platte liegen, wobei die Elektroden den Proben ausgesetzt sind, wobei jede der Elektroden von jeder der anderen Elektroden in der Vorrichtung elektrisch isoliert ist, wobei die Elektroden eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche haben....



Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Vorrichtung bezieht sich auf Untersuchungs- bzw. Screeningvorrichtungen zur markierungsfreien Echtzeitdetektion zellulärer Aktivierung.

[0002] Mit dem Aufkommen kombinatorischer Bibliotheksverfahren zum Erzeugen großer Bibliotheken von Verbindungen sowie Verbesserungen bei der Miniaturisierung und Automatisierung chemischer und biologischer Experimente hat es ein wachsendes Interesse an Verfahren zur Untersuchung bzw. zum Screening solcher Bibliotheken auf Bindung mit molekularen Targets gegeben, entweder in der Gegenwart oder Abwesenheit der biologischen (zellulären) Umgebung.

HTS-VERFAHREN

[0003] Das am weitesten verbreitete Untersuchungs- bzw. Screeningverfahren umfasst kompetitives oder nicht-kompetitives Binden von Bibliotheksverbindungen an ein ausgewähltes Zielprotein, wie etwa einen Antikörper oder Rezeptor, wobei markierte Agonisten eingesetzt werden. Dieses Verfahren wird häufig in einer Untersuchungs- bzw. Screeningvorrichtung mit hohem Durchsatz (high throughput screening apparatus) ausgeführt, die aus einer Vorrichtung mit mehreren Vertiefungen, die eine Vielzahl diskreter Mikrovertiefungen auf einer Substratoberfläche definiert, und Messstrukturen in jeder Vertiefung besteht. Eine Vielzahl von Techniken sind entwickelt worden, um den Assaydurchsatz zu erhöhen. Die Verwendung von Assayplatten mit mehreren Vertiefungen erlaubt das parallele Verarbeiten und die parallele Analyse mehrerer Proben, die in mehreren Vertiefungen einer Platte verteilt sind. Typischerweise werden Proben und Reagenzien in Assayplatten mit mehreren Vertiefungen (auch als Mikroplatten oder Mikrotiterplatten bekannt) gelagert, verarbeitet und/oder analysiert. Die Analyse besteht typischerweise aus optischen oder radiometrischen Messungen von Proben in jeder Vertiefung. Die Mikrotiterplatte dient typischerweise als ein Behälter für die Assayinhalte. Häufig ist die Oberfläche der Platte so behandelt, dass sie mehr oder weniger empfänglich für das Binden mit einer oder mehreren der Assaykomponenten ist. Alternativ (und viel weniger häufig) kann die Mikrotiterplatte mit Strukturen versehen sein, wie etwa Elektroden in jeder Vertiefung, die es erlauben, dass verschiedene Messungen ausgeführt werden.

Verschiedene Elektrodenstrukturen

[0004] Es sind eine Anzahl von Elektrodenstrukturen mit Platten mit Mikrovertiefungen verwendet worden. Die US-Patentanmeldung Nr. 20020025575 umfasst ein Paar von Elektroden, die zur Einführung in eine Vertiefung angepasst sind, und eine Schaltung zum Anlegen eines Niederspannungs-Wechselspannungssignals über die Elektroden, wenn sie (die Elektroden) in die Testprobe eingetaucht sind. Eine synchrone Messung des Stroms über die Elektroden erlaubt das Überwachen des Wachstumsniveaus oder der metabolischen Aktivität in der Testverbindung. Weil die Einführung einer Elektrodenstruktur in jede Plattenvertiefung einen zusätzlichen Grad an Komplexität zu dem Hochdurchsatzprozess hinzufügt und die Durchsatzgeschwindigkeit verringert, wurden integrierte Elektroden benötigt. Ein Substrat, das eine Vielzahl diskreter Mikrovertiefungen definiert, wobei Elektrodenstifte, die an einer Mehrelektroden-Abdeckplatte befestigt sind, in die Flüssigkeit eingetaucht werden, wenn die Abdeckung über dem Substrat angeordnet wird.

[0005] Cady et al. offenbart in dem US-Patent Nr. 4,072,578 eine Mikrotiterplatten-basierte Anordnung von Kammern mit Detektoren zur Messung von Bakterien. Die beschriebenen Vorrichtungen haben Elektroden, die senkrecht von der unteren Plattenoberfläche vorstehen. Vorstehende Elektroden messen den Hauptteil der Flüssigkeit in der Mikrovertiefung und ermöglichen nicht die Messung einer Abscheidung einer Schicht von Zellen auf den Elektroden. Giaver et al. offenbart in dem US-Patent Nr. 5,187,096 ein System zum Messen einer Zellimpedanz, das eine Arbeits- und eine Referenzelektrodenstruktur sowie mehrere Elektrodenschichten und Isolationsschichten verwendet. Verbindungen zu dieser Vorrichtung zu dem Impedanzmesssystem werden über Sonden hergestellt, die die obere Oberfläche des Randes der Elektrodenplatte berühren.

[0006] Van der Weide et al. beanspruchen in US 6,649,402 eine Mikroplatte mit Elektroden, die durch die Vertiefungen zusammengekoppelt sind, um die Messung der Kapazität oder des Widerstandes oder von beidem zwischen den Elektroden bei jeder Vertiefung zu ermöglichen, wobei die Änderung in der Kapazität oder dem Widerstand in jeder Vertiefung über die Zeit mit dem Ausmaß bakteriellen Wachstums in einem Wachstumsmedium korreliert ist. Von der Oberseite eingeführte Sonden und Elektroden an der Unterseite der Platte bilden die Detektionsvorrichtung.

[0007] Mehrere Mikroplatten haben aktive Elektroden, Referenzelektroden und Gegenelektroden in ihren Strukturen enthalten, um Änderungen im pH-Wert (Säurebildung), in der Innenstärke oder in dem Reduktions/Oxidations- (Redox-) Potential zu detektieren. Tsukada et al. diskutieren in der Europäischen Patentanmeldung EP 1 136 819 eine Mikroplatte mit einer Vielzahl von Zellen, wobei jede Zelle zwei Elektroden hat, die an dem Boden jeder Vertie-

fung ausgebildet sind, aber Tsukadas Sauerstoffdetektionselektrodenstruktur erfordert die Verwendung einer aktiven Elektrodenstruktur, einer Gegenelektrodenstruktur und einer Referenzelektrodenstruktur. Purvis beansprucht in der Britischen Patentanmeldung GB 2 386 949 eine Platte mit mehreren Vertiefungen zur elektrochemischen Analyse der Antwort ganzer Zellen auf Änderungen in pH-Wert, Ionenstärke oder chemischer Zusammensetzung einer Elektrolytlösung, wobei die Platte eine Vielzahl von Vertiefungen aufweist, wobei mindestens eine der Vertiefungen ihr zugeordnet eine Messelektrode und eine Referenzelektrode und optional eine weitere Gegenelektrode aufweist. Weil Redoxreaktionen traditionell unter Verwendung von Gleichspannung durchgeführt werden und der mit Redoxreaktionen in Zusammenhang stehende Stromfluss das elektrochemische Gleichgewicht jedes zellulären Systems stören würde, kann die integrierte Redoxelektrodenstruktur nicht für Systeme verwendet werden, die danach streben, zelluläre Echtzeitaktivierung zu überwachen.

[0008] Analytische Messvorrichtungen, die Elektrochemolumineszenz (ECL) verwenden, umfassen auch aktive Elektroden, Referenzelektroden und Gegenelektroden sowie ECL-Reagenzien, die gewöhnlich an der Arbeitselektrode immobilisiert sind, und ein System zur Messung der Lumineszenz, die von der Reaktion erzeugt wird, die stattfindet, wenn das ECL-Reagenz energetisch angeregt wird, wie etwa bei der US-Patentanmeldung 20040022677 (Inhaber Meso Scale Technologies).

Bedarf für eine neue Technologie

[0009] Zusammen mit den Vorteilen elektrischer Untersuchungen in Platten mit mehreren Vertiefungen besteht eine der Herausforderungen, die auftritt, in der großen Anzahl elektrischer Kontakte, die erforderlich ist, wenn die Anzahl von Vertiefungen zunimmt. Wenn zwei elektrische Kontakte pro Vertiefung erforderlich sind, dann erfordert eine Platte mit 96 Vertiefungen 192 elektrische Kontakte, eine Platte mit 384 Vertiefungen erfordert 768 elektrische Kontakte, und eine Platte mit 1536 Vertiefungen erfordert 3072 elektrische Kontakte. Auch wenn in manchen Anwendungen die Anzahl erforderlicher elektrischer Kontakte verringert werden kann, indem ein oder mehrere Leiter miteinander verbunden werden (zum Beispiel Elektroden, die eine gemeinsame Erdleitung teilen), gibt es Anwendungen, in denen dieses aufgrund von Potentialinterferenzen zwischen Vertiefungen, die verbundene Leiter teilen, und der Verringerung der Fähigkeit nicht erwünscht ist, gleichzeitig mehrere Vertiefungen zu messen. Für kleine Anzahlen erforderlicher elektrischer Verbindungen können die Elektroden in den Vertiefungen mit elektrischen Leitungen verbunden sein, die zu dem Rand der Mikrotiterplatte führen, wo Verbindungselemente vom Randtyp (edge-type connectors) eingesetzt werden können. Für die größere Anzahl erforderlicher elektrischer Verbindungen werden Randverbindungen ungeeignet. In diesem Fall ist die Verwendung des gesamten Oberflächenbereichs an der Unterseite der Mikrotiterplatte erwünscht.

[0010] Was benötigt wird, ist eine kostengünstige, wegwerfbare, massenproduzierbare Vorrichtung, die eine Messung hoher Information und integrierte adressierbare Elektroden zulässt, die eine Messung der zellulären Impedanzantwort zellulärer Populationen erlauben, wenn eine Wechselspannung über die Elektroden angelegt wird. Die Vorrichtung sollte ohne Signalverstärkung oder Störung des zellulären elektrochemischen Gleichgewichts arbeiten. Die Vorrichtung sollte in einem Mikrotiterformat arbeiten, das leicht herzustellen und mit gewöhnlichen Mikroplatten-Laborautomationssystemen kompatibel ist. Die benötigte Vorrichtung sollte die verfügbare Oberfläche zur Herstellung mehrerer elektrischer Verbindungen stark erhöhen, was es zulässt, mehr Vertiefungen präzise und gleichzeitig zu messen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die Vorrichtung bezieht sich auf Probenmodule (bevorzugt Probenplatten, mehr bevorzugt Probenplatten mit mehreren Vertiefungen) und Geräte zum Durchführen von Probenmessungen. Probenmodule der Vorrichtung können eine oder mehrere, bevorzugt eine Vielzahl, von Vertiefungen, Kammern und/oder Probenbereichen zum Durchführen einer oder mehrerer Probenmessungen aufweisen, wobei die Proben Komponenten enthalten können, die flüssige, feste, zelluläre oder biologische Verbindungen sind. Die Begriffe Vertiefungen, Kammern und Probenbereiche sind so definiert, dass sie für diese Vorrichtung austauschbar sind. Bevorzugt weisen diese Vertiefungen, Kammern und/oder Probenbereiche einen oder mehrere elektrische Leiter zum Messen der Impedanz der Probe in Kontakt mit den Leitern auf.

[0012] Die Probenplatten mit mehreren Vertiefungen können mehrere Elemente enthalten, zum Beispiel eine obere Platte mit einer Vielzahl von Durchgangsbohrungen, eine untere Platte, Vertiefungen oder Kammern, funktional äquivalente Leiter, dielektrische Materialien, elektrische Verbindungen, Mittel zur Plattenidentifizierung und Probenreagenzien. Die Vertiefungen der Platten können durch Durchgangsbohrungen oder Öffnungen in der oberen Platte gebildet werden. Die untere Platte kann dichtend an der oberen Platte befestigt sein (entweder unmittelbar oder in Kombination mit anderen Komponenten) und kann als der Boden der Vertiefung dienen. Die Probenplatten mit mehreren Vertiefungen können jede Anzahl von Vertiefungen oder Kammern von jeder Größe oder Form, angeordnet in jedem Muster oder jeder Konfiguration, haben und können aus einer

Vielzahl unterschiedlicher Materialien zusammengesetzt sein. Aus Gründen der Bequemlichkeit sind einige Standards für die Instrumentierung erschienen, die verwendet wird, um Proben für Hochdurchsatzassays zu verarbeiten. Bevorzugte Ausführungsformen der Vorrichtung verwenden Industriestandardformate für die Anzahl, Größe, Form und Konfiguration der Platte und der Vertiefungen.

[0013] Assayplatten mit mehreren Vertiefungen sind typischerweise in Standardgrößen und -formen hergestellt und haben Standardanordnungen von Vertiefungen. Einige gut eingeführte Anordnungen von Vertiefungen umfassen diejenigen, die auf Platten mit 96 Vertiefungen, Platten mit 384 Vertiefungen und Platten mit 1536 Vertiefungen und Platten mit 9600 Vertiefungen zu finden sind, wobei die Vertiefungen in zweidimensionalen Anordnungen ausgestaltet sind. Andere Formate können Platten mit einer einzigen Vertiefung (die bevorzugt eine Vielzahl von Assaydomänen hat), Platten mit zwei Vertiefungen, Platten mit sechs Vertiefungen, Platten mit 24 Vertiefungen und Platten mit 6144 Vertiefungen umfassen. Die Society for Biomolecular Screening hat empfohlene Standard-Mikroplattenspezifikationen für eine Vielzahl von Plattenformaten veröffentlicht (siehe http://www.sbs-online.org), wobei die empfohlenen Spezifikationen hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden. In standardisierten Plattenformaten ausgeführte Assays können von leicht verfügbarer Ausrüstung zur Aufbewahrung und Bewegung der Assayplatten sowie leicht verfügbarer Ausrüstung zur schnellen Abgabe von Flüssigkeiten in die und aus den Platten Vorteile ziehen.

[0014] Gemäß der Vorrichtung ist eine Vielzahl funktional äquivalenter Leiter in der Form von Impedanzmesselektroden in die Vertiefungen aufgenommen. Die vorliegende Vorrichtung beschreibt mehrere neue Konfigurationen und Materialien für Leiter in Assayplatten mit mehreren Vertiefungen und die Verbindungen dieser Leiter mit einem zugehörigen Impedanzmesssystem. Assayplatten mit mehreren Vertiefungen der vorliegenden Vorrichtung sind für einen einzelnen Gebrauch ausgestaltet und sind für Anwendungen gut geeignet, in denen die Platten wegwerfbar sind. In manchen Ausführungsformen kann eine Vertiefung einer Platte mit mehreren Vertiefungen eine Vielzahl von Domänen enthalten.

[0015] Die Vorrichtung bezieht sich auf Verfahren, die die Verwendung funktional äquivalenter Leiter in der Form von Impedanzmesselektroden und die Messung von Strom umfassen, einschließlich der Assayplattenvorrichtung und Verfahren zur Verwendung für solche Verfahren. Die Vorrichtung bezieht sich ferner auf ein Gerät, das verwendet werden kann, um Strom, zum Beispiel bei den funktional äquivalenten Leitern, zu induzieren und/oder zu messen. Ein weiterer Aspekt der Vorrichtung bezieht sich auf Verfahren zum Durchführen von Assays, die das Messen einer Impedanz von einer Assayplatte umfassen. Noch ein weiterer Aspekt der Vorrichtung bezieht sich auf Assayplatten und Plattenkomponenten (z.B. Plattenunterteile, Plattenoberteile und Platten mit mehreren Vertiefungen).

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0016] Fig. 1. Darstellung einer Ausführungsform der Assayplatte mit mehreren Vertiefungen, die 96 Vertiefungen und ein Paar funktional äquivalenter Leiter in der Form von Impedanzmesselektroden innerhalb jeder Vertiefung aufweist.

[0017] Fig. 2. Darstellung einer oberen Platte mit Durchgangsbohrungen, bevor sie dichtend an einer unteren Platte befestigt wird.

[0018] Fig. 3. Darstellung einer Draufsicht eines Impedanzmesselektrodenbereichs von einer unteren Platte gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung.

[0019] **Fig.** 4. Darstellung verschiedener Leiterkonfigurationen.

[0020] Fig. 5. Darstellung einer erweiterten Ansicht eines seitlichen Querschnitts einer Ausführungsform einer Mikrovertiefung.

[0021] Fig. 6. Darstellung einer Ausführungsform der Verbindungskonfiguration von Elektrode und elektrischem Kontaktfeld.

[0022] Fig. 7. Darstellung der unmittelbaren elektrischen Verbindung, die zwischen der unteren Oberfläche der Impedanzmesselektroden und dem Kontaktstift eines zugehörigen Messsystems hergestellt ist und die in einer alternativen Ausführungsform der Vorrichtung zu finden ist.

[0023] Fig. 8. Stellt das Stromsignal, das von einem Detektor empfangen wird, und die zugehörige Impedanz dar, die durch Vertiefungen von einer bevorzugten Ausführungsform der Assayplatte mit mehreren Vertiefungen der vorliegenden Vorrichtung erzeugt wird.

[0024] Fig. 9. 96 kinetische Impedanzauftragungen von den 96 Vertiefungen einer spezifischen Ausführungsform der erfinderischen Vorrichtung (insbesondere die Platte von Beispiel 1) werden gleichzeitig während eines Zellaktivierungsexperiments erzeugt.

[0025] Fig. 10. Graph einer maximalen Impedanz für jede Vertiefung der Fig. 9 von einer spezifischen Ausführungsform der erfinderischen Vorrichtung (insbesondere die Platte von Beispiel 1) als eine Funktion der Antagonistenkonzentration, um den IC_{50}-Wert

jedes Antagonisten zu bestimmen. Der Graph zeigt die Fähigkeit der Plattenarchitektur, die relativen Stärken der unterschiedlichen Antagonisten zu bestimmen.

[0026] Fig. 11. 96 kinetische Graphen von Impedanzmessungen von den 96 Vertiefungen einer spezifischen Ausführungsform der erfinderischen Vorrichtung (insbesondere die Platte von Beispiel 2).

