



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 010 542 T2 2008.12.04**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 677 914 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 010 542.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR2004/050527**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 805 770.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2005/042164**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.10.2004**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **12.05.2005**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.2006**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **05.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.12.2008**

(51) Int Cl.⁸: **B01L 3/00 (2006.01)**
B01J 19/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0350763 31.10.2003 FR

(73) Patentinhaber:

Commissariat à l'Energie Atomique, Paris, FR;
Biomerieux S.A., Marcy L'Etoile, FR

(74) Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80802 München

(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

(72) Erfinder:

DELATTRE, Cyril, F-38100 GRENOBLE, FR;
MARCHAND, Gilles, F-38119 PIERRE CHATEL, FR;
POUTEAU, Patrick, F-38240 MEYLAN, FR; GINOT,
Frederic, F-38120 SAINT EGREVE, FR

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR VERTEILUNG VON TROPFEN EINER BETREFFENDEN FLÜSSIGKEIT AUF EINER FLÄCHE**

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

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

Beschreibung

Technischer Bereich

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur lokalisierten Verteilung von Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche, zur Anwendung dieses Verfahrens in einem Chiplabor oder in einem Mikrosystem für die Chemie oder die Biologie. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zur elektrischen, elektrochemischen, chemischen und optischen Detektion von wenigstens einer in einem Tropfen der interessierenden Flüssigkeit eventuell vorhandenen Verbindung, und ein Verfahren zur Elektropolymerisation von in einer interessierenden Flüssigkeit präsenten Molekülen.

[0002] Die vorliegende Erfindung ermöglicht, auf einer Fläche eine sehr dichte Matrix lokalisierter Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit herzustellen. Sie ermöglicht, leicht den Übergang von einer geschlossenen Fluidkammer, Arbeitsgehäuse genannt und mit einer interessierenden Flüssigkeit gefüllt, zu einer Matrix aus Tropfen oder Mikrovolumina, die auf einer in dieser Kammer befindlichen Fläche perfekt lokalisiert sind, wenn die interessierende Flüssigkeit aus dieser Kammer entleert worden ist.

[0003] Unter Tropfenmatrix versteht man eine bestimmte Anordnung der genannten Tropfen, ohne das eine besondere geometrische Form dieser Anordnung gefordert wird. Die Tropfenmatrix kann rund, quadratisch, polygonal und sogar zufällig sein, wobei wesentlich ist, dass die gebildeten Tropfen auf der Fläche lokalisiert und determiniert angeordnet sind, entsprechend der Zielsetzung der vorliegenden Erfindung. Unter "lokalisiert" versteht man abgegrenzt, individualisiert und unterschiedlich zu den anderen absichtlich auf der genannten Fläche dank dem erfindungsgemäßen Verfahren festgehaltenen Tropfen.

[0004] Jeder Tropfen kann einer oder mehreren Operationen unterzogen werden, dazu bestimmt, ein oder mehrere Analyten, die in der interessierenden Flüssigkeit vorhanden sind oder vorhanden sein könnten, qualitativ und/oder quantitativ zu analysieren, zum Beispiel ein Molekül, ein Oligonukleotid, ein Protein, usw. Die Analyse der Analyten in dem Tropfen kann durch irgendeine dem Fachmann bekannte Analysetechnik, insbesondere für Volumen so klein wie ein Flüssigkeitstropfen, realisiert werden. Es kann sich um Analysetechniken für Biochips handeln. Die Analyse kann die mit dem Tropfen bedeckte Fläche der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Einsatz bringen oder nicht, je nach Anwendung der vorliegenden Erfindung.

[0005] Jeder Tropfen bildet ein Volumen, in dem die chemischen oder biochemischen Reaktionen realisiert werden können. Jede dem Fachmann bekannte chemische oder biochemische Reaktion kann in diesem Volumen realisiert werden. Wenn diese Reaktionen die mit dem Tropfen bedeckte Fläche der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einbeziehen, kann dies mit einem Tropfen oder mit mehreren sukzessiv auf dieser Fläche abgeschiedenen Tropfen geschehen, wobei diese sukzessiven Tropfen von einer einzigen Flüssigkeit oder mehreren unterschiedlichen Flüssigkeiten stammen, je nach Anwendung der vorliegenden Erfindung. Ein Beispiel für chemische Reaktionen, die zwei verschiedene interessierende Flüssigkeiten auf einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einbeziehen, ist das folgende: mit Hilfe eines Tropfens einer ersten interessierenden Flüssigkeit lokalisiertes Abscheiden eines Films eines organischen Polymers auf der durch diesen Tropfen bedeckten Fläche, dann, mit Hilfe eines Tropfens einer zweiten interessierenden Flüssigkeit, Funktionalisierung des auf dieser Fläche abgeschiedenen organischen Polymerfilms.

[0006] Nach der vorliegenden Erfindung können chemische/biochemische Analyse(n) und Reaktion(en) auf exklusive Weise auf einer Vorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung (Analyse oder Reaktion) durchgeführt werden, oder auf komplementäre Weise. Im letzteren Fall kann dies simultan (Reaktion und Analyse) oder sukzessiv (Reaktion, dann Analyse oder Analyse, dann Reaktion) geschehen. Außerdem können mehrere Analysen und/oder mehrere Reaktionen aufeinander folgen. Zum Beispiel kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung vorteilhaft eingesetzt werden; einerseits zur Herstellung einer Karte, oder Chiplabor ("lab-on-chip") (zum Beispiel durch chemische Reaktionen, die die Abscheidung eines Polymers und dann sein Funktionalisierung ermöglichen), in dem alle für die qualitativen und quantitativen Analysen notwendigen Schritte integriert sind: Fluidmanipulation, chemische und/oder biochemische Reaktionen, optischer, elektrischer und/oder chemischer Detektionschip, usw. integriert sind; und andererseits zur Benutzung dieser Karte, oder Chiplabor, um in Tropfen einer interessierenden zu analysierenden Flüssigkeit qualitative und/oder quantitative Analysen durchzuführen (chemische/biochemische Reaktion(en) und Analyse).

[0007] In der vorliegenden Beschreibung verweisen die Referenzen zwischen eckigen Klammern [] auf die beigefügte Fundstellenliste.

[0008] Gemäß den vorgesehenen Anwendungen betrifft diese Erfindung das Hauptgebiet der Tropfenbildung, die Arbeit mit Mikrovolumen, Matrizen mit hoher Tropfendichte.

[0009] Die Bildung lokalisierter Zonen, um eine flüssige Phase zu isolieren, ist auf dem Gebiet der Biochips und insbesondere der DNA-Chips verbreitet. Bei diesen Anwendungen ist das Reaktionsvolumen oft sehr klein, um sparsam umzugehen mit den biologischen Produkten und den Reagenzien.

[0010] Zur Bildung von lokalisierten Tropfen und von Matrizen mit hoher Tropfendichte, verwenden die Firmen Protogene Laboratories Inc. [1] und Affymetrix Inc. [2] eine Technik, die ein automatisiertes Spendersystem einsetzt. Diese Systeme führen zur Bildung von Tropfen und Matrizen mit hoher Plot- bzw. Punkt- oder Tropfendichte auf einer Fläche.

[0011] Jedoch, außer dem Tropfenspendesystem erfordern diese Techniken alle eine Vorrichtung zur Verschiebung und genauen Ausrichtung sowie eine Vorrichtung zur Versorgung mit Flüssigkeit. Die Kosten dieser Gerätschaft sind hoch. Außerdem ist die maximale Dichte der Tropfenmatrizen, die gebildet werden können, begrenzt durch eine Kombination aus der Größe der gespendeten Tropfen und der minimalen Punktteilung des Spendesystems.

[0012] Zur Bildung von Matrizen mit einer hohen Mikrotopfdichte kann man zwei wichtige Beispiele nennen: die Bildung eines Mikrotopfgitters mittels Ätzung in einer Siliciumplatte, um durch PCR in Mikrovolumen von einigen Picolitern DNA-Verstärkungen zu realisieren, und die Bildung von Gräben oder Kanälen mittels Photolithographie in Fotoresists, abgeschieden auf einem Plastiksubstrat [3]. Mit diesen Techniken variiert die Anzahl der Töpfe zwischen 100 und 9600, mit Durchmessern von 60 bis 500 µm und Tiefen von 5 bis 300 µm.

[0013] Jedoch gewährleisten die Ränder bzw. Umrandungen dieser Töpfe keine physische Trennung zwischen der flüssigen Phase im Innern der Töpfe und derjenigen auf der Außenseite von dieser, was Verbindungen zwischen den Töpfen und folglich gegenseitige Kontaminationen ermöglicht. Außerdem erfordern diese Vorrichtungen für ihre Benutzung Tropfenspendesysteme, eine Verschiebungs- und Ausrichtvorrichtung und dieser Systeme sowie eine Vorrichtung zur Versorgung mit Flüssigkeit. Es hat es also mit denselben Problemen wie oben zu tun.

[0014] Zur elektrischen oder elektrochemischen Detektion bei den biologischen Tests ermöglichen eine große Anzahl von in der Literatur beschriebenen elektrischen oder elektrochemischen Systemen nicht, als Detektionsgrenze den nanomolaren Bereich zu unterschreiten, wobei diese Begrenzung oft auf der geringen Anzahl der durch jeden Hybriden erzeugten Elektronen beruht.

[0015] Die Techniken, die eine enzymatische Akkumulierung mit einbeziehen, ermöglichen, diese Detektionsgrenze ins Picomolare abzusenken aufgrund der hohen Verstärkung zu detektierender Redoxspezies, die in dem Reaktionsmedium vorhanden sind [4]. Jedoch erzeugt diese Verstärkungsmethode ein Problem für die gegenwärtig bekannten Multiplot-Systeme, denn die Redox-Verbindung diffundiert und kann folglich die benachbarten Plots kontaminieren.

[0016] Aus diesem Grund wird in der Literatur meistens die Benutzung dreidimensionaler Strukturen (Benutzung von Abteilen) empfohlen. Zum Beispiel schlägt Infineon [6] Mauern aus Polymer und ein Migrationssystem der Moleküle durch elektrische Kräfte vor, um sie in ein definiertes Volumen einzuschließen und so die Kontamination zwischen Plots zu vermeiden. Leider begegnet man bei diesem Lösungsweg Fluidbefüllungsproblemen, wenn man zum Beispiel mit einer sehr dünnen Flüssigkeitsader arbeiten will. Auch hier ist ein Tropfenspender unerlässlich.

[0017] Es besteht also ein echter Bedarf an einem Verfahren, die ermöglicht, von einer interessierenden Flüssigkeit eine Tropfenmatrix von hoher Dichte herzustellen, und die keinen Tropfenspender benötigt, einfach herzustellen ist, keine Kontamination zwischen den Tropfen zulässt und sehr flexibel einsetzbar ist bei allen dem Fachmann gegenwärtig bekannten Verfahren zur kollektiven oder individuellen Analyse von Mikrovolumen, zum Beispiel in einem Chiplabor, unabhängig davon, ob es sich um ein chemisches, elektrisches oder optisches Verfahren oder eine Kombination dieser Verfahren handelt.

Darstellung der Erfindung

[0018] Die vorliegende Erfindung entspricht genau diesem Bedarf, und anderen weiter unten erklärten, indem sie ein Verfahren zur lokalisierten Verteilung von Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche eines Substrats liefert, wobei das genannte Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- Eine Einleitung der interessierenden Flüssigkeit in ein Gehäuse durch Einleitungseinrichtungen, wobei das Gehäuse die genannte aktive Fläche einschließt, und
- Eine Entleerung der interessierenden Flüssigkeit aus dem Gehäuse durch Entleerungseinrichtungen,

wobei die aktive Fläche sowie die anderen Flächen im Innern des Gehäuses im Wesentlichen unbenetzbar sind gegenüber der interessierenden Flüssigkeit, ausgenommen mehrere lokalisierte Festhaltezone, die in bestimmter Weise auf der aktiven Fläche ausgebildet sind und von denen jede fähig ist, einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit festzuhalten,

wobei die genannten Einleitungs- und Entleerungseinrichtungen in dem Gehäuse so angeordnet sind, dass die interessierende Flüssigkeit, wenn sie in das Gehäuse eingeleitet wird, die Festhaltezone bedeckt, und wenn die interessierende Flüssigkeit aus dem Gehäuse extrahiert wird, auf verteilter und lokalisierter Weise in jeder Festhaltezone ein Tropfen der interessierenden Flüssigkeit festgehalten wird.

[0019] Im Kontext der vorliegenden Erfindung wird eine Flüssigkeit dann als interessierende Flüssigkeit bezeichnet, wenn sie dazu bestimmt ist, in einem Verfahren nach der vorliegenden Erfindung in Festhaltezone festgehalten zu werden, um eine Tropfenmatrix dieser Flüssigkeit zu bilden.

[0020] Unter "interessierender Flüssigkeit" versteht man jede Flüssigkeit, die zum Beispiel zu einem analytischen und/oder chemischen und/oder biochemischen Zweck in Form einer Tropfenmatrix auf einem Träger aufgebracht werden muss. Unter "chemischem und/oder biochemischem Zweck" versteht man jede chemische und/oder biochemische Reaktion, die in einer Flüssigkeit realisiert werden kann. Unter "analytischem Zweck" versteht man jede qualitative und/oder quantitative Analyse, die in einer Flüssigkeit realisiert werden kann.

[0021] Die interessierende Flüssigkeit kann organisch oder wässrig sein. Es kann sich um irgend eine gegenwärtig in Labors, zum Beispiel auf Chiplabors, oder in der Industrie manipulierte Flüssigkeiten handeln. Es kann sich zum Beispiel um eine Flüssigkeit handeln, die ausgewählt wird aus einer Lösung, einem Reagens, einer Probe, einem Zellenextrakt, einer von einem tierischen oder pflanzlichen Organismus stammende Entnahme, einer in der Industrie oder der Natur vorgenommenen Entnahme. usw. Es kann sich um eine biologische oder chemische Flüssigkeit handeln. Diese interessierende Flüssigkeit kann eine verdünnte Flüssigkeit sein, wenn notwendig für die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung, wie dies zum Beispiel bei den Chiplabors sein kann. Ein festes Produkt kann aufgelöst werden, um im Sinne der vorliegenden Erfindung eine interessierende Flüssigkeit zu bilden. Dieses feste Produkt kann ausgewählt werden zum Beispiel unter einem chemischen oder biochemischen Produkt, einem Reagens, einem zu analysierenden Material, einer von einem tierischen oder pflanzlichen Organismus stammenden Entnahme, einer in der Industrie oder der Natur vorgenommenen Entnahme. Der Fachmann weiß, wie man mit solchen Produkten und interessierenden Flüssigkeiten umgeht.

