

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Februar 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/012389 A2

- | | | |
|---|-------------------------------|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : | G01N | (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ADVALYTIX AG [DE/DE]; Eugen-Sänger-Strasse,
Geb. 53.0, 85649 Brunnthal (DE). |
| (21) Internationales Aktenzeichen: | PCT/EP02/07644 | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: | 9. Juli 2002 (09.07.2002) | (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCRIBA, Jürgen
[DE/DE]; Rumfordstrasse 23, 80469 München (DE).
GAUER, Christoph [DE/DE]; Wiener Platz 8, 81667
München (DE). |
| (25) Einreichungssprache: | Deutsch | |
| (26) Veröffentlichungssprache: | Deutsch | (74) Anwälte: LETTAU, Christoph usw.; Lorenz Seidler Gos-
sel, Widenmayerstrasse 23, 80538 München (DE). |
| (30) Angaben zur Priorität: | | (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, |
| 101 36 008.8 | 24. Juli 2001 (24.07.2001) DE | |

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR ANALYSING MACROMOLECULES, ANALYSIS DEVICE AND A METHOD FOR PRODUCING
AN ANALYSIS DEVICE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANALYSE VON MAKROMOLEKÜLEN, ANALYSEVORRICHTUNG UND VERFAH-
REN ZUR HERSTELLUNG EINER ANALYSEVORRICHTUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for analysing macromolecules using a microarray, which consists of several spots in a known arrangement. Said spots comprise a plurality of first macromolecules that differ at least partially. The microarray is located on the surface of a solid body, preferably a chip. According to the method, at least one drop of liquid containing macromolecules is applied to the surface of the solid body, the quantity of liquid being so small that only one spot or a small group of spots of the microarray comes or come into contact with the drop of liquid. After a predetermined time has elapsed, the drop of liquid is displaced onto a subsequent spot or an additional small group of spots with the help of the transmission pulse of a surface sound wave. The spots that come into contact with the drop of liquid are then analysed to identify whether a reaction with the material of said drop has occurred. The invention also relates to a method for producing an analysis device for macromolecules. According to said method, at least one drop of liquid containing at least one type of macromolecule is applied to the surface of a solid body, preferably a chip, whereby the macromolecules have an active group that is activated during a modification of a corresponding external parameter, in order to allow bonding to the surface or to molecules that have already been bonded. The drop is displaced to a desired location on the surface with the help of the transmission pulse of one or more surface sound waves. The external parameter is modified in a homogeneous, non-local manner, permitting the bonding of the macromolecules to form the spot of a microarray, in which macromolecules from the drop of liquid are bonded to the surface. The invention also relates to an analysis device for carrying out the inventive analysis method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Analyse von Makromolekülen mit Hilfe eines Microarrays, das aus mehreren Spots in bekannter Anordnung besteht, die eine Vielzahl von ersten zumindest teilweise unterschiedlichen Makromolekülen umfassen, wobei sich das Microarray auf einer Festkörperoberfläche, vorzugsweise eines Chips, befindet, bei dem zumindest ein Flüssigkeitstropfen mit Makromolekülen auf die Festkörperoberfläche gebracht wird, wobei die Flüssigkeitsmenge so klein ist, dass im Wesentlichen nur ein oder eine Gruppe von wenigen Spots des Microarrays mit dem Flüssigkeitstropfen in Berührung kommt, und nach Ablauf einer vorbestimmten Zeit der Flüssigkeitstropfen mit Hilfe des Impulsübertrages einer Oberflächenschallwelle zu einem nächsten Spot oder einer weiteren Gruppe weniger Spots bewegt wird. Die mit dem Flüssigkeitstropfen in Berührung gekommenen Spots werden daraufhin untersucht, ob eine Reaktion mit dem Material des Flüssigkeitstropfens stattgefunden hat. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung für Makromoleküle, bei dem zumindest ein Flüssigkeitstropfen mit zumindest einer Art von Makromolekülen auf eine Festkörperoberfläche, vorzugsweise eines Chips, aufgebracht wird, wobei die Makromoleküle eine aktive Gruppe aufweisen, die bei Änderung eines entsprechenden Parameters aktiviert wird, um eine Bindung an die Oberfläche oder bereits gebundenen Molekülen zu ermöglichen. Der Tropfen wird mit Hilfe des Impulsübertrages einer oder mehrerer Oberflächenschallwellen an einen gewünschten Ort auf der Oberfläche bewegt. Der äussere Parameter wird homogen und nicht lokal verändert, so dass eine Bindung der Makromoleküle ermöglicht wird, so dass der Spot eines Microarrays gebildet wird, in dem Makromoleküle aus dem Flüssigkeitstropfen an der Oberfläche gebunden sind. Schliesslich betrifft die Erfindung eine Analysevorrichtung zur Durchführung der erfindungsgemässen Analyseverfahren.

WO 03/012389 A2



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Analyse von Makromolekülen, Analysevorrichtung und Verfahren zur
Herstellung einer Analysevorrichtung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Analyse von Makromolekülen mit Hilfe eines Microarrays und ein Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung für Makromoleküle.

Eine Methode zur schnellen Analyse von Makromolekülen umfaßt den Einsatz eines sogenannten Microarrays auf einem Chip, ähnlich wie er auch aus der Halbleiterindustrie bekannt ist. In einem solchen Microarray sind bekannte erste ggf. verschiedenartige Makromoleküle an verschiedenen Stellen in einer Matrixform angeordnet. Diese Makromoleküle werden auch als „Sondenmoleküle“ bezeichnet. Eine Flüssigkeit mit Makromolekülen („Probenmoleküle“) wird über das Microarray gespült, die mit mindestens einer Art von Sondenmolekülen auf dem Microarray eine spezifische Bindung eingeht (Hybridisierung). Wird dann die Flüssigkeit wieder von der Oberfläche entfernt, verbleiben vornehmlich nur an den Stellen der spezifischen Bindung die zu untersuchenden Probenmoleküle zurück. Mit Hilfe einer orts aufgelösten Messung, z. B. einer Fluoreszenzmessung, läßt sich feststellen, an welchen Stellen zu untersuchende Makromoleküle vorhanden sind. Aus der bekannten Lage der einzelnen Sondenmoleküle in der Matrixform des Microarrays

kann also festgestellt werden, mit welcher Art von Makromolekülen die zu untersuchenden Makromoleküle eine spezifische Bindung eingegangen sind.

Solche Mikroarrays werden z. B. zur Untersuchung von Makromolekülen wie Proteinen, Antigenen oder Antikörpern eingesetzt. Im speziellen werden Microarrays auch zur Untersuchung von DNA, z. B. beim DNA-Screening, eingesetzt.

Die Dauer eines entsprechenden Analyseexperimentes ist zu einem wesentlichen Teil durch die Diffusion der Probenmoleküle zu den Sondenmolekülen bestimmt und kann daher einige Zeit in Anspruch nehmen. Ist z. B. die Konzentration des zu untersuchenden Makromoleküles in der Flüssigkeit nur gering, so kann es sehr lange dauern, bis es seinen spezifischen Bindungspartner auf dem Array gefunden hat.

Ein weiteres Problem mit der Reaktion (Hybridisierung) zwischen den in der Probenflüssigkeit befindlichen Makromolekülen und der auf der Oberfläche befindlichen Sondenmolekülen liegt darin, daß die zu untersuchenden Makromoleküle in einem sehr weiten Mengenbereich in der Flüssigkeit vorliegen können, der bis hinunter zu einigen wenigen Molekülen reicht. Dennoch muß ausreichend Flüssigkeit vorhanden sein, um die gesamte Arrayoberfläche zu bedecken, so daß alle Sondenmoleküle auch erreicht werden können. So stellt sich ggf. eine sehr geringe Konzentration der Probenmoleküle in der Flüssigkeit ein. Eine derartig niedrige Konzentration bewirkt jedoch ein Reaktionsgleichgewicht, das nach dem Massenwirkungsgesetz für chemische Reaktionen sehr stark auf Seite der Edukte liegt. Probenmoleküle bleiben also in der Flüssigkeit gelöst, auch wenn ein passendes Sondenmolekül auf der Oberfläche noch frei wäre. Zur Überwindung dieses Problems müßte die Menge des Ausgangsmaterials, d. h. der Probenmoleküle in der Probenflüssigkeit, erhöht werden, was mangels einer ausreichenden Menge Ausgangsmaterials oft nicht zu erreichen ist.

Die eingesetzten Microarrays sind miniaturisierte Arrays, die im Falle z. B. von DNA-Microarrays einzelne Flächen (Spots) mit Sondenmolekülen jeweils mit einem Durchmesser von etwa 100 µm umfassen. Dabei werden viele verschiedene DNA-Sonden (Spots) z. B. in einem Schachbrettmuster auf die Oberfläche aufgebracht und gleichzeitig zu Hybridisierungsreaktionen benutzt. Die Dichten, die heute auf einem solchen Microarray erreicht werden können, betragen z. B. für DNA (Desoxyribonukleinsäure) bis zu ca. 250.000 verschiedene Arten von Molekülen pro cm² (M. Schena (Hrsg.), „DNA Microarrays“, Oxford University Press, 1999).

In der Regel wird das Microarray nach der Hybridisierung nach einem speziellen Protokoll gewaschen und anschließend orts aufgelöst die Fluoreszenz gemessen. Mit speziellen Techniken ist auch eine Messung des Fluoreszenzsignals in situ während der Hybridisierung möglich, um zusätzliche Informationen über die Reaktionskinetik zu gewinnen. Eine Möglichkeit besteht darin, mit einer Optik von so geringer Tiefenschärfe das Fluoreszenzsignal zu messen, daß nur der Bereich der Grenzfläche zwischen dem Flüssigkeitsfilm und der Chipoberfläche zum Signal beiträgt. Dort befinden sich die zweiten Makromoleküle hauptsächlich im bereits gebundenen Zustand. Das Fluoreszenzsignal zweiter Makromoleküle, die sich im darüberliegenden Flüssigkeitsfilm im ungebundenen Zustand aufhalten, wird mit einer solchen Optik nicht erfaßt. Ebenso kann mit entsprechend ausgestalteten Wellenleitern und evaneszenten Wellen, die seitlich auf den Grenzbereich zwischen Flüssigkeit und Oberfläche geleitet werden, die Fluoreszenz auf der Microarrayoberfläche gebundenen Moleküle untersucht werden (G. L. Duveneck und A. P. Abel, Review on Fluorescence-based Planar Waveguide Biosensors, Proc. SPIE, Vol. 3858 (1999) Seiten 59 ff.).

Die Sondenmoleküle werden heute meist durch eine Drucktechnik (Spotten) aufgebracht. Eine solche Drucktechnik wird z. B. von V.G. Cheung et al., Nature Genetics Supplement, Volume 21, Januar 1999, Seiten 15ff. beschrieben. Eine Lösung mit dem gewünschten Sondenmolekül wird entweder kontaktlos oder kontaktierend auf die Chipoberfläche gebracht. Alternativ können die Sondenmoleküle auch z. B. photolithographisch Base für Base auf dem Chip synthetisiert werden. Sowohl beim

Spotten als auch bei der photolithographischen Herstellung ist eine quantitative Aussage über die Zahl und Dichte der Sondenmoleküle auf einem Spot schwierig. Das bedeutet, daß z. B. bei einem Nachweis der hybridisierten Probenmoleküle z. B. durch Fluoreszenz nur begrenzt quantitative Rückschlüsse auf die Zahl der Probenmoleküle möglich sind. Die Vergleichbarkeit von Daten, die auf unterschiedlichen Microarrays mit nominell identischen Spots gewonnen wurden, ist erheblich eingeschränkt.