[0027] Fig. 12a, Fig. 12b, Fig. 12c. Histogramm, das die Größe der Impedanzantworten von jeder der Verbindungen in den Vertiefungen einer spezifischen Ausführungsform der erfinderischen Vorrichtung (insbesondere die Platte von Beispiel 2) vergleicht.

[0028] Fig. 13. 96 kinetischen Graphen von Impedanzmessungen von den 96 Vertiefungen einer spezifischen Ausführungsform der erfinderischen Vorrichtung (insbesondere die Platte von Beispiel 3).

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER VORRICHTUNG

[0029] Die Vorrichtung enthält Instrumentierung bzw. Einrichtungen und Verfahren zum Ausführen einer Vielzahl unterschiedlicher Arten von Messungen. Die Vorrichtung enthält Assayplatten, Plattenkomponenten und Verfahren zum Durchführen Impedanzbasierter zellulärer Assays. Die vorliegende Vorrichtung beschreibt mehrere neue Konfigurationen und/oder Materialien für funktional äquivalente Leiter in Assayplatten, insbesondere in Assayplatten mit mehreren Vertiefungen.

[0030] Wie in Fig. 1 gezeigt ist, bezieht sich die Vorrichtung auf eine Platte **110** mit einer einzelnen Vertiefung oder mehreren Vertiefungen zur Durchführung eines oder mehrerer Assays, wobei die Platte aus einer oberen Platte und einer unteren Platte ausgebildet ist und die Assayplatte eine Vielzahl von Vertiefungen **130** (und/oder Kammern) und ein Paar funktional äquivalenter Leiter **150** in jeder Vertiefung oder Kammer aufweist. Gemäß einer Ausführungsform der Vorrichtung **210** (die in Fig. 2 gezeigt ist) ist die obere Platte **220** eine einheitliche gegossene Struktur, die aus starren thermoplastischen Materialien, wie etwa Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, Polycarbonat, oder irgendeinem anderen Kunststoff hergestellt ist, der spritzgegossen, maschinell bearbeitet oder auf andere Weise in die gewünschte Konfiguration ausgebildet werden kann. Die untere Platte **260** ist aus Polyethylenterephthalat (üblicherweise auch als Mylar oder PET bekannt), Polyimid, Polycarbonat, Polystyrol oder Cycloolefinpolymer (COP) hergestellt. In einer alternativen Ausführungsform kann das Material der oberen Platte **220** und der unteren Platte **260** eine Kombination von Kunststoffen aufweisen und kann einen Kunststoff aufweisen, der mit schlagzähem Polystyrol gemischt ist, um die Sprödigkeit des Materials zu verringern. Alternativ kann die obere **220** und die untere Platte **260** aus jedem Material ausgebildet sein, das in eine geeignete Form gegossen werden kann. Es können Materialien, wie etwa Kunststoffe, Elastomere, Keramiken, Verbundstoffe, Glas, Kohlenstoffmaterialien oder dergleichen, verwendet werden. Die obere Platte **220** und die untere Platte **260** sind bevorzugt aus einem Material ausgebildet, das im Wesentlichen undurchlässig für Reagenzien ist, die typischerweise in biologischen Assays auftreten, beständig gegenüber der Adsorption von Biomolekülen ist, undurchlässig für Wasser und organische Lösungsmittel ist, die typischerweise verwendet werden, um chemische Bibliotheken zu lösen, und mäßigen Wärmeniveaus widerstehen kann. Die obere Platte **220** und die untere Platte **260** sind darüber hinaus aus einem Material hergestellt, das ausreichend kostengünstig ist, damit die Vorrichtungen nach einer Verwendung ohne große wirtschaftliche oder ökologische Einflüsse weggeworfen werden können.

[0031] Die untere Platte **260** kann in einer Plasma enthaltenden Kammer geätzt werden, um die Oberfläche von Verunreinigungen zu säubern und um das normalerweise hydrophobe Substratmaterial zu modifizieren. Es ist bekannt, dass diese Behandlung die Anhaftung und Lebensfähigkeit bestimmter Zelltypen verbessert, und sie wird gewöhnlich in wegwerfbaren Laborkunststoffen verwendet, bei denen ein Zellwachstum erwünscht ist.

[0032] Es ist eine Ebenheit der oberen Platte **220** erforderlich, so dass die Platte **210** effektiv bezüglich der Temperatur gesteuert bzw. geregelt werden kann, wenn sie in das Assaysystem eingebracht ist. Die Mikroplatte **210** wird während des gesamten Assays gegen die Temperatursteuerfläche gedrückt, um die Temperatur des Vertiefungsinhalts konstant zu halten. Die Temperatursteuerfläche kann ein flacher Block aus Aluminium mit Bohrungen sein, durch die die elektronischen Verbindungsstifte eines zugehörigen Impedanzmesssystems vorstehen. Um den Kontakt zwischen der Mikroplatte **210** und der Temperatursteuerfläche zu verbessern, kann alternativ eine nachgiebige thermisch leitfähige Schicht zwischen der Temperatursteuerfläche und der Vorrichtung vorgesehen werden.

[0033] Eine Temperatursteuerung bzw. -regelung der Assays, typischerweise zwischen Raumtemperatur und 37°C (oder 42°C für Insektenzellen), ist aus zwei Gründen wichtig. Erstens werden die in den Vorrichtungen durchgeführten Zellaktivierungsassays unter Verwendung einer Impedanzdifferenz quantifiziert, bevor und nachdem den Zellen chemische Verbindungen zugeführt wurden. Nicht-spezifische Änderungen in der Impedanz aufgrund von Änderungen in der Temperatur des Puffers oder der Zellen während des Assays würden die Präzisionsmessungen,

die erwünscht sind, negativ beeinflussen. Zweitens ist es bekannt, dass biologische Aktivität aller Arten, von einfachen molekularen Wechselwirkungen bis zu komplexen zellulären Signalübertragungswegen, gegenüber Änderungen in der Temperatur empfindlich sein kann. Wegen dieser Antworten bzw. Reaktionen ist eine Temperatursteuerung bzw. -regelung der Vorrichtungen während der Assays wichtig, und das Steuern bzw. Regeln innerhalb eines Grades eines Sollwertes oder alternativ 0,5° und ferner auf innerhalb 0,1° ist erwünscht.

[0034] Auch wenn die Platten von jeder Dicke sein können, ist die Dicke der unteren Platte **260** bevorzugt optimiert, um eine maximale Transparenz und eine maximale thermische Leitfähigkeit zu ermöglichen (da die Temperatur des Vertiefungsinhalts gesteuert wird, indem die Plattenunterseite in Kontakt mit einer temperaturgesteuerten bzw. -geregelten Fläche angeordnet wird). Die Dicke der oberen Platte und der unteren Platte liegt in dem Bereich von 0,001 Inch bis 0,043 Inch, wobei eine zusätzlich bevorzugte Dicke in der Größenordnung von 0,005 Inch liegt. Die Dicke der unteren Platte **260** und die Materialauswahl ergeben bevorzugt eine Transparenz, die ausreichend ist, um eine Sichtprüfung der an dem Boden der Vertiefungen **230** wachsenden Zellen zu ermöglichen. Die untere Platte **260** ist bevorzugt dünn genug, um einer Kunststofffolie zu ähneln, die dann an der Unterseite der oberen Platte **220** fest haftet.

[0035] Das dichtende aneinander Befestigen der oberen Platte **220** und der unteren Platte **260** bildet die Assayplatte **210**. Die sich ergebende Mikroplatte verhindert einen Austritt von Fluid aus jeder der Vertiefungen, wobei sie sowohl einen Austritt aus der Platte als auch eine Undichtigkeit zwischen Vertiefungen verhindert. Das Dichtungsverfahren muss auch in einer Konstruktion resultieren, die gegenüber einer Einwirkung von Medien, Puffer und Lösungsmitteln stabil ist, die typischerweise in den Anwendungsexperimenten verwendet werden. Es kann erwartet werden, dass Platten mehrere Tage mit diesen Fluiden in Kontakt bleiben, und es ist erforderlich, dass das Verbindungsverfahren während dieses Zeitraums unverändert bleibt.

[0036] Umgekehrt darf der Inhalt der Vertiefungen in keiner Weise durch das Dichtungsverfahren geändert werden. Zum Beispiel müssen Klebemittel, die bei dem Verbindungsprozess verwendet werden, sorgfältig ausgewählt werden, um nachteilige Effekte auf Zellwachstum oder Zellantworten während der Assays zu vermeiden.

[0037] Gemäß einer Ausführungsform wird eine adhäsive Schicht **240** verwendet, um sowohl die obere Platte **220** an der unteren Platte **260** zu befestigen, als auch um eine Abdichtung zwischen den Vertiefungen bereitzustellen. Die adhäsive Schicht **240** weist bevorzugt gestanztes adhäsives Übertragungsband (transfer tage) (das aus Klebemittel allein oder einer mit einer adhäsiven Fläche versehenen Folie besteht) und/oder aushärtbare Klebemittel (z.B. lufthärtende Cyanoacrylate oder UV-härtende Materialien) auf, die als eine dünne Schicht über die gesamte Verbindungsfläche und/oder um jede Vertiefung herum aufgebracht werden. Die chemischen Eigenschaften des Klebemittels sollten so gewählt werden, dass es keinen nachteiligen Effekt auf das Zellwachstum oder die Antwort der Zellen während des Assays gibt. Die Flexibilität der unteren Platte **260** erlaubt eine leichte Bindung der unteren Platte **260** an die obere Platte **220** mit Klebemittel.

[0038] In einer alternativen Ausführungsform sind die obere Platte **220** und die untere Platte **260** unter Verwendung von Einsatzgießen (oder thermischem Verbinden) oder Ultraschallverbinden dichtend befestigt. In dem Fall von Einsatzgießen wird die untere Platte **260** im Inneren einer Spritzgießmaschine angeordnet, und die obere Platte **220** wird unmittelbar auf die obere Platte **260** gegossen. Der geschmolzene Kunststoff bindet an die untere Platte **260** und kühlt dann ab. In dem Fall von Ultraschallverbinden werden die obere **220** und die unteren Platte **260** zusammengedrückt, während Hochfrequenzvibrationen ein lokales Schmelzen und eine lokale Verbindung zwischen den Kunststoffen der oberen **220** und der unteren Platte **260** erzeugen.

[0039] In der oberen Platte **220** ausgebildete Durchgangsbohrungen **215** bilden die Vertiefungen **230** der Assayplatte **210**, wenn die obere Platte **220** dichtend an der unteren Platte **260** befestigt ist. Die Durchgangsbohrungen **215** sind bevorzugt in die obere Platte **220** spritzgegossen oder in dieser durch maschinelle Bearbeitung erzeugt und sind typischerweise zylindrisch, rechteckig oder konisch in ihrer Form mit Durchmessern von ungefähr 1 mm bis 28 mm. Der Durchmesser der Durchgangsbohrungen **215** für eine Platte mit 96 Vertiefungen beträgt mehr bevorzugt 1 mm bis 7 mm. Typischerweise gibt es für Spritzgiessen eine leichte Verjüngung der Bohrungen **210**, wobei der Durchmesser an dem oberen Ende etwas größer als der Durchmesser an dem unteren Ende ist. Der Durchmesser ist optimal gewählt, um die Menge an Materialien zu sparen, die erforderlich ist, um einen Assay zu vervollständigen, und um die Vertiefungsbodenfläche zu minimieren und auf diese Weise die Anzahl von Zellen zu minimieren, die erforderlich ist, um den Assay durchzuführen. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung weist eine Assayplatte **210** eine oder mehrere Assayvertiefungen **230** oder Kammern auf (z.B. diskrete Stellen auf einer Assayplattenfläche, an denen sich Assayreaktionen ereignen und/oder an denen ein Assaysignal ausgesendet wird). Weitere Ausführungsformen enthalten zwei oder mehr, sechs oder mehr, 24 oder mehr, 96 oder mehr, 384 oder mehr, 1536

oder mehr oder 9600 oder mehr Vertiefungen auf. Gemäß einer bestimmten Ausführungsform ist die Assayplatte eine Assayplatte mit mehreren Vertiefungen, die eine Standardvertiefungskonfiguration von sechs Vertiefungen, 24 Vertiefungen, 96 Vertiefungen, 384 Vertiefungen oder 1536 Vertiefungen hat.

[0040] Gemäß der vorliegenden Vorrichtung ist eine Vielzahl funktional äquivalenter Leiter **250** in der Form von Impedanzmesselektroden in jede der Vertiefungen aufgenommen. Die vorliegende Vorrichtung beschreibt mehrere neue Konfigurationen und Materialien für Elektroden in Probenplatten mit mehreren Vertiefungen. Die Impedanzmesselektroden **250** sind in einer Anordnung auf der oberen Oberfläche der unteren Platte **260** ausgebildet, so dass die funktional äquivalenten Elektroden **250** in dem unteren Ende bzw. in dem Boden der ausgebildeten Vertiefungen **230** angeordnet sind, nachdem die obere Platte **220**, die die Durchgangsbohrungen **215** enthält, die die Vertiefungswände aufweisen, dichtend an der unteren Platte **260** befestigt ist. Die Vielzahl von Impedanzmesselektroden **250**, die in Fig. 3 dargestellt sind, vervollständigen eine Schaltung **310** in dem unteren Ende bzw. Boden **380** jeder Mikroassayplattenvertiefung **330**, die es ermöglicht, die Impedanzänderungen während einer Zellaktivierung zu überwachen. Im Gegensatz zu den elektrochemischen Sensoren, die bei Redoxreaktionen verwendet werden, bei denen eine Oxidation an der Anode stattfindet und eine Reduktion an der Kathode stattfindet, werden die Impedanzmesselektroden dieser Vorrichtung nicht verbraucht, und es findet keine Oxidation oder Reduktion an den Elektrodenoberflächen statt. Die Elektroden sind chemisch inert. Für die Impedanzmessungen, die mit dieser Vorrichtung in Zusammenhang stehen, ist jeder der Leiter **350** funktional äquivalent, wobei Zellen an jeder der Elektroden zu den Impedanzänderungen beitragen, die bei einer zellulären Aktivierung auftreten.

[0041] Die Impedanzmesselektroden **350** sind aus einer Einfach- oder Mehrfachschicht eines leitfähigen Materials ausgebildet. Das leitfähige Material ist bevorzugt ein Metall oder ein nicht-metallisches leitfähiges Material mit einer Oberfläche, die für Zellwachstum empfänglich ist. Bevorzugte metallische leitfähige Materialien umfassen Gold, Silber und Platin. Bevorzugte nicht-metallische leitfähige Materialien umfassen ITO, leitfähige Polymere und Kohlenstofffasern. Bevorzugte leitfähige Materialien sind inert gegenüber den organischen und anorganischen Verbindungen, die typischerweise in biologischen Assays verwendet werden, und unterliegen bei den niedrigen Spannungen, die in Impedanzmessungen verwendet werden (100 mV), nicht elektrochemischen Reaktionen.

[0042] Die Impedanzmesselektroden **350** können durch einen negativen Prozess der Entfernung von Metall aus einer gleichförmigen Schicht über dem Substratmaterial hergestellt werden. Das gleichförmige Metall kann unter Verwendung traditioneller Sputter- oder Verdampfungsmittel auf die Oberfläche der unteren Platte aufgesputtert oder aufgedampft werden, was einen dünnen Film erzeugt, der in seiner Dicke Nanometer bis Mikrometer beträgt. Eine bevorzugte Dicke ist 50 nm. Eine 50 nm Schicht Gold ist halbtransparent und erlaubt die Inspektion von Zellen auf den Elektroden unter Verwendung gewöhnlicher Labormikroskope. Alternativ kann die Metallschicht auf die Oberfläche der unteren Platte galvanisiert oder laminiert werden. Nachdem sie aufgebracht ist, kann die gleichförmige Metallschicht unter Verwendung photolithographischer Belichtung und chemischen Ätzens strukturiert werden, um die Impedanzmesselektroden zu bilden, oder alternativ kann das Metall durch einen Laserablationsprozess entfernt werden. Metall, das nicht entfernt wird, bildet die resultierenden Elektroden.

[0043] Alternativ können die Impedanzmesselektroden **350** durch den additiven Prozess eines Druckprozesses hergestellt werden, wie etwa Siebdrucken oder Tampondrucken einer leitfähigen Farbe. Für diesen Zweck können leitfähige Farben, die Silber-, Gold-, Platin- und/oder Kohlenstoffteilchen enthalten, verwendet werden. Leitfähige Farben von Unternehmen, wie etwa Dupont und Acheson, sind typisch für diejenigen, die verwendet werden. Gold ist deshalb ein bevorzugtes leitfähiges Material, weil die Teilchen äußerst leitfähig sind und das Gold äußerst inert ist, was die Oberfläche der Elektroden gegenüber einer Zersetzung durch die Atmosphäre oder durch Fluide beständig macht, die in den Assayvertiefungen **330** verwendet werden können. Außerdem ist Gold aufgrund seiner inerten Natur nicht toxisch für Zellen. Goldteilchen in dem Bereich von 0,25 bis 10 µm können in Farben verwendet werden, die in einer dünnen Schicht aufgebracht werden, um die Elektroden zu bilden. Darüber hinaus können die Elektroden aus der Kombination von Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet werden.

[0044] Die Dimensionen der Merkmale der Elektrode **350** liegen in dem Bereich von 5 µm bis 3 mm, wobei 10 µm bis 250 µm ein bevorzugter Bereich ist. In ähnlicher Weise kann der Abstand zwischen den Elektroden **350** von 5 µm bis 3 mm betragen, wobei ein bevorzugter Bereich 10 µm bis 250 µm ist. Eine kleinere Beabstandung der Merkmale ist bevorzugt, weil die elektrischen Schaltkreise, die durch in solcher Weise beabstandeten Merkmale gebildet werden, weniger empfindlich gegenüber thermischen Änderungen und Verdampfungsänderungen an dem in den Assays verwendeten Puffer sind. Elektrodengeometrien, die die Erzeugung eines Bereichs gleichförmigen elektrischen Feldes über die Detektionsfläche an dem Boden der Mikroplatte ermöglichen, sind bevorzugt. In einer Ausführungsform ist

die Elektroden geometrie eine ineinandergreifende Fingerstruktur mit Finger- und Zwischenraumbreiten, die in ihrer Dimension vergleichbar sind. Andere Geometrien umfassen einfache Ausgestaltungen mit zwei gegenüberliegenden Elektroden in der Form von Linien oder Kreisen, wie es in **Fig.** 4 gezeigt ist.