[0022] Generell kann das erfindungsgemäße Verfahren bei einem Chiplabor, bei einem Mikrolabor für Chemie oder Biologie wie etwa einem Analysemikrosystem oder bei einem Biochip angewendet werden, zum Beispiel ausgewählt aus der Gruppe die DNA-Chips, RNA-Chips, Proteinchips, Antikörperchips, Antigenchips, Zellchips, usw. umfasst.

[0023] Die vorliegende Erfindung benutzt ein Gehäuse. Dieses Gehäuse kann offen oder geschlossen sein, um eine erfindungsgemäße lokalisierte Verteilung von Tropfen der interessierenden Flüssigkeit auf der aktiven Fläche zu erhalten. Sie kann auch benutzt werden, um die auf der aktiven Fläche lokal verteilten einzuschließen und/oder chemische oder biochemische Reaktionen und/oder qualitative und/oder quantitative Analysen an diese Tropfen durchzuführen. Das Gehäuse kann also ein echtes Miniaturlabor bilden (Chiplabor).

[0024] Die Dimensionen dieses Gehäuses hängen insbesondere von den Dimensionen des Substrats und seiner aktiven Fläche ab, die es aufnehmen bzw. überdecken muss, aber ggf. auch von anderen Analysevorrichtungen oder Mikrosystemen, die in dem genannten Gehäuse hinzugefügt werden können, zum Beispiel weitere Chiplabors zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Diese Dimensionen können für die größte Seite des Gehäuses kleiner als 1 cm sein.

[0025] Das Gehäuse kann zum Beispiel aus einem Material sein, das ausgewählt wird aus der Gruppe, die ein organisches Polymer, einen elastomeren Kunststoff, ein Glas, Metall, Silicium, einen Resist oder irgend ein dem Fachmann bekanntes Material umfasst und das die Realisierung der vorliegenden Erfindung ermöglicht. Es kann sich zum Beispiel um ein Polymer handeln, das ausgewählt wird aus der Gruppe, die die Polycarbonate, die Polydimethylsiloxane, die Polymethylmethacrylate, die Polychlorbiphenyle und die Cycloolefin-Copolymere umfasst.

[0026] Das Material des Gehäuses wird generell ausgewählt in Abhängigkeit des Typs der in Tropfen zu verteilenden interessierenden Flüssigkeit, der Verwendung des Gehäuses (einfach Eintauchen oder Eintauchen und Analysen) und in Abhängigkeit der Preisspezifikationen.

[0027] Die Gehäuse sind vorzugsweise so dicht, dass es zu keinen Verlusten der eingefüllten interessierenden Flüssigkeit beim Eintauchen kommt und/oder dass keine äußeren Kontaminationen, zum Beispiel bakterielle, chemische usw. eindringen können und dass es nach der Extraktion der interessierenden Flüssigkeit aus dem Gehäuse zu keiner Verdampfung des Tropfens (der Tropfen) durch die Festhaltezone(n) kommt.

[0028] Die Arbeitsgehäuse können für ihre Montage eine Haube umfassen, die man bei bestimmten Anwendung öffnen und schließen kann, insbesondere um das Substrat mit der aktiven Fläche entnehmen zu können, nachdem es Kontakt hatte mit der interessierenden Flüssigkeit oder nach den Analysen oder Reaktionen in den Tropfen. Es kann nämlich ein einziges Gehäuse auch dazu dienen, mehrere erfindungsgemäße Substrate gleichzeitig oder sukzessiv einzutauchen. Das Gehäuse kann dann auswechselbare Fixierungseinrichtungen, zum Beispiel Clips, des Substrats oder der Substrate in seinem Innern umfassen. Wenn das Gehäuse eine Haube umfasst, ist es vorzugsweise ausreichend dicht, so dass es nicht die Einleitung der interessierenden Flüssigkeit in das Gehäuse stört.

[0029] Die Haube kann aus dem gleichen Material wie das Gehäuse sein. Sie kann zum Beispiel durch Gießen, Ziehen, Ätzen, mechanische Erosion usw. hergestellt werden. Anschließend kann sie definitiv auf dem Gehäuse befestigt werden, zum Beispiel durch Klebung, Druck oder irgend ein anderes dem Fachmann bekanntes Mittel. Sie kann auch abnehmbar auf dem Gehäuse befestigt werden, derart, dass ein selbes Gehäuse dazu dienen kann, sukzessiv verschiedene Substrate mit verschiedenen aktiven Flächen einzutauchen, um mehrere Tropfenmatrizen zu bilden.

[0030] Vorzugsweise ist das Material des Gehäuses und ggf. seiner Haube im Wesentlichen nicht netzend gegenüber der interessierenden Flüssigkeit. Dies ermöglicht, zu vermeiden, dass Tropfen auf der Innenseite des Gehäuses bei dessen Entleerung haften bleiben und dann auf die aktive Fläche fallen und Analysen und Reaktionen in den Arbeitszonen stören. Dies kann Flächenbehandlungen notwendig machen, etwa wie diejenigen, die für die aktive Fläche unten beschrieben werden.

[0031] Die geschlossenen Gehäuse umfassen Einleitungs- und Entleerungseinrichtungen der interessierenden Flüssigkeit. Es gibt keine Einschränkung bezüglich der Position, der Form, der Anzahl dieser Einrichtungen, außer dass sie die Einleitung und dann die Entleerung der interessierenden Flüssigkeit in das bzw. aus dem Gehäuse ermöglichen müssen, und dass sie so angeordnet sein müssen, dass, wenn die interessierende Flüssigkeit in das Gehäuse eingeleitet worden ist, sie die Umrandung(en) der aktiven Fläche bedeckt bzw. überflutet, und wenn die interessierende Flüssigkeit aus dem Gehäuse entleert wird, jeweils ein Tropfen der interessierenden Flüssigkeit in jeder Umrandung zurückbleibt. Die interessierende Flüssigkeit kann durch zwei verschiedene Öffnungen in das Gehäuse hinein und dann wieder herausfließen. Sie kann auch durch eine einzige Öffnung in das Gehäuse hinein und dann wieder herausfließen, wobei eine zweite Öffnung dann dazu dient, dass entweder während der Entleerung Luft in das Gehäuse hineinströmt oder man durch sie ein gasförmiges Druckfluid einspeist, das die interessierende Flüssigkeit aus dem Gehäuse treibt. Die Einleitungs- und Entleerungseinrichtungen der interessierenden Flüssigkeit umfassen insbesondere Öffnungen, die in der Haube oder in den Wänden des Gehäuses angeordnet sind und realisiert werden durch Ätzen, Ziehen bzw. Formen, Gießen, Fotoresistentwickeln, mechanisches Bohren, usw.

[0032] Die Einleitungseinrichtungen der interessierenden Flüssigkeit in das Gehäuse können alle Mittel umfassen, die der Fachmann zum Einspeisen einer Flüssigkeit in ein Gehäuse kennt, insbesondere diejenigen, die auf dem Gebiet der Chipfabrikation und der Mikrosysteme benutzt werden. Es kann sich zum Beispiel um eine Spritze, eine Pipette, eine Mikropipette, eine Injektionspumpe usw. handeln.

[0033] Die Entleerungseinrichtungen der interessierenden Flüssigkeit in das Gehäuse können alle Mittel umfassen, die der Fachmann zum Entleeren einer Flüssigkeit aus einem Gehäuse kennt. Wesentlich ist, dass der

(die) durch die Festhaltezone(n) festgehaltene(n) Tropfen bei der Entleerung der interessierenden Flüssigkeit nicht mitgerissen wird. Die Entleerungseinrichtungen können zum Beispiel eine Saugpumpe umfassen, um die interessierende Flüssigkeit auf dem Gehäuse zu saugen. Der Entleerungsschritt besteht also darin, die interessierende Flüssigkeit aus dem genannten Gehäuse zu saugen. Die Entleerungseinrichtungen können auch Einspritzpumpe eines gasförmigen Fluids in das Gehäuse umfassen: der Entleerungsschritt besteht dann darin, ein gasförmiges Fluid in das Gehäuse zu blasen, um die interessierende Flüssigkeit aus dem Gehäuse zu verdrängen. Vorteilhafterweise wird das gasförmige eingeblasene Fluid mittels irgend einer dem Fachmann bekannten Technik mit dem Dampf der interessierenden Flüssigkeit gesättigt. Außerdem können die Öffnungen oder Anschlüsse des Gehäuses nach außen vorteilhafterweise generell mit Speichern eines Gases verbunden, das gesättigt ist mit Dampf der interessierenden Flüssigkeit, was den Vorteil hat, dass man ein Verdampfen der einmal gebildeten Tropfen zu verhindern, insbesondere wenn die Dimensionen des Gehäuses und des Substrats sehr klein sind. Das Gas oder gasförmige Fluid kann Luft oder ein neutrales Gas sein, wenn nötig.

[0034] Das Substrat kann aus irgend einem zur Realisierung der vorliegenden Erfindung geeigneten Material sein. Es kann sich zum Beispiel um eines der Basismaterialien handeln, die zur Herstellung von Chiplabors, Biochips, Mikrosystemen usw. verwendet werden. Es kann sich zum Beispiel um ein Material handeln, das ausgewählt wird aus der Gruppe, die gebildet wird durch Silicium, Siliciumoxid, Siliciumnitrid, Glas, Plastik, einem organischen Polymer und einem Metall oder einer Metalllegierung. Die organischen Polymere können zum Beispiel aus einer Gruppe ausgewählt werden, welche die Polycarbonate, die Polydimethylsiloxane, die Polymethylmethacrylate, die Polychlorbiphenyle und die Cycloolefin-Copolymere umfasst. Das Metall kann ausgewählt werden aus der Gruppe, die Au, Ti, Pt, Al, Ni, Sn umfasst, und die Metalllegierung kann Inox-Stahl sein.

[0035] Das Substrat kann eine der Wände des Gehäuses bilden. Die das Gehäuse bildenden Wände können dann auf dem Substrat zum Beispiel durch Klebung oder Druck realisiert werden, vorausgesetzt, dass sich die aktive Fläche in dem Gehäuse befindet.

[0036] Die aktive Fläche kann im Wesentlichen aus jedem Material sein, das von der interessierenden Flüssigkeit nicht benetzt werden kann und sich zur Anwendung der vorliegenden Erfindung eignet. Die Funktionsweise des Verfahrens der vorliegenden Erfindung beruht nämlich teilweise auf der Tatsache, dass die aktive Fläche die interessierende Flüssigkeit sehr wenig oder gar nicht zurückhält, was eine totale, leichte Entnetzung ermöglicht, ohne dass zwischen den Rändern der Fläche Flüssigkeit zurückbleibt, und dies ohne Trocknung. Die Tropfen der interessierenden Flüssigkeit werden also selektiv und exklusiv durch die Festhaltezone(n) festgehalten und in diesen Zonen abgegrenzt, so dass es kein Kontaminationsproblem zwischen den festgehaltenen Tropfen gibt.

[0037] Das Material der aktiven Fläche wird also insbesondere in Abhängigkeit von der interessierenden Flüssigkeit gewählt, aus der eine Tropfenmatrix gebildet werden soll, aber auch in Abhängigkeit von dem Substrat, den Festhaltezone(n) und ggf. in Abhängigkeit von Arbeitszone(n), arrangiert mit diesen Festhaltezone(n) (die Arbeitszone(n) werden unten definiert). Es kann auf das Substrat erzeugt werden durch chemische Modifikation oder durch Abscheidung. Es kann sich auch um das Substrat selbst handeln, wenn es aus einem Material besteht, das im Wesentlichen nicht durch die interessierende Flüssigkeit benetzt werden kann.

[0038] Zum Beispiel, wenn die interessierende Flüssigkeit wässrig ist, ist das die aktive Fläche bildende Material vorteilhafterweise hydrophob. Zum Beispiel kann in den oben genannten Substratmaterialbeispielen die Fläche des Substrats durch chemische Modifikation unbenetzbar gemacht werden, hier hydrophob, zum Beispiel mittels Silanisierung mit einem Silan mit hydrophoben Funktionen, zum Beispiel 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluordecyl-Trichlorsilan. Es ist zum Beispiel auch eine Schleuderbeschichtung mit flüssigem Teflon, eine Gasphasensilanisierung von hydrophobem Silan, die Verwendung von Hydrocarbonsilan, zum Beispiel des Typs Octadecyltrichlorsilan, möglich. Die für solche chemischen Modifikationen anwendbaren Materialien und Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Unten wird ein Realisierungsbeispiel beschrieben.

[0039] Die Behandlung, die ermöglicht, die Fläche eines Substrats durch interessierende Flüssigkeit unbenetzbar zu machen, kann vor oder nach der Bildung der Festhaltezone(n) und/oder der entsprechenden Arbeitszone(n) realisiert werden. Letztere werden eventuell geschützt, falls sie nach dieser realisiert werden.

[0040] Die Form und Größe dieser aktiven Fläche und folglich auch des Substrats, auf dem sie ausgebildet ist, sind für die Funktionsweise des erfindungsgemäßen Verfahrens ohne Bedeutung. Sie werden generell in Abhängigkeit von der Anzahl der auf dieser Fläche zu realisierenden Tropfenzone(n) der interessierenden Flüssigkeit

sigkeit sowie der Kostenspezifikationen bestimmt. Um jedoch unvorhergesehene Rückstände der interessierenden Flüssigkeit auf der Fläche zu vermeiden, ist sie vorzugsweise plan. Zum Beispiel kann die aktive Fläche eine Form und Größe haben, die mit den Plättchen vergleichbar sind, die für die Chiplabors und die Analyse- und Detektionsmikrosystemen verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind.