Bei einem bekannten Verfahren zur Herstellung von Microarrays wird die Oberfläche eines Festkörperchips zunächst homogen funktionalisiert, so daß z. B. durch Einwirkung von Licht oder durch Einwirkung eines elektrischen Feldes die zuvor ebenfalls funktionalisierten Sondenmoleküle an der Oberfläche binden. Der Chip wird dazu homogen mit einer Lösung der Sondenmoleküle überschwemmt (z. B. in der Größenordnung einer Menge von 100 µl). Durch lokale Beleuchtung binden photoaktive Sondenmoleküle lokal an den gewünschten Stellen. Bei elektroaktiven Sondenmolekülen, die unter Einwirkung eines elektrischen Feldes an der Oberfläche binden, wird lokal ein elektrisches Feld erzeugt, das die Bindung auslöst. Die Ortsauflösung kommt bei diesen Verfahren also durch die Modulation des elektrischen Feldes bzw. die Lichtintensität zustande. Insbesondere bei Chips mit hoher Spotdichte stellt dies ein aufwendiges und teures Verfahren dar. Ist z. B. die Modulation des elektrischen Feldes notwendig, um eine orts aufgelöste Bindung der Sondenmoleküle an der Oberfläche zu gewährleisten, muß in einer Schicht unterhalb der Chipoberfläche ein Feld von Kondensatoren angebracht sein, die den späteren Spots örtlich entsprechen. Ein solches Verfahren wird von M.J. Heller, A.H. Forster und E. Tu in *Electrophoresis*, 2000, 21, Seiten 157ff. beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Verfahren und eine Vorrichtung anzugeben, mit denen eine genaue und reproduzierbare Analyse von Makromolekülen möglich ist, die auch bei begrenztem Probenmaterial einsetzbar ist. Die Herstellung entsprechender Analysevorrichtungen soll einfach und reproduzierbar möglich sein.

Bezüglich des Verfahrens zur Analyse von Makromolekülen wird die Aufgabe durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruches 1 oder ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruches 6 gelöst. Bezüglich eines Verfahrens zur Herstellung einer Analysevorrichtung für Makromoleküle wird die Aufgabe durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruches 15 gelöst. Bezüglich der Analysevorrichtung wird die Aufgabe mit einer Analysevorrichtung mit den Merkmalen des Anspruches 25 gelöst. Unteransprüche sind jeweils auf bevorzugte Ausgestaltungen gerichtet.

Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Analyse von Makromolekülen mit Hilfe eines Microarrays, das aus mehreren Spots mit Sondenmolekülen in bekannter Anordnung besteht, wird ein Microarray auf einer Festkörperoberfläche, vorzugsweise einem Chip, eingesetzt. Zumindest ein Flüssigkeitstropfen mit zu untersuchenden Makromolekülen wird auf die Festkörperoberfläche gebracht, wobei die Flüssigkeitsmenge eines Tropfens so klein gewählt wird, daß sie im wesentlichen nur einen Spot oder eine Gruppe von einigen wenigen Spots des Microarrays zu einem Zeitpunkt berührt. Günstigerweise sollten dabei von einem Flüssigkeitstropfen nicht mehr als 10% aller Spots eines Microarrays berührt werden. Auf diese Weise können die Reaktionsbedingungen (z. B. Temperatur oder Salzkonzentration) in Abhängigkeit der berührten Spots optimiert werden. Je geringer die Anzahl der Spots ist, die von einem Flüssigkeitstropfen zu einem Zeitpunkt berührt werden, desto spezifischer ist die Einstellung von Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit von den in einem Spot enthaltenen ersten Makromoleküle möglich. In bevorzugter Weise wird das Verfahren derart durchgeführt, daß nur ein Spot zu einem Zeitpunkt von einem Flüssigkeitstropfen berührt wird, so daß die Reaktionsbedingungen für jeden einzelnen Spot individuell eingestellt werden können.

Nach Ablauf einer vorbestimmten Zeit, die z. B. durch die typische Reaktionszeit der in der Flüssigkeit enthaltenen Makromoleküle mit den Makromolekülen, die als Sondenmoleküle auf einem Spot befindlich sind, bestimmt ist, wird mit Hilfe des Impulsübertrages einer Oberflächenschallwelle der Flüssigkeitstropfen zu einem nächsten Spot bewegt. Hier wird wieder eine vorbestimmte Zeit gewartet, bis die typische Reaktionszeit vergangen ist. Auf diese Weise können die gewünschten Spots oder alle Spots des verwendeten Microarrays mit der Flüssigkeit sequenziell

in Berührung gebracht werden. Selbstverständlich kann dieser Prozeß auch parallelisiert werden, indem mehrere Tropfen gleichzeitig über verschiedene Spots bewegt werden.

Im Anschluß können die mit dem Flüssigkeitstropfen in Berührung gekommenen Spots daraufhin untersucht werden, ob bzw. in welchem Umfang eine Reaktion mit den Makromolekülen in dem Flüssigkeitstropfen stattgefunden hat.

Dazu kann z. B. eine orts aufgelöste Fluoreszenzmessung dienen, wenn die zu untersuchenden Makromoleküle fluoreszenzmarkiert sind. Andere Nachweismethoden, z. B. unter Verwendung radioaktiver Probenmoleküle, sind ebenfalls einsetzbar.

Die Untersuchung der mit dem Flüssigkeitstropfen in Berührung gekommenen Spots daraufhin, ob und/oder in welchem Maße eine spezifische Reaktion mit dem Material des Flüssigkeitstropfens stattgefunden hat, kann am Ende des gesamten Prozesses durchgeführt werden, d. h. wenn der Flüssigkeitstropfen mit allen gewünschten Spots in Berührung war.

Ebenso ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, die Untersuchung, ob zweite Makromoleküle mit einem Spot oder einer Gruppe weniger Spots reagiert haben, bereits durchzuführen, während die Flüssigkeit mit einem anderen Spot bzw. mit einer anderen Gruppe weniger Spots in Berührung ist, um dort ggf. zur Hybridisierung der zweiten Makromoleküle zu führen. Während die Flüssigkeit also mit dem zweiten Spot bzw. der zweiten Gruppe von Spots in Berührung ist, kann bereits der erste Spot bzw. die erste Gruppe von Spots ausgewertet werden.

Schließlich ist es bei entsprechender Verfahrensführung auch möglich, z. B. die Fluoreszenz der gebundenen zweiten Makromoleküle in situ zu messen. Dazu kann z. B. eine Optik geringer Tiefenschärfe oder entsprechend angeordnete Wellenleiter und evaneszente Wellen eingesetzt werden, die nur die Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Chipoberfläche erfassen.

Die Flüssigkeit mit den Probenmolekülen wird beim erfindungsgemäßen Verfahren nicht auf die gesamte Fläche des Microarrays aufgebracht, sondern nur auf voneinander getrennte einzelne Spots. Während bei klassischen Microarrayexperimenten Flüssigkeitsvolumina von etwa 10-100 µl notwendig sind, um eine Gesamtprobenfläche von 1 cm² zu bedecken, kann die notwendige Flüssigkeitsmenge mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auf wenige nl reduziert werden, wenn z. B. Spots mit einer Ausdehnung von 100 µm eingesetzt werden. Der kleine Probentropfen wird schrittweise von Spot zu Spot bewegt. Die Diffusionslänge ist dabei nicht in der Größenordnung von 1 cm, sondern nur in der Größenordnung von 100 µm. An den Stellen der Spots selbst findet dann eine schnelle und effiziente Hybridisierungsreaktion statt.

Aufgrund der kleinen Probenflüssigkeitsmenge kann die Konzentration der Ausgangsstoffe auch bei gleicher Menge an Ausgangsmaterial sehr viel höher sein, da statt ungefähr 10-100 µl z. B. nur noch etwa 10 nl benötigt werden. So läßt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der hybridisierten Produkte schieben, so daß eine sehr viel genauere Messung auch mit wenig zu untersuchendem Material möglich ist.

Gegebenenfalls kann die Zeit, die abgewartet wird, bevor der Flüssigkeitstropfen wieder von einem Spot entfernt wird, dadurch verkürzt werden, daß der Flüssigkeitstropfen mit Hilfe des Impulsübertrages einer Oberflächenschallwelle in sich bewegt, also „gerührt“ wird. Dafür wird eine Oberflächenschallwelle geringerer Intensität eingesetzt, als die zum Transport des Flüssigkeitstropfens, so daß der Flüssigkeitstropfen sich nicht vom Spot weg bewegt.

Die erfindungsgemäße Methode erlaubt einen frei programmierbaren Weg der Probenflüssigkeit über die Oberfläche. Bei entsprechend angeordneten Spots aus unterschiedlichen Sondenmolekülen kann dabei eine Versuchsstrategie befolgt werden, um so zunächst jene Spots anzufahren, für die man eher ein positives Ergebnis erwartet. Individuell für unterschiedliche Spots können die Reaktionsbe-

dingungen unterschiedlich gewählt werden. So kann z. B. die Temperatur mit Hilfe von Widerstandsheizungen unterschiedlich eingestellt werden. Dabei kann z. B. der Chip homogen geheizt werden, da die Ortsauflösung durch die begrenzte Ausdehnung des Tropfens gewährleistet wird.

Ebenso kann z. B. die Beschaffenheit der zu untersuchenden Flüssigkeit von einem Spot zum nächsten verändert werden. Während bei einem Spot z. B. die Salzkonzentration in der Flüssigkeit einen ersten Wert hat, kann sie bei einem zweiten Spot durch Hinzufügen entsprechender Pufferlösung auf einen zweiten Wert geändert werden. Die Pufferlösung kann ebenfalls mit Hilfe des Impulsübertrages einer Oberflächenschallwelle in Richtung des entsprechenden Spots bewegt werden.

Mit den erfindungsgemäßen Analyseverfahren ist es nicht mehr notwendig, daß die Festkörperoberfläche z. B. in einem separaten Waschschrift von der Flüssigkeit befreit wird, bevor untersucht wird, ob und in welchem Maße eine Reaktion der zweiten Makromoleküle in der Flüssigkeit mit den ersten Makromolekülen der Spots stattgefunden hat. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird der Flüssigkeitstropfen mit Hilfe der Oberflächenschallwelle von dem entsprechenden Spot fortbewegt, so daß direkt im Anschluß eine Untersuchung erfolgen kann, ob gebundene zweite Makromoleküle an dem Spot zurückgeblieben sind.

