



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 579 T2** 2006.07.06

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 073 904 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 579.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/07799**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 919 804.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/053319**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **21.10.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.02.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **05.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/543** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

59427 **13.04.1998** **US**

287379 **07.04.1999** **US**

(73) Patentinhaber:

3M Innovative Properties Co., St. Paul, Minn., US

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, NL, SE

(72) Erfinder:

**HALVERSON, J., Kurt, Saint Paul, US; PATIL, L.,
Sanjay, Saint Paul, US; RASMUSSEN, K., Jerald,
Saint Paul, US**

(54) Bezeichnung: **HOCHDICHTe, MINIATURISIERTE ANORDNUNGEN UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG**

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

[0001] Diese Erfindung wurde durch staatliche Förderung mit der Projektnummer 95-08-0006 des National Institute of Standards and Technology möglich. Die Regierung hält gewisse Rechte an der Erfindung.

[0002] Diese Erfindung betrifft Anordnungen, die auf polymeren Oberflächen hergestellt werden, und insbesondere hochdichte, miniaturisierte Anordnungen und verfahren zu deren Herstellung.

[0003] Miniaturisierte Anordnungen können in einer Vielfalt von Anwendungen Verwendung finden, wie Gensequenzanalysen, Überwachung der Genexpression, Genkartierung, Bakterienidentifikation, Entwicklung von Arzneimitteln und kombinatorischer Chemie. Viele dieser Anwendungen beinhalten teure und häufig schwierig zu erhaltende Proben und Reaktanten. Demgemäß sind hochdichte, miniaturisierte Anordnungen wünschenswert, da die Verwendung derartiger Anordnungen die Wirksamkeit im Hinblick auf begrenzte oder teure Proben im Vergleich zu üblichen Anordnungen, wie einer 96-Well-Platte, erheblich erhöhen kann. Beispielsweise kann eine 96-Well-Platte zur Durchführung eines Diagnoseversuchs mehrere hundert Mikroliter einer Probe pro Well verlangen, wohingegen eine miniaturisierte Anordnung nur einen Bruchteil dieser Probe für die gesamte Anordnung verlangen würde. Neben der Volumenreduktion ermöglicht die Miniaturisierung die gleichzeitige Durchführung von Hunderten oder Tausenden von Prüfungen. Außerdem kann eine hochdichte Anordnung aufgrund der größeren Variation von Chemien, die auf einer einzigen Anordnung vorhanden sein können, flexibler sein als eine übliche Anordnung.

[0004] Derzeitige Verfahren zur Herstellung von miniaturisierten Anordnungen sind nicht für die Massenfertigung geeignet. Diese Verfahren sind durch Verfahren mit mehreren Schritten und durch die Schwierigkeit begrenzt, miniaturisierte Anordnungen mit dicht gepackten Reaktanten zu erzielen. Die Herstellung dieser Anordnungen wird ferner bei Anwendungen kompliziert, die an unterschiedlichen Bindungsstellen auf den Anordnungen verschiedene Chemien verlangen, wie dies bei der Herstellung von Oligonukleotid-Anordnungen der Fall ist.

[0005] Ein Beispiel für ein mehrstufiges Verfahren zur Herstellung von Anordnungen ist in US-Patent Nr. 5,445,934 offenbart. Dieses Patent offenbart ein Verfahren zur Synthese auf einem Chip. Bei diesem Verfahren ist das Substrat mit einer chemischen Spezies derivatisiert, die eine durch Licht abspaltbare Schutzgruppe enthält. Ausgewählte Stellen werden mittels Bestrahlung durch eine Maske entschützt. Diese Stellen werden dann mit einem DNS-Monomer, das eine photoprotektive Gruppe enthält, umgesetzt. Das Verfahren des Maskierens, Entschützens und Umsetzens wird bei jedem gebundenen Monomer wiederholt, bis eine Anordnung stellspezifischer Sequenzen erreicht ist. Dieses Verfahren kann sowohl zeitaufwändig als auch ressourcenintensiv sein. Aufgrund der planaren Art der Oberfläche kann an jeder Bindungsstelle eine begrenzte Konzentration von Oligonukleotiden (gemessen anhand des Abstands zwischen benachbarten Oligonukleotiden innerhalb einer Bindungsstelle) synthetisiert werden, ehe eine sterische Bedrängtheit die Hybridisierungsreaktion stört. Folglich kann die Menge an nachweisbaren Signalen von jeder Bindungsstelle begrenzt sein.

[0006] Eine andere Art Verfahren, das zur Herstellung von Anordnungen verwendet wird, ist die chipexterne Synthese. Ein Beispiel für die chipexterne Synthese ist in US-Patent Nr. 5,552,270 offenbart. Dieses Verfahren verwendet Gelkissen. Diese Gelkissen werden unter Verwendung von Robotervorrichtungen auf einem Substrat gebildet. Danach werden winzige Mengen zuvor synthetisierter Oligonukleotide mittels Roboter auf einzelne Gelkissen auf dem Substrat aufgebracht. Die Herstellung von Chips unter Verwendung einer chipexternen Synthese ist im Allgemeinen zeitaufwändig, da jede Lösung einzeln oder in kleinen Gruppen abgeschieden wird. Hohe Dichten lassen sich aufgrund der begrenzten Auflösung der Robotervorrichtungen und der Begrenzungen der natürlichen Größe der flüssigkeitsabgebenden Vorrichtungen nur schwer erzielen. Diese Art von Verfahren verlangt üblicherweise die Verwendung von spezialisierten, hoch entwickelten und miniaturisierten Werkzeugen. Die Verwendung von Gelkissen erleichtert das Befestigen einer höheren Konzentration von Oligonukleotiden an jeder Bindungsstelle, wodurch die vorstehend angerissenen Probleme, die bei planaren Oberflächen auftreten, gelöst werden können. Die Verwendung von dicken Gelschichten behindert jedoch aufgrund der langsamen Zielanalytendiffusion in das und aus dem Gel die Hybridisierungskinetik.

[0007] Es besteht ein Bedarf nach hochdichten, miniaturisierten Anordnungen, die reaktive Flächen mit großen Oberflächen und hohen Nachweissignalstärken enthalten. Die Anordnungen würden vorzugsweise eine schnelle Bindungskinetik zwischen befestigten Reaktanten und Zielanalyten fördern. Ferner besteht ein Bedarf nach Verfahren zur Herstellung von hochdichten, miniaturisierten Anordnungen. Diese Verfahren würden vorzugsweise kostengünstig sein und sich für die Massenfertigung eignen.

[0008] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform enthält die Anordnung ein polymeres Substrat und eine mindestens teilweise daran haftende verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung. Die Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung weist eine projizierte Oberfläche und eine topographische Oberfläche auf und die topographische Oberfläche ist größer als die projizierte Oberfläche. Die topographische Oberfläche ist mindestens doppelt so groß wie die projizierte Oberfläche. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die topographische Oberfläche ist mindestens fünfmal so groß wie die projizierte Oberfläche. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist die topographische Oberfläche ist mindestens fünfzehnmal so groß wie die projizierte Oberfläche. Die Beschichtung umfasst vorzugsweise eine wellige Oberfläche.

[0009] In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform weist die Anordnung eine Bindungsstellendichte von mehr als 1.000 Bindungsstellen pro Quadratzentimeter auf. Eine Dichte von mindestens 25.000 Bindungsstellen pro Quadratzentimeter ist bevorzugt, wobei eine Dichte von mehr als 60.000 Bindungsstellen pro Quadratzentimeter am meisten bevorzugt ist.