[0041] Die Fläche des in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Substrats (aktive Fläche) wird modifiziert (Strukturierung), um gegenüber der interessierenden Flüssigkeit benetzbare Zonen zu erzeugen, das heißt mit starker Affinität oder mit Kapillarwirkung für die interessierende Flüssigkeit. Diese Zonen werden "Festhaltezone" genannt. Der Begriff "lokalisiert" wurde oben definiert. Wenn man etwas interessierende Flüssigkeit über die aktive Fläche rieseln lässt, halten die Festhaltezone einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit zurück oder fest, während die (restliche) aktive Fläche, im Wesentlichen unbenetzbar gegenüber der interessierenden Flüssigkeit, keine oder nur sehr wenig interessierende Flüssigkeit zurückhält. Wenn das Rieseln beendet wird, bleiben nur die durch die Festhaltezone lokal festgehaltenen Tropfen auf der aktiven Fläche zurück.

[0042] Eine Vielzahl von Lösungen können zur Herstellung dieser Festhaltezone auf der aktiven Fläche des Substrats vorgesehen werden: chemische Behandlung der Fläche, um lokal die Affinität zu der interessierenden Flüssigkeit zu erhöhen, zum Beispiel durch Pflanzung von Molekülen mit spezifischen Gruppen, lokalisierte Elektrobenetzung dank Mikroelektroden, Mikrotöpfen, gebildet durch erhabene Kränze auf der Fläche, eingezätzte Töpfe usw. Diese wenigstens eine Festhaltezone kann eine chemische, elektrische oder physikalische Festhaltezone eines Tropfens der interessierenden Flüssigkeit sein. Es kann sich um jede Art einer lokalisierten Zone handeln, die ermöglicht, einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit festzuhalten durch einfachen Kontakt dieser Zone mit der interessierenden Flüssigkeit.

[0043] Zum Beispiel kann es sich um eine Benetzungs-Festhaltezone handeln. Die Festhaltezone kann nämlich durch ein Trägermaterial gebildet werden, das auf bestimmte Weise auf der genannten aktiven Fläche oder auf dem Substrat angeordnet ist und, wenn notwendig, chemisch modifiziert werden kann, um benetzbar zu sein gegenüber der interessierenden Flüssigkeit, zum Beispiel durch Pflanzung einer chemischen Funktion, benetzbar durch die interessierende Flüssigkeit.

[0044] Dieses Trägermaterial kann zum Beispiel durch ein Material gebildet werden, das ausgewählt wird aus der Gruppe, die gebildet wird durch Silicium, Siliciumdioxid, Siliciumnitrid, Glas, Polymere, zum Beispiel organische Polymere wie die, die aus einer Gruppe ausgewählt werden, welche die Polycarbonate, die Polydimethylsiloxane, die Polymethylmetaacrylate, die Polychlorbiphenyle und die Cycloolefin-Copolymere umfasst. Das Metall kann ausgewählt werden aus der Gruppe, die Au, Al oder Inox-Stahl umfasst.

[0045] Zum Beispiel kann die chemische Benetzungsfunktion gegenüber einer wässrigen interessierenden Flüssigkeit ausgewählt werden aus der Gruppe, die eine Funktion des Typs Alkohol, Alkoholat, Karboxylsäure, Karboxylat, Schwefelsäure, Sulfonat, Oxyamin, Hydrazin, Amin und Ammonium umfasst.

[0046] Zum Beispiel kann das in den Dokumenten [9] oder [10] beschriebene Verfahren zur Herstellung dieses Typs einer Festhaltezone angewendet werden.

[0047] Zum Beispiel, wenn das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere dazu bestimmt ist, Tropfen der wässrigen interessierenden Flüssigkeit zu verteilen, und wenn die aktive Fläche oder das Substrat auf Siliciumbasis ist, kann die Festhaltezone durch hydrophiles schwarzes Silicium gebildet werden, das auf einer solchen Fläche sehr leicht durch Ätzung gebildet werden kann. Die geätzte Zone wird besonders gegenüber einer wässrigen interessierenden Flüssigkeit benetzbar. Die geätzte Zone bedarf keiner anderen chemischen Modifikation, um gegenüber wässrigen Lösungen benetzbar zu sein. Dieses Realisierungsbeispiel ist folglich sehr wirtschaftlich. Zum Beispiel offenbart das Dokument [11] ein Laborprotokoll, das benutzt werden kann, um diese Art von Festhaltezone herzustellen.

[0048] Zum Beispiel kann die Festhaltezone eine Benetzungs-Festhaltezone sein. Nach diesem Beispiel kann die Festhaltezone, hier eine Elektrode, zum Beispiel aus einem Material sein, das ausgewählt wird aus der Gruppe, welche die Edelmetalle, zum Beispiel Au, Pt, Pd, Ti, Ni, Al, usw. oder eine Edelmetalllegierung, Kohlenstoff, Graphit und Indium- und Zinnoxid (ITO) umfasst. Die genannten Materialien werden benetzbar gemacht durch galvanische Beschichtung mit einem elektrisch leitfähigen Polymer, auf dem eine chemische Benetzungsfunktion gegenüber der interessierenden Flüssigkeit fixiert wird. Das elektrisch leitfähige Polymer kann eines der Polymere sein, die bei der Herstellung von Chiplabors verwendet werden. Es kann aus der Gruppe ausgewählt werden, die Polypyrrol, Polyanilin, Polyzulen, Polyfluoren umfasst. Die chemische Benet-

zungsfunktion kann zum Beispiel eine der oben genannten chemischen Benetzungsfunktionen sein. Ihre Fixierung auf dem Monomer vor der Polymerisierung oder auf dem Polymer nach der Polymerisationsreaktion kann mittels klassischer Verfahren erfolgen. Ein Realisierungsbeispiel dieses Typs von Festhaltezone findet man in dem Dokument [4].

[0049] Wieder beispielhaft kann die Festhaltezone eine Zone zum Festhalten eines Tropfen der interessierenden Flüssigkeit durch Kapillarkräfte sein. Es kann sich zum Beispiel um eine Ätzung bzw. Einätzung oder einen Vorsprung der aktiven Fläche handeln, so dass der Tropfen durch Kapillarkräfte festgehalten werden kann. Diese Ätzungen bzw. Einätzungen oder Vorsprünge können zum Beispiel realisiert werden durch Direktätzung des Substrats; Aufbringen eines Materials auf der Fläche eines planen Substrats, zum Beispiel durch Aufwachsen, Aufdampfen, Sputtern oder elektrochemisches Abscheiden, dann Ätzen in Verbindung mit einem klassischen Fotolithographieverfahren, zum Beispiel Aufbringen von Resist, Belichten und Definieren von Mustern oder Ätzen; durch direktes Definieren von Mustern durch Photolithographie in photosensiblen Polymeren, zum Beispiel im Falle von photosensiblen Resists; Gießen oder Formen bzw. Prägen von Kunststoffen. Diese Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Wesentlich ist, dass diese Ätzungen bzw. Einätzungen oder Vorsprünge, welche diese Festhaltezone bilden, ermöglichen, lokalisiert mittels Kapillarwirkung einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit festzuhalten.

[0050] Wieder beispielhaft können die Festhaltezone eine Vertiefung oder ein Vorsprung des Substrats sein, so realisiert, dass sie auf der genannten aktiven Fläche Umrandungen bilden. Vorzugsweise berühren sich die Umrandungen gegenseitig nicht, haben keinen gemeinsamen Rand und bilden jeweils eine Umrandung auf der Fläche, die dazu bestimmt ist, einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit festzuhalten. Die beigefügte [Fig. 1](#) ist eine schematische Schnittdarstellung von zwei Topftypen: links Töpfe (c_a), eingetieft in ein Substrat (S_a), und rechts Töpfe (c), mit ihrer Umrandungen (b) auf einem Substrat (S) ausgebildet. Rechts gibt es zwischen den Umrandungen der Töpfe (c) einen freien Raum für den Abfluss der interessierenden Flüssigkeit. Die Herstellung der Umrandungen oder Töpfe kann erfolgen zum Beispiel durch Direktätzung des Substrats, Abscheidung eines Materials auf der Oberseite eines ebenen Substrats, zum Beispiel durch Beschichtung (couchage), Aufdampfung, Sputtern oder elektrochemische Abscheidung, dann Ätzung in Verbindung mit einem klassischen Photolithographieverfahren, zum Beispiel durch Resistbeschichtung, Belichtung und Definition von Mustern, oder Ätzung; Direktdefinition von Mustern durch Photolithographie in photosensiblen Polymeren, zum Beispiel im Falle von photosensiblen Photoresists; Gießen oder Prägen, zum Beispiel von Plastikmaterialien oder des die aktive Fläche bildenden Substrats. Diese Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Sie können insbesondere während des letzten Schritts einer technologischen Stapelung von mehreren Schichten auf dem Substrat angewendet werden. Die unteren Schichten können Aktoren oder mechanische, optische oder elektronische Detektoren enthalten, zum Beispiel des Typs MEMS ("Micro Electro Mechanical System") oder optisches MEMS, oder auch mit der interessierenden Flüssigkeit gefropfte chemische oder biologische Moleküle, dazu bestimmt, Arbeitszone zu bilden.

[0051] Wenn die interessierende Flüssigkeit wässrig ist, ist die Festhaltezone vorzugsweise eine hydrophile Zone und die im Wesentlichen unbenetzbare aktive Fläche ist vorzugsweise hydrophob. Die Festhaltezone kann also den Tropfen aus der interessierenden Flüssigkeit durch Interaktionen des hydrophilen/hydrophoben Typs mit der interessierenden Flüssigkeit festhalten. Generell hält die Festhaltezone lokal den Tropfen der interessierenden Flüssigkeit fest aufgrund einer Benetzbarkeit (chemisch oder kapillar) der Festhaltezone gegenüber der interessierenden Flüssigkeit, die größer ist als die der aktiven Fläche.

[0052] Nach der Erfindung können die auf bestimmte Weise über die genannte aktive Fläche verteilten lokalisierten Festhaltezone eine Matrix bilden. Unter Tropfenmatrix versteht man eine bestimmte Anordnung der genannten Tropfen, ohne das eine besondere geometrische Form dieser Anordnung gefordert wird. Die Tropfenmatrix kann rund, quadratisch, polygonal und sogar zufällig sein, wobei wesentlich ist, dass die gebildeten Tropfen auf der Fläche lokalisiert und determiniert angeordnet sind, entsprechend der Zielsetzung der vorliegenden Erfindung. Unter "lokalisiert" versteht man abgegrenzt, individualisiert und unterschiedlich zu den anderen absichtlich auf der genannten Fläche dank des erfindungsgemäßen Verfahrens festgehaltenen Tropfen.

[0053] Nach der Erfindung kann die Festhaltezone eine beliebige Form haben, vorausgesetzt sie können einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit zurückhalten. Zum Beispiel kann diese Zone eine dreieckige, sternartige, rechteckige, ringartige, elliptische Form haben, oder vieleckig sein, mit 2 bis 20 Seiten, oder eine sonstige, für die vorliegende Erfindung geeignete Form aufweisen. Generell ist sie streifenförmig.

[0054] Außerdem kann jede Festhaltezone mit wenigstens einer Arbeitszone (weiter unten definiert) arrangiert sein, die auf der genannten aktiven Fläche so ausgebildet ist, dass sie mit der interessierenden Flüssigkeit

Kontakt hat, wenn diese durch die Festhaltezone zurückgehalten wird. Vorzugsweise hat wenigstens eine Festhaltezone eine offene oder geschlossene runde Form, welche die wenigstens eine mit ihr arrangierte Arbeitszone umgibt. Außerdem kann eine Festhaltezone eines Tropfens der interessierenden Flüssigkeit mehrere Arbeitszonen umgeben, zum Beispiel 2 bis 4 oder mehr, vorausgesetzt – wenn ein Tropfen der interessierenden Flüssigkeit durch die Festhaltezone zurückgehalten wird – dieser Tropfen bedeckt alle durch diese Festhaltezone umgebenen Arbeitszonen wenigstens partiell.

[0055] Unter Arbeitszone versteht man in der vorliegenden Erfindung eine Zone, in der physikalische und/oder chemische und/oder optische Operationen in dem durch die Umrandung zurückgehaltenen Tropfen durchgeführt werden können. Nach der Erfindung kann wenigstens eine Arbeitszone eine Interaktionszone sein, ausgewählt unter einer Zone der elektrischen, chemischen, mechanischen, optischen Interaktion mit dem genannten zurückgehaltenen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit, oder eine Zone, in der mehrere dieser Interaktionen simultan oder sukzessive stattfinden.

[0056] Zum Beispiel kann wenigstens eine Arbeitszone eine elektrische Interaktionszone mit dem Tropfen aus der interessierenden Flüssigkeit sein, mit oder ohne elektrochemische Mikrozelle. Die Arbeitszone kann zum Beispiel Funktionen oder chemische oder biologische Reagenzien umfassen, die fähig sind, mit einem Target dieser in der interessierenden Flüssigkeit präsenten Funktionen oder Reagenzien zu reagieren. Diese Arbeitszone kann unter denen ausgewählt werden, die der Fachmann auf dem Gebiet der Biochips (der Firmen AGILENT, CIPHERGEN, EUROGENTEC) kennt. Der Unterschied der erfindungsgemäßen Vorrichtung zu den Chips nach dem Stand der Technik beruht vor allem auf dem Vorhandensein einer mit der genannten Arbeitszone arrangierten Festhaltezone. Diese Arbeitszone kann zum Beispiel durch Silanisierung und dann Immobilisierung von biologischen Sonden realisiert werden, wie zum Beispiel beschrieben in dem Dokument [12].

[0057] Diese Arbeitszone kann zum Beispiel eine Zone sein, die durch ein chemisches Molekül ("Sonde") funktionalisiert wird, das dazu bestimmt ist, mit einem Target zu interagieren, das vermutlich in der interessierenden Flüssigkeit präsent ist. Das chemische Molekül (Sonde) kann zum Beispiel ausgewählt werden aus der Gruppe, die gebildet wird durch die Silanolfunktionsträgermoleküle, die organometallischen Komplexe (zum Beispiel Rhodium, verbunden mit Chiralphosphinen wie BINAP (Handelsmarke), DUPHOS (Handelsmarke), das bei Hydrogenierungsreaktionen eine Rolle spielt, oder auch Komplexe des Rutheniums, die zum Beispiel bei Synthesen von ungesättigten Ketonen eine Rolle spielt, und die Katalysatoren auf Metallbasis (zum Beispiel Palladium auf Siliciumdioxid, Aluminiumchlorid). Das jeder der chemischen Funktionen ("Sonden") entsprechende "Target" kann zum Beispiel ausgewählt werden aus der Gruppe, die gebildet wird durch Silane (zum Beispiel Tri-, Di-, Monochlorsilane), alkenische Verbindungen (zum Beispiel die Dehydroaminosäuren), allylische Alkoholderivate (zum Beispiel das 3-Buten-2-ol), aromatische gechlorte Verbindungen bzw. Chlorverbindungen (zum Beispiel Mono-, Di-, Trichlorphenol, Mischungen aus aromatischen Verbindungen und halogenierten Reagenzien (zum Beispiel Benzol und Brom oder Benzol und Acetylchlorid).