Die Auswertung kann parallel zur Hybridisierung passieren. Zum Beispiel von einer fluoreszenzmarkierten Probenmolekülsorte in der Probenflüssigkeit wird ein Tropfen auf einen ersten Spot bewegt. Nach der typischen Hybridisierungszeit wird der Tropfen auf den nächsten Spot bewegt und parallel am ersten Spot ortsaufgelöst die Fluoreszenz gemessen. Am zweiten Spot kann z. B. zur Änderung der Reaktionsbedingungen die Temperatur geändert werden oder ein geringes Volumen Pufferlösung hinzugegeben werden, um die Stringenz der Reaktion zu gewährleisten.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Menge der am jeweiligen Spot gebundenen zweiten Makromoleküle aus der Dämpfung und/oder Geschwindigkeitsänderung einer Oberflächenschallwelle durch

das Vorhandensein der zweiten Makromoleküle bestimmt. Eine Oberflächenschallwelle wird in Richtung des Spots mit den an den ersten Makromolekülen gebundenen zweiten Makromolekülen gesendet. Durch die Masse auf der Oberfläche, die durch die hybridisierten zweiten Makromoleküle gebildet wird, wird die Oberflächenschallwelle in ihrer Intensität gedämpft oder ihre Geschwindigkeit geändert. Mit einem Detektor für die Oberflächenschallwelle kann deren Intensität vor und nach der Hybridisierung der zweiten Makromoleküle gemessen werden und aus der dadurch bestimmten Dämpfung bzw. Geschwindigkeitsänderung auf die Anzahl der gebundenen zweiten Makromoleküle zurückgeschlossen werden. Gegebenenfalls kann eine Kalibrierungsmessung mit bekannten Parametern durchgeführt werden.

Bei einer anderen Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zumindest ein Flüssigkeitstropfen mit zweiten Makromolekülen auf die Festkörperoberfläche mit dem Microarray gebracht, wobei die Flüssigkeitsmenge eines Tropfens so klein ist, daß im wesentlichen nur ein Spot oder eine Gruppe von wenigen Spots des Microarrays zu einem Zeitpunkt mit dem Flüssigkeitstropfen in Berührung kommt. Mit Hilfe des Impulsübertrages von zwei im wesentlichen gegeneinander gerichteten Oberflächenschallwellen, die im zeitlichen Wechsel in Richtung des Flüssigkeitstropfens geschickt werden, wird der Tropfen hin und her bewegt. Die Intensität der Oberflächenschallwellen wird dabei so gewählt, daß der Tropfen nicht vollständig entfernt wird.

Während der Hin- und Herbewegung wird lokal an dem Spot untersucht, ob und in welchem Maße zweite Makromoleküle an den ersten Makromolekülen des Spots bzw. der Gruppe weniger Spots hybridisiert haben. Dazu wird z. B. wieder die Fluoreszenz von fluoreszenzmarkierten zweiten Makromolekülen untersucht. Durch die Hin- und Herbewegung des Tropfens kann die Zeitabhängigkeit der Reaktion bestimmt werden. So ist eine Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. die Reaktionskinetik möglich. Mit zunehmender Zeitdauer, d.h. zunehmend häufigerer Hin- und Herbewegung des Tropfens über den Spot des Microarrays, werden mehr zweite Makromoleküle gebunden, wodurch z. B. die Intensität der Fluoreszenz der gebundenen zweiten Makromoleküle an dem jeweiligen Spot erhöht wird. Wird die

Fluoreszenz nur dann ausgemessen, wenn sich die Flüssigkeit nicht auf dem Spot bzw. der Guppe von Spots befindet, wird verhindert, daß auch die noch in der Flüssigkeit befindlichen ungebundenen zweiten Makromoleküle an der Fluoreszenzmessung teilnehmen und diese verfälschen würden.

Selbstverständlich können die erfindungsgemäßen Verfahren kombiniert werden, um eine integrale Aussage über die Menge der hybridisierten Makromoleküle an einem Spot und über die Reaktionskinetik zu erhalten.

Bei den erfindungsgemäßen Analyseverfahren wird der Flüssigkeitstropfen mit Hilfe des Impulsübertrages von Oberflächenschallwellen bewegt. Auf der Oberfläche des Chips, auf dem sich das Microarray befindet, wird eine Oberflächenschallwelle erzeugt. Der Impulsübertrag wird dann entweder durch die mechanische Deformation der Festkörperoberfläche oder durch die Kraftwirkung der sie begleitenden elektrischen Felder auf geladene oder polarisierbare Materie in der Flüssigkeit erzielt. Die Stärke der Kraftwirkung auf die Flüssigkeit kann in einem weiten Bereich über die Amplitude der Oberflächenschallwelle eingestellt werden. Die Oberflächenschallwelle kann pulsförmig mit Pulsen verschiedener Länge oder kontinuierlich erzeugt werden. Oberflächenschallwellen lassen sich auf piezoelektrischen Substraten oder Substraten mit piezoelektrischen Bereichen, z. B. piezoelektrischen Beschichtungen, erzeugen. Die Bewegung mit Hilfe des Impulsübertrages von Oberflächenschallwellen ist besonders präzise. Zudem sind keinerlei Kanäle oder andere Führungsmechanismen oder Pumpvorrichtungen, wie z. B. mikromechanische Pumpen, notwendig, um die Flüssigkeit auf der Oberfläche zu bewegen.

Die Oberflächenschallwelle kann mit Hilfe mindestens einer Oberflächenwellenerzeugungseinrichtung generiert werden. Vorteilhafterweise wird dazu ein an sich bekannter Interdigitaltransducer eingesetzt. In einfachster Ausführung hat ein solcher Interdigitaltransducer zwei Elektroden, die fingerartig ineinander greifen. Durch Anlegen eines hochfrequenten Wechselfeldes, z. B. in der Größenordnung von 10 bis einigen 100 MHz, wird in einem piezoelektrischen Substrat bzw. in einem piezoelektrischen Bereich des Substrates eine Oberflächenschallwelle angeregt, deren

Wellenlänge sich als Quotient aus der Oberflächenschallgeschwindigkeit und der Frequenz ergibt. Die Ausbreitungsrichtung ist senkrecht zu den ineinander greifenden Fingerelektrodenstrukturen. Mit Hilfe eines solchen Interdigitaltransducers läßt sich auf sehr einfache Weise eine sehr definierte Oberflächenschallwelle erzeugen. Die Herstellung eines solchen Interdigitaltransducers ist mit bekannten lithographischen Verfahren und Beschichtungstechnologien kostengünstig und einfach. Interdigitaltransducer können zudem, z. B. durch Einstrahlung eines elektromagnetischen Wechselfeldes in eine mit dem Interdigitaltransducer verbundene Antenneneinrichtung, drahtlos angesteuert werden.

Um bestimmte lokal begrenzte Bereiche einer Oberfläche mit der Oberflächenschallwelle zu überstreichen, können z. B. mehrere Interdigitaltransducer in der gewünschten Anordnung eingesetzt werden, die selektiv angesteuert werden.

Bei einem besonders vorteilhaften Verfahren wird ein lateral begrenzter Schallpfad der Oberflächenschallwelle mit Hilfe sogenannter getaperter Interdigitaltransducer erzeugt. Bei einem solchen getaperten Interdigitaltransducer ändert sich der Fingerabstand der ineinander greifenden Fingerelektroden entlang der Transducerachse. Bei gegebener Frequenz wird die Resonanzbedingung, daß die Frequenz gleich dem Quotienten aus der Oberflächenschallgeschwindigkeit und dem Fingerabstand ist, nur in einem lateral räumlich begrenzten Bereich erfüllt. Mit einem solchen getaperten Transducer kann also ein ausgewählter Bereich der Oberfläche durch entsprechende Wahl der Frequenz gezielt mit einer Oberflächenschallwelle beschallt werden. Auf diese Weise lassen sich einzelne Spots oder einzelne Reihen von Spots auswählen.

Soll gemäß oben beschriebener bevorzugter Ausgestaltung die Dämpfung einer Oberflächenschallwelle durch die Masse der hybridisierten zweiten Makromoleküle ausgewertet werden, kann als Oberflächenschallwellendetektor ebenfalls ein Interdigitaltransducer eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Analyseverfahren kann auf einem Chip durchgeführt werden, auf dem die Sondenmoleküle direkt gebunden sind. Besonders vorteilhaft ist es jedoch, wenn der Flüssigkeitstropfen mit den zu untersuchenden Makromolekülen auf einem bevorzugten Aufenthaltsbereich der Festkörperoberfläche bewegt wird, dessen Benetzungseigenschaften sich derart von seiner Umgebung unterscheiden, daß sich der Flüssigkeitstropfen bevorzugt darauf aufhält. Die Sondenmoleküle sind dann auf diesem bevorzugten Aufenthaltsbereich angeordnet.

Durch die Definition eines solchen bevorzugten Aufenthaltsbereiches kann die Fläche auf dem Festkörper, auf dem sich die Flüssigkeit bewegen soll, bestimmt werden. Die Flüssigkeit mit den zu untersuchenden Makromolekülen hält sich in der Regel nur auf dem bevorzugten Aufenthaltsbereich auf, ohne daß Kanäle oder Gräben notwendig sind, die die Bewegung der Flüssigkeit ansonsten einschränken würden. Die Oberflächenspannung des Flüssigkeitstropfens bewirkt zusätzlich, daß die Flüssigkeit den bevorzugten Aufenthaltsbereich ohne Einwirkung einer äußeren Kraft nicht verlassen kann.

Die unterschiedlichen Benetzungseigenschaften können z. B. durch eine entsprechende Beschichtung entweder des bevorzugten Aufenthaltsbereiches oder dessen Umgebung realisiert werden. Zum Beispiel können hydrophile oder hydrophobe Bereiche definiert werden. Sind die zu untersuchenden Makromoleküle z. B. in wäßriger Lösung enthalten, wird der bevorzugte Aufenthaltsbereich so gewählt, daß er hydrophiler ist als die umgebende Festkörperoberfläche. Dies kann entweder durch eine hydrophile Beschichtung des bevorzugten Aufenthaltsbereiches oder durch eine hydrophobe Umgebung erreicht werden. Eine hydrophobe Umgebung kann z. B. durch eine silanierte Oberfläche realisiert werden. Je nach den Benetzungseigenschaften der Flüssigkeit, in der die zu untersuchenden Makromoleküle enthalten sind, kann die den Aufenthaltsbereich umgebende Festkörperoberfläche auch hydrophil, lipophob oder lipophil im Vergleich zur Oberfläche des bevorzugten Aufenthaltsbereiches gewählt werden. Die Benetzungseigenschaften können weiterhin durch Mikrostrukturierung moduliert werden, wie es beim sogenannten Lotuseffekt der Fall ist, der auf unterschiedlicher Rauigkeit der Oberfläche beruht

und so unterschiedliche Benetzungseigenschaften bewirkt. Eine solche Rauigkeitsmodulation kann z. B. durch Mikrostrukturierung der entsprechenden Oberflächenbereiche erhalten werden, z. B. durch chemische Behandlung oder Ionenbestrahlung. Die Herstellung von Bereichen unterschiedlicher Benetzungseigenschaften ist dabei durch Verwendung bereits bekannter lithographischer Verfahren und/oder Beschichtungstechnologien einfach und kostengünstig.