[0045] Um Verbindungen zwischen den Elektroden im Inneren der Vertiefungen und einem Impedanzmesssystem vorzusehen, mit dem die Platte in Verbindung arbeitet, sind die Vorrichtungen mit einer Anordnung elektrisch leitfähiger elektrischer Kontaktfelder (oder elektrischer Kontaktfelder (contact pads)), die an der unteren Oberfläche der unteren Platte angeordnet sind, und einer Anordnung elektrisch leitfähiger Durchkontaktierungen bzw. Verbindungsbahnen versehen, die diese Kontaktfelder mit den Elektroden an der oberen Oberfläche der unteren Platte verbinden. Wie in Fig. 5 gezeigt ist (einer erweiterten Ansicht eines seitlichen Vertiefungsquerschnitts), wird ein elektrischer Kontakt mit dem Impedanzmesssystem über elektrische Kontaktstifte **565** hergestellt, die die Vorrichtung kontaktieren, wenn die Vorrichtung in einem zugehörigen Impedanzmesssystem angeordnet ist. Elektrische Kontaktfelder (contact pads) **525**, die an der unteren Oberfläche der unteren Platte **560** angeordnete sind, sind runde oder ovale Ziele leitfähigen Materials, wie etwa gesputterter Gold- oder Silberfarbe. Die Größe der Felder ist derart, dass Toleranzen in den Orten der Stifte **565** und in der Anordnung der Platte in das System stets einen Kontakt gewährleisten. Die Felder können auf der unteren Platte **560** unter Verwendung derselben Prozessschritte strukturiert werden, die verwendet werden, um die Elektroden **550** auf der oberen Oberfläche der unteren Platte **560** zu strukturieren, d.h. Sputtern und Entfernen von Gold oder Siebdrucken leitfähiger Farbe, wie etwa Silberfarbe.

[0046] Um einen elektrischen Kontakt zwischen dem elektrischen Kontaktfeld **525** und den Elektroden **550** herzustellen, die sich an gegenüberliegenden Oberflächen der unteren Platte **560** befinden, werden elektrisch leitfähige Durchkontaktierungen **545** in der unteren Platte **560** hergestellt. Die Durchkontaktierungen **545** werden erzeugt, indem zunächst eine Anordnung von Bohrungen in die untere Platte **560** gebohrt wird. Das Bohren kann durch herkömmliche maschinelle Bearbeitung, durch Laserbearbeitung oder durch Ultraschallbohren durchgeführt werden kann. Laser- und Ultraschallbohren können verwendet werden, um eine untere Platte zu bohren, die aus einem zerbrechlichen Material, wie etwa Glas, hergestellt ist. Für untere Platten **560**, die aus dünnen Kunststofffolien hergestellt sind, ist Laserbohren ein schneller und bequemer Weg zum Bohren von Bohrungen, deren Durchmesser in der Größenordnung von 150 µm liegt. Nach der Herstellung der Bohrungen können die Bohrungen in leitfähige Durchkontaktierungen **545** ausgebildet werden, indem sie mit einem leitfähigen Material beschichtet oder gefüllt werden, das die Elektroden **550** und die elektrischen Kontaktfelder **525** an den gegenüberliegenden Oberflächen der unteren Platte **560** kontaktiert. Darüber hinaus können die elektrisch leitfähigen elektrischen Kontaktfelder und die leitfähigen Durchkontaktierungen aus einer Kombination von Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet werden.

[0047] In einer Ausführungsform, in der gesputtertes Gold verwendet wird, um sowohl die Elektroden **550** als auch die Felder **525** zu erzeugen, werden die Bohrungen vor dem Sputterprozess gebohrt. Auf diese Weise kann gesputtertes Gold auch die inneren Oberflächen der gebohrten Bohrungen beschichten, was die leitfähige Durchkontaktierung bildet. In einer anderen Ausführungsform, in der die Elektroden **550** und die Felder **325** unter Verwendung leitfähiger Farbe siebgedruckt werden, können die zuvor gebohrten Bohrungen während des Druckens dieser anderen Merkmale mit der Farbe beschichtet werden.

[0048] In der alternativen Ausführungsform, die in Fig. 6 dargestellt ist, werden die Elektroden **650** aus gesputterten 50 nm Gold hergestellt, und die Felder **625** werden mit leitfähiger Silberfarbe gedruckt. Der oberen Oberfläche der unteren Platte **660** wird ein weiteres elektrisches Feld **625** hinzugefügt, um zu gewährleisten, dass eine elektrische Kontinuität zwischen der Durchkontaktierung **645** und der Elektrode **650** hergestellt wird. In dieser Ausführungsform wird ein oberes elektrisch leitfähiges Farbfeld **625** auf die obere Oberfläche der unteren Platte **660** siebgedruckt, das sowohl die gebohrte Bohrung als auch die Elektrode **650** schneidet. Während dieses Druckschrittes wird leitfähige Farbe auch in die Verbindungsbohrung **645** gefüllt. Auf diese Weise stellt Farbe, die gedruckt wird, um das elektrische Kontaktfeld **625** zu bilden, das auf die untere Oberfläche der unteren Platte **660** gedruckt wird, einen Kontakt mit der Farbe her, die gedruckt wird, um das obere elektrische Feld **625** zu bilden.

[0049] In einer weiteren Ausführungsform wird eine elektrische Verbindung unmittelbar zwischen den Messsystemstiften **765** und der unteren Oberfläche der Elektroden **750** hergestellt, wie es in Fig. 7 dargestellt ist. Gebohrte Bohrungen **755** in der unteren Platte **760** erlauben einen Zugang zu den Elektroden **750** durch die Messsystemstifte **765**. In diesem Fall muss das Elektrodenmaterial robust genug sein, um über das obere Ende der Öffnung der Bohrung **755** zu verlaufen und während der verschiedenen Stufen der Vorrichtungsherstellung intakt zu bleiben. Die Bohrungen **755** müssen klein genug dimensioniert sein, um es dem Elektrodenmaterial zu ermöglichen, das obere Ende der Bohrung **755** robust abzudecken. Umgekehrt müssen die Bohrungen **755** groß genug dimensioniert sein, um eine Ausrichtung und einen Kontakt mit der gesamten Anordnung von

Messsystemstiften **765** zu ermöglichen, die den Toleranzen in dem Plattenort in dem Instrument und den Orten der Stifte **765** in den Instrument Rechnung tragen. Für Elektroden, die aus 10 µm leitfähigen Metalls hergestellt sind, werden Bohrungsdurchmesser von 0,010 Inch bis 0,080 Inch vorgeschlagen. Andere, dickere oder robustere Elektrodenmaterialien ermöglichen gegebenenfalls die Abdeckung größerer Bohrungen. Umgekehrt würden dünnere oder weniger robuste Materialien nur verwendet werden, um kleinere Bohrungen abzudecken.

[0050] Das Herstellen eines Kontaktes mit der unteren Oberfläche der Mikroplatte anstatt des Verbindens durch das obere Ende der Vertiefungen oder entlang des Randes der Mikroplatte bietet spezielle Vorteile. Diese Konfiguration ermöglicht, dass der Bereich um die Oberseite der Platte für einen Zugang zur Injektion bzw. Einbringung chemischer Verbindungen in die Vertiefungen frei ist, während Messungen gemacht werden. Die Injektion bzw. das Einbringen kann unter Verwendung eines großen Pipettierkopfes mit einer Anordnung von 96 oder mehr Pipettierspitzen durchgeführt werden. Darüber hinaus erlaubt der große Oberflächenbereich, der unter der Vorrichtung verfügbar ist, dass eine viel größere Anzahl elektrischer Verbindungen hergestellt wird. Dies ist aus zwei Gründen wichtig. Erstens ermöglicht es die Verbindung zunehmender Anzahlen von Elektroden, die in Mikroplatten höherer Dichte mit 384, 864, 1536 oder mehr Vertiefungen aufgenommen würden. Zweitens ermöglicht die Verbindung jeder einzelnen Elektrode mit einem Berührungsfeld in dieser Weise eine homogene Plattenarchitektur, bei der jede Vertiefung mit jeder anderen Vertiefung in der Platte elektrisch identisch ist. Diese Architektur ermöglicht die simultane Messung einer beliebigen Anzahl von Vertiefungen gleichzeitig, die nur durch die Komplexität der Impedanzmesselektronik begrenzt ist. Andere Vorrichtungen, die im Stand der Technik beschrieben sind, um die Anzahl von elektrischen Kontakten zu verringern, sehen einen gemeinsamen elektrischen Kontakt mit mehreren Elektroden vor. Zum Beispiel kann ein elektrischer Bus mit allen Vertiefungen in jeder Reihe der Vorrichtung verbunden sein. Bei dieser Strategie gibt es jedoch zwei Nachteile. Erstens kann nur eine Vertiefung pro Reihe ohne eine potentielle Kopplung oder potentielle Interferenzen zwischen Vertiefungen auf einmal gemessen werden. Zweitens würde ein Problem mit einem elektrischen Kontakt zu einer Reihe die gesamte Reihe deaktivieren.

[0051] Die untere Kontaktanordnung gewährleistet auch, dass sich sogar für eine Vorrichtung mit einer großen Anzahl von Verbindungen Bahnen in der Mikrotiterplatte niemals kreuzen müssen. Somit kann eine einzelne leitfähige Schicht auf der Bodenplatte hergestellt werden, was sie einfach und kostengünstig in der Herstellung hält. Mit dieser Strategie werden komplexe und teure elektrische Mehrschicht-Vorrichtungen nur in dem Impedanzmessinstrument selbst benötigt.

[0052] Isolierende Schichten über den Elektroden können vorgesehen werden, um die freiliegende Elektrodengeometrie weiter zu definieren, um den elektrischen Beitrag bestimmter Bereiche der Elektroden zu beseitigen und um die elektrische Verbindung mit einem zugehörigen Impedanzmesssystem zu vereinfachen. In einem Beispiel kann es wünschenswert sein, die Messung ausschließlich in der Mitte der Mikrotiterplattenvertiefungen zu konzentrieren, um die Menge leitfähigen Materials zu verringern, die benötigt wird, um den Assay durchzuführen, und um die Gesamtherstellungskosten zu verringern. Zum Beispiel ist die Verwendung von Gold in der Vertiefungsmitte bevorzugt, aber die Kosten von Gold verbieten seine Verwendung als das gesamte leitfähige Element. Auch wenn die Verwendung kostengünstigerer leitfähiger Materialien, wie etwa Silber, wünschenswert sein kann, kann die Toxizität von Silber seine Verwendung in dem Vertiefungszentrumsbereich verbieten. Um die Konzentration der Messung auf die Vertiefungsmitte zu vereinfachen, kann eine dielektrische Farbe gedruckt werden, um die Elektrodenbereiche außerhalb der Vertiefungsmitten zu maskieren. In einem solchen Beispiel können die Elektroden aus zwei leitfähigen Materialien hergestellt werden, wobei das erste Material den Teil der Elektrode bildet, der in der Mitte der Vertiefung liegt und der in Kontakt mit dem Assayinhalt sein wird, während ein zweites Material einen Teil der elektrischen Bahn zwischen dem ersten Material und der leitfähigen Durchkontaktierung bildet.

[0053] Als eine Alternative dazu, dass die Vorrichtung aus einer oberen Platte und einer unteren Platte hergestellt wird, kann die Vorrichtung in einem Stück hergestellt werden. Eine Mikrotiterplatte kann unmittelbar auf einen leitfähigen Leitungsrahmen spritzgegossen werden, der in der Spritzgießmaschine angeordnet ist. Das Ergebnis von dem Spritzgießprozess ist eine Anordnung von Impedanzmesselektroden, die dichtend durch den eingespritzten Kunststoff eingekapselt sind, wobei freiliegende obere Oberflächen der Elektroden an dem unteren Ende bzw. Boden der gebildeten Vertiefungen angeordnet sind und die unteren Oberflächen der Elektroden an den Stellen elektrischen Kontaktes an der Unterseite der Mikrotiterplatte frei liegen. Teile des Leitungsrahmens, die die Anordnung von Elektroden während des Herstellungsprozesses miteinander verbinden, aber von einem elektrischen Standpunkt unnötig sind, können in einem Nachbearbeitungsschritt weggebrochen werden.

[0054] Wie in Fig. 8 gezeigt ist, erstreckt sich das elektrische Feld **825**, das von den Elektroden **830** erzeugt wird, von der Elektrodenoberfläche **835** an dem unteren Ende bzw. dem Boden der Vertiefung **880** bis

zu einer Tiefe, die ungefähr gleich dem Zwischenraum zwischen den Elektroden **830** ist. Zellen **845**, die an dem unteren Ende bzw. Boden der Vertiefung **880** und an den Elektroden **830** wachsen, spüren dieses elektrische Feld **825**. Eine Messung des Gesamtstroms in der Schaltung, der aus intrazellulären (Itc) und extrazellulären (Iec) Strömen besteht, ermöglicht die Berechnung der Zellschichtimpedanz durch das Impedanzmesssystem. Darüber hinaus können nicht-adhärente Zellen, die auf den Boden der Vertiefungen sedimentiert sind und sich in dem elektrischen Feld befinden, unter Verwendung dieser Technologie zusätzlich geprüft werden.

[0055] Für die Impedanzmessung, die mit Wechselspannung durchgeführt wird, misst ein Detektor den Strom, der sich aus der angelegten Wechselspannung ergibt. Sowohl die Größe des resultierenden Stromes als auch die Phase (in Bezug auf die angelegte Spannung) sind Teil der Impedanz, die eine komplexe Zahl ist, die aus einer realen und einer imaginären Komponente gebildet wird. Das zugehörige Messsystem kann beide Komponenten oder eine von beiden messen. Typischerweise wird ein Signal von 100 mV (rms) angelegt, und es werden Ströme in der Größenordnung von 0,1 bis 1 mA (rms) gemessen. Das System (Mikrotiterplatte und zugehöriges Impedanzmesssystem) sollte ausgestaltet sein, um mit Spannungen zu arbeiten, die bis zu 300 bis 400 mV betragen. Die untere Grenze der angelegten Spannung wird im Wesentlichen durch das Ausmaß an Rauschen bestimmt, das toleriert werden kann. Es ist wahrscheinlicher, dass Spannungen typisch sind, die so niedrig wie 10 bis 20 mV sind.

[0056] Wenn eine Identifizierung einer bestimmte Mikrotiterassayplatte in einem Assaysystem erforderlich ist, werden typischerweise Strichcodeetiketten auf die Oberseite oder die Ränder der Mikroplatte aufgebracht. In der gegenwärtigen Vorrichtung war es erwünscht, in die Herstellung der Mikroplatte selbst ein Merkmal aufzunehmen, das eine Identifizierung der Plattenart für das Assaysystem erlauben würde. Dies würde die Notwendigkeit eines separaten Strichcodeetiketts und eines separaten Strichcodelesers im Inneren des Instruments beseitigen. In einer Ausführungsform kann die Plattenidentifizierung durch eine Anzahl von Mechanismen erreicht werden. Optisch lesbare Merkmale, die in die Plattenunterseite bzw. den Plattenboden zu derselben Zeit wie die elektrischen Kontaktfelder eingearbeitet werden, könnten mit einem stationären reflektiven optischen Sensor gelesen werden, wenn sich die Platte in das Assaysysteminstrument bewegt. Elektrisch lesbare Merkmale, die in die Plattenunterseite bzw. den Plattenboden zu derselben Zeit wie die elektrischen Kontaktfelder eingearbeitet werden, könnten unter Verwendung derselben elektrischen Kontaktstifte und der Elektronik des Impedanzmesssystems gelesen werden. Mechanische Merkmale an der oberen Platte, wie etwa Bohrungen, Vertiefungen oder Stufen, könnten unter Verwendung optischer oder mechanischer Schalter gelesen werden. RFID-Etiketten könnten in die Plattenunterseite oder -oberseite aufgenommen werden, wobei die RFID-Etiketten durch eine in der Nähe befindliche Einheit im Inneren des zugehörigen Impedanzmesssystems lesbar sein würden. Eine weitere Option zur Ermöglichung einer Platten-ID, die es ermöglicht, dass eine größere Menge an Information gespeichert und gelesen wird, ist die Aufnahme eines Mikrochips, wie etwa eines PROMs (Programmable read-only memory chip) oder EEPROMs (electronically erase-able programmable read-only memory chip). Jeder Mechanismus könnte zusätzlich einen Fehler detektierenden Code enthalten, der Systemfehler detektieren würde, bevor die Platte gelesen wird.

[0057] Die Assayplatten mit mehreren Vertiefungen der vorliegenden Vorrichtung können mit adhärenten und nicht-adhärenten zellulären Spezies, molekularen Spezies, viralen Partikeln und Bakterien verwendet werden, und können einmal verwendet werden oder können mehrere Male verwendet werden. Die Assayplatten sind gut für Anwendungen geeignet, bei denen die Platten in Abhängigkeit von der biologischen Natur des Vertiefungsinhalts wegwerfbar sind.

ANWENDUNGEN

Das Impedanzmessinstrument

[0058] Die Vorrichtungen, die in den Beispielen unten beschrieben werden, koppeln auf drei Wegen mit einem individuellen Impedanzmesssystem. 1) Die elektrischen Kontaktfelder an der Unterseite der zusammengebauten Vorrichtung kontaktieren elektrische Kontaktstifte an dem Instrument. Eine elektrische Verbindung jeder Vertiefung führt zu einer Impedanzmesselektronik. 2) Die untere Oberfläche der Vorrichtung liegt an einer thermisch gesteuerten bzw. geregelten Oberfläche an, was es erlaubt, dass die Temperatur des Inhalts der Vertiefungen der Vorrichtung gesteuert bzw. geregelt wird. 3) Die Vertiefungen der oberen Platte sind mit einer automatischen Pipettiervorrichtung des Instruments ausgerichtet, was die Hinzufügung unterschiedlicher chemischer Verbindungen ermöglicht, die während der Impedanzmessungen zu jeder der Vertiefungen hinzugefügt werden sollen.