[0010] In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform enthält ein Material zur Verwendung bei der Herstellung einer Anordnung ein gerichtetes polymeres Substrat, einschließlich einer Verknüpfungsmittel umfassenden Beschichtung. Dieses Material ist für die anschließende Befestigung von Reaktanten daran geeignet.

[0011] Die erfindungsgemäßen Anordnungen erleichtern die Befestigung einer hohen Konzentration an Reaktanten an jeder Bindungsstelle mit allen damit verbundenen Vorteilen einer hohen Dichte, einschließlich der Fähigkeit, die Nachweissignalstärke zu erhöhen. Die Anordnungen mit großer topographischer Oberfläche sind in dieser Beziehung besonders nützlich. Darüber hinaus ermöglichen es diese Anordnungen mit großer topographischer Oberfläche, dass Proben mit den fraglichen Analyt(en) schnell mit den Reaktanten in Berührung kommen, ohne dass dies eine Diffusion in eine dicke Beschichtung, wie ein Hydrogel, erforderlich macht.

[0012] In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren enthält das polymere Substrat eine Hauptfläche mit einer Oberfläche. Ein Reaktant, wie DNS, wird an der Hauptfläche des Substrats befestigt, um Bindungsstellen zu bilden. Die Oberfläche der Hauptfläche wird verkleinert, wodurch die Dichte der Bindungsstellen auf dem Substrat erhöht wird.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Substrat eine biaxial gereckte Schrumpffolie. In einer besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform sind die Reaktanten Oligonukleotide, wobei die Zusammensetzung der Oligonukleotide an verschiedenen Bindungsstellen auf dem Substrat unterschiedlich ist.

[0014] In noch einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform umfasst ein Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Anordnungen das Bereitstellen eines gerichteten polymeren Substrats. Eine Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung wird auf eine Fläche des Substrats aufgetragen. Anschließend wird das Substrat derart entspannt, dass es weniger gerichtet oder isotrop wird. Während des Entspannungsschritts wird die topographische Oberfläche der Beschichtung größer als die projizierte Oberfläche der Beschichtung. Reaktanten können vor, während oder nach dem Entspannungsschritt an den Verknüpfungsmitteln befestigt werden, um eine Anordnung mit Bindungsstellen zu bilden. Vorzugsweise werden die Reaktanten vor dem Entspannungsschritt befestigt.

[0015] Die erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren sind für die Massenfertigung geeignet. Die erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren können verwendet werden, um die Wirksamkeit derzeitiger Verfahren zur Herstellung von Anordnungen durch Erreichen höherer Reaktantendichten zu erhöhen. Die erfindungsgemäßen Verfahren sind besonders nützlich beim Erreichen von hochdichten Nukleinsäureanordnungen, wobei verschiedene Nukleinsäuren an unterschiedlichen Stellen auf dem Substrat angeordnet sind.

[0016] [Fig. 1a](#) ist eine Seitenansicht einer erfindungsgemäßen Anordnung vor der Entspannung des Substrats davon.

[0017] [Fig. 1b](#) ist eine Seitenansicht der erfindungsgemäßen Anordnung aus [Fig. 1a](#) nach der Entspannung des Substrats davon.

[0018] [Fig. 2](#) ist eine perspektivische Ansicht einer Oligonukleotidanordnung, die in Übereinstimmung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde, wobei jeder Buchstabe ein anderes Oligonukleotid darstellt.

- [0019] [Fig. 3](#) ist eine Explosionsansicht einer Bindungsstelle einer Anordnung, die in Übereinstimmung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde.
- [0020] [Fig. 4](#) veranschaulicht eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren.
- [0021] [Fig. 5](#) veranschaulicht eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren.
- [0022] [Fig. 6a](#) ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM) eines Substrats, das vor der Entspannung des Substrats mit einem Copolymer aus Dimethylacrylamid/Vinyldimethylazlacton beschichtet wurde.
- [0023] [Fig. 6b](#) ist eine REM des beschichteten Substrats aus [Fig. 6a](#) nach der Entspannung davon.
- [0024] [Fig. 7a](#) ist eine REM eines entspannten Substrats, das mit Polyethylenimin beschichtet ist.
- [0025] [Fig. 7b](#) ist eine REM eines entspannten Substrats, das mit dem Copolymer aus Dimethylacrylamid/Vinyldimethylazlacton, welches mit Polyethylenimin überschichtet ist, beschichtet ist.
- [0026] [Fig. 8a](#) ist eine REM eines Substrats, das vor der Entspannung des Substrats mit einem carboxylierten Polyvinylchlorid beschichtet wurde.
- [0027] [Fig. 8b](#) ist eine REM des beschichteten Substrats aus [Fig. 8a](#) nach der Entspannung davon.
- [0028] [Fig. 9a](#) ist eine REM eines Substrats mit einem Copolymer mit einer niedrigen Glasübergangstemperatur nach der Entspannung des Substrats.
- [0029] [Fig. 9b](#) ist eine REM eines Substrats mit einem Copolymer mit einer höheren Glasübergangstemperatur als das aus [Fig. 9a](#) nach der Entspannung des Substrats.
- [0030] Die vorliegende Erfindung stellt hochdichte miniaturisierte Anordnungen und Verfahren zu deren Herstellung bereit.
- [0031] Für die Zwecke dieser Erfindung haben gelten die Definitionen mit den nachstehenden Bedeutungen.
- [0032] "Befestigen" umfasst jede Art des Anbringens von Reaktanten an einem Substrat. Zu solchen Arten gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, kovalente und ionische Bindung, Adhäsion, wie mit einem Klebstoff, oder physikalischer Einschluss innerhalb eines Substrats. Im Falle von Verknüpfungsmitteln können Reaktanten mittels Verknüpfungsmitteln, die durch Funktionalisieren einer Fläche, wie mittels einer Säurewäsche, gebildet werden, oder mittels Verknüpfungsmitteln, die auf das Substrat aufgetragen werden, am Substrat befestigt sein.
- [0033] "Analyt" bedeutet ein Molekül, eine Verbindung, eine Zusammensetzung oder einen Komplex, entweder natürlich vorkommend oder synthetisiert, welche(s/r) in einer fraglichen Probe nachgewiesen oder gemessen oder von dieser getrennt werden soll. Zu Analyten gehören, ohne darauf begrenzt zu sein, Proteine, Peptide, Aminosäuren, Fettsäuren, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Hormone, Steroide, Lipide, Vitamine, Bakterien, Viren, Arzneimittel und Stoffwechselprodukte.
- [0034] "Bindungsstelle" bedeutet einen diskreten Ort auf einem Substrat, wobei Reaktanten daran befestigt sind. Eine einzige Bindungsstelle kann eine Menge an einem oder mehreren desselben Reaktanten enthalten, die an dem Substrat befestigt sind.
- [0035] "Dichte" bedeutet ein Maß der Menge pro Einheit projizierte Substratfläche, wie beispielsweise Verknüpfungsmittel pro Quadratzentimeter oder Bindungsstellen pro Quadratzentimeter.
- [0036] "Äquivalent" bedeutet im Wesentlichen gleich.
- [0037] "Verknüpfungsmittel" bedeutet jede chemische Spezies, die im Stande ist, einen "Reaktanten" am Substrat zu befestigen.
- [0038] "Projizierte Oberfläche" bedeutet die Oberfläche einer Fläche, die bezüglich der Ebene berechnet

wird, welche die "x-" und die "y-"Achse der Fläche umfasst.