Die Geometrie des bevorzugten Aufenthaltsbereiches kann an die entsprechende Anwendung angepaßt werden. Zum Beispiel kann der bevorzugte Aufenthaltsbereich mäanderrförmig durch das Microarray geführt werden, so daß die einzelnen Positionen des Microarrays sich entlang des bevorzugten Aufenthaltsbereiches aufreihen. Ebenso kann eine kreuzweise Anordnung vorgesehen sein, bei der sich die einzelnen Positionen des Microarrays in den Kreuzungsbereichen befinden.

Wird das erfindungsgemäße Verfahren auf einem derartig ausgestalteten bevorzugten Aufenthaltsbereich durchgeführt, sind die Anforderungen an die Genauigkeit in der Richtung und lateralen Ausbreitung der Oberflächenschallwelle geringer, da die Bewegung des Flüssigkeitstropfens durch die Form des Aufenthaltsbereiches mit bestimmt wird.

Bei einer anderen Ausgestaltung werden entsprechend definierte bevorzugte Aufenthaltsbereiche nur im Bereich der einzelnen Spots vorgesehen, ohne miteinander verbunden zu sein. Die Aufenthaltsbereiche dienen dann der Lokalisierung des Flüssigkeitstropfens im Bereich eines Spots bzw. einer Gruppe weniger Spots. Durch Einstrahlen einer Oberflächenschallwelle ausreichender Intensität kann die Flüssigkeit dennoch von einem Aufenthaltsbereich zum nächsten transportiert werden. Die so definierten Aufenthaltsbereiche wirken wie ein „Anker“, der die Lokalisierung des Flüssigkeitstropfens an einem Spot oder an einer Gruppe weniger Spots erleichtert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann z. B. vorteilhaft zur Analyse von Oligonukleotiden eingesetzt werden. Es eignet sich unter anderem besonders zum

DNA-Screening, wobei die zu untersuchenden Oligonukleotide z. B. aus kurzen DNA-Strängen (Desoxyribonukleinsäuresträngen) bestehen. Ebenso können jedoch unterschiedliche Makromoleküle mit spezifischer Bindung wie unterschiedliche Proteine, unterschiedliche Antigene oder unterschiedliche Antikörper im Microarray vorgesehen bzw. analysiert werden.

Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung für Makromoleküle wird zumindest ein Flüssigkeitstropfen mit zumindest einer Art von Makromolekülen auf einer Festkörperoberfläche, vorzugsweise der Oberfläche eines Chips, aufgebracht, wobei die Makromoleküle eine aktive Gruppe aufweisen, die bei Änderung eines entsprechenden äußeren Parameters derart aktiviert wird, daß sie eine Bindung mit der Festkörperoberfläche oder bereits an der Oberfläche gebundenen Makromolekülen eingehen kann. Der Tropfen wird mit Hilfe des Impulsübertrages einer oder mehrerer Oberflächenschallwellen an einen gewünschten Ort auf der Oberfläche bewegt. Daraufhin wird der äußere Parameter homogen und nicht lokal derart verändert, daß eine Bindung der Makromoleküle ermöglicht wird. Der Flüssigkeitstropfen kann danach ggf. mehrfach an einen anderen Ort des Chips mit Hilfe der Oberflächenschallwellen bewegt und der Parameter wieder geändert werden, um so sukzessiv ein Microarray zu erzeugen. Selbstverständlich können diese Prozesse auch parallelisiert werden, indem mehrere Flüssigkeitstropfen gleichzeitig über die Festkörperoberfläche bewegt werden und durch die Änderung des äußeren Parameters am gewünschten Ort eine Reaktion der in den Flüssigkeitstropfen enthaltenen Makromoleküle mit der Oberfläche ermöglicht wird. Mit den so an die Festkörperoberfläche gebundenen Molekülen wird dann ein Microarray aus Sondenmolekülen gebildet.

Im Unterschied zu herkömmlichen Verfahren zur Herstellung eines Microarrays ist es nicht notwendig, daß der äußere Parameter nur lokal verändert wird. Dies stellt eine signifikante Vereinfachung des Verfahrens dar, da z. B. keine orts aufgelöste Beleuchtung oder orts aufgelöste elektrische Felder notwendig sind. Im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren, bei denen der Chip mit der Flüssigkeit, die die zu bindenden Makromoleküle enthält, überschwemmt werden muß, ist außerdem der

Materialverbrauch erheblich reduziert. Um den Chip homogen zu überschwemmen, werden typisch 10-100 μl benötigt, während man mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Nanoliter- (nl-) bzw. wenigen Mikroliter- (μl -) Mengen auskommen kann.

Werden z. B. Makromoleküle mit einer photoaktiven Gruppe verwendet, wird als äußerer Parameter die Beleuchtung gewählt. Je nach Natur der photoaktiven Gruppe wird entweder deren Intensität oder deren Frequenz geändert, um eine Bindung der photoaktiven Makromoleküle mit der Oberfläche bzw. bereits gebundenen Makromolekülen zu ermöglichen. Der Flüssigkeitstropfen wird an die gewünschte Stelle mit Hilfe der Oberflächenschallwelle bewegt und dann die Beleuchtung eingeschaltet bzw. entsprechend verändert. Nur dort, wo sich die Flüssigkeit gerade befindet, werden die Makromoleküle mit der Oberfläche eine Bindung eingehen. So läßt sich sehr genau und lokal ein Spot eines Microarrays erzeugen.

Werden z. B. Makromoleküle mit einer elektroaktiven Gruppe verwendet, dient als zu verändernder äußerer Parameter das elektrische Feld. Der Flüssigkeitstropfen wird mit Hilfe der Oberflächenschallwellen an die gewünschte Stelle auf dem Festkörperchip bewegt. Dann wird das elektrische Feld derart geändert, daß eine Reaktion der Makromoleküle in der Flüssigkeit mit der Oberfläche des Chips bzw. bereits gebundenen Makromolekülen stattfinden kann. Dabei ist es nicht notwendig, daß die Elektroden zur Anlegung des elektrischen Feldes eine lokale begrenzte Ausdehnung haben. Die gesamte Chipoberfläche kann als Elektrode dienen, da die Ortsauflösung der Reaktion durch die begrenzte Flüssigkeitsmenge gewährleistet ist.

Der Tropfen kann auch Makromoleküle enthalten, die auf Temperaturänderungen reagieren. Ist der Tropfen mit Hilfe von Oberflächenschallwellen an den gewünschten Ort bewegt worden, wird die Chipoberfläche erwärmt, um an diesem Ort die Reaktion der Makromoleküle mit der Oberfläche oder bereits gebundenen Makromolekülen zu ermöglichen. Die Temperaturerhöhung braucht nicht lokal zu sein,

da eine Ortsauflösung durch das begrenzte Ausmaß des Tropfens gewährleistet wird.

Die Verwendung von Oberflächenschallwellen zur Bewegung von Flüssigkeitstropfen bietet bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren die gleichen Vorteile wie bei den oben beschriebenen erfindungsgemäßen Analyseverfahren. Zur Erzeugung der Oberflächenschallwellen können ebenso wie bei den erfindungsgemäßen Analyseverfahren Interdigitaltransducer, z. B. sogenannte getaperte Interdigitaltransducer, eingesetzt werden. Der Einsatz derartiger Interdigitaltransducer bietet bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren die gleichen Vorteile wie bei den erfindungsgemäßen Analyseverfahren.

Das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren kann auf der freien Oberfläche eines Festkörperchips erfolgen. Besonders vorteilhaft ist es jedoch, wenn der Festkörperchip vor Anwendung des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens mit einem bevorzugten Aufenthaltsbereich versehen wird, dessen Benetzungseigenschaften sich von seiner Umgebung derart unterscheiden, daß sich die Flüssigkeit mit den zu bindenden Makromolekülen bevorzugt darauf aufhält. Ebenso wie bei den erfindungsgemäßen Analyseverfahren läßt sich so die Anforderung an die Genauigkeit der Oberflächenschallwelleneinstrahlung reduzieren, da die Bewegung der Flüssigkeit sich hauptsächlich auf den bevorzugten Aufenthaltsbereich beschränkt.

Zudem ist eine mit einem solchen Herstellungsverfahren hergestellte Analysevorrichtung vorteilhaft einsetzbar, um ein erfindungsgemäßes Analyseverfahren durchzuführen, bei dem ebenfalls ein bevorzugter Aufenthaltsbereich wie bereits oben beschrieben vorteilhaft zum Einsatz kommen kann.

Ein bevorzugter Aufenthaltsbereich kann wie bereits bei den erfindungsgemäßen Analyseverfahren beschrieben hergestellt werden. Dabei sind verschiedene Geometrien des Aufenthaltsbereiches möglich.

Ebenso wie bei den erfindungsgemäßen Analyseverfahren können auch mehrere bevorzugte Aufenthaltsbereiche eingesetzt werden, die an denjenigen Orten der Festkörperoberfläche angeordnet sind, an denen sich die Spots des Microarrays befinden sollen, das mit dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren hergestellt wird. Die bevorzugten Aufenthaltsbereiche an diesen Orten erleichtern die Lokalisierung der Flüssigkeit mit den Makromolekülen, die an den Spots gebunden werden sollen. Durch Einstrahlen einer Oberflächenschallwelle ausreichend hoher Intensität kann dennoch der Flüssigkeitstropfen mit den Makromolekülen, die die Spots des Microarrays bilden sollen, von einem bevorzugten Aufenthaltsbereich zum nächsten bewegt werden.

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens wird die Menge der an einem Ort gebundenen Makromoleküle durch Vermessung der Dämpfung und/oder Geschwindigkeitsänderung von zumindest einer Oberflächenschallwelle bestimmt, die in Richtung der gebundenen Makromoleküle geschickt wird. Nachdem ein oder mehrere Spots des Microarrays mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt worden sind, wird eine Oberflächenschallwelle in Richtung des bzw. der Spots geschickt und nach Durchlaufen des entsprechenden Gebietes der Oberfläche in ihrer Intensität und/oder bzgl. der Geschwindigkeitsänderung vermessen. Durch Vergleich der Intensität und/oder Geschwindigkeit mit dem Wert, der vor dem Aufbringen der Makromoleküle im Microarray gemessen wurde, kann die Dämpfung bzw. Geschwindigkeitsänderung der Oberflächenschallwelle durch die Präsenz der Makromoleküle bestimmt werden. Daraus kann auf die Menge der gebundenen Makromoleküle zurückgeschlossen werden. So kann für jeden einzelnen Spot des hergestellten Microarrays auf die dort befindliche Anzahl der Makromoleküle geschlossen werden. Wird ein solchermaßen vermessenes Microarray zur Analyse von Makromolekülen z. B. gemäß dem erfindungsgemäßen Analyseverfahren eingesetzt, ist eine genaue quantitative Aussage möglich. Gegebenenfalls wird zusätzlich eine Kalibrierungsmessung vorgenommen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung läßt sich auf präzise und reproduzierbare Weise ein Microarray herstellen, das ins-

besondere vorteilhaft mit den erfindungsgemäßen Analyseverfahren eingesetzt werden kann. Die Einrichtungen zur Erzeugung der Oberflächenschallwellen, vorzugsweise also der Interdigitaltransducer, können zunächst für die Herstellung des Microarrays eingesetzt und dann weiterbenutzt werden, um Analysen durchzuführen. Auch ein ggf. vorhandener bevorzugter Aufenthaltsbereich kann zunächst vorteilhaft bei der Herstellung des Microarrays ausgenutzt und dann bei folgenden Analysen verwendet werden.