[0058] Die Arbeitszone kann zum Beispiel ein durch eine biologische Sonde funktionalisiertes Polymer wie das oben genannte umfassen, um ein entsprechendes Target zu fixieren, das in der interessierenden Flüssigkeit präsent sein könnte, um es zu detektieren, zum Beispiel optisch. Auf einem Substrat wie zum Beispiel den vorerwähnten kann man diese Arbeitszone gemäß den in dem Dokument [13] beschriebenen Methoden realisieren.

[0059] Ebenfalls als Beispiel kann die erfindungsgemäße Arbeitszone auch eine elektrische Interaktionszone sein, zum Beispiel eine elektrochemische Mikrozelle. Eine elektrochemische Mikrozelle ist eine Vorrichtung mit wenigstens zwei Elektroden, die vorzugsweise koplanar sind und eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode bilden. Sie kann auch eine Referenzelektrode besitzen. Diese Elemente sind dem Fachmann bekannt und die dem Fachmann bekannten Herstellungsverfahren sind zur Herstellung dieser Arbeitszone anwendbar, zum Beispiel das in dem Referenzdokument [8] beschriebene Verfahren. Die Arbeitszone bildet dann einen echten elektrochemischen Mikroreaktor, der die durch die Umrandungen festgehaltenen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit als Reaktionsmedien und noch genauer als elektrochemische Medien benutzt. Jeder elektrochemische Reaktor nach dieser ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung (Umrandung + Arbeitszone in Form einer elektrochemischen Mikrozelle + Tropfen der festgehaltenen interessierenden Flüssigkeit) kann benutzt werden, um jede dem Fachmann bekannte Reaktion und/oder elektrochemische Analyse durchzuführen.

[0060] Das diese Reaktoren benutzende Verfahren der Erfindung kann zum Beispiel dazu dienen, Reaktionen einer lokalisierten Elektropolymerisation eines oder mehrerer in dem Tropfen vorhandener Monomere (Polymerisations oder Copolymerisation) und/oder einer lokalisierten Elektropolymerisation eines oder mehrerer in dem

Tropfen der interessierenden Flüssigkeit vorhandenen chemischer Moleküle auf einer der Elektroden der Mikrozele durchzuführen. In diesem Beispiel kann die interessierende Flüssigkeit eine Flüssigkeit sein, die die zur Elektropolymerisation oder zur Elektropfropfung nötigen Reagenzien enthält. Die Polymerisation und die Pfropfung werden dann vorteilhafterweise lokalisiert in Höhe des Tropfen der in der Umrandung festgehaltenen interessierenden Flüssigkeit. Derartige lokalisierte Operationen können zum Beispiel zur Herstellung von Biochips oder Analysesystemen benutzt werden.

[0061] In einem besonderen Beispiel kann die elektrochemische Mikrozele der erfindungsgemäßen Vorrichtung zunächst benutzt werden, um die Arbeitszonen "herzustellen", und anschließend, um zum Beispiel diese Arbeitszonen für die Analyse der Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit zu benutzen. Wenn zum Beispiel die Arbeitszonen ein durch eine Sonde, zum Beispiel eine biologische Sonde funktionalisiertes organisches Polymer umfassen müssen, können sie durch Elektropolymerisation eines durch eine Sonde funktionalisierten leitenden Polymers hergestellt werden, zum Beispiel nach dem in dem Dokument [5] beschriebenen Verfahren. Die mit der Benutzung der erfindungsgemäßen Vorrichtung verbundene Besonderheit besteht darin, dass man die Festhaltezone benutzt, um auf lokalisierte Weise in jeder Arbeitszone einen ersten Tropfen einer ersten interessierenden Flüssigkeit festzuhalten, welche die für die Elektropolymerisation notwendigen Reagenzien enthält (organisches Monomer). Die Funktionalisierung durch die Sonde kann simultan zur Elektropolymerisation erfolgen, wobei die erste interessierende Flüssigkeit dann auch die Sonde enthält (zum Beispiel Monomer funktionalisiert durch die Sonde). Die Funktionalisierung kann auch nach der Elektropolymerisation mit Hilfe eines zweiten Tropfens einer (die Sonde enthaltenden) zweiten interessierenden Flüssigkeit erfolgen, festgehalten durch dieselben Umrandungen und aus diesem Grund in bzw. auf denselben Arbeitszonen lokalisiert. Außerdem können die so hergestellten Arbeitszonen anschließend getrocknet werden, und sie können, wieder dank ihrer Umrandung dazu dienen, einen Tropfen einer dritten zu analysierenden interessierenden Flüssigkeit festzuhalten, die ein Target enthält, das mit der Sonde interagiert (zum Beispiel komplementäre Oligonukleotide). Eine vierte interessierende Flüssigkeit kann noch benutzt werden, um die Sonde/Target-Interaktionen in den genannten Arbeitszonen zu analysieren (Detektion und/oder Dosierung), usw.

[0062] Der elektrochemische Mikroreaktor, der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden kann, kann zum Beispiel auch dazu dienen, qualitative und/oder quantitative elektrochemische Analysen von Analyten durchzuführen, die in den durch die Umrandungen festgehaltenen Tropfen enthalten sind. Er kann zum Beispiel auch dazu dienen, qualitative und/oder quantitative elektrochemische Analysen von einer molekularen Sonde/Target-Interaktion durchzuführen, wobei die Sonde in einer Arbeitszone befestigt wird und das Target sich in den Tropfen der festgehaltenen interessierenden Flüssigkeit befindet.

[0063] In einem besonderen Beispiel, wo die elektrochemische Mikrozele dazu benutzt wird, ein in einer Flüssigkeit präsent Target zu detektieren, zum Beispiel indem man eine Interaktion des Targets mit einer in der Arbeitszone befestigten spezifischen Sonde benutzt, ist es möglich, die Interaktion zum Beispiel mit Verstärkung des Signals durch enzymatische Akkumulierung in einem Tropfen einer durch die Festhaltezone festgehaltenen interessierenden Flüssigkeit zu detektieren, die ein enzymatisches Substrat enthält. Das Dokument [4] umfasst ein für diesen Detektionstyp nützliches Operationsprotokoll, anwendbar in Verbindung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung.

[0064] Die Detektion einer Sonde/Target-Interaktion in einer Arbeitszone kann eines der anderen dem Fachmann außer der Mikrozele bekannten Mittel mit einbeziehen, zum Beispiel eines der beiden Exposees in der vorliegenden Beschreibung, zum Beispiel ein optisches Verfahren. Die elektrochemische Mikrozele kann in diesem Fall nur dazu dienen, die Arbeitszonen "herzustellen", wobei die Detektion einer Sonde/Target-Interaktion anschließend durch ein anderes Mittel durchgeführt wird, oder eine Sonde/Target-Interaktion zu analysieren, wobei die Herstellung der Arbeitszonen durch ein anderes Verfahren, zum Beispiel eines der beiden dem Fachmann auf dem Gebiet der Biochips bekannten realisiert wird.

[0065] Generell, wenn in den Arbeitszonen eine Sonde verwendet wird, kann sie zum Beispiel aus der Gruppe ausgewählt werden, die gebildet wird durch ein Enzym, ein Enzymsubstrat, ein Oligonukleotid, ein Oligonukleosid, ein Protein, einen Membranrezeptor einer eukaryoten oder prokaryoten Zelle, einen Antikörper, ein Antigen, ein Hormon, einen Metaboliten eines lebenden Organismus, ein Toxin eines lebenden Organismus, Polynukleotid, Polynukleosid, komplementäre DNA, oder eine Mischung aus diesen. Selbstverständlich wird sie in Abhängigkeit des Targets ausgewählt, mit dem sie interagieren soll.

[0066] Ebenfalls als Beispiel kann die Arbeitszone aktive oder Messvorrichtungen besitzen, etwa Sensoren oder Aktoren. Diese Vorrichtungen können die oben genannten Arbeitszonen ergänzen oder exklusiv sein, abhängig von der Zielsetzung bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung. Die aktiven oder Messvorrichtungen

gen befinden sich vorteilhafterweise im Zentrum der Festhaltezone. Wenn eine Arbeitszone einen Sensor umfasst, kann er zum Beispiel ausgewählt werden aus der Gruppe, die elektrische, magnetische, elektrostatische, mechanische (zum Beispiel Druckfühler), thermische (zum Beispiel Temperaturfühler), optische (zum Beispiel optische Detektionsvorrichtungen) oder chemische Sensoren umfasst. Wenn die Arbeitszone einen Aktor umfasst, kann er zum Beispiel ausgewählt werden aus der Gruppe, die optische (Lichtquellen), elektrische, magnetische, elektrostatische, mechanische (mechanische Verschiebung), thermische (Heizwiderstand) und chemische Aktoren umfasst. Solche Sensoren und Aktoren, verwendbar für die Anwendung der vorliegenden Erfindung, sowie ihre Herstellungsverfahren sind dem Fachmann bekannt, insbesondere auf dem Gebiet der Bi-chips.

[0067] Zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die wenigstens eine Arbeitszone eine im Wesentlichen gegenüber der interessierenden Flüssigkeit nicht benetzbare oder benetzbare Zone sein. Die Erfinder haben nämlich im Laufe ihrer Untersuchungen festgestellt, dass die Benetzbarkeit der Arbeitszone nicht bestimmend ist für das Funktionieren des erfindungsgemäßen Verfahrens. Sie haben nämlich völlig unerwartet festgestellt, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch funktionieren kann, wenn die Arbeitszone nicht benetzbar ist gegenüber der interessierenden Flüssigkeit, vorausgesetzt der festgehaltene Tropfen bedeckt die genannte Arbeitszone wenigstens partiell.

[0068] Die Dimensionen einer Festhaltezone können stark variieren in Abhängigkeit von der vorgesehenen Anwendung und von ihrer Art (Typ der Festhaltezone, eine oder mehrere Arbeitszonen pro Festhaltezone, eine oder mehrere Arbeitszonen auf der aktiven Fläche usw.). Für ein Chiplabor oder ein Mikrosystem kann die Festhaltezone einen Durchmesser von 5 μm bis 500 μm haben. Wenn die Festhaltezone streifenförmig ist, kann dieser Streifen eine Breite von 1 bis 500 μm und eine Dicke in Bezug auf die aktive Fläche von 0 bis 500 μm haben. Die Arbeitszone, deren Durchmesser hauptsächlich von der Festhaltezone abhängt (der Tropfen muss diese Arbeitszone wenigstens partiell bedecken) kann zum Beispiel – mit den oben genannten Dimensionen der Festhaltezone – einen derartigen Durchmesser haben, dass er die Festhaltezone, die ihn umgibt, berührt oder nicht berührt. Zum Beispiel kann die Arbeitszone einen Durchmesser von 5 μm bis 5 mm haben.

[0069] Nach der Erfindung – wenn die Festhaltezone die Form einer Umrandung aufweist (s. [Fig. 11](#) bezüglich der Referenzen) – kann die aktive Fläche auch folgendermaßen definiert werden:

Bezugszeichenliste

- D** Innendurchmesser der Tropfen mit zum Beispiel $15 \mu\text{m} \leq D \leq 5 \text{ mm}$;
- L** Abstand zwischen Tropfen;
- e** breitester Querschnitts der Wand mit zum Beispiel $20 \mu\text{m} \leq e \leq 100 \mu\text{m}$; und
- h** Höhe der Wand mit zum Beispiel $5 \mu\text{m} \leq h \leq 20 \mu\text{m}$;

mit $h/D < 0,15$; $e/D < 0,33$; und $h/L < 0,3$.

[0070] In den Bereichen der Chiplabors und der Mikrotechnologien, wo die charakteristischen Durchmesser der Festhaltezone ungefähr 100 μm beträgt, hat die Ausrichtung des Gehäuses keine Bedeutung, denn die Schwerkraft ist gegenüber den durch die Festhaltezone auf den Tropfen ausgeübten Festhaltekräften. Hingegen, bei Ausführungen der vorliegenden mit höheren Größenmaßstäben, wird das verwendete Gehäuse selbstverständlich vorzugsweise horizontal angeordnet, mit nach oben gekehrter aktiver Fläche zur Ausbildung der nach oben gewandten Festhalte- und Arbeitszonen.

[0071] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann folgende zwei Schritte umfassen:

- partielle oder totale Befüllung des Gehäuses mit einer interessierenden Flüssigkeit, so dass die interessierende Flüssigkeit die Rückhaltezone(n) bedeckt, dann
- Entleerung der interessierenden Flüssigkeit aus dem Gehäuse.

[0072] Nur die Festhaltezone(n) halten einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit fest, da die aktive Fläche nicht benetzbar ist.

[0073] Bei der Durchführung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung in den verschiedenen Anwendungen kann man sukzessiv eine kollektiv ablaufende Operation und dann in jedem Tropfen Einzeloperationen vorsehen. So ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren in einer ersten kollektiv genannten Operation den Übergang von einem in das genannte Gehäuse injizierten fluidischen Strom bzw. Strahl der interessierenden Flüssigkeit zu einer Matrix aus voneinander unabhängigen Tropfen, oder Mikrovolumen. Anschließend können in-

dividuell dem Fachmann bekannte Detektions- und/oder chemische oder biochemische Reaktionsverfahren angewendet werden (Einzeloperation), parallel oder sukzessiv in jedem der durch die Festhaltezone zurückgehaltenen Tropfen, um in der interessierenden Flüssigkeit präsenste Targets zu detektieren oder zu analysieren.

[0074] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens in den Chiplabors und Mikrostemen für die Chemie oder die Biologie, zum Beispiel für die Analyse und/oder die Detektion von Targetanalyten, präsent in einer zu analysierenden interessierenden Flüssigkeit. Die Chiplabors und Mikrosysteme können selbst hergestellt werden, indem man das erfindungsgemäße Verfahren anwendet, so wie dies der Fachmann bei der Lektüre der vorliegenden Beschreibung verstehen wird.