[0039] "Reaktant" bedeutet jedes chemische Molekül, jede chemische Verbindung, Zusammensetzung oder jeden chemischen Komplex, entweder natürlich vorkommend oder synthetisiert, welche(s/r) im Stande ist, einen Analyten einer fraglichen Proben entweder alleine oder in Verbindung mit einem Molekül oder einer Verbindung, das bzw. die die Bindung des Analyten an das Substrat unterstützt, wie beispielsweise ein Coenzym, zu binden. Die erfindungsgemäßen Reaktanten sind für das chemische oder biochemische Messen, Nachweisen oder Trennen nützlich. Demgemäß schließt der Begriff "Reaktant" ausdrücklich Moleküle, Verbindungen, Zusammensetzungen oder Komplexe, wie Tinte, aus, die Analyten nicht wie vorstehend beschrieben binden. Zu Beispielen für Reaktanten gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, Aminosäuren, Nukleinsäuren, einschließlich Oligonukleotide und cDNA, Kohlenhydrate und Proteine, wie Enzyme und Antikörper.

[0040] "Topographische Oberfläche" bedeutet die Oberfläche einer Fläche, die bezüglich der Ebenen berechnet wird, welche die "x-", "y-" und "z-"Achse der Fläche umfassen, oder, anders ausgedrückt, ein Maß der Oberflächenmerkmale der Beschichtung.

[0041] "Wellen oder wellig" bedeutet gewundene, wellenartige Formen. Für die Zwecke dieser Erfindung ist bevorzugt, dass eine wellige Fläche Wellen aufweist, die bezüglich ihres Musters unregelmäßig sind, wie in [Fig. 6b](#), [Fig. 7b](#), [Fig. 8b](#) und [Fig. 9b](#) dargestellt. "Wellen oder wellig" umfasst nicht Strukturen, wie Mulden oder Mikrowells, die durch Verfahren, wie beispielsweise Drucken, Prägen, Gießen, Formen, Anritzen mittels Laser, Fotolithographie, Ätzen, mechanisches Anritzen oder Rillen, gebildet werden.

[0042] Unter Bezugnahme auf [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#), enthält die vorliegende Erfindung **10** ein Substrat **12** mit mindestens einer Fläche **14** mit einer Oberfläche. Die Hauptfläche **14** kann im Allgemeinen glatt sein oder Wellen enthalten. Das Substrat **12** kann eine Anzahl von Formen aufweisen. Die Form des Substrats **12** ist nicht begrenzt, solange das Substrat **12** einen Träger für das Auftragen der Verknüpfungsmittel und Reaktanten **22** umfassenden Beschichtung **15** darauf, wie nachstehend ausführlich beschrieben, bereitstellt.

[0043] Das erfindungsgemäße Substrat ist ein polymeres Material. Das Material des Substrats wird unter Berücksichtigung der Anwendung der gebildeten Anordnungen ausgewählt. Beispielsweise weist das Substrat, für den Fall, dass für Nachweiszwecke Fluoreszenz verwendet wird, vorzugsweise eine geringe Hintergrundfluoreszenz auf und stört somit im Wesentlichen nicht die Meldesysteme, die bei den Versuchen mit den Anordnungen verwendet werden, welche in Übereinstimmung mit den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden. Das Substratmaterial ist vorzugsweise mit den Reagenzien und Bedingungen, wie Temperatur und pH-Wert, der Versuche kompatibel.

[0044] Zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können zahlreiche polymere Materialien nützlich sein. Um jedoch die große Oberfläche der Beschichtung mit Verknüpfungsmitteln auszubilden, wie nachstehend ausführlich beschrieben, sind die Materialien vorzugsweise im Stande, gerichtet zu werden, d. h. Folien, die bei der Anwendung von Energie, vorzugsweise Wärme, bei der Folie über einen bestimmten Zeitraum mindestens in eine Richtung in der Folienebene schrumpfen. Elastomere Materialien, die vor der Befestigung der Reaktanten in mindestens eine Richtung gedehnt werden, während der Befestigung der Reaktanten in gedehntem Zustand gehalten werden und sich dann wieder zusammenziehen können, wodurch die projizierte Oberfläche der Substratfläche im Vergleich zum gedehnten Zustand verkleinert wird, sind ebenfalls zur erfindungsgemäßen Verwendung geeignet.

[0045] Bezüglich verstreckter Folien muss die Schrumpfung in je zwei orthogonalen Richtungen innerhalb der Folienebene nicht gleich sein, obwohl eine im Wesentlichen einheitliche Schrumpfung bevorzugt ist. Bei Betrachtung der Schrumpfung in Abhängigkeit von der Richtung der Folienebene wird eine wesentliche Einheitlichkeit der richtungsabhängigen Schrumpfung von Punkt zu Punkt innerhalb der Folie bevorzugt; das heißt, die Folie schrumpft vorzugsweise um im Wesentlichen dieselbe Menge in jeder Richtung, ungeachtet der Position auf der Folienebene. Wenn die verwendete Folie keine im Wesentlichen einheitlichen Schrumpfkennzeichen aufweist, kann ein Registrierungsanzeiger zu den Bindungsstellen gegeben oder anderweitig verwendet werden, um die Bindungsstellen auf der fertigen Anordnung zu registrieren.

[0046] Zwar enthält das erfindungsgemäße Ausgangssubstratmaterial verstreckte Folien, die Substrate der erfindungsgemäßen Anordnungen sind jedoch im Allgemeinen entspannt, d. h. im Allgemeinen nicht länger verstreckt oder, in der Tat, isotrop. Ein Träger kann auf das Substrat aufgetragen werden, um das Substrat in einem weniger gerichteten Zustand zu erhalten. Der Träger kann wahlweise eine Antihafunterlage enthalten, die das Entfernen des Trägers, falls erwünscht, ermöglicht.

[0047] Das Substrat stellt eine vorzugsweise nicht poröse Fläche bereit, auf der Beschichtungen und/oder Reaktanten befestigt werden können. Nach dem Entspannen des gerichteten Substrats oder einer Verkleinerung der Oberfläche der Hauptfläche stellt das Substrat Stabilisierung und Integrität für die Beschichtungen und/oder Reaktanten darauf bereit. Außerdem bewahrt das Substrat die relative räumliche Beziehung zu den Bindungsstellen.