[0059] Impedanzmessungen bestehen aus einer Impedanzgröße und einer Impedanzphase. Diese beiden Größen können verwendet werden, um den reellen Teil der komplexen Impedanz zu berechnen. Das Vergleichen der Impedanzänderungen verschiedener Vertiefungen nach dem Hinzufügen der chemischen Verbindungen erlaubt die Bestimmung, ob und in welchem Ausmaß die chemischen Verbindungen die Zellen beeinflussen.

Beispiel 1.

[0060] Eine untere Platte wurde aus einem 1 mm dicken 122 mm × 79 mm Borofloat™-Glassubstrat hergestellt. Bohrungen in dem Glas (0,030 Inch) wurden unter Verwendung eines Ultraschallverfahrens gebohrt. 1,6 µm Gold wurden auf sowohl die obere als auch die untere Oberfläche des Glases gesputtert. Zur selben Zeit beschichtete gesputtertes Gold die Innenfläche der gebohrten Bohrungen, was eine elektrische Durchkontaktierung zwischen der oberen und der unteren Oberfläche des Glases bildete. Dann wurden photolithographische Belichtungs- und chemische Ätztechniken verwendet, um die Impedanzmesselektroden an der oberen Oberfläche der unteren Platte zu strukturieren und um die elektrischen Kontaktfelder an der unteren Oberfläche der unteren Platte zu bilden. Die Elektroden waren ein Paar ineinandergreifender Fingerkämme mit Fingergrößen von 30 µm in der Breite und 2,5 mm in der Länge. Zwischenräume zwischen den Fingern an gegenüberliegenden Kämmen waren 30 µm.

[0061] Die untere Platte wurde unter Verwendung von UV-härtbarem Epoxid mit einer maschinell bearbeiteten oberen Polystyrolplatte verbunden, die 96 Durchgangsbohrungen in einer 8 × 12-Anordnung enthielt. Die 96 Bohrungen, jede sechs mm im Durchmesser und 12 mm tief, waren über den Elektrodenmerkmalen an der verbundenen unteren Platte ausgerichtet, um 96 Vertiefungen zu bilden.

[0062] In jede Vertiefung der Vorrichtung mit 96 Vertiefungen wurden 40 000 CHO-Zellen, die mit dem ml-muscarinischen Rezeptor transfiziert waren, zusammen mit 150 µl Wachstumsmedium pipettiert. Die Vorrichtung wurde bei 37°C und einer Umgebung von 5 % CO_2 für 18 Stunden in einem Inkubator angeordnet, um es den Zellen zu ermöglichen, sich auf dem Boden der Vertiefungen abzusetzen und sich über der Oberfläche des Vertiefungsbodens und der Elektrode zu befestigen und zu wachsen. Vor dem Durchführen des Zellantwortexperiments wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch 136 mM Hanks-Hepes-Puffer mit 0,1 % BSA ersetzt. Sechs Antagonistentitrationen mit abnehmender Konzentration von links nach rechts wurden von Reihe A bis Reihe F (einschließlich) hinzugefügt, und sie konnten für 15 Minuten inkubieren. Zu den Reihen G und H wurde die negative Kontrolle (passender Puffer) hinzugefügt. Die Vorrichtung wurde in dem Impedanzmesssystem angeordnet und konnte bei 28°C mit dem System in thermisches Gleichgewicht gelangen. Nach der Inkubation von 15 Minuten wurde den Reihen A bis G eine einfache Konzentration von Antagonist (Carbachol) hinzugefügt, während der Reihe H eine negative Kontrolle (passender Puffer) hinzugefügt wurde. Impedanzen jeder Vorrichtung wurden für 5 Minuten vor und 10 Minuten nach der Antagonistenhinzufügung in 20-Sekunden-Intervallen gemessen.

[0063] In Fig. 9 sind die Impedanzmessungen der 96 Vertiefungen als eine Funktion der Zeit gezeigt. Es ist zu sehen, wie eine verringerte Antagonistenkonzentration größere Zellimpedanzänderungen ergibt. In Fig. 10 wurden Antworten als eine Funktion der Antagonistenkonzentration graphisch aufgetragen, um den IC_{50}-Wert jedes Antagonisten zu bestimmen, der die relativen Stärken der verschiedenen Antagonisten zeigt.

Beispiel 2.

[0064] Eine untere Platte wurde aus einem 1 mm dicken 122 mm × 79 mm Polystyrolfoliensubstrat hergestellt. Es wurden Bohrungen in das Polystyrol (0,030 Inch) gebohrt. 0,5 µm Gold wurde durch einen dünne Metallmaske oder Schablone auf die obere Oberfläche des Polystyrols gesputtert, um das Elektrodenmuster zu erzeugen. Die Elektroden waren ein Paar ineinandergreifender Fingerkämme mit Fingergrößen von 200 µm in der Breite und 1,5 mm in der Länge. Zwischenräume zwischen den Fingern an gegenüberliegenden Kämmen waren 200 mm. Zu derselben Zeit, zu der die Elektroden erzeugt wurden, beschichtete gesputtertes Gold die Innenfläche der gebohrten Bohrungen. Anschließend wurde durch eine dünne Metallmaske oder Schablone 0,5 µm Gold auf die untere Oberfläche des Polystyrols gesputtert, um das elektrische Kontaktfeldmuster zu erzeugen. Zu derselben Zeit beschichtete gesputtertes Gold wieder die Innenfläche der gebohrten Bohrungen, was eine elektrische Durchkontaktierung zwischen der oberen und der unteren Oberfläche des Polystyrols bildete. Nach der Herstellung der Goldmerkmale auf dem Polystyrol wurde die untere Platte plasmageätzt, um die Anhaftung von Zellen an der Oberfläche zu erhöhen.

[0065] Die untere Platte wurde unter Verwendung UV-härtbaren Epoxids mit einer maschinell bearbeiteten oberen Polystyrolplatte verbunden, die 96 Durchgangsbohrungen in einer 8 × 12 Anordnung enthielt. Die 96 Bohrungen, jede 6 mm im Durchmesser und 12 mm tief, waren über den Elektrodenmerkmalen an der verbundenen unteren Platte ausgerichtet, um 96 Vertiefungen zu bilden.

[0066] 50 000 HeLa-Zellen pro Vertiefung wurden in die Vertiefungen der Vorrichtung in 150 µl MEM-Wachstumsmedium pipettiert. Die Zellen in der Vorrichtung wurden über Nacht in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden vorsichtig dreimal mit 136 mM Hanks-Hepes-Puffer gewaschen. Der abschließende Fluidaustausch führte 135 µl 136 mM Hanks-Hepes-Puffer mit 0,1 % BSA zu. Die Vorrichtung wurde in das Impedanzmessinstrument eingebracht, wo sie auf 28°C erwärmt wurde.

30 Minuten nach dem Austausch von Medium gegen Puffer wurden Impedanzmessungen begonnen. Nach 5 Minuten der Impedanzmessung vor Hinzufügung von Wirkstoff wurde zu den Zellen in der Vorrichtung eine Gruppe chemischer Verbindungen hinzugefügt. Die Quelle der Gruppe war eine Platte mit 96 Vertiefungen, die 92 verschiedene chemische Verbindungen enthielt. Die verbleibenden 4 Vertiefungen enthielten nur Puffer.

[0067] In Fig. 11 sind die Impedanzmessungen der 96 Vertiefungen gezeigt. Es ist leicht zu sehen, dass die Antworten der Zellen auf die verschiedenen chemischen Verbindungen sowohl durch die Größe der Impedanzänderungen als auch die Kinetik und Richtung der Impedanzantworten charakterisiert werden können.

[0068] In den Fig. 12a–Fig. 12c wird die Größe der Antworten von jeder der Verbindungen in einem Histogrammformat verglichen.

Beispiel 3.

[0069] Untere Platten wurden aus einem 0,005 Inch dicken Polyesterlagensubstrat hergestellt. Bohrungen in dem Polystyrol (0,15 mm) wurden in einem Muster lasergebohrt, um zu den elektrischen Durchkontaktierungen zu passen, die in einem späteren Schritt in der unteren Platte erzeugt werden sollten. Leitfähige Silberfarbe wurde in einem Siebdruckprozess verwendet, um die elektrischen Kontaktfelder an der unteren Oberfläche des unteren Plattenmaterials zu erzeugen und um in die gebohrten Durchkontaktierungsbohrungen gefüllt zu werden. Anschließend wurde ein zweiter Druckdurchgang mit Silberfarbe verwendet, um Merkmale auf die obere Oberfläche der unteren Platte zu drucken, die von den gebohrten Durchkontaktierungen in Richtung auf eine Stelle in der Nähe dessen führen, wo die Mitte der Mikroplattenvertiefungen erzeugt werden, wenn die untere Platte und die obere Platte verbunden werden. Anschließend wurden Finger aus Goldfarbe gedruckt, was ein ineinandergreifendes Fingermuster zwischen den zwei Silberleitungen erzeugte. Jeder Goldfinger überlappte an einem Ende mit einer der Silberleitungen. In dem letzten Druckschritt wurde eine dielektrische Farbe gedruckt, die die gesamte Oberfläche der oberen Oberfläche der unteren Platte mit Ausnahme eines Rechtecks abdeckte, das Längen der Goldfinger freiliegend beließ. Durch Abdecken der Spitzen der Goldfinger mit isolierendem Dielektrikum wurde die Gesamtlänge der freiliegenden Goldfinger durch die Dimension des dielektrischen Fensters und der Fingerbreiten bestimmt. Das bedruckte untere Plattenmaterial wurde für 4 Minuten in einer Sauerstoffatmosphäre plasmageätzt, um die Zelladhäsion zu erhöhen. Im Anschluss an das Ätzen wurden einzelne untere Platten aus der Folie geschnitten.

[0070] Jede untere Platte wurde unter Verwendung von 0,002 Inch Klebeübertragungsband (adhesive transfer tage) mit einer oberen spritzgegossenen Polystyrolplatte verbunden, die 96 Durchgangsbohrungen in einer 8 × 12-Anordnung enthielt. Die 96 Bohrungen, jede 6,55 mm im Durchmesser, wurden über den Elektrodenmerkmalen an der verbundenen unteren Platte ausgerichtet, um 96 Vertiefungen zu bilden.

[0071] In jede Vertiefung der Vorrichtung mit 96 Vertiefungen wurden 50 000 HeLa-Zellen pipettiert, die zusammen mit 150 µl Wachstumsmedium hinzugefügt wurden. Die Vorrichtung wurde bei 37°C und einer Umgebung von 5 % CO_2 für 18 Stunden in einem Inkubator angeordnet, um es zu ermöglichen, dass die Zellen sich auf dem Boden der Vertiefungen absetzen und über der Oberfläche des Vertiefungsbodens und der Elektrode anhaften und wachsen. Vor der Durchführung des Zellantwortexperiments wurde das Wachstumsmedium entfernt und wurde durch 136 mM Ranks-Hepes-Puffer mit 0,1 % BSA ersetzt. Die Vorrichtung wurde in dem Impedanzmesssystem angeordnet und konnte bei 28°C mit dem System ins thermische Gleichgewicht gelangen. Eine Gruppe von 14 Liganden mit jeweils 6 Replikaten wurde zu sieben Reihen (B bis H) der Vorrichtung mit 2 Liganden pro Reihe hinzugefügt. Der Reihe A wurde die negative Kontrolle (Puffer) hinzugefügt. Impedanzen jeder Vorrichtung wurden in 20-Sekunden-Intervallen für 5 Minuten vor und 10 Minuten nach der Ligandenhinzufügung gemessen. In Fig. 13 sind die Impedanzänderungen mit der Zeit für jede Vertiefung aufgetragen. Ähnliche Antwortkinetiken und -charakteristiken können zusammen gruppiert werden (z.B. D01–D06, D06–12 und E01–06 erscheinen ähnlich), was anzeigt, dass zelluläre Antworten auf diese Liganden in Zusammenhang stehen. Zwei elektrisch offene Vertiefungen lieferten keine sinnvollen Daten, wie es durch das Impedanzmesssystem angegeben ist (Vertiefungen D01 und A07).

ZUSAMMENFASSUNG

[0072] Während das Obige eine vollständige Beschreibung möglicher Ausführungsformen der Vorrichtung ist, können verschiedene Alternativen, Modifikationen und Äquivalente verwendet werden. Zum Beispiel wird ein Fachmann erkennen, dass die Impedanzmesselektrodengeometrie nicht auf eine Ausgestaltung ineinandergreifender Finger beschränkt ist. Andere Leitergeometrien können alternativ verwendet werden. Ferner sind alle Publikationen und Patentdokumente, die in dieser Anmeldung zitiert werden, in ihrer Gesamtheit für alle Zwecke in demselben Ausmaß durch Bezugnahme aufgenommen, als wenn jede einzelne Publikation und jedes einzelne Patentdokument so individuell angegeben wäre. Die obige Beschreibung sollte nur als beispielhafte Ausführungsformen der Vorrichtung betrachtet wer-

den, deren Grenzen geeignet durch den Inhalt und die Grenzen der folgenden Ansprüche definiert sind.

Patentansprüche

1. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen mit:
A. einer Vielzahl von Kammern zum Aufnehmen separater Proben in einer ebenen Anordnungskonfiguration, wobei die Kammern eine Bodenfläche haben und die Kammern aus einer oberen Platte, die eine Vielzahl von Durchgangsbohrungen enthält, und einer unteren Platte ausgebildet sind,
wobei die untere Platte eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche hat,
wobei die obere Platte eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche hat,
wobei die obere Oberfläche der unteren Platte dichtend an der unteren Oberfläche der oberen Platte befestigt ist.
B. Einer Vielzahl funktional äquivalenter Impedanzmesselektroden, die flach auf der Bodenfläche von jeder der Vielzahl von Kammern und auf der oberen Oberfläche der unteren Platte liegen, wobei die Elektroden den Proben ausgesetzt sind, wobei jede der Elektroden von jeder der anderen Elektroden in der Vorrichtung elektrisch isoliert ist, wobei die Elektroden eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche haben.
C. Einer Verbindungseinrichtung zum Herstellen eines elektrischen Kontaktes mit jeder der Elektroden von der unteren Oberfläche der unteren Platte.

2. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Proben flüssig sind.

3. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Proben fest sind.

4. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Proben biologische Verbindungen sind.

5. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Proben molekular sind.

6. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Durchgangsbohrungen zylindrisch sind.

7. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Durchgangsbohrungen quadratisch sind.

8. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Durchgangsbohrungen konisch sind.

9. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die obere und die untere Platte aus Kunststoffen, Elastomeren, Keramiken, Verbundstoffen, Glas, Kohlenstoffmaterialien oder einer Kombination von irgendwelchen dieser Materialien ausgebildet sind.

10. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 9, bei der der Kunststoff Polystyrol, Polycarbonat, Polyamid, Polyamid, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Cycloolefinpolymer oder Polyester sein kann.

11. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 9, bei der der Kunststoff ein spritzgießbarer Kunststoff ist.

12. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die untere Platte transparent ist.

13. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die ebene Anordnung aus 24 Vertiefungen besteht.

14. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die ebene Anordnung aus 96 Vertiefungen besteht.

15. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die ebene Anordnung aus 384 Vertiefungen besteht.

16. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die ebene Anordnung aus 864 Vertiefungen besteht.

17. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die ebene Anordnung aus 1536 Vertiefungen besteht.

18. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Vielzahl funktional äquivalenter Impedanzmesselektroden aus zwei identischen Elektroden besteht.

19. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 1, bei denen die Elektroden aus leitfähigem Material ausgebildet sind, das auf die Oberfläche der unteren Platte mittels Galvanisieren, Sputtern, Verdampfen, Siebdrucken oder Tampondrucken aufgebracht ist.

20. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 1, bei denen das leitfähige Material Gold, Silber, Indiumzinnoxid, Kupfer oder Kohlenstofffasern, Kupfer ist.

21. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 1, bei denen die Elektroden aus einer einzigen Schicht eines leitfähigen Materials ausgebildet

sind.

22. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 1, bei denen die Elektroden aus mehreren Schichten leitfähiger Materialien ausgebildet sind.

23. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der der Prozess des dichtenden Befestigens der oberen Platte an der unteren Platte mit einer Klebeschicht, thermischer Verbindung oder Ultraschallverbindung erreicht wird.

24. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Verbindungseinrichtung zum Herstellen eines elektrischen Kontaktes mit jeder der Elektroden von der unteren Oberfläche der unteren Platte elektrische Kontaktfelder, die an der unteren Oberfläche der unteren Platte ausgebildet sind, und elektrisch leitfähige Durchkontaktierungen aufweist, die die Kontaktfelder mit den Elektroden an der oberen Oberfläche der unteren Platte verbinden.

25. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 24, bei denen die Felder aus leitfähigem Material ausgebildet sind, das auf die untere Oberfläche der unteren Platte mittels Galvanisieren, Sputtern, Verdampfen, Siebdrucken oder Tampondrucken aufgebracht ist.

26. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 25, bei denen das leitfähige Material Gold, Silber, Indiumzinnoxid, Kupfer oder Kohlenstofffasern ist.

27. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 24, bei denen die Kontaktfelder aus leitfähigen Teilchen ausgebildet sind, die als leitfähige Farbe aufgebracht werden.

28. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 27, bei denen die leitfähigen Teilchen aus Gold, Silber, Platin oder Kohlenstoff hergestellt sind.

29. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Impedanzmesselektroden aus leitfähigen Teilchen ausgebildet sind, die als eine leitfähige Farbe aufgebracht sind.

30. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 29, wobei die leitfähigen Teilchen aus Gold, Silber, Platin oder Kohlenstoff hergestellt sind.

31. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, bei der die Elektroden aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

32. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 24, bei der die leitfähigen Durchkontaktierungen aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

33. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 24, bei der die elektrischen Kontaktfelder aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

34. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 1, die zusätzlich ein Mittel zur instrumentenlesbaren Plattenidentifizierung aufweist.

35. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 34, bei der das Mittel zur instrumentenlesbaren Plattenidentifikation optisch lesbare Merkmale, elektrisch lesbare Merkmale, mechanische Merkmale, RFID-Etiketten oder einen Speicherchip aufweist.

36. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen mit:
A. einer Vielzahl von Kammern zur Aufnahme separater Proben in einer ebenen Anordnungskonfiguration, wobei die Kammern eine Bodenfläche haben und die Kammern aus einer Platte ausgebildet sind, die eine Vielzahl von Bohrungen enthält, die sich teilweise durch die Platte erstrecken.
B. Einer Vielzahl funktional äquivalenter Impendanzmesselektroden, die flach auf der Bodenfläche von jeder der Vielzahl von Kammern liegen, wobei die Elektroden den Proben ausgesetzt sind, wobei jede der Elektroden von jeder der anderen Elektroden in der Vorrichtung elektrisch isoliert ist, wobei die Elektroden eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche haben, wobei die Platte um die Elektroden ausgebildet ist.
C. Eine Verbindungseinrichtung zum Herstellen eines elektrischen Kontaktes mit den Elektroden von der unteren Oberfläche der Platte.

37. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Proben flüssig sind.

38. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Proben fest sind.

39. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Proben biologische Verbindungen sind.

40. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Proben molekular sind.

41. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Bohrungen zylindrisch sind.

42. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Ver-

tiefungen nach Anspruch 36, bei der die Bohrungen quadratisch sind.

43. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Bohrungen konisch sind.

44. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Platte aus Kunststoffen, Elastomeren, Keramiken, Verbundstoffen, Glas, Kohlenstoffmaterialien oder einer Kombination von irgendwelchen dieser Materialien hergestellt ist.

45. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 44, bei der der Kunststoff Polystyrol, Polycarbonat, Polyamid, Polyamid, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Cycloolefinpolymer oder Polyester sein kann.

46. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 44, bei der der Kunststoff ein spritzgießbarer Kunststoff ist.

47. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Platte transparent ist.

48. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die ebene Anordnung aus 24 Vertiefungen besteht.

49. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die ebene Anordnung aus 96 Vertiefungen besteht.

50. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die ebene Anordnung aus 384 Vertiefungen besteht.

51. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die ebene Anordnung aus 864 Vertiefungen besteht.

52. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die ebene Anordnung aus 1536 Vertiefungen besteht.

53. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Vielzahl funktional äquivalenter Impedanzmesselektroden aus zwei identischen Elektroden besteht.

54. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 36, bei denen die Elektroden durch die Abscheidung eines leitfähigen Materials auf einen Rahmen mittels Sputtern, Verdampfen, Siebdrucken oder Tampondrucken ausgebildet sind.

55. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 54, bei denen die Platte auf den Rahmen gegossen ist.

56. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 36, bei denen das leitfähige Material Gold, Silber, Indiumzinnoxid oder Kohlenstofffasern enthält.

57. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 36, bei denen die Elektroden aus einer einzigen Schicht eines leitfähigen Materials ausgebildet sind.

58. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 36, bei denen die Elektroden aus mehreren Schichten eines leitfähigen Materials ausgebildet sind.

59. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Verbindungseinrichtung zur Herstellung eines elektrischen Kontaktes mit jeder der Elektroden von der unteren Oberfläche der Platte elektrische Kontaktfelder, die an der unteren Oberfläche der Platte angeordnet sind, und elektrisch leitfähige Durchkontaktierungen aufweist, die die Kontaktfelder mit den Elektroden an der oberen Oberfläche der Platte verbinden.

60. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 59, bei denen die Felder aus leitfähigem Material ausgebildet sind, das mittels Galvanisieren, Sputtern, Verdampfen, Siebdrucken oder Tampondrucken auf die untere Oberfläche der unteren Platte aufgebracht ist.

61. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 60, bei denen das leitfähige Material Gold, Silber, Indiumzinnoxid, Kupfer oder Kohlenstofffasern ist.

62. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 59, bei denen die Kontaktfelder aus leitfähigen Teilchen ausgebildet sind, die als leitfähige Farbe aufgebracht werden.

63. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 62, bei denen die leitfähigen Teilchen aus Gold, Silber, Platin oder Kohlenstoff hergestellt sind.

64. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Elektroden aus leitfähigen Teilchen ausgebildet sind, die als eine leitfähige Farbe aufgebracht sind.

65. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 64, bei der die leitfähige Farbe aus Gold, Silber, Platin, Indiumzinnoxid, Polymeren oder Kohlenstoff hergestellt ist.

66. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, bei der die Elektroden aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

67. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 59, bei der die leitfähigen Durchkontaktierungen aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

68. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 59, bei der die elektrischen Kontaktfelder aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

69. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 36, die zusätzlich ein Mittel zur instrumentenlesbaren Plattenidentifizierung aufweist.

70. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 69, bei der das Mittel zur instrumentenlesbaren Plattenidentifikation optisch lesbare Merkmale, elektrisch lesbare Merkmale, mechanische Merkmale, RFID-Etiketten oder einen Speicherchip aufweist.

71. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen mit:
A. einer Vielzahl von Kammern zur Aufnahme separater Proben in einer ebenen Anordnungskonfiguration, wobei die Kammern eine Bodenfläche haben und die Kammern aus einer oberen Platte, die eine Vielzahl von Durchgangsbohrungen enthält, und einer unteren Platte ausgebildet sind,
wobei die untere Platte eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche hat,
wobei die obere Platte eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche hat,
wobei die obere Oberfläche der unteren Platte dichtend an der unteren Oberfläche der oberen Platte befestigt ist.
B. Einer Vielzahl funktional äquivalenter Impendanzmesselektroden, die flach auf dem Boden von jeder der Vielzahl von Kammern und auf der oberen Oberfläche der unteren Platte liegen, wobei die Elektroden den Proben ausgesetzt sind, wobei jede der Elektroden von jeder der anderen Elektroden in der Vorrichtung elektrisch isoliert ist, wobei die Elektroden eine obere Oberfläche und eine untere Oberfläche haben.
C. Einer Verbindungseinrichtung zum Herstellen eines elektrischen Kontaktes mit jeder der Elektroden von der unteren Oberfläche der unteren Platte.
D. Einem Mittel zur instrumentenlesbaren Plattenidentifizierung.

72. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Proben flüssig sind.

73. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Proben fest sind.

74. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Proben biologische Verbindungen sind.

75. Impedanzvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Proben molekular sind.

76. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Durchgangsbohrungen zylindrisch sind.

77. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Durchgangsbohrungen quadratisch sind.

78. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Durchgangsbohrungen konisch sind.

79. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die obere und die untere Platte aus Kunststoffen, Elastomeren, Keramiken, Verbundstoffen, Glas, Kohlenstoffmaterialien oder einer Kombination von irgendwelchen dieser Materialien ausgebildet sind.

80. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 79, bei der der Kunststoff Polystyrol, Polycarbonat, Polyamid, Polyamid, Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Cycloolefinpolymer oder Polyester sein kann.

81. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 79, bei der der Kunststoff ein spritzgießbarer Kunststoff ist.

82. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die untere Platte transparent ist.

83. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die ebene Anordnung aus 24 Vertiefungen besteht.

84. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die ebene Anordnung aus 96 Vertiefungen besteht.

85. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die ebene Anordnung aus 384 Vertiefungen besteht.

86. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die ebene Anordnung aus 864 Vertiefungen besteht.

87. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die ebene Anordnung aus 1536 Vertiefungen besteht.

88. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Ver-

tiefungen nach Anspruch 71, bei der die Vielzahl funktional äquivalenter Impedanzmesselektroden aus zwei identischen Elektroden besteht.

89. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 71, bei denen die Elektroden durch die Abscheidung eines leitfähigen Materials auf die Oberfläche der unteren Platte mittels Sputtern, Verdampfen, Siebdrucken oder Tampondrucken ausgebildet sind.

90. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 71, bei denen das leitfähige Material Gold, Silber, Indiumzinnoxid oder Kohlenstofffasern ist.

91. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 71, bei denen die Elektroden aus einer einzigen Schicht eines leitfähigen Materials ausgebildet sind.

92. Funktional äquivalente Elektroden nach Anspruch 71, bei denen die Elektroden aus mehreren Schichten eines leitfähigen Materials ausgebildet sind.

93. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der der Prozess des dichtenden Befestigens der oberen Platte an der unteren Platte mit einer Klebeschicht, thermischer Verbindung oder Ultraschallverbindung erreicht wird.

94. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Verbindungseinrichtung zum Herstellen eines elektrischen Kontaktes mit jeder der Elektroden von der unteren Oberfläche der unteren Platte elektrische Kontaktfelder, die an der unteren Oberfläche der unteren Platte angeordnet sind, und elektrisch leitfähige Durchkontaktierungen aufweist, die die Kontaktfelder mit den Elektroden an der oberen Oberfläche der unteren Platte verbinden.

95. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 94, bei denen die Felder aus leitfähigem Material ausgebildet sind, das auf die untere Oberfläche der unteren Platte mittels Galvanisieren, Sputtern, Verdampfen, Siebdrucken oder Tampondrucken aufgebracht ist.

96. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 95, bei denen das leitfähige Material Gold, Silber, Indiumzinnoxid, Kupfer oder Kohlenstofffasern ist.

97. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 94, bei denen die Kontaktfelder aus leitfähigen Teilchen ausgebildet sind, die als eine leitfähige Farbe aufgebracht werden.

98. Elektrische Kontaktfelder nach Anspruch 97, bei denen die leitfähigen Teilchen aus Gold, Silber, Platin oder Kohlenstoff hergestellt sind.

99. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Elektroden aus leitfähigen Teilchen ausgebildet sind, die als eine leitfähige Farbe aufgebracht sind.

100. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 99, bei der die leitfähige Farbe aus Gold, Silber, Platin, Indiumzinnoxid, Polymeren oder Kohlenstoff hergestellt ist.

101. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der die Elektroden aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

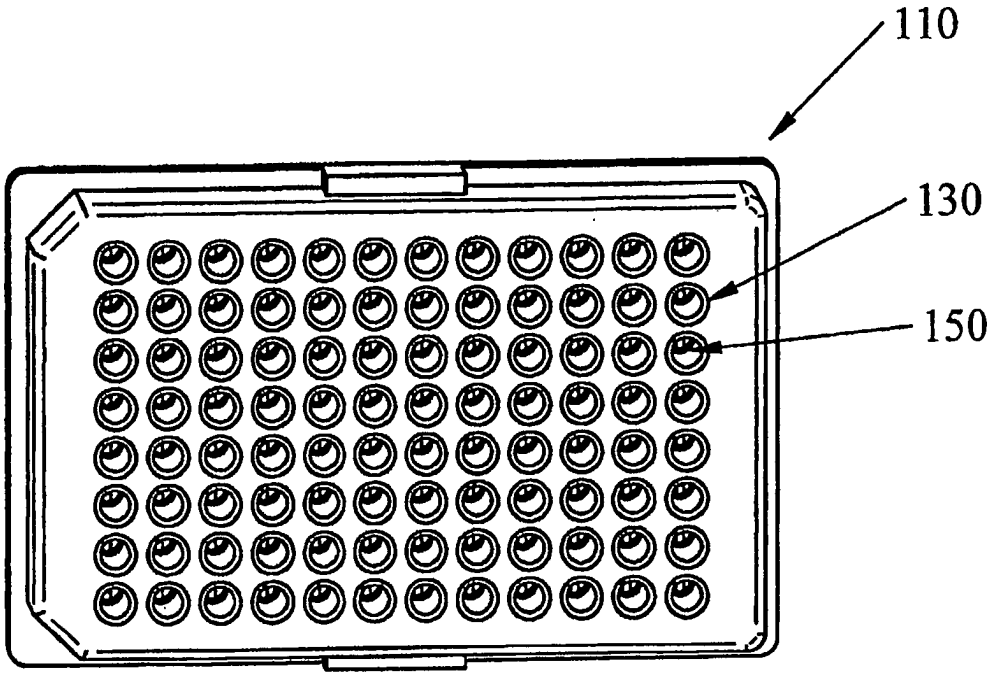
102. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 94, bei der die leitfähigen Durchkontaktierungen aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

103. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 94, bei der die elektrischen Kontaktfelder aus Metallschichten und leitfähiger Farbe ausgebildet sind.

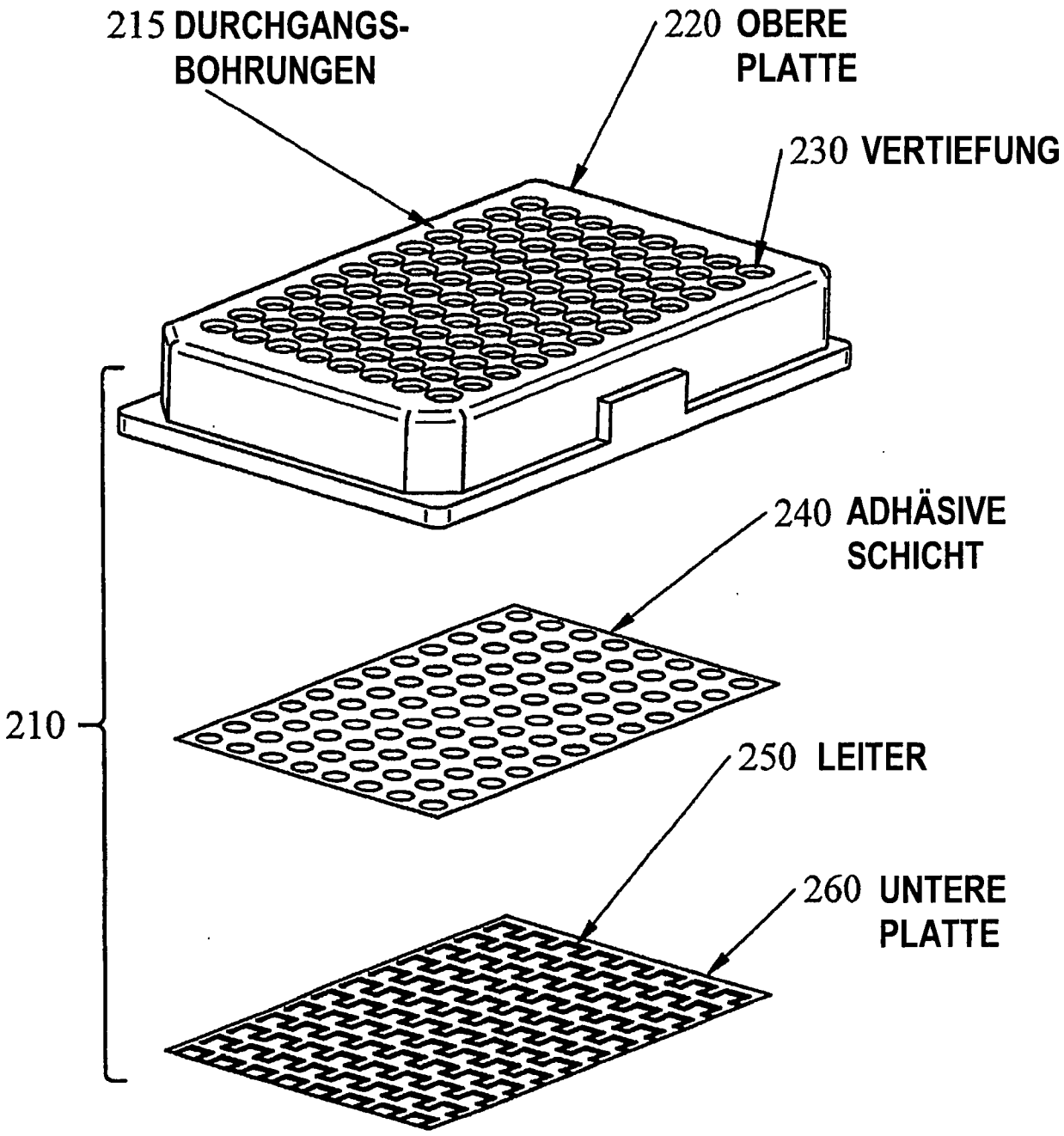
104. Impedanzmessvorrichtung mit mehreren Vertiefungen nach Anspruch 71, bei der das Mittel zur instrumentenlesbaren Plattenidentifikation optisch lesbare Merkmale, elektrisch lesbare Merkmale, mechanische Merkmale, RFID-Etiketten oder einen Speicherchip aufweist.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