Sowohl bei den erfindungsgemäßen Analyseverfahren als auch beim erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren wird eine kleine Flüssigkeitsmenge mit Hilfe von Oberflächenschallwellen bewegt, um lokal reagieren zu können, entweder zum Aufbau eines Microarrays aus einzelnen Spots oder zur Reaktion des in der Flüssigkeit befindlichen Materials mit einzelnen Spots des Microarrays. Der Einsatz des Impulsübertrages von Oberflächenschallwellen ermöglicht dabei jeweils eine schonende und definierte Bewegung.

Anhand der anliegenden Figuren werden Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahren im Detail erläutert. Die Figuren sind dabei nicht notwendigerweise maßstabsgetreu und nur schematisch. Es zeigt

- Figur 1 eine Anordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Analyse von Makromolekülen,
- Figur 2 eine andere Anordnung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Analyse von Makromolekülen,
- Figur 3 eine weitere Anordnung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Analyse von Makromolekülen, und
- Figur 4 einen Schritt bei der erfindungsgemäßen Herstellung einer Analysevorrichtung.

Figur 1 zeigt eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens. 1 kennzeichnet die Oberfläche eines Festkörperchips, ähnlich wie er z. B. auch für Anwendungen in der Halbleitertechnik verwendet wird. Das Material des Substrates dieser Oberfläche ist piezoelektrisch und vorteilhafterweise mit Siliziumdioxid beschichtet. Eine Siliziumdioxidbeschichtung garantiert eine wohl definierte und bekannte Oberflächenchemie.

Auf der Oberfläche befinden sich Interdigitaltransducer 5, 6, 7 und 8 in getapelter Ausführung. Die Interdigitaltransducer bestehen aus Elektroden 9 mit fingerartigen Fortsätzen, die paarweise ineinander greifen. Alternativ sind auch andere Geometrien von Interdigitaltransducern denkbar, wie sie aus der Technologie der Oberflächenwellenfilter bekannt sind. Bei Anlegen eines Wechselfeldes an die Elektroden 9 eines Interdigitaltransducers wird eine Oberflächenschallwelle mit einer Wellenlänge erzeugt, die dem Fingerabstand der Elektroden entspricht und deren Ausbreitungsrichtung im wesentlichen senkrecht zu den Fingerelektroden ist. Durch die getaperte Ausführung, bei der der Abstand der Finger lokal unterschiedlich ist, ist eine lateral begrenzte Oberflächenschallwelle erzeugbar. Die Transducer umfassen jeweils eine große Anzahl von ineinander greifenden Fingern, von denen jeweils nur einige schematisch und nicht maßstabsgetreu dargestellt sind.

Die Anzahl und Anordnung der Interdigitaltransducer ist an die gewünschten Gegebenheiten angepaßt. Bei dem gezeigten Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens befindet sich zwischen den Interdigitaltransducern ein bevorzugter Aufenthaltsbereich 11. Dessen Benetzungseigenschaften unterscheiden sich derart von seiner Umgebung, daß sich eine wäßrige Lösung bevorzugt darauf aufhält. Dazu ist z. B. die Umgebung des bevorzugten Aufenthaltsbereiches silanisiert. Ein solcher bevorzugter Aufenthaltsbereich verbessert die Lokalisierung von wäßriger Lösung, ist jedoch zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht notwendigerweise vorgesehen. Im Bereich des bevorzugten Aufenthaltsbereiches 11 sind Spots 16 aus Makromolekülen angeordnet. Die einzelnen Spots 16 umfassen jeweils Makromoleküle, die für jeden Spot 16 z. B. unterschiedlich sind.

Mit einer solchen Anordnung wird das erfindungsgemäße Analyseverfahren wie folgt durchgeführt. Ein Flüssigkeitstropfen 3 mit zu untersuchenden Makromolekülen wird z. B. mit Hilfe eines Pipettierroboters in den Bereich der Spots 16 gebracht, wie es in Figur 1 sichtbar ist. Der Flüssigkeitstropfen ist in der Größenordnung von einigen wenigen nl bis μ l. Ein Spot hat z. B. eine Ausdehnung von 100 μ m, wenn ein Tropfen mit wenigen nl eingesetzt wird.

Mit Hilfe von Oberflächenschallwellen, die mit den Interdigitaltransducern 5, 6, 7 und 8 erzeugt werden, wird ein Impuls auf die Flüssigkeitsmenge erzeugt. Dazu wird an den entsprechenden Interdigitaltransducer über die Elektroden 9 und entsprechende nicht gezeigte Anschlußelektroden ein elektromagnetisches Wechselfeld einiger 10 bis einiger 100 MHz angelegt. Dort, wo der Fingerabstand derart ist, daß die Resonanzbedingung im wesentlichen erfüllt ist, wird eine Oberflächenschallwelle erzeugt, die sich im wesentlichen senkrecht zu den Fingern des Interdigitaltransducers ausbreitet. Beispielhaft ist dies in Figur 1 durch den Pfeil 14 angedeutet. Die Oberflächenschallwelle überträgt einen Impuls auf die Flüssigkeitsmenge 3 und bewegt so den Flüssigkeitstropfen von einem Spot zu einem anderen. Mit Hilfe der in Figur 1 gezeigten vier Interdigitaltransducer 5, 6, 7 und 8 läßt sich der Flüssigkeitstropfen 3 so definiert an die Stelle eines bestimmten Spots 16 bringen.

Nach einer Verweildauer, die etwa der typischen Hybridisierungszeit der in dem Flüssigkeitstropfen 3 vorhandenen Makromoleküle mit den an dem Spot vorhandenen Makromolekülen entspricht, wird der Flüssigkeitstropfen 3 wiederum mit Hilfe von Oberflächenschallwellen von dem Spot entfernt. Er kann zu einem anderen Spot bewegt werden, um eine entsprechende Hybridisierung an dem dortigen Ort zu ermöglichen. Nachdem die gewünschten Spots 16 mit der Flüssigkeit 3 in Berührung gekommen sind, wird analysiert, an welchen Spots eine Hybridisierung mit den in der Flüssigkeit vorhandenen Makromolekülen stattgefunden hat. Befinden sich z. B. in der Flüssigkeit fluoreszenzmarkierte Makromoleküle, kann durch eine orts aufgelöste Messung der Fluoreszenz festgestellt werden, an welchen Spots eine Reaktion stattgefunden hat. Ist die Art der Makromoleküle, die sich an

den einzelnen Spots 16 befinden, bekannt, läßt sich auf diese Weise auf die Art der Makromoleküle in dem Flüssigkeitstropfen 3 zurückschließen.

Es kann auch eine in situ-Messung durchgeführt werden. Nachdem der Flüssigkeitstropfen 3 auf den ersten Spot aufgebracht worden ist, wird er z. B. mit Hilfe der Oberflächenschallwelle 14 des ersten Interdigitaltransducers 7 ein wenig von dem Spot weg bewegt. Mit dem gegenüberliegenden Interdigitaltransducer 6 wird eine zweite Oberflächenschallwelle erzeugt, die im Wechsel mit der ersten Oberflächenschallwelle 14 in entgegengesetzter Richtung auf den Tropfen 3 wirkt. Daraufhin bewegt sich der Tropfen 3 rückwärts wiederum über den Spot hinweg. Durch den zeitlichen Wechsel der zwei Oberflächenschallwellen bewegt sich also der Tropfen hin und her. Bei jeder Berührung des Tropfens 3 mit dem Spot reagieren Makromoleküle aus der Flüssigkeit mit Makromolekülen am Spot. Durch Vermessen z. B. der Fluoreszenz zu denjenigen Zeitpunkten, an denen sich der Tropfen 3 gerade nicht an dem Spot befindet, kann so der zeitliche Verlauf der Reaktion bestimmt und eine Aussage über die Reaktionskinetik getroffen werden.

Die Messung der Fluoreszenz oder eines anderen Nachweisparameters, wie z. B. der elektrischen Ladung oder der Masse, erfolgt in bekannter Weise mit entsprechenden hier nicht näher interessierenden Meß- und Auswerteeinrichtungen und Auswerteprogrammen.

Bei den beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren ist nur eine sehr kleine Flüssigkeitsmenge 3 notwendig, so daß auch bei einer begrenzten Menge Material, das zu untersuchen ist, eine verlässliche und reproduzierbare Messung möglich ist. Es ist nicht notwendig, alle Spots 16 gleichzeitig mit der Flüssigkeit zu überschwemmen.

Da nur eine kleine Flüssigkeitsmenge notwendig ist, kann die Konzentration der zu untersuchenden Makromoleküle in dem Flüssigkeitstropfen höher sein, auch wenn nur wenig Ausgangsmaterial an zu untersuchenden Makromolekülen vorliegt.

Andererseits kann bei mit herkömmlichen Verfahren vergleichbarer Konzentration die Probenmenge sehr viel geringer sein, da nur Nanolitermengen benötigt werden.

Figur 2 zeigt die Geometrie einer anderen Anordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens. Die Spots 16 sind hier entlang eines mäanderförmigen Aufenthaltsbereiches 17 angeordnet. Ein Flüssigkeitstropfen, der sich auf diesem mäanderförmigen Aufenthaltsbereich 17 befindet, kann mit Hilfe der Interdigitaltransducer entlang des Aufenthaltsbereiches bewegt werden, so daß er alle Spots sequenziell berührt. Diese Anordnung des Aufenthaltsbereiches senkt die Anforderungen an die Genauigkeit der lateralen Auflösung eines einzelnen Interdigitaltransducers. Bei dem gezeigten Verfahrensschritt der Figur 2 wird eine Oberflächenschallwelle 12 mit Hilfe des Interdigitaltransducers 8 erzeugt, so daß ein Flüssigkeitstropfen im in der Figur linken Teil des Aufenthaltsbereiches 17 nach oben bewegt werden kann. Der Übersichtlichkeit halber ist der Flüssigkeitstropfen selbst nicht dargestellt.

Durch eine entsprechende zeitliche Ansteuerung an die Interdigitaltransducer ist auch der Einsatz von Interdigitaltransducern mit gleichmäßigem Fingerabstand möglich. Erreicht der Flüssigkeitstropfen eine Ecke des mäanderförmigen Aufenthaltsbereiches 17, wird zeitlich synchron ein anderer Interdigitaltransducer eingesetzt, der eine Bewegung in der abgeknickten Richtung ermöglicht.

Die Auswertung erfolgt ebenso wie bei einer Anordnung der Figur 1.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch mit einer Analysevorrichtung gemäß der Figur 3 durchgeführt werden. Hier ist der Aufenthaltsbereich 19 kreuzförmig gestaltet. Auch bei einer solchen Anordnung sind die Anforderungen an die Präzision der Interdigitaltransducer niedriger.