[0048] Zu bevorzugten verstreckten Folien gehören biaxial gereckte Polyethylene niedriger Dichte; biaxial gereckte lineare Polyethylene niedriger Dichte und biaxial gereckte Polyethylene ultraniedriger Dichte. Biaxial gereckte Folien sind bevorzugt, da sie eine Schrumpfung in zwei orthogonalen Richtungen in der Ebene aufweisen (nachstehend als die "x-" und die "y-"Richtung bezeichnet). Zu anderen verstreckten Folien, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung nützlich sein können, gehören uniaxial, biaxial oder multiaxial gereckte Folien, die mittels jedem im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt sein können, einschließlich, ohne darauf beschränkt zu sein, Schmelzrecken; Blasfolien, Blas-, Doppelblas- und Schlauchverfahren; Längsrecken; Verfahren mit Spannrahmen; Spannen über einen Dorn; Warmformen und Blasformen. Zu Polymeren, die in derartigen Folien Verwendung finden können, gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, Polyethylene, einschließlich hochdichten Polyethylens, Polyethylens niedriger Dichte, linearen Polyethylens niedriger Dichte, Polyethylens ultraniedriger Dichte, und Ethylen-Copolymere (einschließlich Ethylen-Propylen-Copolymere und Ethylen-Vinylacetat-Copolymere); Polyolefine, einschließlich isotaktischen Polypropylens, syndiotaktischen Polypropylens und Polymethylpentens; Polyacetale; Polyamide, einschließlich Polyamids 6 und Polyamids 66; Polyester, einschließlich Polyethylenterephthalats, Polybutylenterephthalats und Polyethylenaphthalats; halogenierte Polymere, einschließlich Polyvinylchlorids, Polyvinylidenchlorids, Polychlortrifluorethylens, Polyvinylfluorids und Polyvinylidenfluorids; Styrolpolymere, einschließlich allgemeinen Polystyrols und syndiotaktischen Polystyrols; Celluloseester, einschließlich Celluloseacetats und Cellulosepropionats; Polyketone, einschließlich Polyetheretherketons und Copolymere und Terpolymere von Kohlenstoffmonoxid mit Ethylen und/oder Propylen; Polycarbonate, einschließlich des Polycarbonats von Bisphenol A; Phenylringpolymere, einschließlich Polyphenylensulfids; Polysulfone; Polyurethane; Polymere mit Acryl- und Methacrylsäure und deren Estern; Ionomere und Copolymere, Gemische oder Schichtstrukturen mit einem jeden der vorstehend genannten Polymere. Verstreckte Folien aus jedem dieser Polymere können wahlweise vernetzt sein.

[0049] Zu Beispielen für elastomere Materialien, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung nützlich sein können, gehören natürlicher Kautschuk, Polyisoprene, Polychloropren, Polyisobutylene, Polybutene, Nitrite, Polyurethane, Silicone, statistische Copolymere und Terpolymere (wie Ethylen-Propylen-Copolymere und Ethylen-Propylen-dien-Monomer-Terpolymere) und Blockcopolymere.

[0050] Weiterhin unter Bezugnahme auf [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) enthält die Anordnung eine Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung **15**. Die Wahl der Verknüpfungsmittel basiert auf den auf dem Substrat **12** zu befestigenden Reaktanten **22** und der Anwendung, in der die Anordnung **10** verwendet wird.

[0051] In einer bevorzugten Ausführungsform werden verknüpfungsmittel derart auf die Hauptfläche **14** des Substrats **12** aufgebracht, dass die Beschichtung **15** mindestens teilweise am Substrat **12** haftet. Die verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung **15** weist eine projizierte Oberfläche und eine topographische Oberfläche auf. Die Beschichtung auf dem Substrat hat im Allgemeinen ein glattes Aussehen, wie in [Fig. 6a](#) und [Fig. 8a](#) dargestellt. Demgemäß sind die projizierte Oberfläche und die topographische Oberfläche im Wesentlichen äquivalent.

[0052] Wie nachstehend ausführlich beschrieben, wird die topographische Oberfläche nach der Entspannung des Substrats **12** größer als die projizierte Oberfläche. Überraschenderweise enthalten die erfindungsgemäßen Anordnungen **10** Beschichtungen **15**, die im Stande sind, topographische Oberflächen aufzuweisen, die erheblich größer sind als die projizierten Oberflächen. Die topographische Oberfläche der Beschichtung **15** ist mindestens doppelt so groß wie die projizierte Oberfläche der Beschichtung. Die topographische Oberfläche ist vorzugsweise mindestens fünfmal so groß wie die projizierte Oberfläche. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist die topographische Oberfläche ist mindestens fünfzehnmal so groß wie die projizierte Oberfläche.

[0053] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Beschichtung mit Verknüpfungsmitteln **15** nach der Entspannung des Substrats **12**, wie nachstehend ausführlich beschrieben, wellig, wie in [Fig. 1b](#), [Fig. 6b](#), [Fig. 7b](#), [Fig. 8b](#) und [Fig. 9b](#) dargestellt. Zwar sind die Wellen in diesen Figuren, was ein erkennbares Muster betrifft, unregelmäßig, es ist jedoch denkbar, dass in Übereinstimmung mit den erfindungsgemäßen Verfahren ein regelmäßiges Wellenmuster erzielt werden kann.

[0054] Es wird angenommen, dass dieses sehr unerwartete Ergebnis auf eine Vielfalt von Faktoren zurückzuführen ist, einschließlich der Hafteigenschaften der Beschichtung in Bezug auf das Substrat sowie die Dicke und die Glasübergangstemperatur (T_g) der Beschichtung. Nach der Entspannung des Substrats entwickelt sich aufgrund der Dehnungsübereinstimmung eine Spannungsabweichung an der Grenzfläche Substrat/Beschichtung. Die Haftung der Beschichtung auf dem Substrat sollte ausreichen, um ein vollständiges Ablösen der Beschichtung von dem Substrat zu verhindern. Da die gewünschte Anordnung vorzugsweise eine wellige Fläche enthält, kann tatsächlich ein Grad an Ablösung auftreten und trotzdem eine nützliche erfindungsgemäße Anordnung bereitgestellt werden. Der Grad der Ablösung darf jedoch nicht so groß sein, dass dies versuche stört, die auf den Anordnungen durchgeführt werden, oder dass dies zu einem tatsächlichen Verlust der Beschichtung von dem Substrat führt.

[0055] Bemerkenswerterweise haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung entdeckt, dass ein Erwärmen zum Entspannen des Substrats die Haftung an der Beschichtung tatsächlich verbessern kann. Es ist möglich, dass das polymere Substrat und die polymere Beschichtung aufgrund der Wellen eine ineinander greifende Struktur bilden. Darüber hinaus kann es während des Erwärmungsschritts zu einer gelegentlichen Verhakung der Polymerketten an der Grenzfläche Substrat/Polymer kommen. In beiden Fällen dienen die ineinander greifenden Strukturen oder die Polymerverhakungen nach dem Abkühlen dazu, ein Ablösen der Beschichtung auf ein Mindestmaß zu beschränken.

[0056] Es wird angenommen, dass dickere Beschichtungen zu Wellen mit größeren Abmessungen führen, da sich die Biegesteifigkeit der Beschichtung ungefähr in dritter Potenz zur Dicke verändert. Theoretisch ist zu erwarten, dass sich ein Gegenstand mit höherer Biegesteifigkeit mit einem größeren Radius biegt als ein Gegenstand mit geringerer Steifigkeit (sofern alle anderen Variablen gleich sind). In der Praxis wird die Biegesteifigkeit auch durch die Hafteigenschaften der Beschichtung in Bezug auf das Substrat beeinflusst.

[0057] In der vorliegenden Erfindung wird eine Beschichtung zwischen etwa 0,1 Mikron und 10 Mikron bevorzugt, wobei eine Beschichtung mit etwa 1 Mikron bevorzugt ist, um Diffusionsschwierigkeiten zu minimieren, die bei Verwendung dickerer Beschichtungen auftreten können. Ein Analyt von Interesse muss möglicherweise durch die Beschichtung diffundieren, bevor er mit dem daran befestigten Reaktanten in Kontakt kommt. Wenn die Beschichtung mit Verknüpfungsmitteln relativ dick ist, z. B. mehr als etwa 10 Mikron, könnte die erforderliche Diffusionszeit die Kinetik der Analyt/Reaktant-Wechselwirkung verlangsamen. Ferner kann sich die Beschichtung, falls diese zu dick ist, aufgrund der hohen Biegesteifigkeit einer derartigen Beschichtung von dem Substrat ablösen.