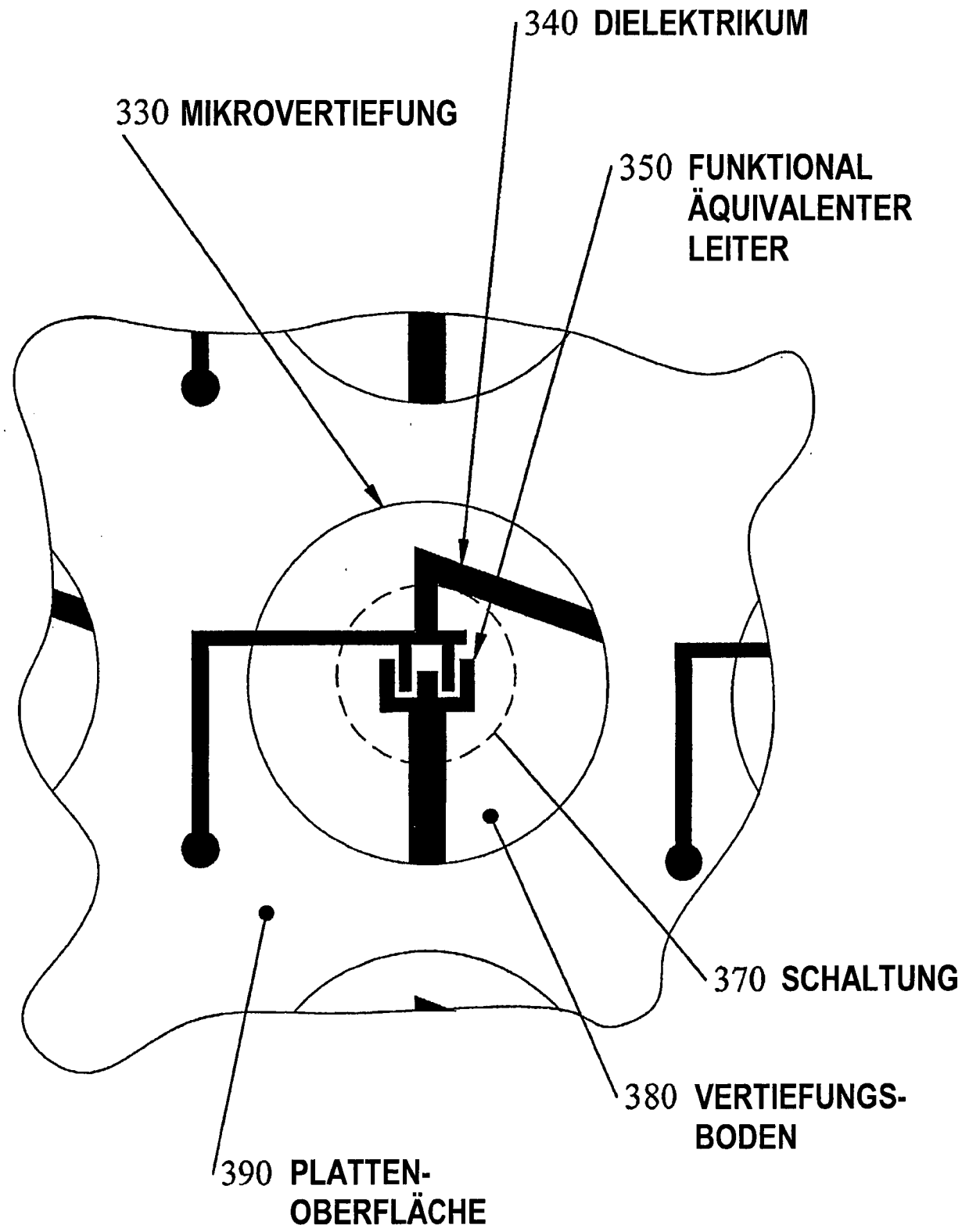
Anhängende Zeichnungen



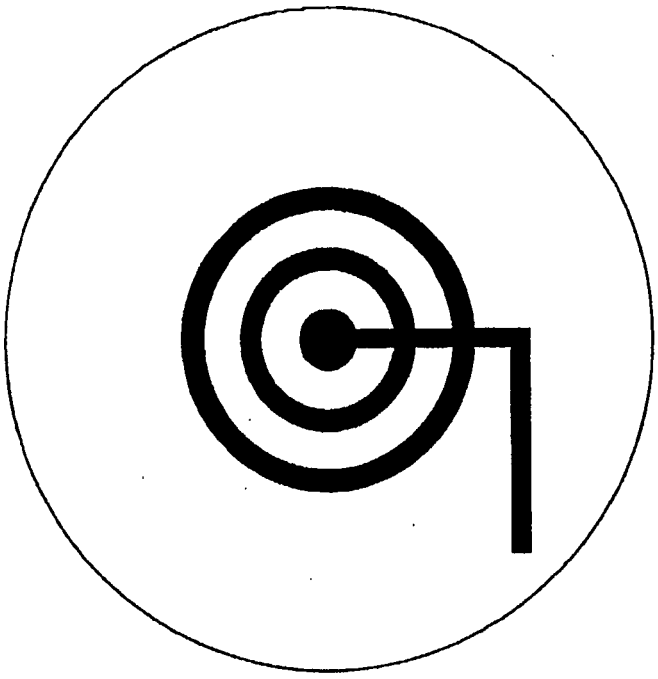
Figur 1


215 DURCHGANGS-
BOHRUNGEN
220 OBERE
PLATTE
230 VERTIEFUNG
240 ADHÄSIVE
SCHICHT
210
250 LEITER
260 UNTERE
PLATTE

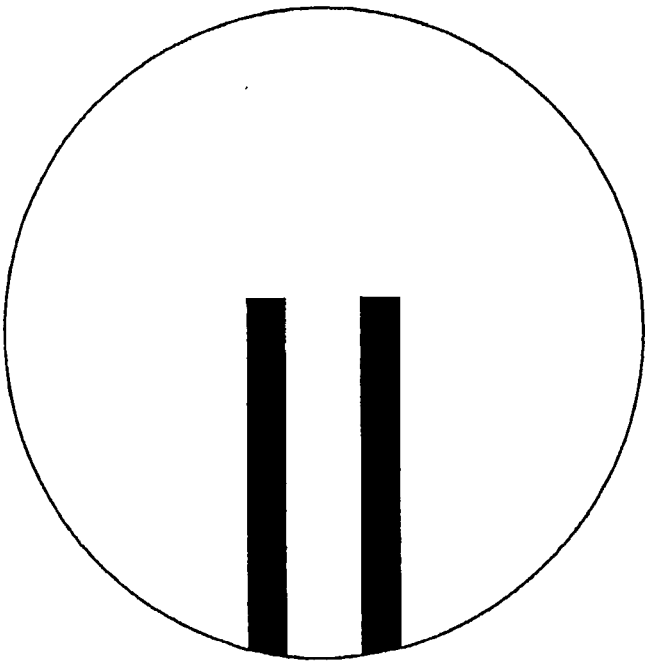
Figur 2


340 DIELEKTRIKUM
330 MIKROVERTIEFUNG
350 FUNKTIONAL ÄQUIVALENTER LEITER
370 SCHALTUNG
380 VERTIEFUNGS-BODEN
390 PLATTEN-OBERFLÄCHE

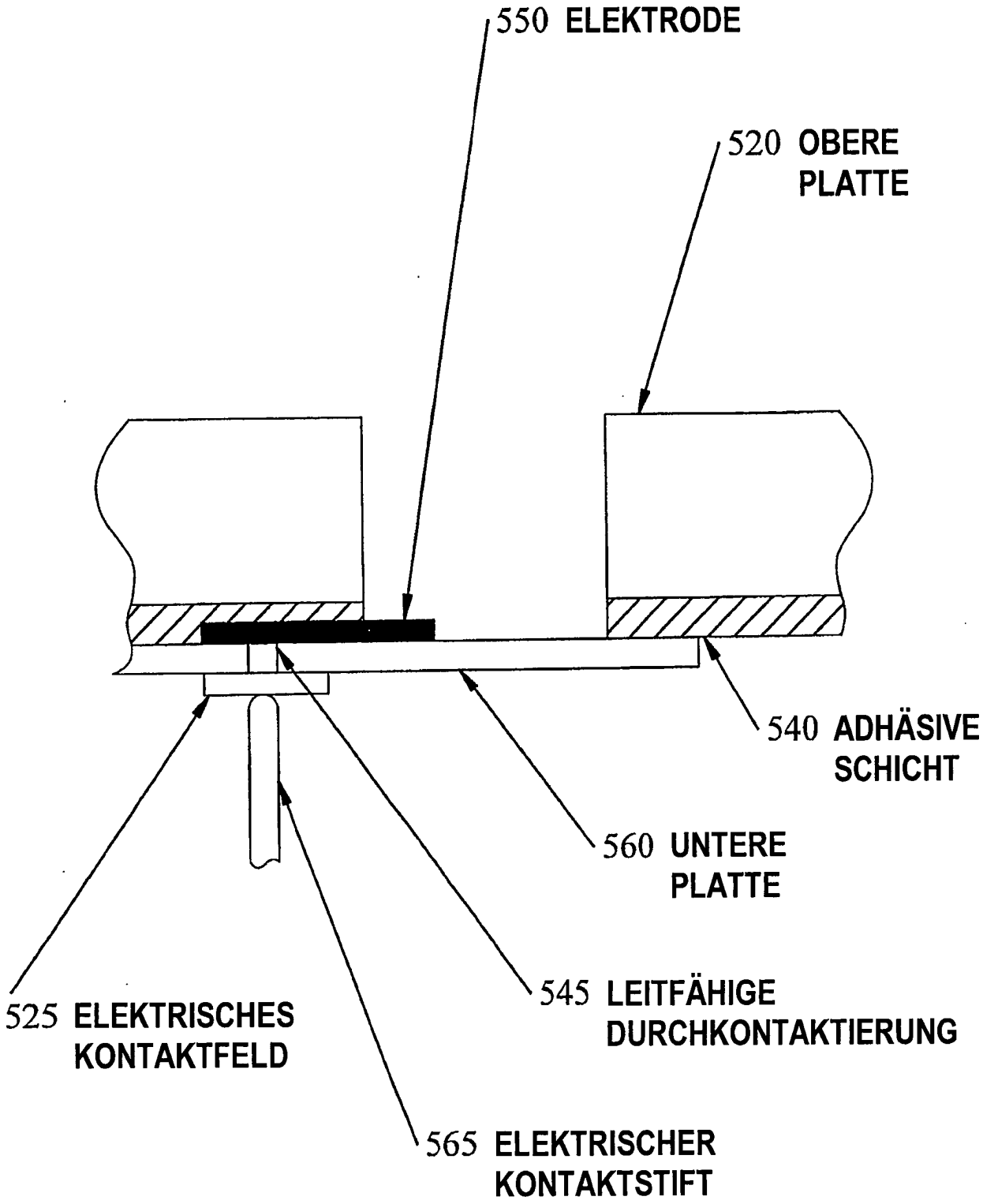
Figur 3



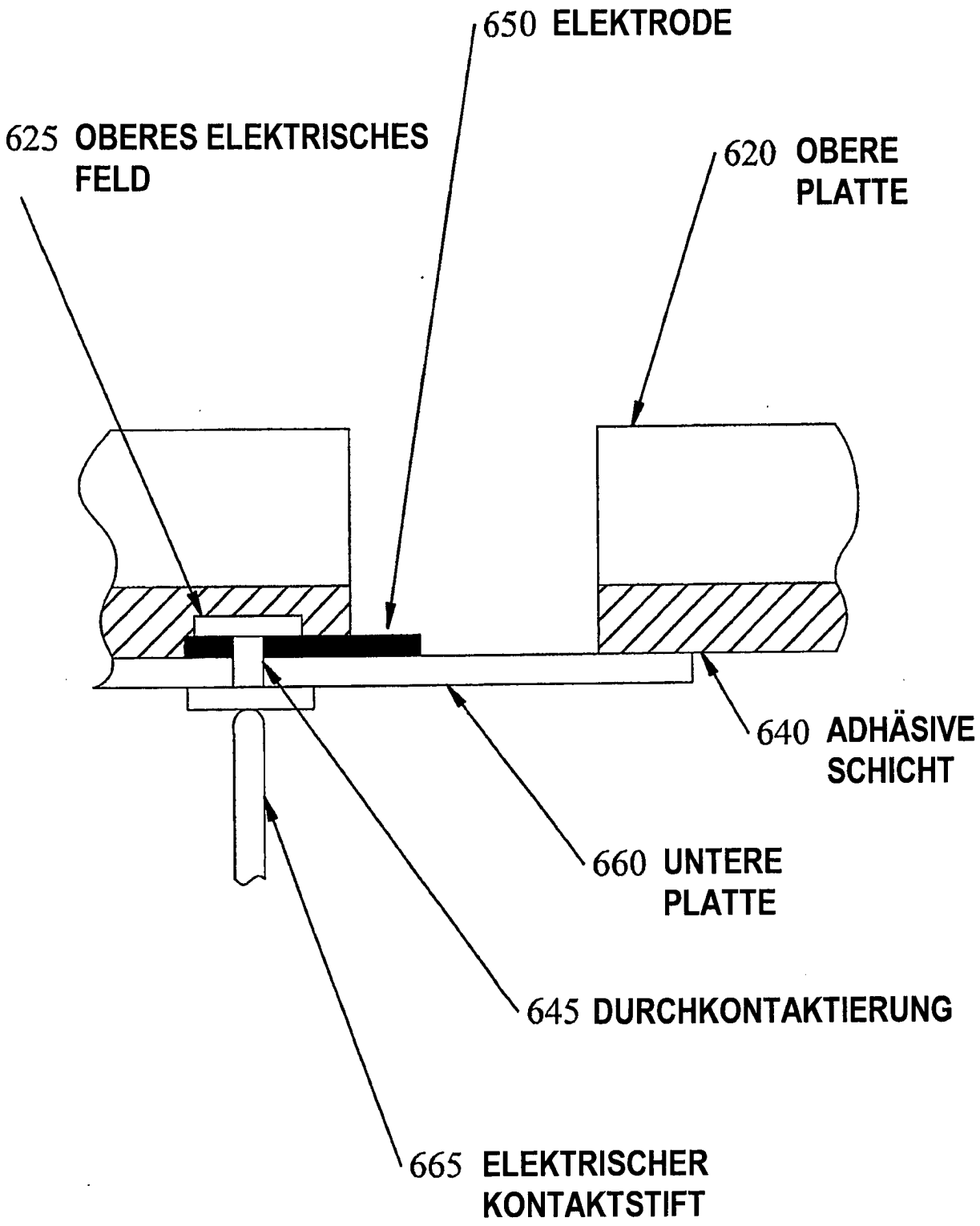
Figur 4A



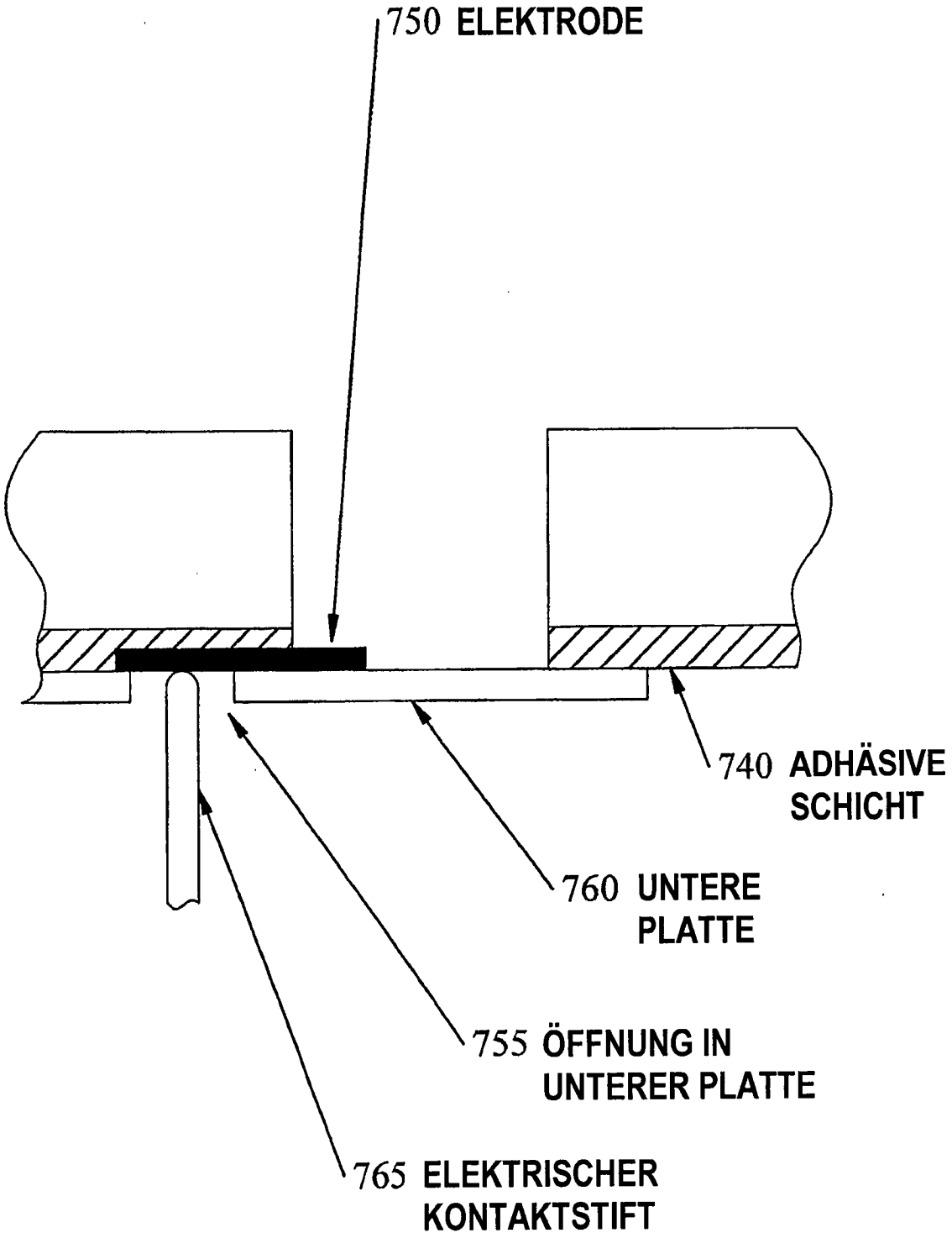
Figur 4B


550 ELEKTRODE
520 OBERE PLATTE
540 ADHÄSIVE SCHICHT
560 UNTERE PLATTE
525 ELEKTRISCHES KONTAKTFELD
545 LEITFÄHIGE DURCHKONTAKTIERUNG
565 ELEKTRISCHER KONTAKTSTIFT