Selbstverständlich sind auch andere Geometrien der Aufenthaltsbereiche denkbar, die an die entsprechenden Gegebenheiten angepaßt sind. Die Figuren zeigen die

Anordnung jeweils nur schematisch. Tatsächlich befindet sich eine sehr viel größere Anzahl von Spots auf einem Chip, so daß z. B. eine DNA-Screening-Analyse möglich ist.

Bei einer nicht gezeigten Ausführungsform sind bevorzugte Aufenthaltsbereiche nur im Bereich der einzelnen Spots vorgesehen, ohne miteinander verbunden zu sein. Solche Aufenthaltsbereiche dienen der Lokalisierung des Flüssigkeitstropfens im Bereich der einzelnen Spots. Durch Einstrahlen einer Oberflächenschallwelle ausreichender Intensität kann dennoch der Flüssigkeitstropfen von einem Aufenthaltsbereich zum nächsten bewegt werden. Die Anforderungen an die Präzision der Oberflächenwelleneinstrahlung sind jedoch verringert, da die bevorzugten Aufenthaltsbereiche an den einzelnen Spots die Lokalisierung des Tropfens in ihrem Bereich unterstützen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch ohne Einsatz eines bevorzugten Aufenthaltsbereiches 11, 17, 19 durchgeführt werden, wenn die Ansteuerung der Interdigitaltransducer präzise genug erfolgt. Anstelle getaperter Interdigitaltransducer kann auch eine Anzahl unterschiedlicher und individuell ansteuerbarer Transducer eingesetzt werden, die immer nur einen schmalen Bereich der Oberfläche mit einer Oberflächenschallwelle überstreichen.

Figur 4 zeigt einen Schritt bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren für ein Microarray. Auf dem Festkörperchip 1 ist ein bevorzugter Aufenthaltsbereich 11 vorgesehen. Ein Flüssigkeitstropfen 2 wird auf den bevorzugten Aufenthaltsbereich 11 z. B. mit Hilfe eines Pipettierroboters aufgebracht. Die Flüssigkeitsmenge ist z. B. in der Größenordnung von 1 nl bis wenigen µl. Der Flüssigkeitstropfen enthält Makromoleküle, die als Sondenmoleküle dienen sollen und zu diesem Zweck an vorbestimmten Orten gebunden werden sollen. Der Flüssigkeitstropfen wird dazu mit Hilfe von Oberflächenschallwellen, die mit den Interdigitaltransducern 5, 6, 7 und 8 erzeugt werden, an einen gewünschten Ort gebracht. Beispielhaft ist eine Oberflächenwelle 13 gezeigt, die mit dem Interdigitaltransducer 7 in einer Weise erzeugt wird, die bereits oben für das erfindungsgemäße Analyseverfahren be-

schrieben ist. Durch den Impulsübertrag der Oberflächenschallwelle 13 auf den Flüssigkeitstropfen 2 wird dieser in Richtung 15 bewegt. Ist der Flüssigkeitstropfen 2 an der gewünschten Stelle angekommen, wird die Beschallung mit der Oberflächenschallwelle gestoppt, so daß der Flüssigkeitstropfen 2 zur Ruhe kommt. Daraufhin wird ein äußerer Parameter geändert, auf den das Material in dem Flüssigkeitstropfen 2 reagiert. Zum Beispiel können die in dem Flüssigkeitstropfen enthaltenen Makromoleküle photoaktiv sein. In diesem Falle wird eine Beleuchtungsquelle geeigneter Wellenlänge und Intensität eingeschaltet, die oberhalb des Chips 1 angeordnet ist und den gesamten Chip homogen beleuchtet. Die Oberflächenchemie des Chips bzw. des bevorzugten Aufenthaltsbereiches 11 ist dabei so gewählt, daß durch die Beleuchtung der photoaktiven Gruppe der Makromoleküle eine Bindung der Makromoleküle mit der Oberfläche ermöglicht wird. Auf diese Weise wird an einem definierten Ort der Oberfläche ein Spot erzeugt, an dem sich die Makromoleküle aus der Flüssigkeitsmenge 2 binden. Die Flüssigkeitsmenge 2 kann im Anschluß weiterbewegt werden, um an einer anderen Stelle einen weiteren Spot zu erzeugen.

Im Anschluß kann z. B. eine weitere Flüssigkeitsmenge aufgebracht werden, in der sich andere Makromoleküle befinden, die an anderen Stellen des Chips gebunden werden sollen, um so ein Microarray zu erzeugen, in dem sich an unterschiedlichen Spots unterschiedliche Makromoleküle befinden.

Es können auch Flüssigkeitstropfen mit unterschiedlichen Makromolekülen nacheinander über denselben Spot bewegt werden. Auf diese Weise können verschiedene Sequenzen aneinander gehängt werden, um gewünschte Sondenmoleküle zu erzeugen. Die Makromoleküle aus Flüssigkeitstropfen, die zu einem späteren Zeitpunkt über die Oberfläche bewegt werden, auf denen bereits Makromoleküle aus früher über die Oberfläche bewegten Flüssigkeitstropfen gebunden sind, hybridisieren ggf. mit den ersten Makromolekülen, um ggf. längere Makromoleküle zu bilden.

Werden Makromoleküle eingesetzt, die eine elektroaktive Gruppe aufweisen, die bei Anlegen eines elektrischen Feldes eine Bindung mit der Oberfläche eingeht, so

wird anstelle der Beleuchtung ein homogenes elektrisches Feld geeigneter Stärke, Orientierung und Polarität angelegt.

Der gesamte Prozeß kann auch parallelisiert werden, um die Prozeßgeschwindigkeit bei der Herstellung eines Microarrays zu erhöhen.

In analoger Weise lassen sich auch die Anordnungen der Figur 2 und 3 erzeugen.

Die Lokalisierung der Flüssigkeitstropfen, die zur Bildung des Microarrays über die Oberfläche geschickt werden, kann durch die entsprechenden bevorzugten Aufenthaltsbereiche unterstützt werden. So ist es auch möglich, eine Anordnung von bevorzugten Aufenthaltsbereichen auf der Festkörperoberfläche vorzusehen, an denen sich die Spots nach dem Herstellungsverfahren befinden sollen. Durch solche Aufenthaltsbereiche, die nicht miteinander verbunden sind, wird die Lokalisierung der Flüssigkeit bei der Bildung des Microarrays unterstützt, so daß Anforderungen an die Präzision der durch die Oberflächenschallwellen induzierten Bewegung verringert sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung eines Microarrays muß also der äußere Parameter, in den geschilderten Beispielen die Beleuchtung oder das elektrische Feld, nicht lokal erzeugt werden, sondern kann homogen über der ganzen Chipoberfläche sein. Die orts aufgelöste Bindung wird dadurch gewährleistet, daß nur ein sehr kleiner Teil der Oberfläche mit dem Flüssigkeitstropfen 2 in Verbindung ist, in dem sich die zu bindenden Makromoleküle befinden.

Verfahren zur Analyse von Makromolekülen, Analysevorrichtung und Verfahren zur
Herstellung einer Analysevorrichtung

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen mit Hilfe eines Microarrays, das aus mehreren Spots (16) in bekannter Anordnung besteht, die eine Vielzahl von ersten Makromolekülen umfassen, die für einen Spot untereinander im wesentlichen gleich sind, wobei sich das Microarray auf einer Festkörperoberfläche (1), vorzugsweise eines Festkörperchips, befindet, bei dem
 - a) zumindest ein Flüssigkeitstropfen (3), der zweite Makromoleküle enthält, auf die Festkörperoberfläche (1) gebracht wird, wobei die Flüssigkeitsmenge eines Tropfens (3) so klein ist, daß im wesentlichen nur ein Spot (16) oder eine Gruppe von wenigen Spots des Microarrays zu einem Zeitpunkt mit dem Flüssigkeitstropfen (1) in Berührung kommt,
 - b) nach Ablauf einer vorbestimmten Zeit der Flüssigkeitstropfen (3) mit Hilfe des Impulsübertrages zumindest einer Oberflächenschallwelle (12, 14)

zu einem nächsten Spot (16) bzw. einer weiteren Gruppe weniger Spots bewegt wird,

- c) Wiederholung der Schritte a) und b), bis die gewünschten Spots des Microarrays mit dem Flüssigkeitstropfen (3) in Berührung waren.
 - d) Untersuchung der mit dem Flüssigkeitstropfen (3) in Berührung gekommenen Spots daraufhin, ob und/oder in welchem Maße eine spezifische Reaktion mit dem Material des Flüssigkeitstropfens (3) stattgefunden hat.
- 2. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach Anspruch 1, bei dem Schritt d) individuell nach der jeweiligen Durchführung des Schrittes a) oder nach der jeweiligen Durchführung des Schrittes b) durchgeführt wird.
 - 3. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach Anspruch 1, bei dem Schritt d) nach Schritt c) durchgeführt wird.
 - 4. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem eine Oberflächenschallwelle in Richtung eines oder mehrerer Spots (16) geschickt wird, und aus deren Dämpfung und/oder Geschwindigkeitsänderung auf die Menge der am jeweiligen Spot (16) gebundenen zweiten Makromoleküle geschlossen wird, nachdem der Flüssigkeitstropfen (3) entfernt worden ist.
 - 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem Schritt a) den folgenden Schritt a1) umfaßt:
 - a1) Bewegung des Flüssigkeitstropfens mit Hilfe des Impulsübertrages von zumindest zwei im wesentlichen gegeneinander gerichteten Oberflächenschallwellen, die derart im Wechsel auf den Flüssigkeitstropfen (3) geschickt werden, daß der Tropfen hin und her bewegt wird, und währenddessen eine zeitabhängige Untersuchung des Spots oder der Grup-

pe weniger Spots daraufhin durchgeführt wird, ob und/oder in welchem Maße eine spezifische Reaktion mit dem Material des Flüssigkeitstropfens (3) stattgefunden hat.

6. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen mit Hilfe eines Microarrays, das aus mehreren Spots (16) in bekannter Anordnung besteht, die eine Vielzahl von ersten Makromolekülen umfassen, die für einen Spot untereinander im wesentlichen gleich sind, wobei sich das Microarray auf einer Festkörperoberfläche (1), vorzugsweise eines Festkörperchips, befindet, bei dem
 - a) zumindest ein Flüssigkeitstropfen (3), der zweite Makromoleküle enthält, auf die Festkörperoberfläche (1) gebracht wird, wobei die Flüssigkeitsmenge eines Tropfens (3) so klein ist, daß im wesentlichen nur ein Spot (16) oder eine Gruppe von wenigen Spots des Microarrays zu einem Zeitpunkt mit dem Flüssigkeitstropfen (1) in Berührung kommt.
 - a1) der Flüssigkeitstropfen (3) mit Hilfe des Impulsübertrages von zumindest zwei im wesentlichen gegeneinander gerichteten Oberflächenschallwellen, die im Wechsel in Richtung des Flüssigkeitstropfens (3) geschickt werden, hin und her bewegt wird und währenddessen zeitabhängig untersucht wird, ob und/oder in welchem Maße eine spezifische Reaktion mit dem Material des Flüssigkeitstropfens (3) stattgefunden hat.
7. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem nicht mehr als 10%, vorzugsweise im wesentlichen nur einer der Spots (16) des Microarrays zu einem Zeitpunkt mit dem Flüssigkeitstropfen (3) in Berührung kommen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem die zweiten Makromoleküle fluoreszierend sind und zur Untersuchung in Schritt d) bzw. Schritt a1) die Fluoreszenz ausgewertet wird.

9. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei dem der Flüssigkeitstropfen (3) mit Hilfe der Oberflächenschallwelle (12, 14) auf einem bevorzugten Aufenthaltsbereich (11, 17, 19) der Festkörperoberfläche (1) bewegt wird, dessen Benetzungseigenschaften sich derart von seiner Umgebung unterscheiden, daß sich der Flüssigkeitstropfen (3) bevorzugt darauf aufhält.
10. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach Anspruch 9, bei dem der bevorzugte Aufenthaltsbereich (17) mäanderförmig ist.
11. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach Anspruch 9, bei dem der bevorzugte Aufenthaltsbereich (19) kreuzförmig ist.
12. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei dem der Flüssigkeitstropfen (3) mit Hilfe der Oberflächenschallwellen (12, 14) auf einer Festkörperoberfläche (1) bewegt wird, die eine Anzahl von bevorzugten Aufenthaltsbereichen aufweist, deren Benetzungseigenschaften sich derart von ihrer Umgebung unterscheiden, daß sich der Flüssigkeitstropfen (3) bevorzugt darauf aufhält, und die an den Orten der Spots (16) angeordnet sind.
13. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 12, bei dem die Vielzahl erster Makromoleküle unterschiedliche Oligonukleotide und/oder unterschiedliche Proteine und/oder unterschiedliche Antigene und/oder unterschiedliche Antikörper umfaßt, deren Lage auf dem Microarray bekannt ist.
14. Verfahren zur Analyse von Makromolekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 13, bei dem die zumindest eine Oberflächenschallwelle (12, 14) mit zumindest einem, vorzugsweise getaperten, Interdigitaltransducer (5, 6, 7, 8) erzeugt wird.

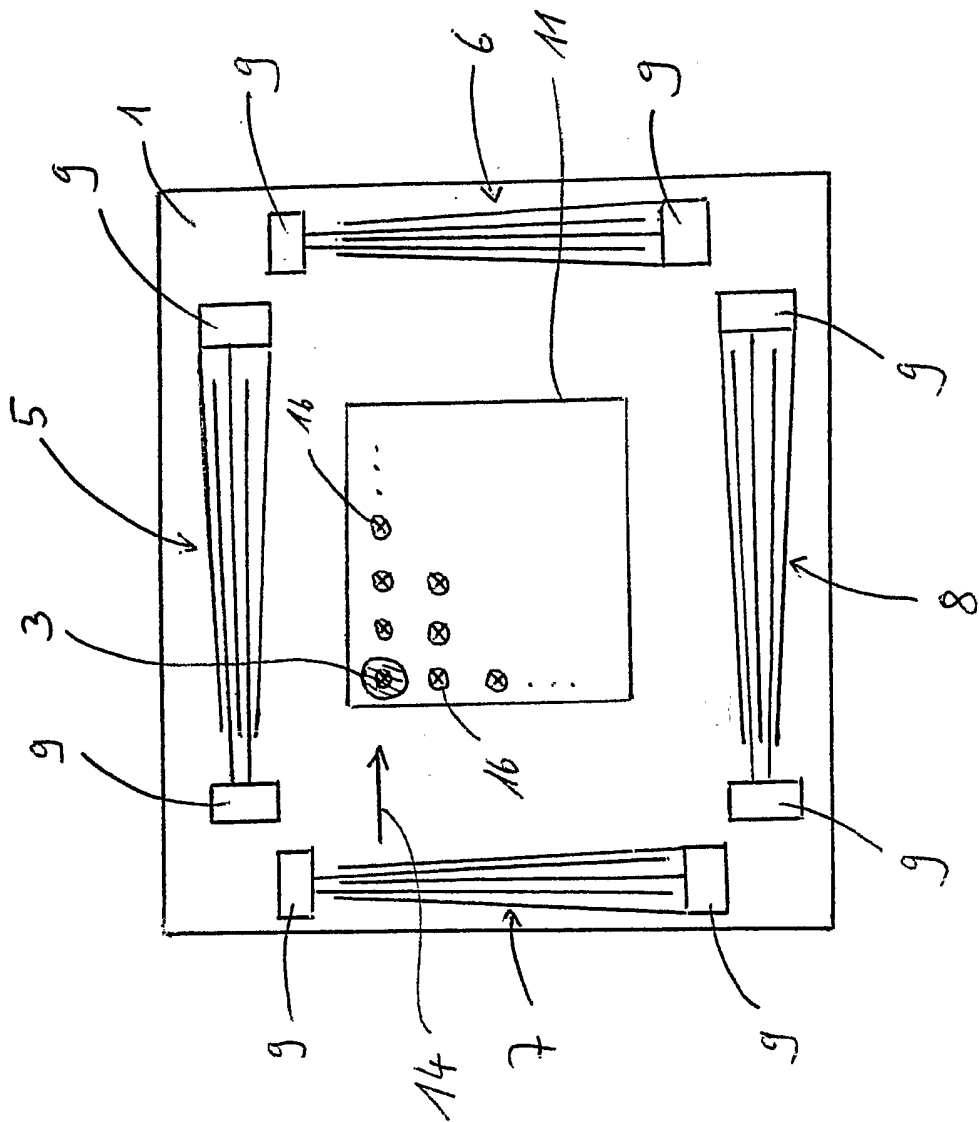
15. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung für Makromoleküle, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14, bei dem
- a) zumindest ein Flüssigkeitstropfen (2) mit zumindest einer Art von Makromolekülen auf eine Festkörperoberfläche (1), vorzugsweise eines Chips, aufgebracht wird, wobei die Makromoleküle eine aktive Gruppe aufweisen, die bei Änderung eines entsprechenden äußeren Parameters aktiviert wird, um eine Bindung an die Oberfläche (1) oder mit bereits an der Oberfläche gebundenen Molekülen zu ermöglichen,
 - b) der Tropfen (2) mit Hilfe des Impulsübertrages einer oder mehrerer Oberflächenschallwellen (13) an einen gewünschten Ort auf der Oberfläche (1) bewegt wird,
 - c) der äußere Parameter in zumindest einem Bereich der Oberfläche homogen und nicht lokal derart geändert wird, daß eine Bindung der Makromoleküle ermöglicht wird.
16. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach Anspruch 15, bei dem die aktive Gruppe eine photoaktive Gruppe und der äußere Parameter die Beleuchtung, insbesondere deren Intensität oder Frequenz, umfassen.
17. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach Anspruch 15, bei dem die aktive Gruppe eine elektroaktive Gruppe und der äußere Parameter ein elektrisches Feld umfassen.
18. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach Anspruch 15, bei dem Makromoleküle eingesetzt werden, deren aktive Gruppe bei Temperaturerhöhung reagiert, und der äußere Parameter die Temperatur der Oberfläche umfaßt.

19. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, bei dem die Oberflächenschallwelle mit Hilfe zumindest eines, vorzugsweise getaperten, Interdigitaltransducers (5, 6, 7, 8) erzeugt wird.
20. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, bei dem zur Bildung einer Anordnung aus einer Vielzahl von Spots (16), an denen Makromoleküle mit der Oberfläche (1) verbunden sind, der Flüssigkeitstropfen (2) mit Hilfe des Impulsübertrages von einer oder mehrerer Oberflächenschallwellen über die Festkörperoberfläche (1) bewegt wird und der äußere Parameter immer dann zur Ermöglichung der Bindung mit der Oberfläche (1) geändert wird, wenn der Flüssigkeitstropfen (2) eine vorbestimmte Position erreicht hat.
21. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, bei dem mehrere Flüssigkeitstropfen (2) an für sie vorbestimmte Positionen auf der Festkörperoberfläche (1) mit Hilfe einer oder mehrerer Oberflächenschallwellen (13) bewegt werden und durch Änderung des äußeren Parameters zur Ermöglichung der Bindung der Makromoleküle in dem jeweiligen Flüssigkeitstropfen (2), eine Anordnung von Makromolekülen auf der Festkörperoberfläche (1) erzeugt wird.
22. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, bei dem die Festkörperoberfläche (1) zumindest einen bevorzugten Aufenthaltsbereich (11) umfaßt, dessen Benetzungseigenschaften sich derart von seiner Umgebung unterscheiden, daß sich der zumindest eine Flüssigkeitstropfen (2) bevorzugt darauf aufhält.
23. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, bei dem die Makromoleküle unterschiedliche Oligonukleotide und/oder unterschiedliche Proteine und/oder unterschiedliche Antigene und/oder unterschiedliche Antikörper umfassen.

24. Verfahren zur Herstellung einer Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, bei dem nach Durchführung der Schritte a), b) und c) die Menge von an einem Ort gebundenen Makromolekülen durch Vermessung der Dämpfung und/oder Geschwindigkeitsänderung von zumindest einer Oberflächenschallwelle bestimmt wird, die in Richtung der gebundenen Makromoleküle geschickt wird, nachdem der Flüssigkeitstropfen (2) von dem Ort entfernt worden ist.
25. Analysevorrichtung zur Manipulation kleiner Flüssigkeitsmengen mit
- einer Vielzahl von separaten Aufenthaltsbereichen auf einer Oberfläche, wobei sich die Benetzungseigenschaften der Aufenthaltsbereiche derart von ihrer umgebenden Oberfläche unterscheiden, daß sich die Flüssigkeit bevorzugt darauf aufhält, und
 - mindestens einer Oberflächenwellenerzeugungseinrichtung zur Erzeugung einer Oberflächenschallwelle, wobei die Oberflächenschallwellenerzeugungseinrichtung bzw. die Oberflächenschallwellenerzeugungseinrichtungen in einer Anzahl und/oder Anordnung vorgesehen sind, daß für je zwei benachbarte Aufenthaltsbereiche eine Oberflächenschallwelle mit einer Impulskomponente in Richtung der Verbindungslinie zwischen den zwei Aufenthaltsbereichen erzeugt werden kann.
26. Analysevorrichtung nach Anspruch 25, bei der die Oberfläche die Oberfläche eines piezoelektrischen Festkörpersubstrates bzw. eines Substrates mit einer piezoelektrischen Beschichtung umfaßt.
27. Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 25 oder 26, bei der die mindestens eine Oberflächenschallwellenerzeugungseinrichtung einen vorzugsweise getaperten Interdigitaltransducer umfaßt.

28. Analysevorrichtung nach Anspruch 25 , bei der mehrere individuell ansteuerbare Interdigitaltransducer vorgesehen sind.
29. Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 25 bis 28, bei der die die Aufenthaltsbereiche umgebende Oberfläche im Vergleich zu den Aufenthaltsbereichen hydrophob ist.
30. Analysevorrichtung nach Anspruch 29, bei der die die Aufenthaltsbereiche umgebende Oberfläche silanisiert ist.
31. Analysevorrichtung nach einem der Ansprüche 25 bis 30, bei der die Oberfläche mit Siliziumdioxid beschichtet ist.