[0058] Es wird ebenfalls angenommen, dass die Beschichtung ausreichend Zeit hat, während der Verkleinerung der Substratfläche, auf der die Beschichtung haftet, Viskoelastizität zu erfahren, wenn die T_g der Beschichtung wesentlich kleiner ist als die T_g des Substrats. Die gebildete Beschichtung ist dann relativ glatt und weist keine signifikanten Wellen auf. In diesem Fall sind die projizierte Oberfläche der Beschichtung und die topographische Oberfläche der Beschichtung im Wesentlichen äquivalent. Ferner nimmt die Dicke der Beschichtung zu. Andererseits wird angenommen, dass Beschichtungen mit einer T_g , die mit der des Substrats ziemlich vergleichbar oder höher als diese ist, während der Entspannung des Substrats keine ausreichende Viskoelastizität erfahren und demgemäß eine wellige Fläche mit einer großen topographischen Oberfläche bilden.

[0059] Angesichts des Vorstehenden wird angenommen, dass eine große Vielfalt von Beschichtungen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung nützlich sein kann, sofern die Beschichtungen für das Befestigen von Reaktanten geeignet und mit den Versuchen und entsprechenden Bedingungen, die auf der jeweiligen Anordnung durchgeführt werden sollen, kompatibel sind. Bevorzugte Verknüpfungsmittel sind Azlacton-Gruppierungen, wie diejenigen, die gemäß der Lehre von US-Patent Nr. 4,304,705; 4,451,619; 5,262,484; 5,344,701 und 5,403,902 durch Copolymere bereitgestellt werden. Insbesondere bevorzugte Copolymere sind diejenigen, die unter Verwendung von hydrophilen oder wasserlöslichen Comonomeren, wie Acrylamid und Acrylamidderivaten, Hydroxyethylacrylat und -methacrylat und dergleichen, hergestellt werden. Neben Azlacton-Verknüpfungsmitteln können auch andere Verknüpfungsmittel enthaltende Copolymere verwendet werden. Dazu gehören beispielsweise Epoxy-, Carbonsäure-, Hydroxyl-, Amin-, N-Hydroxysuccinimid-, Iso- und Isothiocyanat-, Anhydrid-, Aldehyd- und andere Gruppen, die im Fachgebiet der Immobilisierung von Reaktanten gut bekannt sind. Die Verknüpfungsmittel umfassenden Copolymere können entweder mittels Stufen- oder Kettenpolymerisationsverfahren hergestellt werden, die im Fachgebiet gut bekannt sind.

[0060] Azlacton-Gruppierungen sind bevorzugt, da diese Gruppierungen für die Reaktion mit zahlreichen Reaktanten, einschließlich Oligonukleotide, geeignet sind. Azlacton-Gruppierungen sind im Allgemeinen hydroly-

tisch stabil und haben somit eine relativ lange Haltbarkeit, wenn sie in erfindungsgemäßen Anwendungen verwendet werden. Diese Gruppierungen weisen im Allgemeinen bei einer großen Vielfalt von Reaktanten eine hohe Reaktivität auf.

[0061] Die Beschichtungen können vernetzt oder anderweitig behandelt sein, um die Beschichtung unlöslich zu machen, die T_g der Beschichtung zu verändern oder die Hafteigenschaften der Beschichtung zu verändern. Copolymere mit einer niedrigen T_g können beispielsweise mit einem Vernetzungsmittel formuliert werden, um die T_g der gebildeten Beschichtung zu erhöhen. Die Beschichtungen können mittels eines von mehreren herkömmlichen im Fachgebiet bekannten Mitteln, wie Extrusionsbeschichten, Düsenbeschichten, Tauchbeschichten, Luftmesserbeschichten, Tiefdruckbeschichten, Beschichten mittels Lackvorhang, Spritzbeschichten, der Verwendung von drahtgewickelten Beschichtungsstäben und dergleichen, aufgetragen werden. Beschichtungen können aus Lösungen mit anschließendem Abziehen des Lösungsmittels oder durch Schmelzbeschichten 100 % fester Formulierungen hergestellt werden.

[0062] Die Haftung der Beschichtung auf dem Substrat kann, falls erwünscht, durch jedes dem Fachmann bekannte Verfahren verbessert werden. Zu diesen Verfahren gehören verschiedene Vorbehandlungen oder Beschichtungen der Hauptfläche, wie Korona- oder Plasmabehandlung, oder das Auftragen von Grundierungen. Zu geeigneten Grundierungen gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, Polyethylenimin, Polyvinylidenchlorid, Grundierungen, wie diejenigen, die in US-Patent Nr. 5,602,202 beschrieben sind, und Kolloiddispersi-onen anorganischer Metalloxide in Kombination mit ambifunktionellen Silanen, wie in US-Patent Nr. 5,204,219, 5,464,900 und 5,639,546 beschrieben. Weitere Verfahren zur Erhöhung der Haftung von Copolymeren an Polyolefinsubstraten sind in US-Patent Nr. 5,500,251 offenbart.

[0063] Die Verknüpfungsmittel können im Wesentlichen über den gesamten Bereich einer Fläche des Substrats, wie der Hauptfläche, oder in Punkten mit einem regelmäßigen oder unregelmäßigen Muster auf einer derartigen Fläche aufgebracht werden. In letzterem Fall ist die topographische Oberfläche jedes Punkts nach der Entspannung des Substrats größer als die projizierte Oberflächen eines derartigen Punkts. Als Alternative kann mehr als eine Verknüpfungsmittel umfassende polymere Schicht auf das Substrat aufgebracht werden. Eine erste Beschichtung mit Verknüpfungsmittel kann mit einer zweiten Verknüpfungsmittel umfassenden Beschichtung überschichtet sein, um Wellen in Übereinstimmung mit den erfindungsgemäßen Verfahren zu erhalten. Auf diese Weise kann eine Beschichtung, die ansonsten keine Wellen ausbilden würde, in eine wellige Beschichtung umgewandelt werden. Die beiden Beschichtungen haften vorzugsweise aneinander oder sind chemisch aneinander gebunden. Das Substrat kann beispielsweise mit einem Azlacton-Gruppierungen enthaltenden Polymer beschichtet sein, das wiederum mit einem zweiten Amin-Gruppierungen enthaltenden Polymer überschichtet ist. Die Amine und Azlactone reagieren unter Bindung der Schichten aneinander, es ist jedoch zu erwarten, dass freie Amingruppen übrig bleiben, die Reaktanten, wie cDNA, an dem Substrat befestigen.

[0064] Reaktanten **22** werden an dem Substrat **12** befestigt, um Bindungsstellen **16** zu bilden, wie in [Fig. 1a](#), [Fig. 1b](#) und [Fig. 3](#) dargestellt. Wie nachstehend ausführlich beschrieben, können bezüglich der erfindungsgemäßen Verfahren beliebig viele im Fachgebiet bekannte Verfahren zur Einführung der Reaktanten verwendet werden, um diese am Substrat zu befestigen. Es ist offensichtlich, dass die Befestigungsweise in Übereinstimmung mit dem oder den verwendeten Reaktant(en) abgewandelt werden kann.