[0075] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion wenigstens eines Moleküls, das in einer interessierenden Flüssigkeit vorhanden sein könnte, wobei das genannte Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- lokalisierte Verteilung von Tropfen der interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche in einem Gehäuse gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, und
- elektrochemische Detektion des wenigstens einen eventuell präsenten Moleküls in den genannten Tropfen.

[0076] Das in diesem Verfahren verwendete Gehäuse umfasst ein Substrat, eine aktive Fläche, Festhaltezone, arrangiert mit Arbeitszone, die elektrochemische Mikrozellen sind. Das Substrat, die Strukturierung zur Bildung der Arbeitszone, die Behandlung der Fläche des Substrats, dazu bestimmt, sie im Wesentlichen unbenetzbar zu machen, und die Strukturierung der Fläche, dazu bestimmt, die Festhaltezone eines Tropfens der interessierenden Flüssigkeit zu bilden, werden weiter unten definiert.

[0077] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein optisches Detektionsverfahren wenigstens eines Moleküls, das in einer interessierenden Flüssigkeit präsent sein könnte, wobei das genannte Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- eine lokalisierte Verteilung von Tropfen der interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche in einem Gehäuse nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, und
- Detektion – in dem Gehäuse – in wenigstens einem der Tropfen des wenigstens einen eventuell präsenten Moleküls mittels eines optischen Detektors.

[0078] Das in diesem Verfahren verwendete Gehäuse umfasst ein Substrat, eine aktive Fläche, Festhaltezone, arrangiert mit Arbeitszone, wobei diese letzteren optische Detektoren sind. Das Substrat, die Strukturierung zur Bildung der Arbeitszone, der optische Detektor, die Behandlung der Fläche des Substrats, dazu bestimmt, sie im Wesentlichen unbenetzbar zu machen, und die Strukturierung der Fläche, dazu bestimmt, die Festhaltezone eines Tropfens der interessierenden Flüssigkeit auszubilden, werden weiter unten definiert.

[0079] Die optische Detektion kann realisiert werden nach einer Durchführung einer elektrochemischen Operation in den festgehaltenen Tropfen (in dem Fall, wo die Arbeitszone zusätzlich zu dem optischen Detektor eine elektrochemische Zelle umfassen), oder einer chemischen oder biochemischen Operation in dem festgehaltenen Tropfen (zum Beispiel eine enzymatische Reaktion, die eine Sonde/Target-Interaktion in der durch den Tropfen der interessierenden Flüssigkeit bedeckten Arbeitszone zeigt).

[0080] Nach der Erfindung können Detektionen verschiedener eventuell in der interessierenden Flüssigkeit präsenster Moleküle parallel, simultan oder sukzessiv in verschiedenen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit auf der genannten aktiven Fläche in dem Gehäuse stattfinden.

[0081] Nach der Erfindung kann der wenigstens eine zu detektierende Analyt zum Beispiel unter den biologischen oder chemischen Molekülen ausgewählt werden. Die biologischen Moleküle können zum Beispiel aus der Gruppe ausgewählt werden, die ein Enzym, ein Enzymsubstrat, ein Oligonukleotid, ein Oligonukleosid, ein Protein, einen Membranrezeptor einer eukaryoten oder prokaryoten Zelle, einen Antikörper, ein Antigen, ein Hormon, einen Metaboliten eines lebenden Organismus, ein Toxin eines lebenden Organismus, ein Nukleotid, ein Nukleosid, eine komplementäre DNA umfasst. Das chemische Molekül kann jedes Molekül sein, das qualitativ und/oder quantitativ analysiert werden muss.

[0082] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Elektropolymerisationsverfahren von in einer interessierenden Flüssigkeit präsenten Molekülen, wobei das genannte Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- lokalisierte Verteilung von Tropfen der interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche in einem Ge-

häuse nach dem Verfahren der Erfindung, und

– Elektropolymerisation in dem genannten Gehäuse, in den Tropfen der interessierenden Flüssigkeit, der zu polymerisierenden Moleküle.

[0083] Das in dem Verfahren benutzte Gehäuse umfasst ein Substrat, eine aktive Fläche, Festhaltezone arrangiert mit Arbeitszonen, wobei diese letzteren elektrochemische Mikrozellen sind. Das Substrat, die Strukturierung zur Bildung dieser Arbeitszone, die Behandlung der Fläche des Substrats, dazu bestimmt, sie im Wesentlichen unbenetzbar zu machen, und die Strukturierung der Fläche, dazu bestimmt, die Festhaltezone eines Tropfens der interessierenden Flüssigkeit auszubilden, werden weiter unten definiert. Das Polymer kann zum Beispiel irgend eines der zur Herstellung von Biochips verwendeten Polymere sein, zum Beispiel Polypyrrol, Polyanilin, Polyzulene, Polythiophen, Polyindol, Polyfuran, Polyfluoren.

[0084] Der Hauptgegenstand der Erfindung ist ein Verfahren, das die Bildung einer Matrix von hoher Dichte aus Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit auf einer Fläche in einer vorzugsweise geschlossenen nur Fluidanschlüsse aufweisenden Fluidkammer (Gehäuse) ermöglicht. Es ist also kein äußeres Tropfenspendesystem (Tropfenverteilungsapparat) nötig. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht, eine solche Tropfenmatrix sehr leicht und sehr schnell zu realisieren, und dies zu geringen Kosten (keine Tropfenverteilungsapparat). Alle möglichen Anwendungen des erfindungsgemäßen Verfahrens profitieren von diesem Vorteil.

[0085] Die elementarste Anwendung des Verfahrens der Erfindung ist die Herstellung von Chiplabors oder Mikrosystemen für die Analyse. Die interessierende Flüssigkeit kann alle zur Herstellung von Chiplabors und Mikrosystemen notwendigen chemischen Elemente enthalten, zum Beispiel ein für seine lokale Polymerisation an dem Platz jedes Tropfens auf der aktiven Fläche lokalisiertes Polymer, ein solches Monomer, funktionalisiert durch eine Sonde, eine auf einem Polymer lokalisiert an dem Platz jedes Tropfens der interessierenden Flüssigkeit zu fixierende Sonde, lokalisiert auf eine Fläche zu bringende chemische und/oder biochemische Reagenzien, Marker, usw.

[0086] Bei Chemie- oder Biochemieverfahren und/oder bei Analyseverfahren mit mehreren Schritten, die das erfindungsgemäße Verfahren anwenden, müssen nicht alle Schritte zur Bildung von Tropfen führen. Tatsächlich hindert nichts daran, dass gewisse Schritte realisiert werden, indem man die Gesamtheit der Festhaltezone mit einer Flüssigkeit flutet und dass das Gehäuse von dieser Flüssigkeit so entleert, dass keine durch die Festhaltezone festgehaltenen Tropfen zurückbleiben (indem man zum Beispiel ein Druckgas in das Gehäuse bläst, eine heftige Schüttelbewegung ausführt, usw.).

[0087] Es ist außerdem möglich, dank der sie umgebenden Festhaltezone sukzessive verschiedene Tropfen einer oder mehrerer interessierender Flüssigkeiten in einer selben Arbeitszone festzuhalten. Jede interessierende Flüssigkeit kann ein Reagens oder mehrere Reagenzien enthalten, die zum Beispiel notwendig sind, um einen der Schritte eines chemischen oder biochemischen Verfahrens durchzuführen, zum Beispiel um die Arbeitszonen herzustellen und/oder um Analysen durchzuführen. Das Aufeinanderfolgen verschiedener Tropfen in einer selben Arbeitszone ermöglicht zum Beispiel, verschiedene aufeinanderfolgende Schritte eines dank des erfindungsgemäßen Verfahrens durchgeführten Verfahrens in den von ihren Erfassungszonen umgebenen Arbeitszonen zu realisieren. Die Gesamtheit dieser Schritte des Verfahrens ist folglich vorteilhaft in den Arbeitszonen lokalisiert.

[0088] Diese Erfindung kann auf sehr verschiedenen Gebieten angewendet werden. So können die Chemie- und Biologie-Mikrosysteme, üblicherweise Chiplabor (LOC) oder Totalanalyse-Mikrosystem μ (TAS) genannt, in allen Fällen aus dieser Erfindung Nutzen ziehen, wo es notwendig ist, auf einer Fläche mit einer hohen Dichte von Plätzen zu arbeiten und sehr schnell einen kollektiven Schritt und dann einen individuellen Schritt auszuführen. Zum Beispiel sind die DNA- oder Protein-Chips von dieser Erfindung betroffen. Außerdem kann diese Erfindung überall dort angewendet werden, wo es notwendig ist, kontrollierte Matrizen von Tropfen oder Produkten zu bilden: lokalisierte Trocknung von pharmazeutischen Produkten, Bildung von Farbflecken ("Spots"), lokalisierte Pfropfung von qualitativ und/oder quantitativ zu analysierenden Molekülen. Außerdem ermöglicht dieses neue Verfahren, mit sehr kleinem Volumen zu arbeiten und daher Anwendungen zu realisieren, wo man mit Reagenzien sparsam umgehen muss: zum Beispiel Homogenkatalyse, Moleküle der pharmazeutischen Industrie mit hohem Mehrwert.

[0089] Weitere Merkmale und Vorteile erfährt auch der Fachmann aus der nachfolgenden Beschreibung von erläuternden und nicht einschränkenden Ausführungsbeispielen, bezogen auf die beigefügten Figuren.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0090] Die [Fig. 1](#) ist ein Schema, das im Querschnitt ein Anwendungsbeispiel des Verfahrens der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer Tropfenmatrix zeigt.

[0091] Die [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung von verschiedenen möglichen Realisierungsarten des erfindungsgemäßen Verfahrens mit verschiedenen geschlossenen Gehäusen, die sich insbesondere durch die Anordnung der Eingangs- und Ausgangsöffnungen der interessierenden Flüssigkeit unterscheiden.

[0092] Die [Fig. 3](#) ist ein schematischer Querschnitt einer zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendbaren Vorrichtung, bei der die Einrichtungen zum Einspeisen der interessierenden Flüssigkeit in das geschlossene Gehäuse und zum Entleeren der interessierenden Flüssigkeit aus dem Gehäuse eine selbe Öffnung dieses Gehäuses umfassen.

[0093] Die [Fig. 4](#) ist eine Draufsicht einer aktiven Fläche (S), realisiert aufgrund von experimentellen Fotografien, welche die Bildung einer Tropfenmatrix nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung darstellt: links die Fläche ohne Tropfen vor der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, und rechts die Fläche mit der Matrix der von den Festhaltezone (Zc) zurückgehaltenen, Tropfen (g), nachdem die interessierende Flüssigkeit in dem letzten Schritt des Verfahrens aus dem Gehäuse entleert worden ist.

[0094] Die [Fig. 5](#), [Fig. 6](#) und 7a) bis 7c) zeigen schematisch verschiedene Formen von Festhaltezone, geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren, insbesondere wenn diese Zonen eine Arbeitszone umgeben.

[0095] Die [Fig. 8](#) zeigt schematisch eine zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignete Vorrichtung, bei der die Arbeitszone ein elektrochemisches Mikrosystem ist.

[0096] Die [Fig. 9a](#)) und [9b](#)) sind zwei Fotografien, welche die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens bei einer Vorrichtung zeigen, deren Arbeitszone eine elektrochemische Mikrozelle ist: die [Fig. 9a](#)) ohne einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit und die [Fig. 9b](#)) mit einem Tropfen der interessierenden Flüssigkeit.

[0097] Die [Fig. 10](#) ist ein Diagramm, das die Detektion eines Produkts einer enzymatischen Reaktion im Innern eines festgehaltenen Tropfens in Höhe einer Arbeitszone durch die Anwendung der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0098] Die [Fig. 11](#) ist eine schematische Schnittdarstellung zweier Typen von Töpfen: links die Töpfe nach dem Stand der Technik und rechts die Töpfe nach der vorliegenden Erfindung.

BEISPIELE

[0099] In diesen Beispielen ist die Strukturierung des Substrats zur Bildung der Festhaltezone von Tropfen der interessierenden Flüssigkeit generell ringförmig, so dass sich im Zentrum jeder Festhaltezone eine Arbeitszone befindet.

Beispiel 1: Herstellungsbeispiel einer durch eine wässrige interessierenden Flüssigkeit nicht benetzbaren aktiven Fläche

[0100] Ein Substrat aus Silicium (Si) mit einer oberen Schicht aus Siliciumoxid (SiO_2) von 300 nm wird behandelt mit einem hydrophoben Silan (1H, 1H, 2H, 2H Perfluordecyl-Trichlorsilan), um die Fläche hydrophob zu machen.

[0101] Das Protokoll ist das folgende: nach der Behandlung in einer Mischung aus Natronlauge/Wasser/Ethanol mit 3,5 M während 2 Stunden bei Umgebungstemperatur, um die Silanolplätze zu erzeugen, wobei das Substrat während 10 Minuten bei Umgebungstemperatur in einer Mischung aus anhydriischem Toluol und hydrophobem Silan mit 9 mM Silankonzentration. Es wird anschließend mit Toluol gewaschen. Anschließend wird das Substrat für eine Stunde in einen Ofen mit 110°C gegeben. Der gemessene Kontaktwinkel mit dem Wasser beträgt 110° .

Beispiel 2: Herstellung einer Festhaltezone für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, gebildet durch ein auf der aktiven Fläche abgeschiedenes Trägermaterial

[0102] Auf einem Si-Substrat mit einer SiO₂-Schicht von 300 nm Durchführung von dem Fachmann bekannten Standardschritten:

- Abscheiden von 300 nm Platin (Pt) durch Sputtern;
- Photolithographie in einem photosensiblen Resist mit Öffnung eines ringförmigen Musters, verbunden mit einem Stromzuführungsstreifen;
- in einem Plasmareaktor komplettes Ionenätzen des Pt in den Zonen ohne Resist;
- Entfernen des Resists in einem Salpetersäurebad;
- in einem Plasmareaktor chemische Gasphasenabscheidung von 500 nm SiO₂;
- Photolithographie in einem photosensiblen Resist mit Öffnung des ringförmigen Musters; und
- in einem Plasmareaktor komplettes Ionenätzen von 500 nm SiO₂ in den Zonen ohne Resist; und
- Entfernen des Resists in einem Salpetersäurebad.