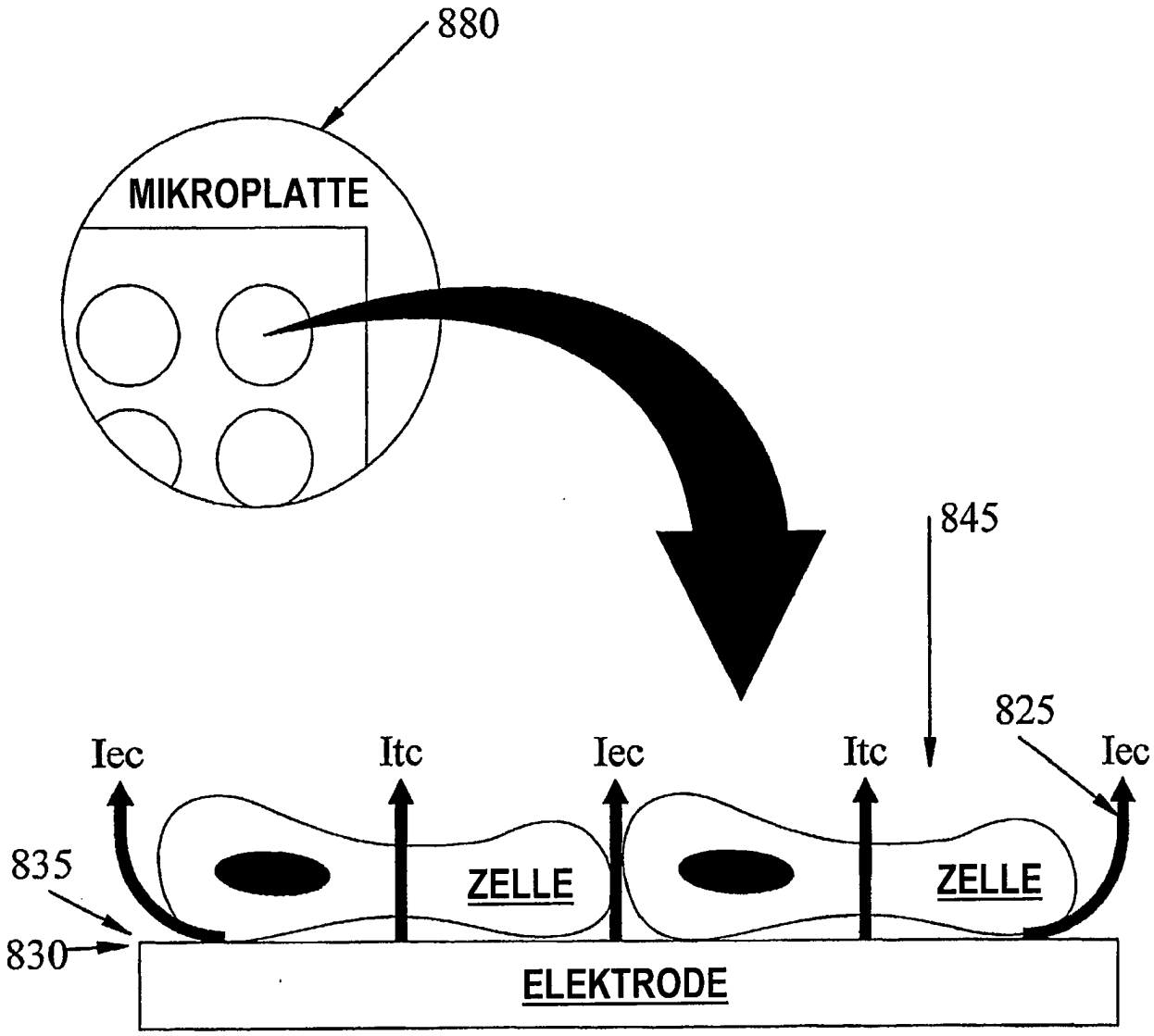
Figur 5


650 ELEKTRODE
625 OBERES ELEKTRISCHES FELD
620 OBERE PLATTE
640 ADHÄSIVE SCHICHT
660 UNTERE PLATTE
645 DURCHKONTAKTIERUNG
665 ELEKTRISCHER KONTAKTSTIFT

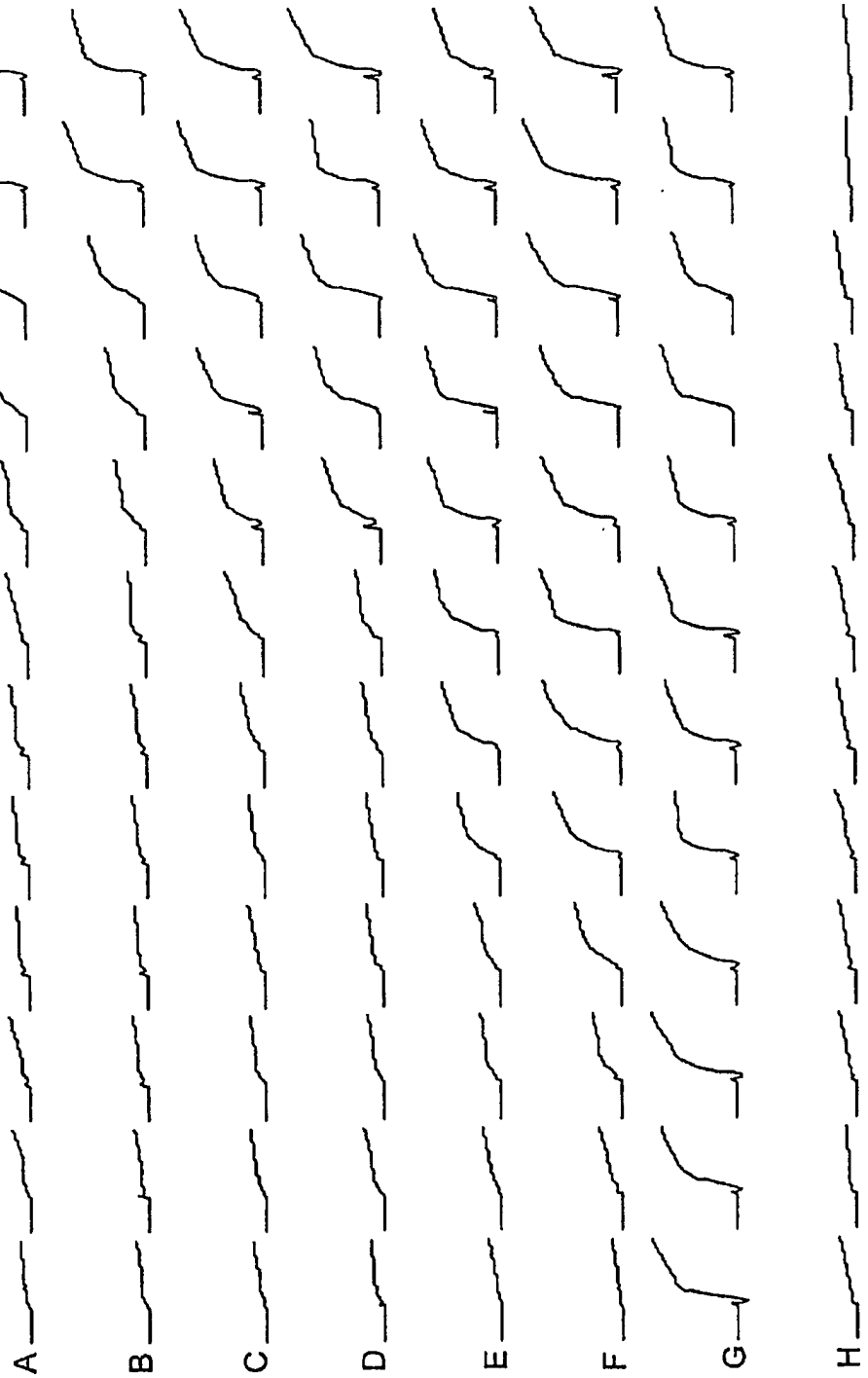
Figur 6


750 ELEKTRODE
740 ADHÄSIVE SCHICHT
760 UNTERE PLATTE
755 ÖFFNUNG IN UNTERER PLATTE
765 ELEKTRISCHER KONTAKTSTIFT

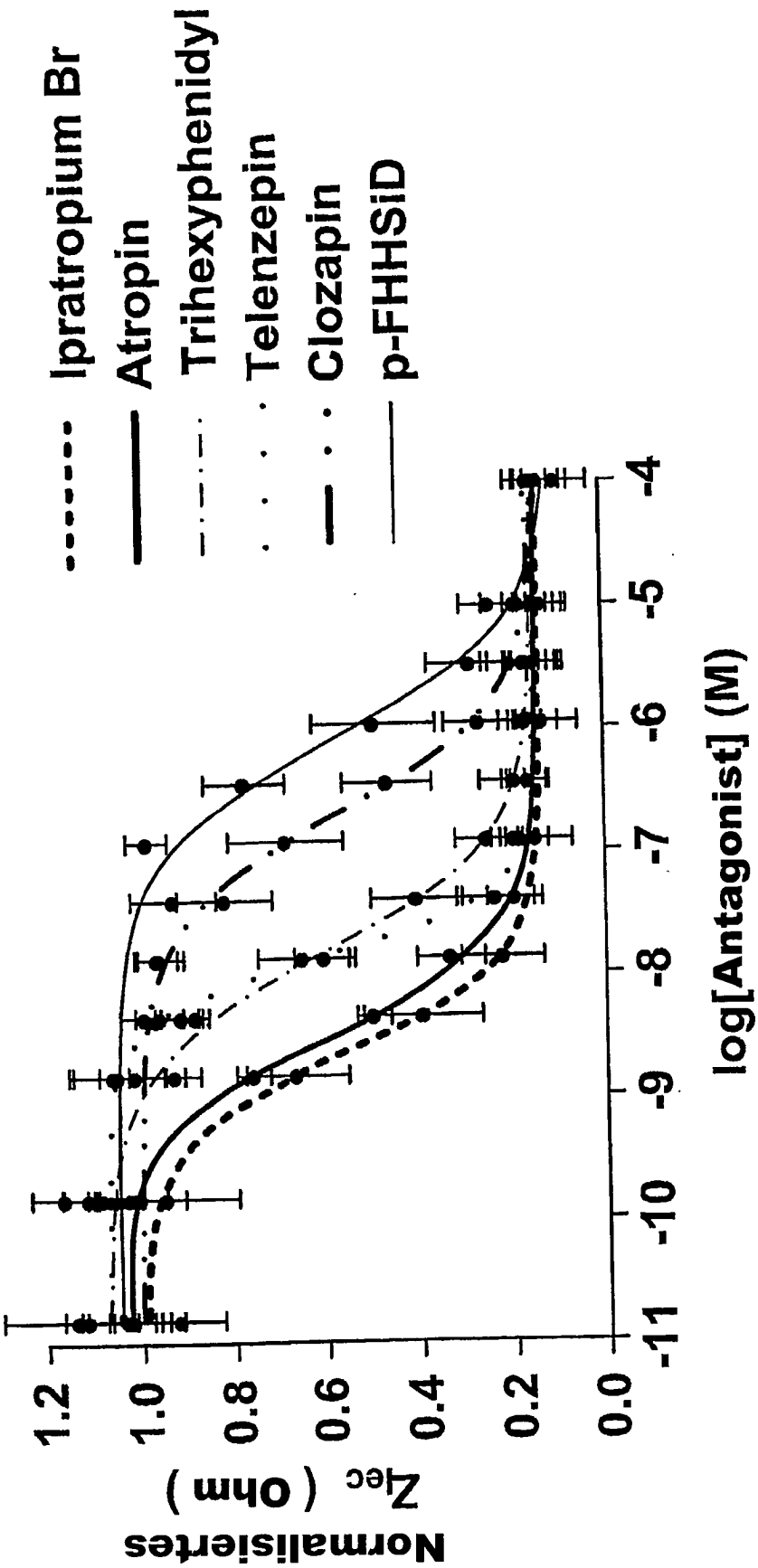
Figur 7


880
MIKROPLATTE
845
825
Iec
Itc
Iec
Itc
Iec
835
830
ZELLE
ZELLE
ELEKTRODE

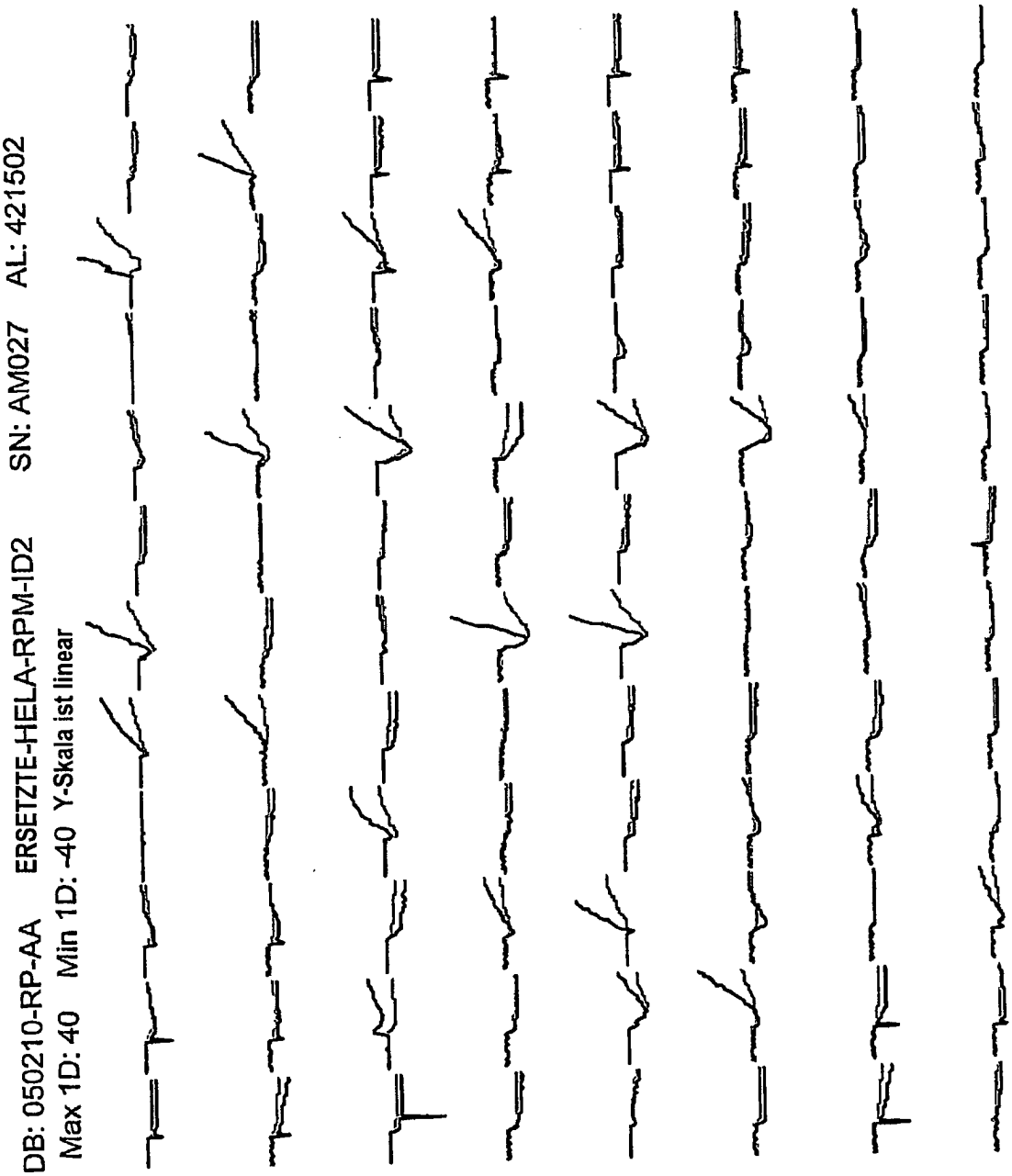
Figur 8



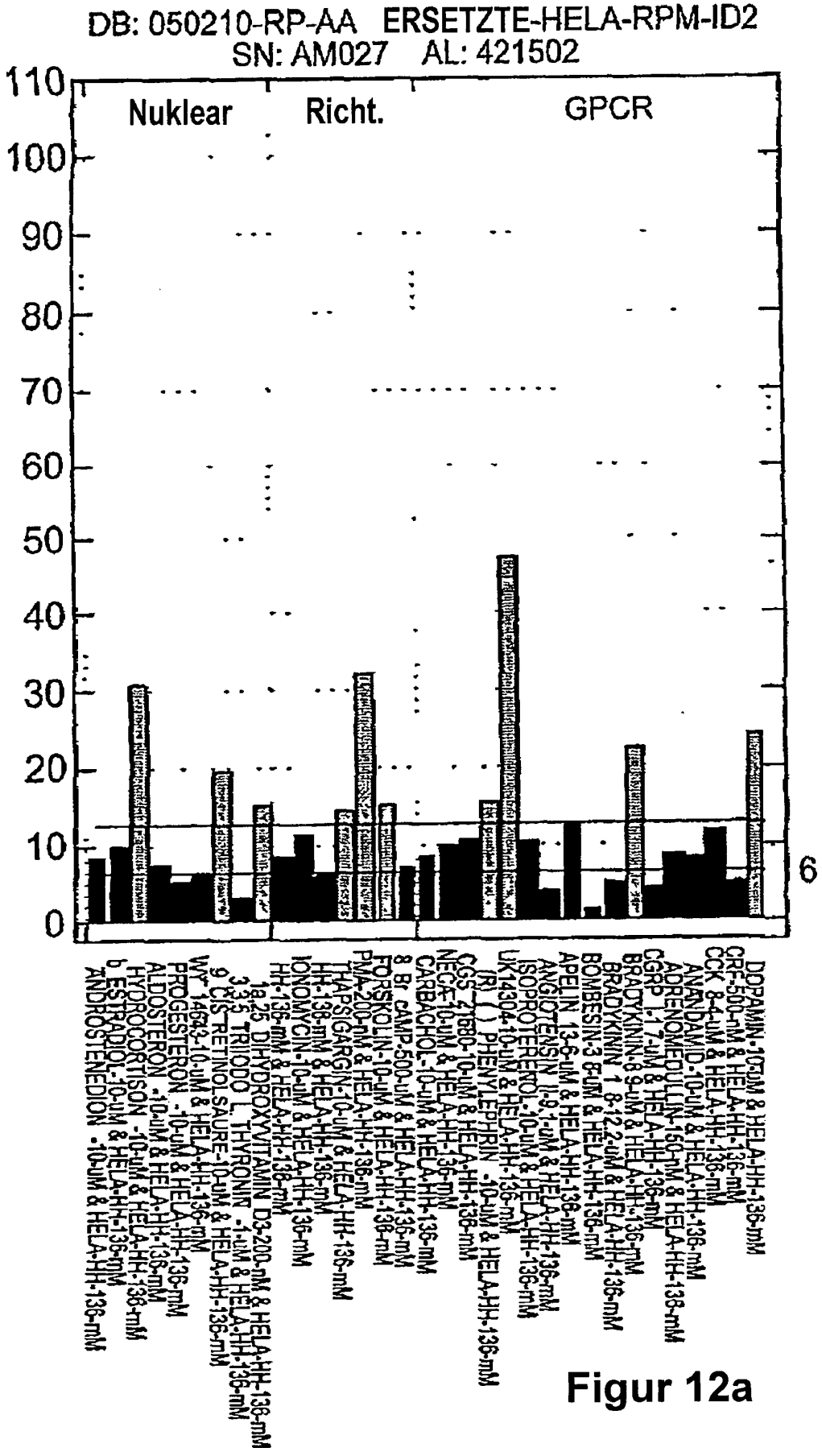
Figur 9


Ipratropium Br
Atropin
Trihexyphenidyl
Telenzepin
Clozapin
p-FHHSiD
Normalisiertes
Z_ec (Ohm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
log[Antagonist] (M)