[0065] Die Art der erfindungsgemäß verwendeten Reaktanten ändert sich entsprechend der Anwendung und des fraglichen Analyten. Bei der Charakterisierung von DNS sind beispielsweise Oligonukleotide bevorzugt. Bei der Durchführung von Diagnoseversuchen zur Bestimmung der Gegenwart eines Antigens sind Antikörper bevorzugt. Bei anderen Anwendungen sind Enzyme bevorzugt. Demgemäß gehören zu Beispielen für Reaktanten, ohne darauf beschränkt zu sein, Aminosäuren, Nukleinsäuren, einschließlich Oligonukleotide und cDNA, Kohlenhydrate und Proteine, wie Enzyme und Antikörper.

[0066] Unter Bezugnahme auf [Fig. 2](#) sind in einer bevorzugten Ausführungsform eine Vielfalt von Nukleinsäuren, wie Oligonukleotiden **18** (ein Oligonukleotid ist durch einen Buchstaben gekennzeichnet), an dem Substrat **12** an getrennten Bindungsstellen **16** befestigt. Die Vielfalt der Oligonukleotide **18** auf dem Substrat **12** ermöglicht eine große Anzahl potenzieller Bindungsereignisse zwischen Reaktanten und Zielanalyten einer Probe.

[0067] Die Reaktanten können vor, während oder nach der Verkleinerung der Hauptfläche oder der Entspannung des Substrats befestigt werden. Es ist jedoch bevorzugt, die Reaktanten vor der Verkleinerung der Hauptfläche oder der Entspannung des Substrats zu befestigen, um sich die erfindungsgemäßen Verfahren zu Nutze zu machen, wobei hohe Bindungsstellendichten der Reaktanten erreicht werden können.

[0068] Unter Bezugnahme auf [Fig. 6b](#), [Fig. 7b](#), [Fig. 8b](#) und [Fig. 9b](#) sind erfindungsgemäße Anordnungen im Stande, große topographische Oberflächen aufzuweisen. Diese Anordnungen mit großer Oberfläche bieten weitere Möglichkeiten, die Signalstärke der Anordnungen zu erhöhen. Die welligen Flächen ermöglichen die Befestigung von mehr Reaktanten pro Flächeneinheit als beim Binden von Reaktanten an eine relativ ebene Fläche. Außerdem ist im Falle der Befestigung von Reaktanten vor der Entspannung des Substrats das räumliche Verhältnis der Reaktanten zueinander auf der Fläche festgelegt. Nach der Entspannung des Substrats wird die Fläche der Beschichtung wellig, was eine Erhöhung der Dichte der Reaktanten bezüglich der projizierten Oberfläche bewirkt, aber aufgrund der topographischen Oberfläche deren relative Trennung aufrecht erhält. Dieser Abstand ermöglicht das Anbieten einer hohen Dichte an Reaktanten oder Bindungsstellen auf oder nahe der Fläche der Beschichtung unter Vermeidung einer potenziellen sterischen Bedrängtheit. Das wiederum erleichtert eine rasche Wechselwirkungskinetik zwischen Analytenkandidaten.

[0069] Bezüglich der erfindungsgemäßen Verfahren und unter Bezugnahme auf [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) ist das Ausgangsmaterial des Substrats **12** mindestens teilweise gerichtet. Verstreckte Folien weisen eine Flächenminderung durch Schrumpfung auf, die zum Teil von dem Verlängerungsgrad der Folie während deren Verstreckung abhängig ist. Bei den erfindungsgemäßen Verfahren ist die Flächenminderung durch Schrumpfung ein Maß für die Schrumpfung der Fläche der Folie von ihren gereckten, Abmessungen vor der Schrumpfung auf die Abmessungen nach Anwendung von Energie zum Schrumpfen der Folie. Eine Folie von 10 cm × 10 cm (Fläche 100 cm²), die nach Anwendung von ausreichender Wärme um fünfzig Prozent (50 %) in "x"-Richtung und um fünfzig Prozent (50 %) in "y"-Richtung schrumpft, wird auf 5 cm × 5 cm (Fläche 25 cm²) verkleinert und weist somit eine Flächenminderung durch Schrumpfung von fünfundsiebzig Prozent (75 %) auf. Zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist eine Flächenminderung durch Schrumpfung von etwa fünfundzwanzig Prozent (25 %) geeignet, wobei eine Flächenminderung durch Schrumpfung von mehr als etwa fünfundsiebzig Prozent (75 %) am meisten bevorzugt ist, da Folien, die Flächenminderungen durch Schrumpfung dieser Größenordnung aufweisen, im Stande sind, sehr hochdichte Anordnungen zu erzielen, wie nachstehend ausführlich beschrieben.

[0070] Unter Bezugnahme auf [Fig. 5](#) wird das Substrat **12** hergestellt. Im Falle von elastomeren Materialien wird das Substrat **12** in der "x-" und/oder der "y"-Richtung verstreckt und in verstrecktem Zustand gehalten. Zu Verfahren zum Verstrecken von elastomerem Material können die Verwendung einer Spannvorrichtung oder das Verstrecken des Materials auf einem Rahmen oder über einem Dorn gehören. In den meisten Anwendungen ist eine einheitliche Verstreckung des Substrats in sowohl der "x-" als auch der "y"-Richtung bevorzugt, sodass die Reaktanten in parallelen Reihen an dem Substrat befestigt oder daran gebunden werden können. Es können jedoch andere Muster der Reaktanten erwünscht sein, wie beispielsweise eine fächerförmige Anordnung der Reaktanten. Demgemäß kann das Ausmaß und das Muster des Verstreckens von der gewünschten Form der fertigen Anordnung abhängig sein.

[0071] Unter Bezugnahme auf [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) muss die Fläche des Substrats **12** nicht funktionalisiert sein, um die Reaktanten **22** daran zu befestigen. Abhängig von der Art der Befestigung kann das Substrat **12** jedoch mittels Funktionalisieren der Fläche zur Bildung von Verknüpfungsmitteln weiter vorbereitet werden.

[0072] Die Art der Funktionalisierung hängt von der Art des Substrats und des/der Reaktant(en) ab. In einer bevorzugten Ausführungsform mit einer verstreckten Folie, wie verstrecktem Polyethylen, sind die Verknüpfungsmittel beispielsweise Azlacton-Gruppierungen. Neben den vorstehend angeführten Azlacton-Copolymeren gehören auch die in US-Patent Nr. 4,485,236 und 5,149,806 offenbarten zu geeigneten Verbindungen mit funktionellen Azlacton-Gruppen. Ein Verfahren zur Funktionalisierung der Fläche umfasst das Säurewaschen des Substrats mit anschließender Zugabe eines bis-Aminomoleküls zur Bildung einer Fläche mit funktionellen Amin-Gruppen, an denen Azlacton-Verknüpfungsgruppen befestigt werden. Die gebildete funktionalisierte Oberfläche ist im Stande, Oligonukleotide zu befestigen. Im Fachgebiet sind weitere Verfahren zur Funktionalisierung von Polymeren bekannt und in dem Ausmaß geeignet, in dem sie zur Bildung von Verknüpfungsmitteln zum Befestigen von Reaktanten verwendet werden können, beispielsweise die in US-Patent Nr. 5,436,147 offenbarten bifunktionellen Hetero-Vernetzungsmittel. Die Verknüpfungsmittel verbleiben nach der Verkleinerung der Oberfläche der Hauptfläche vorzugsweise im Wesentlichen an dem Substrat befestigt und werden ferner durch die Verkleinerung der Oberfläche im Wesentlichen nicht abgebaut. Nach der Funktionalisierung weist das Substrat eine leere Anordnung auf, die für die anschließende Befestigung von Reaktanten geeignet ist.