[0103] Die **Fig. 7a** ist eine schematische Darstellung einer ringförmigen Festhaltezone, gebildet durch ein Trägermaterial und eine hergestellte Arbeitszone umgebend.

Beispiel 3: Herstellung einer Festhaltezone für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, gebildet durch schwarzes Silicium

[0104] Auf einem Si-Substrat (alle diese Schritte sind dem Mikroelektronik-Fachmann bestens bekannt):

- Photolithographie in einem photosensiblen Resist mit Öffnung eines kranzförmigen Musters;
- in einem Plasmareaktor reaktives Ionenätzen von ungefähr 3 µm Silicium gemäß dem in dem Dokument [11] beschriebenen Protokoll zur Bildung des schwarzen Siliciums;
- Reinigen der Fläche am Ende des Ätzens in einem Plasmareaktor Plassys MDS 150 (Firma Plassis, Frankreich) unter den folgenden Bedingungen: Leistung 500 W, Reaktionszeit 4 Minuten, Druck 21,33 Pa (160 mTorr), Sauerstoffdurchsatz 25 cm³/min, Umgebungstemperatur; und
- Entfernen des Resists in einem Salpetersäurebad.

[0105] Das in diesen bestimmten Zonen gebildete schwarze Silicium ist stark hydrophil, während das Silicium gegenüber wässrigen interessierenden Flüssigkeit (Proben) im Wesentlichen unbenetzbar ist.

[0106] Die **Fig. 5** und **Fig. 6** zeigen schematisch verschiedene Sensorenzonen, ausgebildet um ihre Arbeitszone(n) herum. Die Feinstrukturierung ist so realisiert worden, dass ein Streifen aus schwarzem Silicium erzeugt wurde, offen oder geschlossen, der die Festhaltezone (Zc) bildet, um eine Zone herum, die zur Bildung der Arbeitszone (Zt) vorgesehen ist. In der **Fig. 6** ist eine Festhaltezone um zwei (rechts) oder vier (links) Arbeitszonen herum dargestellt.

[0107] Die geätzte Zone erfordert keine andere bzw. weitere chemische Modifikation. Diese erfindungsgemäße Vorrichtung ist dazu bestimmt, mit wässrigen interessierenden Flüssigkeit benutzt zu werden.

Beispiel 4: Herstellung einer Festhaltezone in Form einer benetzbaren Elektrode, nutzbar für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens

4.1 FESTHALTEZONE IN FORM EINER FESTHALTEELEKTRODE:

[0108] Auf einem Si-Substrat mit einer SiO₂-Schicht von 300 nm werden folgende Schritte ausgeführt:

α) Ausführung derselben Schritte wie in Beispiel 2, um eine Elektrode (Trägermaterial) auf einer aktiven Fläche abzuscheiden.

β) Realisierung der gegenüber der interessierenden Flüssigkeit unbenetzbaren aktiven Fläche auf dem gesamten Substrat, um es hydrophob zu machen, wie in Beispiel 1. Die Elektrode wird anschließend chemisch gereinigt mit einer Natronlauge/Wasser/Ethanol-Lösung. Dazu wird ein Tropfen einer Natronlauge/Wasser/Ethanol-Lösung mit 3,5 M für zwei Stunden auf den Elektroden angebracht, bei Umgebungstemperatur. Anschließend werden die Elektroden gewaschen.

γ) In zusätzlichen Versuchen wurde auf der Elektrode eine hydrophile Barriere mittels Elektropolymerisation unter potentiostatischen Bedingungen eines Alkoholfunktionsträger-Pyrrols (Benetzungsfunktionen gegenüber einer wässrigen interessierenden Flüssigkeit) in Position 3 realisiert. Dieses Polypyrrol wird aus einer Lösung des Typs Pyrrol-3-Ethanol 100 mM und Lithiumperchlorat (LiClO₄) 0,5 M erzeugt. Ein Potential von 1 V

vs bzw. gegen Ag/AgCl/Cl wird 5 Sekunden lang angewendet. Der gemessene Kontaktwinkel mit dem Wasser auf der Elektrode beträgt 53°.

[0109] Die **Fig. 7a** ist eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, hergestellt nach dem Protokoll dieses Beispiels. In dieser Figur wird die die Arbeitszone (Zt) umgebende Festhaltezone (Zc) durch eine Elektrode gebildet, die mit einem Benetzungsfunktionstrager-Polypyrrol überzogen (Alkoholfunktionen) ist.

4.2 FESTHALTEZONE IN FORM EINES BENETZUNGSSTREIFENS:

[0110] Auf einem Si-Substrat mit einer SiO₂-Schicht von 300 nm werden folgende Schritte realisiert:

- α) Realisierung der gegenüber der interessierenden Flüssigkeit unbenetzbaren aktiven Fläche auf dem gesamten Substrat, um es hydrophob zu machen, wie in Beispiel 1.
- β) Photolithographie in einem photosensiblen Resist des negativen Typs (Referenz NFR-015 der Firma Shipley) mit einer Öffnung eines kranzförmigen Musters, um die Festhaltezone (oder Benetzungsstreifen) zu bilden;
- γ) Vernichtung des hydrophoben Silans in den offenen Mustern des photosensiblen Resists in einem Plasma-Reaktor Plassys MDS 150 (Firma Plassis, Frankreich) unter den folgenden Bedingungen: Leistung 500 W, Reaktionszeit 4 Minuten, Druck 21,33 Pa (160 mTorr), Sauerstoffdurchsatz 25 cm³/min, Umgebungstemperatur; und
- δ) Realisierung der Festhaltezone durch Silanisierung mit einem Aminfunktionen tragenden Silan (Benetzungsfunktionen für die interessierende Flüssigkeit). Das Substrat wird in eine Lösung aus γ-Aminopropyltriethoxysilan mit 10 Volumenprozent in Ethanol gegeben. Nach einer Nacht bei Umgebungstemperatur wird das Substrat mit Ethanol gewaschen und schließlich für drei Stunden in einen Ofen mit 110°C gegeben.

Beispiel 5: Herstellung von durch Umrandungen gebildete Festhaltezone zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens

[0111] Auf einer neuen Siliciumplatte realisiert man einen Lithographieschritt mit einem dicken photosensiblen Resist Clariant AZ4562 (Handelsmarke) wie folgt:

- Abscheiden eines Haftförderers, hier Hexamethylendisilazan, im Ofen bei 120°C,
- Resistbeschichtung mit der Schleuder (tournette) bei 1000 U/min während 30 s mit einer Beschleunigung von 200 U/min/s,
- Tempern auf Heizplatte bei 115°C während zwei Minuten,
- Belichten auf Belichtungsmaschine Karl Süss MA750 (Handelsmarke) während 50 s im Unterbrechungsbetrieb (5 × 10 Sekunden mit 5 Sekunden Pause) durch eine Maske hindurch,
- Entwickeln in einer Lösung Shipley MF319 (Handelsmarke), verdünnt im Verhältnis 1:3 mit entionisiertem Wasser,
- Waschen in entionisiertem Wasser und Trocknen unter einem Stickstoffstrom,
- Tempern auf Heizplatte bei 115°C während drei Minuten, dann bei 150°C während 1 Minute,
- Dickenmaß: 3 µm.

[0112] Bei der zum Belichten verwendeten Maske stellen alle Muster Ringe dar, deren Wände eine Breite von 35 µm haben, mit variablen Kombinationen zwischen ihrem Durchmesser (100 bis 1000 µm) und dem Abstand zwischen den Mittelpunkten zweier Umrandungen (Kränze) (50 bis 1000 µm).

[0113] Es konnten leicht 3025 Töpfe (c) auf einer Fläche von 1 cm² realisiert werden.

[0114] Die **Fig. 11** zeigt im rechten Teil die in Form von Umrandungen erhaltenen Festhaltezone. Diese Festhaltezone bilden Töpfe (c), fähig einen Tropfen (g) einer interessierenden Flüssigkeit festzuhalten.

Beispiel 6: Herstellung von durch eine Sonde funktionalisierten, in dem erfindungsgemäßen Verfahren benutzbaren Arbeitszonen,

[0115] In diesem Beispiel wird eine vier Elektroden umfassende Arbeitszone hergestellt und benutzt. Auf einem Si-Substrat mit einer SiO₂-Schicht von 300 nm werden dem Mikroelektronik-Fachmann bekannte Standardherstellungsschritte realisiert:

- Abscheiden von 300 nm Platin (Pt) durch Sputtern;
- Photolithographie in einem photosensiblen Resist mit Öffnung der Muster der Mikrozelle und der Stromzuführungstreifen;
- in einem Plasmareaktor komplettes Ionenätzen des Pt in den Zonen ohne Resist;

- Entfernen des Resists in einem Salpetersäurebad;
- in einem Plasmareaktor chemische Gasphasenabscheidung von 500 nm SiO₂;
- Photolithographie in einem photosensiblen Resist mit Öffnung der Muster der Elektroden der Mikrozelle und der Festhalteelektrode;
- in einem Plasmareaktor komplettes Ionenätzen von 500 nm SiO₂ in den Zonen ohne Resist; und
- Entfernen des Resists in einem Salpetersäurebad.

[0116] Die Arbeitselektrode (We) (s. [Fig. 8](#)), die Gegenelektrode (CE) und die Zusatzelektrode zur Bildung der Festhaltezone (Zc) sind aus Platin (Abscheidung ca. 5000 Å).

[0117] Eine Referenzelektrode Ag/AgCl/Cl⁻ (Rf) ist ebenfalls präsent (s. [Fig. 8](#)). Diese Elektrode wird hergestellt durch Abscheidung von Silber auf dem Platin gemäß folgendem Protokoll:

- Bereitstellung von 10 ml Lösung mit AgNO₃ 0,2 M, KI 2 M, Na₂S₂O₃ 0,5 mM.
- ein Potential von -0,65 V vs bzw. gegen gesättigte Kalomelektrode wird während 90 s (verfolgt mittels Chronoamperometrie an die Referenzelektrode gelegt. Man erhält eine grau-weiße Abscheidung. Anschließend wird die Arbeitszone mit Wasser gewaschen; und
- Die Arbeitszone mit der vorhergehend modifizierten Elektrode wird in eine HCl-Lösung 0,1 M getaucht und einem Potential von 0,5 V vs bzw. gegen gesättigte Kalomelektrode während 30 s ausgesetzt, um die Silberabscheidung zu chlorieren. Das Substrat wird anschließend mit Wasser gewaschen.

[0118] Die Gesamtheit jeder Arbeitszone ist gemäß dem in dem Beispiel 1 beschriebenen Protokoll mit einem hydrophoben Silan silanisiert worden.

[0119] Die hydrophile Barriere wird auf der Festhalteelektrode gemäß dem in dem Beispiel 4.1-δ beschriebenen Protokoll realisiert.

[0120] Die Gegenelektrode (CE) wird anschließend funktionalisiert mit einem leitfähigen Pyrrol/Pyrrol-Copolymer in Position 1 durch die biologische Funktion (hier ein Sondenoligonukleotid) [5]. Die Elektropolymerisation ist auf der Gegenelektrode der Arbeitszone lokalisiert.

[0121] Um diese Arbeitszone zu testen, wird das Sondenoligonukleotid hybridisiert mit einem Targetoligonukleotid (100 pM), Träger eines enzymatischen Markers (HRP "Horse Radish Peroxidase") in einem Puffer (NaCl 1 M/Tris 10 mM/EDTA 1 mM/Triton X100 0,05%). Nach Waschungen in demselben Puffer aber ohne Triton wird die Entwicklungslösung (OPD + H₂O₂ + Phosphat-Citrat-Puffer 50 mM) in die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung eingespeist, dann abgesaugt. Eine Fraktion der Flüssigkeit(en) bleibt lokalisiert in der Arbeitszone zurück, wie die Fotografien der [Fig. 9](#) zeigen:

- links, bevor die Vorrichtung mit der Entwicklungslösung bedeckt wird, sieht man die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ohne den Tropfen; und
- rechts, nachdem die Entwicklungslösung abgesaugt worden ist, sieht man die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung, wie sie dank ihrer Festhaltezone (hydrophiler Streifen) einen Tropfen der Entwicklungslösung zurückgehalten hat.

[0122] Nach 5 Minuten Entwicklung wird das enzymatische Produkt auf der Messelektrode (WE) durch gepulste Differentialvoltamperometrie detektiert. Die Resultate dieser Detektion werden durch das Diagramm der beigefügten [Fig. 10](#) dargestellt.

[0123] Die [Fig. 8](#) ist eine schematische Darstellung einer elektrochemischen Mikrozelle einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, hergestellt gemäß dem Protokoll dieses Beispiels. In dieser Figur wird die Arbeitszone gebildet durch die Messelektrode oder Arbeitselektrode (WE), das leitfähige Oligonukleotidträger-Polymer (Po), abgeschieden auf der Gegenelektrode (CE), und die Festhaltezone (Zc), gebildet durch die äußerste Elektrode, auf der das Trägerpolymer der Alkoholfunktionen abgeschieden worden ist (Pm). Das Ganze ist realisiert auf der unbenetzbaren aktiven Fläche (Sa).

Beispiel 7: Herstellung eines zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Gehäuses

[0124] Man realisiert mittels Guss in einer Glasform eine hohle Haube aus Polydimethylsiloxan (PDMS) mit einem quadratischen Muster mit Überdicke 1 mm.

[0125] Auf einer planen Vorrichtung, wie den in dem vorhergehenden Beispiel hergestellten, wird diese hohle Haube hermetisch befestigt durch Klebung mit dem durch UV-Belichtung vernetzenden Klebstoff (VITRALIT

6181). Die Anschlüsse für die Eintritte und Austritte der Fluids werden realisiert, indem man die Haube mit Nadeln von geringem Durchmesser durchbohrt. Die Eintrittsnadel wird mit Fluidförderrohren und einer mit interessierender Flüssigkeit gefüllten Spritze verbunden. Das fertige Ganze wird auf Lecks getestet, wobei klar ist, dass die Flüssigkeit nur durch die zu diesem Zweck vorgesehenen Anschlüsse fließen darf.

[0126] Die [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung des in diesem Beispiel hergestellten Gehäuses.