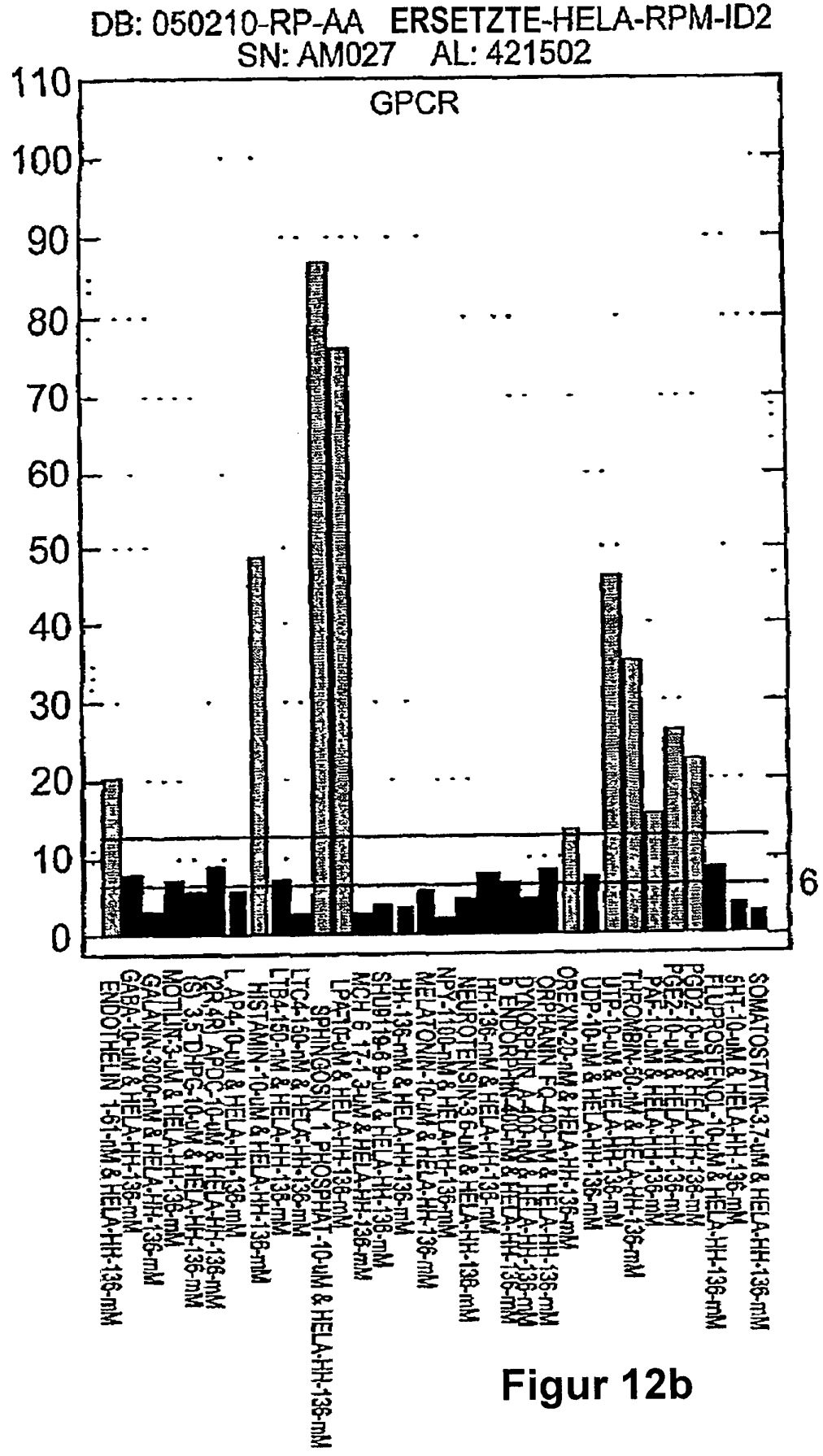
Figur 10


DB: 050210-RP-AA ERSETZTE-HELA-RPM-ID2 SN: AM027 AL: 421502
Max 1D: 40 Min 1D: -40 Y-Skala ist linear

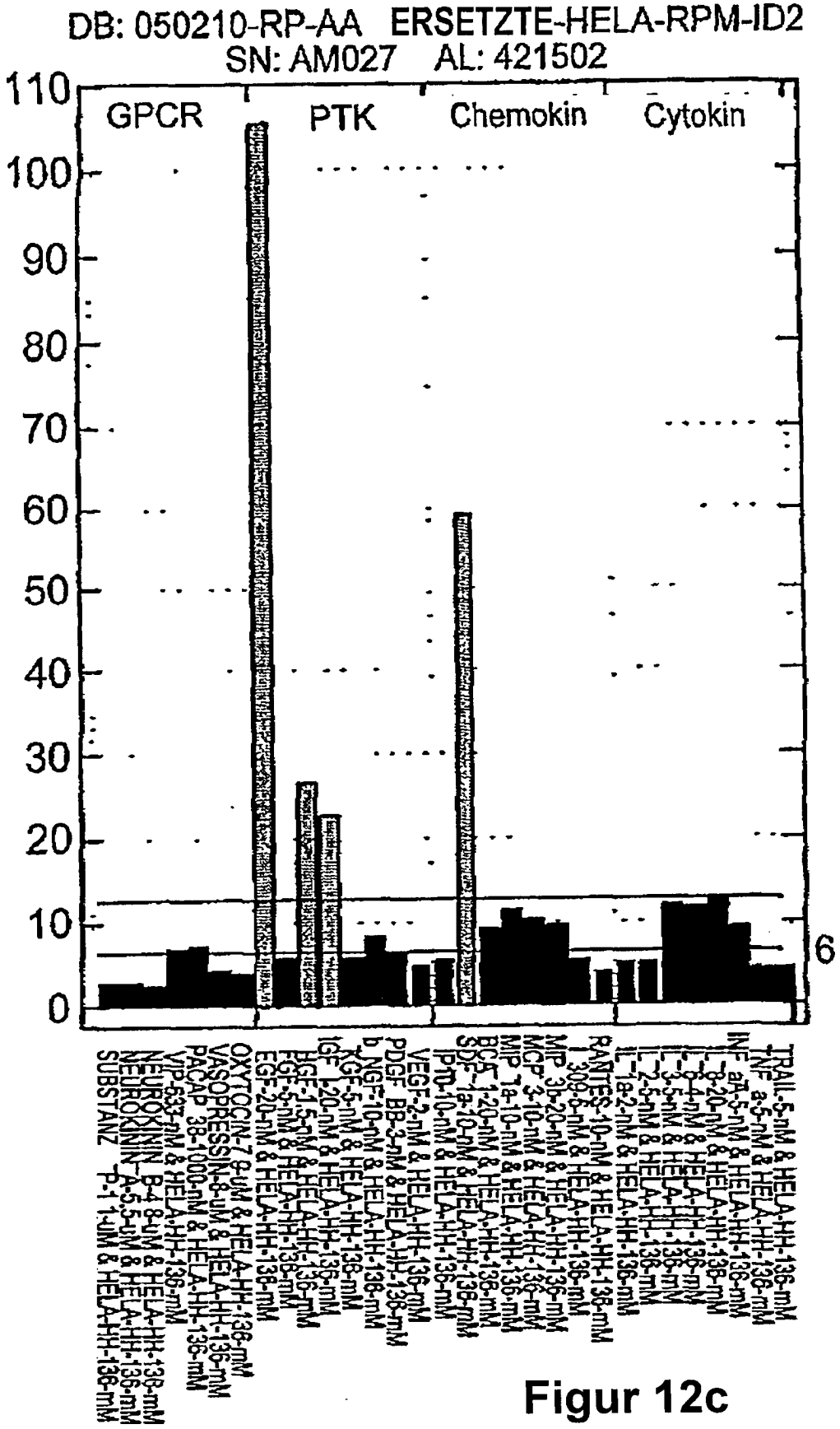
Figur 11


DB: 050210-RP-AA ERSETZTE-HELA-RPM-ID2
SN: AM027 AL: 421502
Nuklear
Richt.
GPCR
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
6
DOPAMIN -10uM & HELA-HH-136-mM
CRF-500-nM & HELA-HH-136-mM
CCK 8-4-uM & HELA-HH-136-mM
ANANDAMID-10-uM & HELA-HH-136-mM
ADRENOMEDULLIN-150nM & HELA-HH-136-mM
CGRP 1-7-uM & HELA-HH-136-mM
BRADYKININ-8,9-uM & HELA-HH-136-mM
BRADYKININ 1-8-12-uM & HELA-HH-136-mM
BOMBESIN-3 8-uM & HELA-HH-136-mM
APELIN 13-6-uM & HELA-HH-136-mM
ANGIOTENSIN II-9,1-uM & HELA-HH-136-mM
ISOPROTERENOL-10-uM & HELA-HH-136-mM
UK14304-10-uM & HELA-HH-136-mM
(R) ( ) PHENYLEPHRIN -10-uM & HELA-HH-136-mM
CGS-21680-10-uM & HELA-HH-136-mM
NECA-10-uM & HELA-HH-136-mM
CARBACHOL-10-uM & HELA-HH-136-mM
8 Br cAMP-500-uM & HELA-HH-136-mM
FORSKOLIN-10-uM & HELA-HH-136-mM
PMA-200-nM & HELA-HH-136-mM
THAPSIGARGIN-10-uM & HELA-HH-136-mM
IONOMYCIN-10-uM & HELA-HH-136-mM
HH-136-mM & HELA-HH-136-mM
1a,25 DIHYDROXYVITAMIN D3-200-nM & HELA-HH-136-mM
3,3,5 TRIIODO L THYRONIN -1-uM & HELA-HH-136-mM
9 CIS-RETINOLSAURE-10-uM & HELA-HH-136-mM
WY 14643-10-uM & HELA-HH-136-mM
PROGESTERON -10-uM & HELA-HH-136-mM
ALDOSTERON -10-uM & HELA-HH-136-mM
HYDROCORTISON -10-uM & HELA-HH-136-mM
b ESTRADIOL-10-uM & HELA-HH-136-mM
ANDROSTENEDION -10-uM & HELA-HH-136-mM

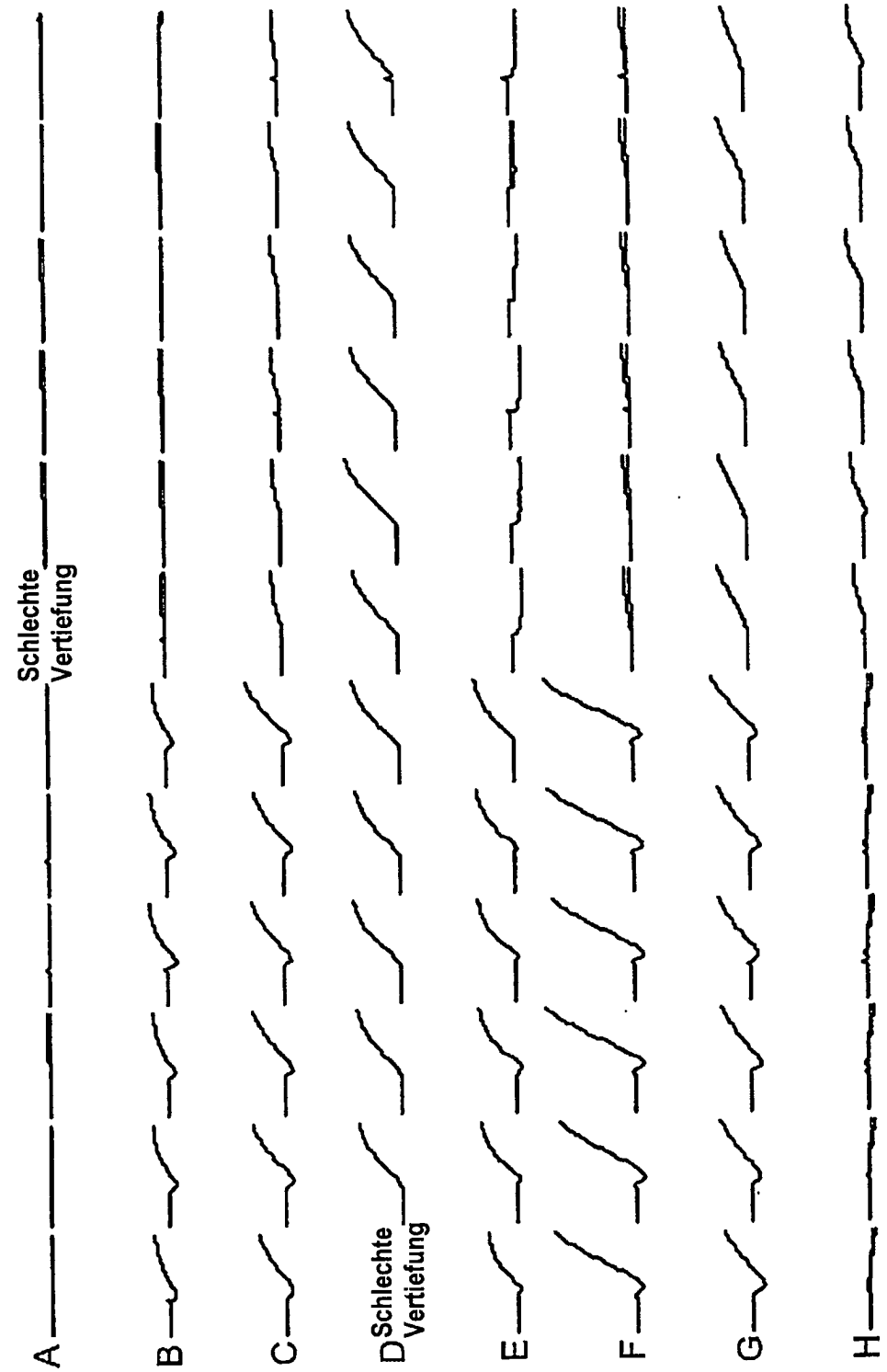
Figur 12a


DB: 050210-RP-AA ERSETZTE-HELA-RPM-ID2
SN: AM027 AL: 421502
GPCR
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
6
SOMATOSTATIN-3.7-uM & HELA-HH-136-mM
5HT-10-uM & HELA-HH-136-mM
FLUPROSTENOL-10-uM & HELA-HH-136-mM
PGD2-10-uM & HELA-HH-136-mM
PGE2-10-uM & HELA-HH-136-mM
PAF-10-uM & HELA-HH-136-mM
THROMBIN-50-mM & HELA-HH-136-mM
UTP-10-uM & HELA-HH-136-mM
OREXIN-20-mM & HELA-HH-136-mM
ORPHANIN FQ-400-nM & HELA-HH-136-mM
DYNORPHIN A-400-nM & HELA-HH-136-mM
B-ENDORPHIN-400-nM & HELA-HH-136-mM
NEUROTENSIN-3.6-uM & HELA-HH-136-mM
NPY-1100-nM & HELA-HH-136-mM
MELATONIN-10-uM & HELA-HH-136-mM
HH-136-mM & HELA-HH-136-mM
SHU9119-8.9-uM & HELA-HH-136-mM
MCH 6.17-1.3-uM & HELA-HH-136-mM
LPA-10-uM & HELA-HH-136-mM
SPHINGOSIN 1 PHOSPHAT-10-uM & HELA-HH-136-mM
LTC4-150-nM & HELA-HH-136-mM
LTB4-150-nM & HELA-HH-136-mM
HISTAMIN-10-uM & HELA-HH-136-mM
LAP4-10-uM & HELA-HH-136-mM
(3R,4R) APDC-10-uM & HELA-HH-136-mM
(S) 3,5 DHPG-10-uM & HELA-HH-136-mM
MOTILIN-3-uM & HELA-HH-136-mM
GALANIN-3000-nM & HELA-HH-136-mM
GABA-10-uM & HELA-HH-136-mM
ENDOTHELIN 1-61-nM & HELA-HH-136-mM

Figur 12b


DB: 050210-RP-AA ERSETZTE-HELA-RPM-ID2
SN: AM027 AL: 421502
GPCR
PTK
Chemokin
Cytokin
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
6
OXYTOCIN-7 &uM & HELA-HH-136-mM
VASOPRESSIN-8-uM & HELA-HH-136-mM
PACAP 38-1000-nM & HELA-HH-136-mM
VIP-633-nM & HELA-HH-136-mM
NEUROKININ B-4 8-uM & HELA-HH-136-mM
SUBSTANZ P-1 1-uM & HELA-HH-136-mM
EGF-20-nM & HELA-HH-136-mM
FGF-1,5-nM & HELA-HH-136-mM
IGF-1-20-nM & HELA-HH-136-mM
bNGF-5-nM & HELA-HH-136-mM
PDGF BB-10-nM & HELA-HH-136-mM
VEGF-2-nM & HELA-HH-136-mM
PTD-10-nM & HELA-HH-136-mM
SDF-1 1a-10-nM & HELA-HH-136-mM
BCA-1 1-20-nM & HELA-HH-136-mM
MIP 1a-10-nM & HELA-HH-136-mM
MCP 3-10-nM & HELA-HH-136-mM
MIP 3b-20-nM & HELA-HH-136-mM
I-309-5-nM & HELA-HH-136-mM
RANTES-10-nM & HELA-HH-136-mM
IL-1a-2-nM & HELA-HH-136-mM
IL-2-5-nM & HELA-HH-136-mM
IL-3-5-nM & HELA-HH-136-mM
IL-6-4-nM & HELA-HH-136-mM
IL-8-20-nM & HELA-HH-136-mM
INF aA-5-nM & HELA-HH-136-mM
TNF a-5-nM & HELA-HH-136-mM
TRAIL-5-nM & HELA-HH-136-mM

Figur 12c


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
A
Schlechte Vertiefung
B
C
D
Schlechte Vertiefung
E
F
G
H

Figur 13