Figure 1



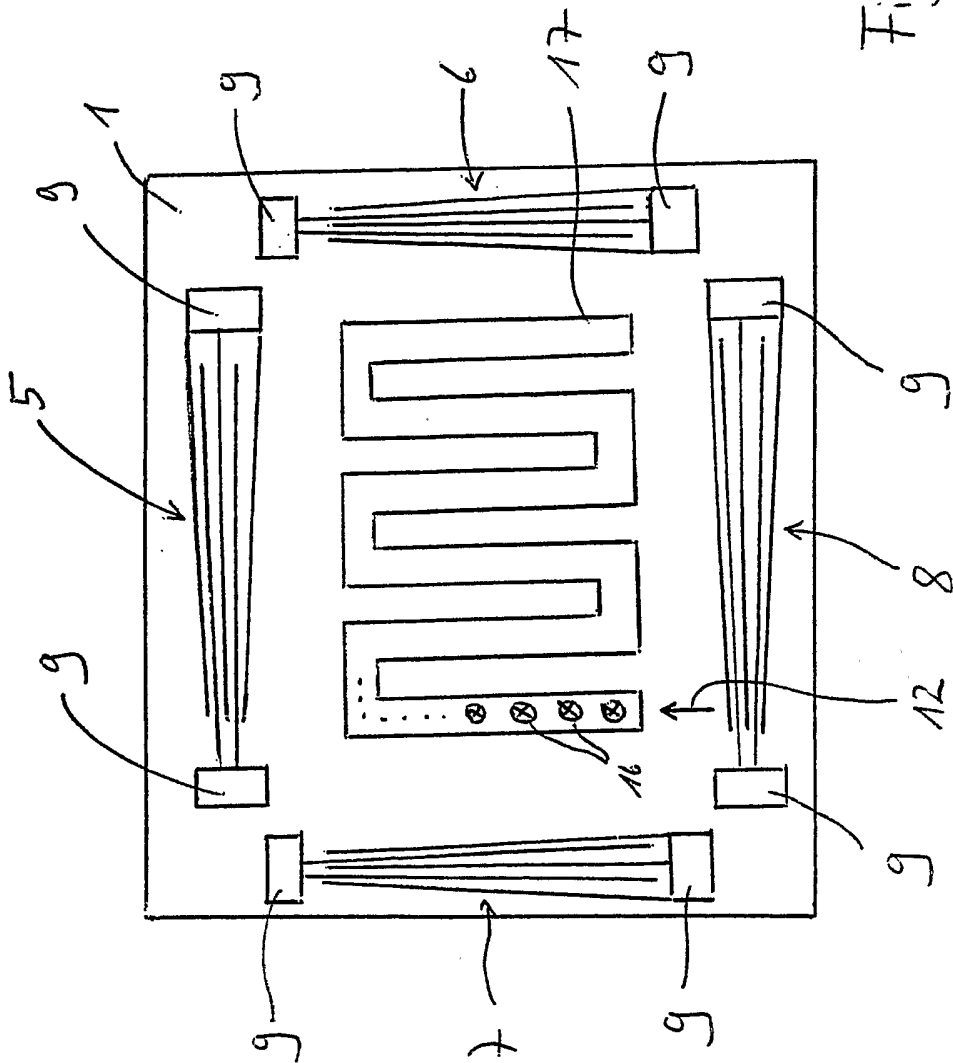
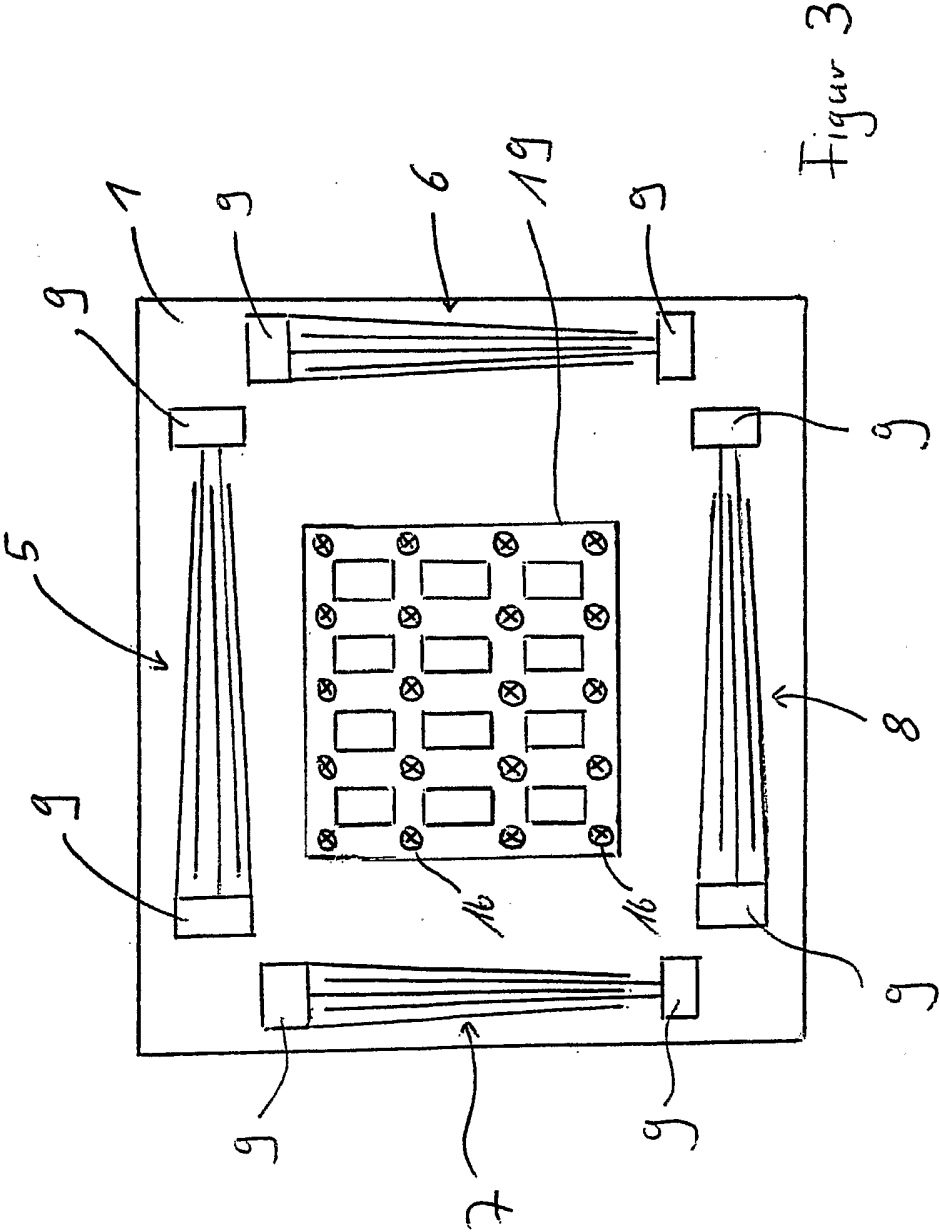
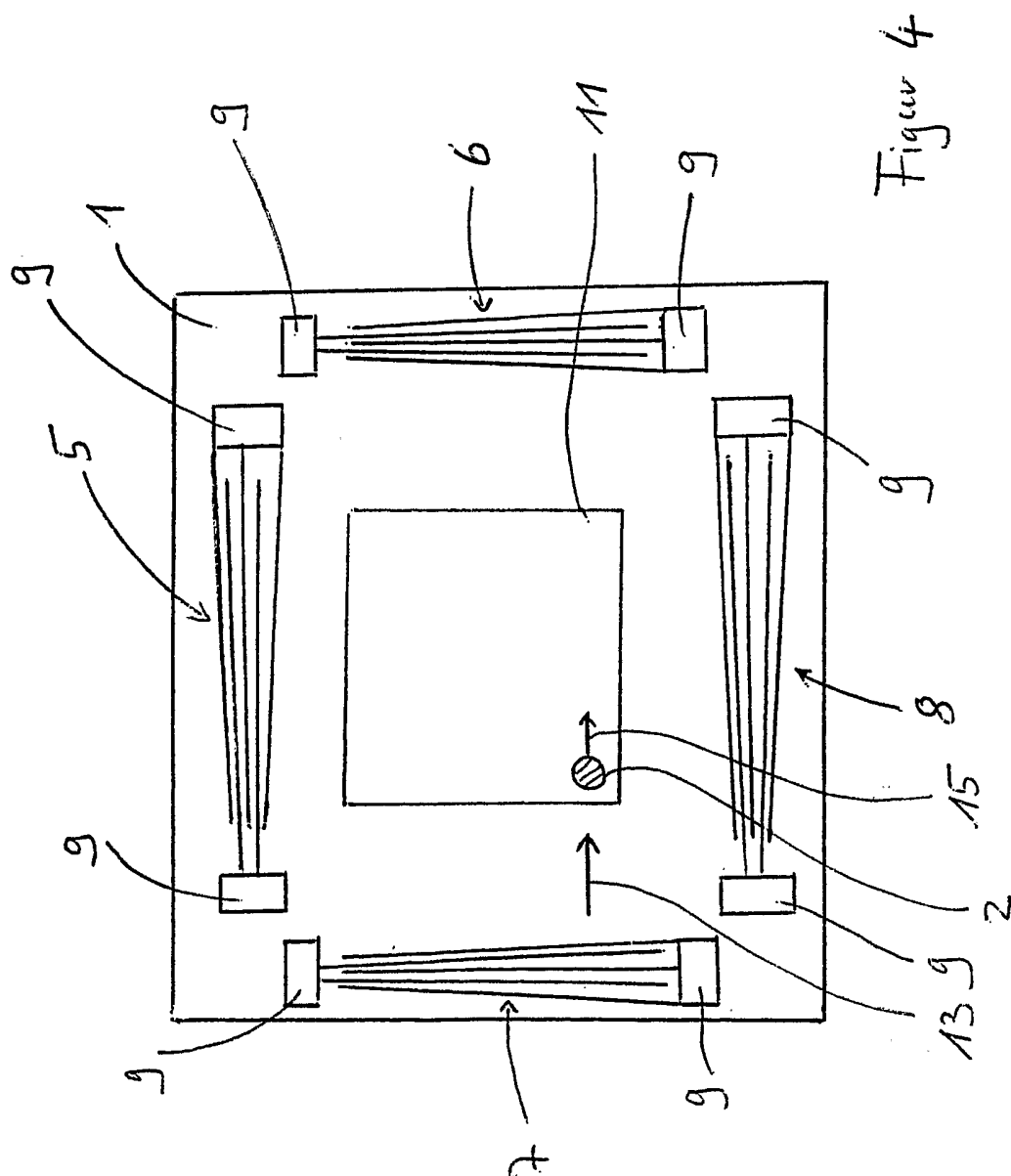


Figure 2



Figur 3



Figur 4