[0127] Andere Anordnungen der Eintritts- und Austrittsanschlüsse (o, s) zum Einleiten und Entleeren einer interessierenden Flüssigkeit können leicht realisiert werden, und die [Fig. 2](#) zeigt schematische Darstellungen unterschiedlicher Gehäuse. In dieser Figur stellen B1, B2 und B3 drei Typen von erfindungsgemäßen Gehäusen mit unterschiedliche angeordneten Eingangs- und Ausgangsöffnungen (o) und (s) dar. Sb, Sa, Zc, Zt haben dieselbe Bedeutung wie in den vorhergehend genannten Figuren. Die verschiedenen das erfindungsgemäße Gehäuse bildenden Elemente sind in den drei Schemata auf gleiche Weise dargestellt.

[0128] Die [Fig. 4](#) ist eine schematische Draufsicht einer aktiven Fläche, die zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Gehäuses benutzt wird. Diese aktive Fläche umfasst 12 Festhaltezone und 12 entsprechende Arbeitszone. Die aktive Fläche ist unbenetzbar gegenüber dem Substrat (gegenüber der interessierenden Flüssigkeit). Verschiedene Formen von Festhaltezone, geeignet zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, sind hergestellt worden, insbesondere ring- oder scheibenförmige. Sie sind in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) dargestellt.

Beispiel 8: Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur lokalisierten Verteilung von Tropfen und Resultate

[0129] Die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird mit Gehäusen getestet, hergestellt gemäß dem vorhergehenden Beispiel 7, mit den verschiedenen Festhaltezone gemäß den obigen Beispielen 2 bis 6.

[0130] Die [Fig. 1](#) zeigt die Funktionsweise eines geschlossenen Gehäuses mit einer ersten Öffnung (o) zum Einspeisen der interessierenden Flüssigkeit in das Gehäuse, und einer zweiten Öffnung (s) zum Entleeren der interessierenden Flüssigkeit aus dem Gehäuse: interessierende Flüssigkeit E wird solange durch die erste Öffnung (o) eingespeist (oberes Schema), bis das Gehäuse voll ist (mittleres Schema) und dann durch die zweite Öffnung (s) entleert (unteres Schema). Die Einspeiseeinrichtung ist eine Spritze, und die Entleereinrichtung ist eine Spritze. Dank der Festhaltezone (Zc) erhält man auf der aktiven Fläche eine Matrix von Tropfen (g), wie dargestellt in der [Fig. 4](#).

[0131] Die [Fig. 3](#) zeigt die Funktionsweise eines geschlossenen Gehäuses mit einer ersten Öffnung (o) zum Einspeisen der interessierenden Flüssigkeit in das Gehäuse und zum Entleeren der interessierenden Flüssigkeit aus dem Gehäuse, und einer zweiten Öffnung (s), die dazu dient, die in dem Gehäuse enthaltene Luft austreten zu lassen, wenn die interessierende Flüssigkeit in das Gehäuse eingespeist wird, beziehungsweise Umgebungsluft eintreten zu lassen, wenn die interessierende Flüssigkeit aus dem Gehäuse entleert wird. Die interessierende Flüssigkeit E wird durch eine einzige Öffnung in das Gehäuse eingespeist bzw. aus diesem entleert. Man erhält eine Matrix aus Tropfen (g), wie dargestellt in der [Fig. 4](#).

[0132] Dieses Beispiel zeigt, dass man durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung eine Matrix gut lokalisierter Tropfen (g) erhält. Das Befüllen des Gehäuses ist nicht obligatorisch, vorausgesetzt die verschiedenen Festhaltezone sind mit der interessierenden Flüssigkeit bedeckt.

[0133] Versuche, durchgeführt mit verschiedenen Formen der Festhaltezone, etwa den Formen der [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#), zeigen, dass diese mit den Arbeitszone arrangierten Zonen ebenfalls für die Anwendung der Erfindung funktionell sind.

Beispiel 9: Elektrochemisches Detektionsverfahren

[0134] Es wird ein Gehäuse gemäß dem Protokoll des Beispiels 7 hergestellt, mit Festhaltezone und Arbeitszone, hergestellt gemäß Beispiel 6.

[0135] Die interessierende Flüssigkeit wird durch eine das Substrat des Enzyms HRP umfassende Entwicklungslösung gebildet, oxigeniertes Wasser (H_2O_2) und Chromogen OPD (OrthoPhenylDiamin). Diese Lösung wird in das geschlossene Gehäuse eingespeist, so dass es die Festhaltezone bedeckt, dann aus diesem Gehäuse abgesaugt.

[0136] Tropfen der interessierenden Flüssigkeit werden durch die Festhaltezone festgehalten und bedecken die Arbeitszone, wie die Fotografien der [Fig. 9](#) zeigen:

- links, bevor die aktive Fläche von der interessierenden Flüssigkeit bedeckt ist: man sieht die Arbeitszone ohne Tropfen; und
- rechts, nachdem die interessierende Flüssigkeit abgesaugt worden ist: man sieht, wie die Festhaltezone einen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit zurückgehalten hat.

[0137] Nach 5 Ruheminuten, die der Entwicklung der enzymatischen Reaktion dienen, wird das enzymatische Produkt durch gepulste Differentialvoltamperometrie detektiert. Die Resultate dieser Detektion sind in dem Diagramm der [Fig. 10](#) dargestellt.

[0138] Die die Arbeitszone umgebende Festhaltezone ist also funktionell und das Verfahren der Erfindung ermöglicht sehr gut, einen Analyten in jedem festgehaltenen Tropfen zu detektieren.

Beispiel 10: Elektropolymerisationsverfahren

[0139] Es wird ein Arbeitsgehäuse gemäß dem Protokoll des Beispiels 7 hergestellt, mit Festhaltezone und Arbeitszone gemäß Beispiel 6.

[0140] Wie in obigem Beispiel 6 ist eine Polymerisation mit Pyrrol, funktionalisiert oder nicht, realisiert worden, lokalisiert auf die durch die Festhaltezone festgehaltenen Tropfen.

Liste der Referenzen

- [1] WO 02/16023: Protogene Laboratories Inc.
- [2] US 6,040,193: Affymetrix Inc.
- [3] WO 99/03684: Eapen Saji et col.
- [4] Azek et al., Analytical Biochemistry, 2000, 284, 107–113.
- [5] WO 00/36145: Commissariat à l'Energie Atomique.
- [6] WO 02/090573: Infineon
- [7] Junghoon Lee et al., "Electrowetting and Electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling", Sensor and Actuators A 95 (2002), 259–268
- [8] J. Cooper et al., "Micromachining Sensor for Electrochemical Measurement in Subnanoliter Volumes", Anal. Chem. 1997, 69, 253–258.
- [9] Mengsu Yang et al., "Covalent Immobilisation of Oligonucleotides on Modified Glass/Silicon Surfaces for Solid-Phase DNA Hybridization and Amplification", Chemistry Letters 1998, 257–258.
- [10] Mila Boncheva et al., "Design of Oligonucleotide Arrays at Interfaces" Langmuir 1999, 15, 4317–4320.
- [11] H. Jansen et al., "The black silicon method: a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control", J. Micromech. Microeng. 5 (1995), 115–120.
- [12] FR-A-2 818 662.
- [13] EP-B-561 722.

IN DER BESCHREIBUNG GENANNT REFERENZEN

[0141] Diese Liste der durch den Anmelder genannten Referenzen dient nur dazu, dem Leser zu helfen und ist nicht Teil der europäischen Patentschrift. Obwohl sie mit einem Höchstmaß an Sorgfalt erstellt worden ist, können Fehler oder Weglassungen nicht ausgeschlossen werden und das EPA lehnt in dieser Hinsicht jede Verantwortung ab.

In der Beschreibung genannte Patentschriften

- WO 0216023 A, Protogene Laborstories Inc.
- US 6040193 A, Affymetrix Inc.
- WO 9903684 A, Espen Saji et col.
- WO 0036145 A, Commissariat à l'Energie Atomique.
- WO 02090573 A
- FR 2818662 A
- EP 561722 A

In der Beschreibung genannte Nichtpatentliteratur

- AZEK et al., Analytical Biochemistry, 2000, Vol. 284, 107–113

- JUNGHOOON LEE et al. Electrowetting and Electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling. Sensor and Actuators, 2000, Vol. A 95, 259–268
- J. COOPER et al. Micromachining Sensor for Electrochemical Measurement in Subnanoliter Volumes, Anal. Chem., 1997, 69, 253–258
- MENG SU YANG et al. Covalent Immobilisation of Oligonucleotides on Modified Glass/Silicon Surfaces for Solid-Phase DNA Hybridization and Amplification. Chemistry Letters, 1998, 257–258
- MILA BONCHEVA et al. Design of Oligonucleotide Arrays at Interfaces. Langmuir, 1999, Vol. 15, 4317–4320
- H. Jansen et al., The black silicon method: a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control, J. Micromech. Microeng., 1995, Vol. 5, 115–120

Patentansprüche

1. Verfahren zur lokalisierten Verteilung von Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche eines Substrats, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- eine Einleitung der interessierenden Flüssigkeit in eine Kammer mittels Einleiteinrichtungen, wobei die genannte Kammer die genannte aktive Fläche umschließt, und
- eine Entleerung der interessierenden Flüssigkeit aus der genannten Kammer durch Entleereinrichtungen, wobei die aktive Fläche sowie die anderen Flächen im Innern der Kammer im Wesentlichen nicht benetzbar sind gegenüber der interessierenden Flüssigkeit, mit Ausnahme von mehreren in bestimmter Weise auf der genannten aktiven Fläche ausgebildeten lokalisierten Festhaltezone, von denen sich jede zum Festhalten eines Tropfens der interessierenden Flüssigkeit eignet, und die genannten Einleit- und Entleereinrichtungen der Kammer so vorgesehen sind, dass die interessierende Flüssigkeit, wenn sie in die Kammer eingeleitet worden ist, die genannten Festhaltezone bedeckt, und wenn sie aus der Kammer abgeführt wird, auf jeder Festhaltezone auf verteilte und lokalisierte Weise ein Tropfen der interessierenden Flüssigkeit festgehalten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem jede Festhaltezone mit wenigstens einer Arbeitszone versehen ist, die so auf der genannten aktiven Fläche ausgebildet ist, dass sie Kontakt hat mit dem festgehaltenen Tropfen der interessierenden Flüssigkeit.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem wenigstens eine Arbeitszone eine mit der interessierenden Flüssigkeit nicht benetzbare Zone ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, bei dem wenigstens eine Festhaltezone die Form eines offenen oder geschlossenen Rings hat, der die wenigstens eine Arbeitszone umgibt, mit der sie versehen ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die Festhaltezone des Tropfens der interessierenden Flüssigkeit mehrere Arbeitszonen umgibt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Arbeitszone eine Detektionszone einer in der interessierenden Flüssigkeit vorhandenen chemischen Spezies ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die Arbeitszone eine durch eine biologische Sonde funktionalisierte Zone ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem die Sonde aus der Gruppe ausgewählt wird, die gebildet wird durch ein Enzym, ein Enzymsubstrat, ein Oligonukleotid, ein Oligonukleosid, ein Protein, einen Membranrezeptor, eine eukaryote oder procaryote Zelle, einen Antikörper, ein Antigen, ein Hormon, einen Metabolit eines lebenden Organismus, ein Toxin eines lebenden Organismus, ein Polynukleotid, ein Polynukleosid, eine komplementäre DNA.

9. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die Arbeitszone eine durch ein chemisches Molekül funktionalisierte Zone ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, bei dem die Arbeitszone eine Zone der elektrischen und/oder chemischen Wechselwirkung mit dem genannten festgehaltenen Tropfen ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem die Arbeitszone eine elektrochemische Mikrozelle ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, bei dem die Arbeitszone einen Sensor umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, die durch optische, elektrische, magnetische, elektrostatische, mechanische, thermische und chemische Sensoren gebildet wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, bei dem die Arbeitszone einen Aktor umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, die durch optische, elektrische, magnetische, elektrostatische, mechanische, thermische und chemische Aktoren gebildet wird.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem wenigstens eine der Zonen zum Festhalten eines Tropfens der interessierenden Flüssigkeit eine Zone zum elektrischen oder physischen Festhalten ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Festhaltezone den Tropfen der interessierenden Flüssigkeit durch Kapillarkräfte festhält.

16. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Festhaltezone den Tropfen interessierender Flüssigkeit mittels Benetzung lokal festhält.

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem die Festhaltezone den Tropfen interessierender Flüssigkeit lokal aufgrund einer Benetzbarkeit der Festhaltezone der interessierenden Flüssigkeit festhält, die stärker ist als diejenige der aktiven Fläche.

18. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem die Festhaltezone den Tropfen interessierender Flüssigkeit mittels Elektrobenetzung lokal festhält.

19. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Festhaltezone den Tropfen interessierender Flüssigkeit durch hydrophile/hydrophobe Wechselwirkungen mit der interessierenden Flüssigkeit festhält.

20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem wenigstens eine der Festhaltezone in Bezug auf die aktive Fläche, in der sie ausgebildet ist, vertieft oder erhöht ist.

21. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem die in bestimmter Weise auf der genannten aktiven Fläche verteilten lokalisierten Festhaltezone eine Matrix bilden.

22. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem die Einrichtungen zur Entleerung der interessierenden Flüssigkeit Saugeinrichtungen sind, wobei der Entleerungsschritt darin besteht, die interessierende Flüssigkeit aus der genannten Kammer zu saugen.

23. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem die Entleereinrichtungen der interessierenden Flüssigkeit Einrichtungen zum Einspritzen eines gasförmigen Fluids in die Kammer sind, wobei der Entleerungsschritt darin besteht, ein gasförmiges Fluids in die Kammer einzuspritzen, um die interessierende Flüssigkeit aus der Kammer auszutreiben.

24. Verfahren nach Anspruch 23, bei dem das eingespritzte gasförmige Fluid mit dem Dampf der interessierenden Flüssigkeit gesättigt wird.

25. Anwendung eines Verfahrens nach einem der vorangehenden Ansprüche in einem On-Chip-Labor oder in einem Mikrosystem für Chemie oder Biologie.

26. Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 25 in einem Biochip, ausgewählt aus der Gruppe, die durch DNA-Chips, RNA-Chips, Protein-Chips, Antikörper-Chips, Antigen-Chips, Zell-Chips gebildet wird.