[0073] Für den Fachmann sollte es offensichtlich sein, dass eine Vielfalt von Ansätzen, die Flächen von elastomeren Materialien chemisch reaktiv zu machen, bekannt sind und in der vorliegenden Erfindung insoweit zum Einsatz kommen können, dass durch ihre Verwendung Verknüpfungsmittel auf dem Substrat zur anschlie-

ßenden Befestigung von Reaktanten gebildet werden. Die Verknüpfungsmittel verbleiben nach der Verkleinerung der Oberfläche der Hauptfläche oder der Entspannung des Substrats vorzugsweise im Wesentlichen an dem Substrat befestigt und werden ferner durch eine derartige Verkleinerung oder Entspannung im Wesentlichen nicht abgebaut. Ein Beispiel für einen solchen Ansatz zur Behandlung von Flächen für das Anbringen von Biomolekülen ist in US-Patent Nr. 5,258,041 beschrieben.

[0074] Unter Bezugnahme auf [Fig. 3](#) werden zur Befestigung unter Bildung von Bindungsstellen **16** Reaktanten **22** in das Substrat und vorzugsweise in die Hauptfläche eingeführt. Zu den Arten der Befestigung können, ohne darauf beschränkt zu sein, physikalische Mittel, wie beispielsweise physikalischer Einschluss der Reaktanten **22** innerhalb des Substrats, gehören. Unter Bezugnahme auf [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) werden Reaktanten **22** in einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform unter Verwendung einer Beschichtung **15** mit Verknüpfungsmitteln zur Befestigung an dem Substrat **12** eingeführt. Die Verbindungsmittel können unter Verwendung jeder der vorstehend beschriebenen Verfahren auf das Substrat **12** aufgebracht werden. Die Beschichtung **15** haftet mindestens teilweise an der Hauptfläche **14** des Substrats **12**. Das Substrat **12** kann auch vor einem derartigen Beschichtungsschritt grundiert oder auf andere Weise behandelt sein, um die Haftung der Beschichtung **15** an dem Substrat zu erhöhen. Geeignete Grundiermittel sind vorstehend angeführt.

[0075] Ungeachtet der Befestigungsweise der Reaktanten können eine Vielzahl von im Fachgebiet bekannten Verfahren zur Einführung der Reaktanten **22** in das Substrat verwendet werden, einschließlich Synthese auf einem Chip oder chipextern. Unter Verwendung dieser Techniken können die erfindungsgemäßen Verfahren dazu verwendet werden, die Stellendichte der Anordnung um mehr als das 20-fache zu erhöhen. Für die Fertigung mit hohem Durchsatz sind hoch entwickelte miniaturisierte Werkzeuge und Verfahren wie diejenigen, die bei der Synthese auf einem Chip oder chipextern verwendet werden, möglicherweise unerwünscht. Demgemäß können große Mengen Reaktanten innerhalb einer kurzen Zeitdauer abgeschieden werden, da die anfängliche Substratgröße relativ groß ist, wie ein Substrat mit einer Fläche von 4 cm × 4 cm. Die resultierenden ausgebildeten Bindungsstellen können relativ groß sein, wobei Flächen von beispielsweise etwa 0,25 mm² bis 1,0 mm² zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind. Die Lösungen, die die zu befestigenden Reaktanten **22** enthalten, können beispielsweise gleichzeitig über Anordnungen von Kapillarröhrchen, über angeordnete PipetierVorrichtungen oder über eine Anordnung von Stäben, die zur Übertragung von Flüssigkeitströpfchen von einem Schale mit Mulden ausgebildet ist, eingeführt werden.

[0076] Es ist bevorzugt, dass die Reaktanten mit einem bekannten Muster zu Registrierungszwecken in das Substrat eingeführt werden. Die erste Anfangsposition des Reaktanten sollte bekannt sein, damit diese Position mit der Endposition korreliert werden kann, nachdem die Substratgröße auf die Abmessung verkleinert wurde, die zur Durchführung des Versuchs verwendet wird. Jede Bindungsstelle kann einen Farbstoff enthalten, um die Korrelierung zwischen dem ersten Anfangspunkt und dem Endpunkt zu erleichtern. Der Farbstoff unterliegt vorzugsweise einer anderen Nachweisart, z. B. Lichtquelle, Wellenlänge usw., als der Farbstoff oder Indikator, der zum Zwecke des Nachweises von Bindungsereignissen auf der Anordnung verwendet wird.

[0077] Unter weiterer Bezugnahme auf [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) wird das Substrat **12** nach der Befestigung des/der Reaktanten am Substrat, vorzugsweise der Hauptfläche davon, oder in bestimmten Fällen nach der Funktionalisierung des Substrats zur Bildung von Verknüpfungsmitteln (nicht dargestellt) entspannt und die Oberfläche der Hauptfläche **14** des Substrats **12** wird im Falle von verstreckten Folien durch Anwendung von Energie, wie Wärme, und im Falle von elastomeren Materialien durch Entspannung der Verstreckungskraft verkleinert. Die Anzahl der Bindungsstellen **16** vor und nach der Größenverkleinerung ist äquivalent. Der Anstieg der Dichte von Reaktanten, Bindungsstellen **16** und Verknüpfungsmitteln, falls vorhanden, kann erheblich sein. Die Anordnungen, die in Übereinstimmung mit den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden, können Bindungsstellendichten von mehr als 1.000 pro cm² aufweisen. Eine bevorzugte Dichte ist mindestens 25.000 pro cm² und eine am meisten bevorzugte Dichte ist mehr als 60.000 pro cm². Demgemäß ermöglichen die erfindungsgemäßen Verfahren dem Hersteller eine Erhöhung der Dichte der Bindungsstellen von der anfänglichen Befestigung der Reaktanten auf den verkleinerten Zustand um ziemlich erhebliche Faktoren, wie 4, 10 und sogar mehr als 20. Unter Bezugnahme auf [Fig. 4](#) kann die Fläche jeder Bindungsstelle **16** um dieselben Faktoren verkleinert werden, wodurch eine erhöhte Dichte der Reaktanten **22** an jeder Stelle gebildet wird. Diese erhöhte Dichte der Reaktanten **22** ist vorteilhaft, wenn bei der Durchführung eines Versuchs ein verstärktes Nachweissignal erwünscht ist, beispielsweise wenn fluoreszierende, absorbierende oder chemilumineszierende Spezies als Reporter verwendet werden.

[0078] Bezüglich verstreckter Folien wird die Verkleinerung vorzugsweise durch die Anwendung von Wärme bewirkt. Für die Zwecke dieser Erfindung kann jedoch jede Weise ausreichen, die zu einer Verkleinerung der Oberfläche der Hauptfläche führt. Die Art der Größenveränderung, wie die Anwendung von Wärme, beein-

trächtigt die Aktivität der Reaktanten vorzugsweise nicht wesentlich. Die Anmelderin hat gezeigt, dass ziemlich hohe Wärme zum Schrumpfen eines Substrats mit daran befestigten Oligonukleotiden (etwa 150 Grad Celsius) verwendet werden kann, ohne dadurch die Fähigkeit zu zerstören, eine anschließende DNS-Hybridisierung mit den Oligonukleotiden durchzuführen.