27. Verfahren zur Detektion wenigstens eines in einer interessierenden Flüssigkeit möglicherweise vorhandenen Moleküls, wobei dieses Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- lokalisierte Verteilung von Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche in einer Kammer gemäß dem Verfahren des Anspruchs 1, und
- elektrochemische Detektion in den genannten Tropfen des wenigstens einen in der genannten interessierenden Flüssigkeit möglicherweise vorhandenen Moleküls.

28. Verfahren zur optischen Detektion wenigstens eines in einer interessierenden Flüssigkeit möglicherweise vorhandenen Moleküls, wobei das genannte Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

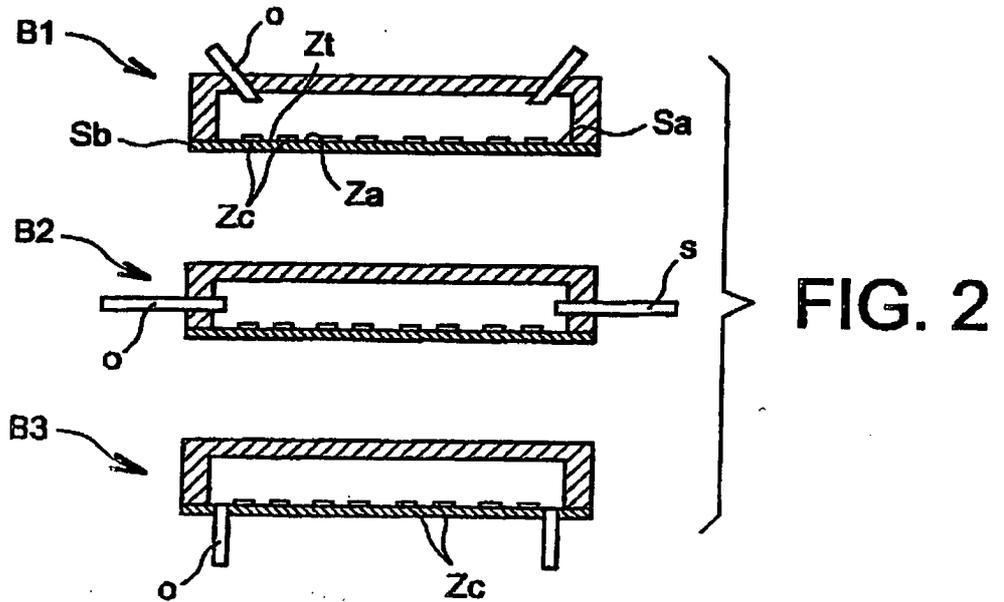
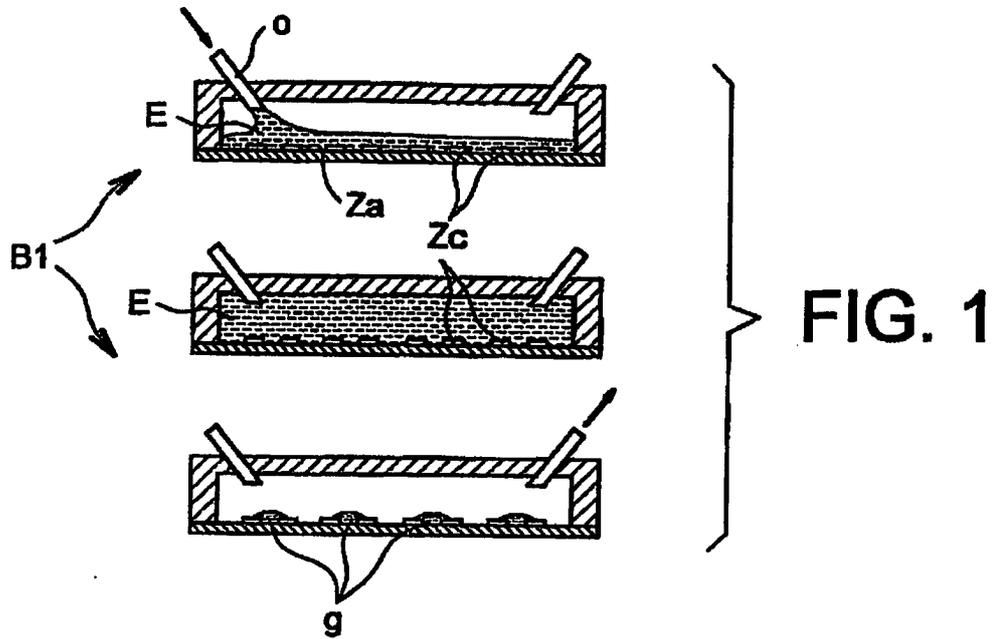
- eine lokalisierte Verteilung von Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche in einer Kammer gemäß dem Verfahren des Anspruchs 1, und
- optische Detektion in den genannten Tropfen des wenigstens einen in der genannten interessierenden Flüssigkeit möglicherweise vorhandenen Moleküls.

29. Verfahren nach Anspruch 27 oder 28, bei dem Detektionen verschiedener in der interessierenden Flüssigkeit vorhandener Moleküle parallel in verschiedenen auf der aktiven Fläche in der Kammer festgehaltenen Flüssigkeitstropfen realisiert werden.

30. Elektropolymerisationsverfahren von in einer interessierenden Flüssigkeit vorhandenen Molekülen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- lokalisierte Verteilung von Tropfen einer interessierenden Flüssigkeit auf einer aktiven Fläche in einer Kammer gemäß dem Verfahren des Anspruchs 1, und
- Elektropolymerisation der zu polymerisierenden Moleküle in den Tropfen der genannten interessierenden Flüssigkeit in der genannten Kammer.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen



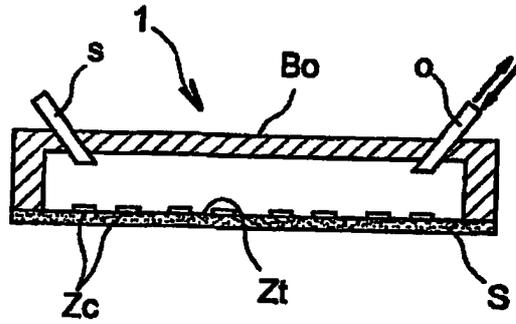


FIG. 3

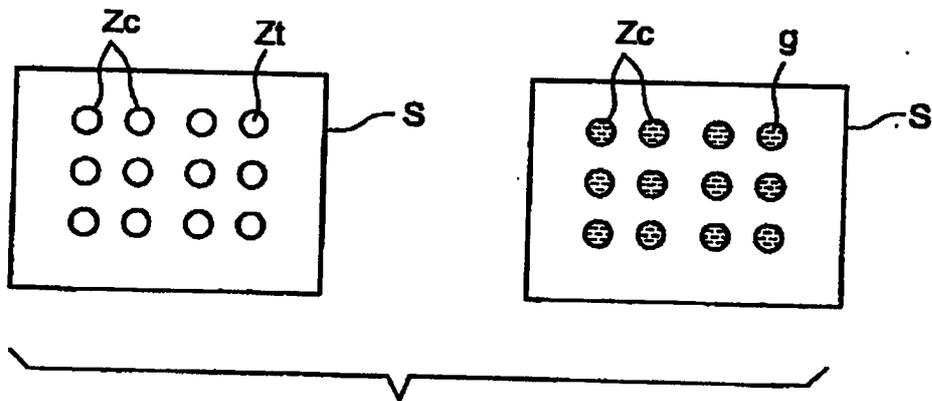


FIG. 4

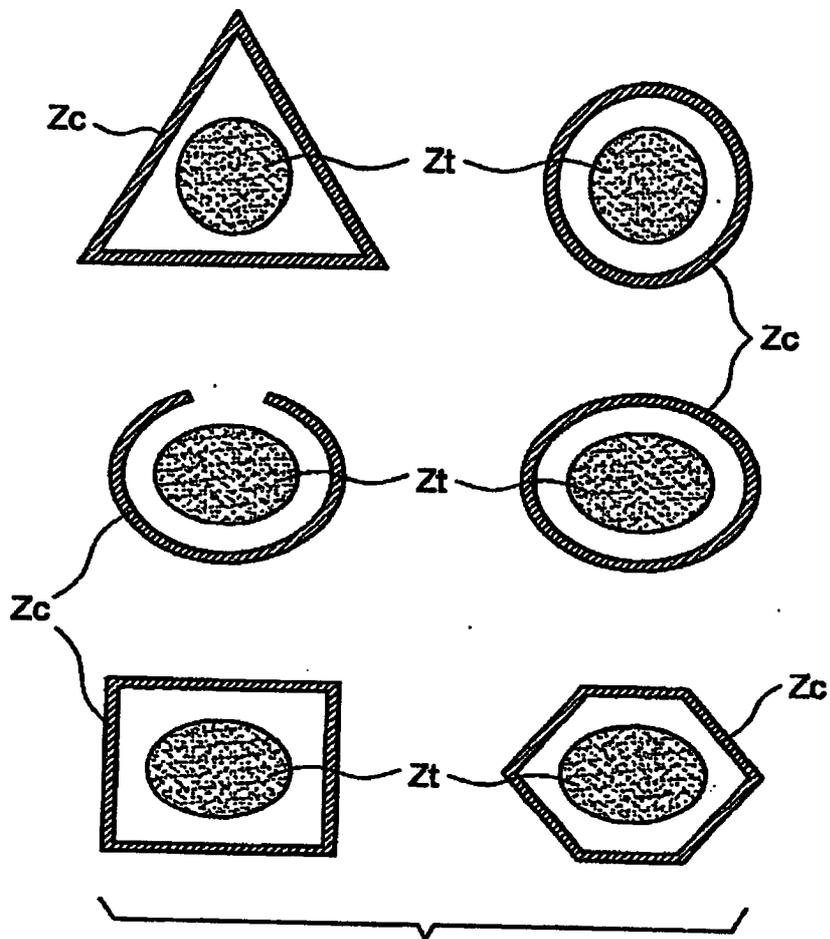


FIG. 5

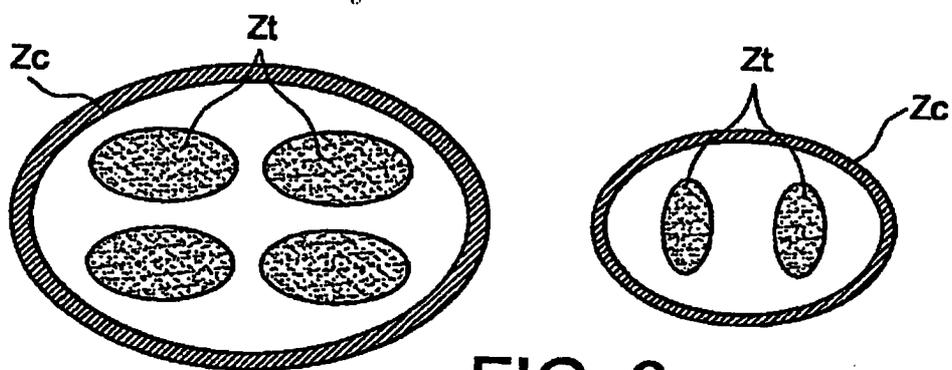


FIG. 6

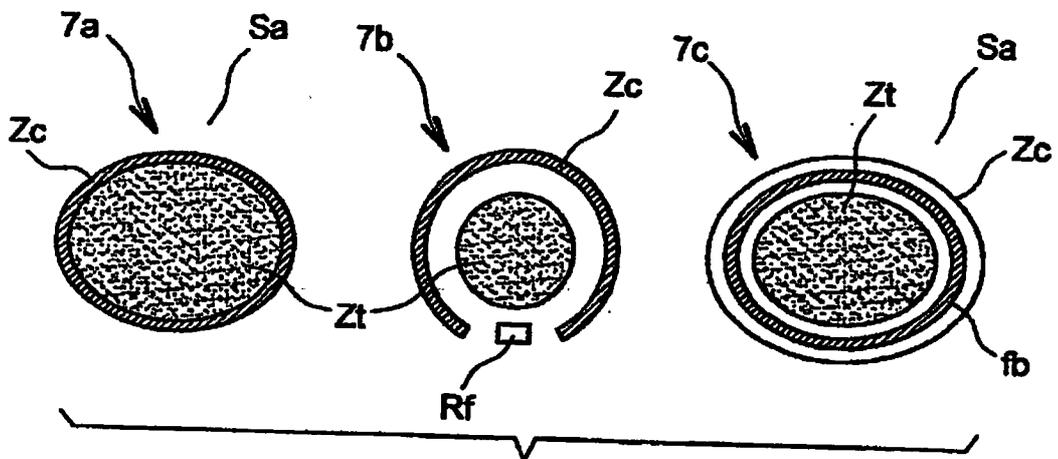


FIG. 7

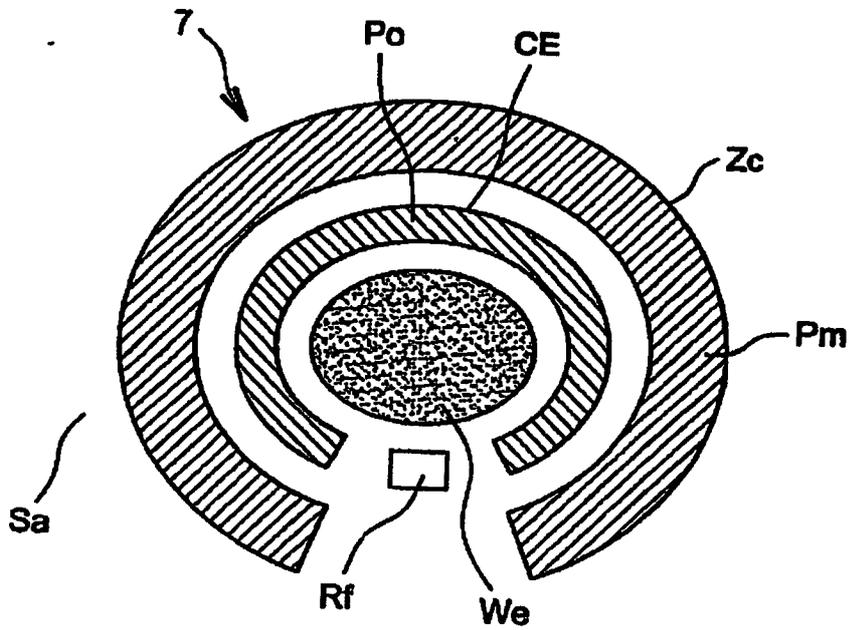


FIG. 8



(a) FIG. 9 (b)