[0079] Bezüglich der elastomeren Materialien kann die Verkleinerung der Oberfläche durch Freigabe der Kraft erreicht werden, die das Material in verstrecktem Zustand hält. Das Substrat kann anschließend behandelt werden, um das Substrat in dem verkleinerten Format zu halten. Als Alternative kann ein Träger oder ein anderes physikalisches Mittel am Substrat befestigt werden, um es in dem größenveränderten Format zu halten.

[0080] Nach der Größenveränderung des Substrats kann das Substrat, falls erwünscht, behandelt werden, um das Substrat in dem Zustand einer verkleinerten Oberfläche zu halten. Zu einer derartigen Behandlung gehört die Vernetzung des Substrats. Als Alternative können physikalische Arten verwendet werden, wie das Befestigen eines Trägers am Substrat.

[0081] Die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Anordnungen sind in einer Vielfalt von Anwendungen nützlich, wie Gensequenzanalysen, Überwachung der Genexpression, Genkartierung, Nachweis von Krankheiten, Entwicklung von Arzneimitteln und kombinatorischer Chemie.

[0082] Für den Fachmann ist es ersichtlich, dass die erfindungsgemäßen Verfahren zur Verwendung für die Massenfertigung angepasst werden können.

BEISPIEL 1

Befestigung eines Musters an biaxial gereckter Folie

[0083] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung eines erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung eines Prüfmusters, das auf ein Substrat aus biaxial gereckter Schrumpffolie aufgedruckt ist.

[0084] Ein repetitives Muster kreisförmiger Punkte wurde unter Verwendung üblicher Flexodruckverfahren auf die Fläche einer Rolle biaxial gereckter Polyethylen-Schrumpffolie (Cryovac™ D-955 Folie, W. R. Grace & Co., Duncan, South Carolina) aufgedruckt. Das Muster umfasste eine 34 × 32 quadratische Anordnung kreisförmiger Punkte (Durchmesser 0,5 mm) mit einem Mittenabstand von 1,0 mm (100 Punkte pro Quadratzentimeter). Nach dem Drucken wurde ein Abschnitt der Folie mit dem Muster von der Rolle abgeschnitten. Die Folie wurde dann über einer Heizplatte mit einer Oberflächentemperatur von 155 °C angebracht. Die Folie wurde gelegentlich mit einer Pinzette umgedreht, um eine gleichmäßige Wärmeverteilung während des Schrumpfschritts bereitzustellen. Nachdem die beobachtbare Schrumpfung beendet war (etwa 2-3 Minuten), wurde die Folie von der Heizplatte entfernt und zum Abkühlen stehen gelassen. Die resultierende Größe des Musters nach dem Schrumpfschritt betrug etwa 0,77 cm × 0,70 cm, wobei die Größe der Flecken auf einen Durchmesser von 110 Mikron und deren Abstand auf etwa 225 Mikron, gemessen unter einem Mikroskop, abgenommen hatte. Die ursprüngliche Punktdicke erhöhte sich um das etwa 20-fache von 100 Punkten pro Quadratzentimeter auf 2.000 Punkte pro Quadratzentimeter.

BEISPIEL 2

Funktionalisierung von biaxial gereckter Folie zur Bildung von Verknüpfungsmitteln

[0085] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung der kovalenten Bindung eines Verknüpfungsmittels an die Fläche einer biaxial gereckten Schrumpffolie. Das Verknüpfungsmittel wird für die anschließende Befestigung von Reaktanten verwendet.

[0086] Gemäß dem Verfahren von Bentjen et al. (Journal of Applied Polymer Science, Band 44, 1992, S. 965), das vorliegend durch Bezugnahme eingeschlossen ist, wurden auf der Fläche einer Polyethylen-Schrumpffolie (Cryovac™ D-955, 75 Gauge, W. R. Grace and Co., Duncan, SC) funktionelle Carbonsäuregruppen erzeugt. Ein 5 cm × 5 cm großer Abschnitt der Folie wurde 1 min lang bei 72 °C in eine Chromsäurelösung (CrO₃/H₂O/H₂SO₄) eingetaucht. Die Probe wurde mit Wasser (1x), Salpetersäure (10 %, 1x) und Wasser (1x) gewaschen. Die Probe Polyethylen-Schrumpffolie wurde bei Umgebungstemperatur an Luft trocknen gelassen. Anschließend wurde sie in eine Lösung aus Dichlormethan (10 Milliliter) eingetaucht, die Diisopropylcarbodiimid (80 Mikroliter, 50 mM, Aldrich Chemical Co.) und N-Hydroxysuccinimid (60 mg, 50 mM) enthielt. Die

Lösung mit der Folie wurde 30 Minuten lang vorsichtig geschüttelt. Dann wurde O,O'-Bis-(2-aminopropyl)polyethylenglycol 800 (500 mg, Fluka Chemical Co.) zusammen mit Diisopropylethylamin (20 Mikroliter, Aldrich) zugegeben. Die Lösung wurde 18 Stunden lang vorsichtig geschüttelt, wonach die Polyethylen-Schrumpffolie mit einer hydrophilen Amin-Verknüpfungsgruppe entnommen und mit Dichlormethan (3x) gewaschen wurde.

[0087] Ein 5 cm × 5 cm großer Abschnitt der wie vorstehend beschrieben hergestellten Polyethylen-Schrumpffolie wurde in eine Lösung (5 % Feststoff, Methylethylketone, 25 ml) eingetaucht, die ein Copolymer aus Vinyldimethylazlacton/Dimethylacrylamid (60/40 Gew.-%) enthielt, welches mittels eines typischen Lösungspolymerisationsverfahrens hergestellt wurde, wie desjenigen, das in US-Patent Nr. 4,304,705 beschrieben ist. Die Mischung wurde 2 Stunden lang vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Polyethylenfolie wurde aus der Lösung entfernt, mit MEK (15 Minuten) gewaschen und an Luft trocknen gelassen, wodurch ein Substrat erzeugt wurde, da kovalent gebundene Verknüpfungsmittel enthielt.

BEISPIEL 3

Befestigung eines Reaktanten an biaxial gereckter Folie

[0088] Dieses Beispiel veranschaulicht die kovalente Bindung eines Oligonukleotids auf der Fläche der in Beispiel 2 hergestellten Folie.

[0089] Zum Nachweis der kovalenten Bindung an die mit Azlacton funktionalisierte Folie aus Beispiel 2 wurden mit Fluorescein gekennzeichnete Thymidin-Oktamere verwendet. 3'-C3-amino-(thymidin)₈-5'-fluorescein-isothiocyanat (H₂N-(T)₈-FITC) und 3'-Hydroxyl-(thymidin)₈-5'-fluorescein-isothiocyanat (HO-(T)₈-FITC) wurden von Genemed Synthesis, Inc., South San Francisco, CA, erworben. Die lyophilisierten Proben (5 O.D., 57 Nanomol) wurden in entionisiertem Wasser (0,5 ml) rekonstituiert und gefroren aufbewahrt. Durch Verdünnen in Phosphatpuffer (50 mM, pH 8,5) wurden aus dieser Stammlösung Oligonukleotidlösungen (20 Nanomol/ml) hergestellt.

[0090] Die Lösungen wurden unter Verwendung eines Kapillardispensers (4 Mikroliter, Microcap, Drummond Scientific Co., Broomall, PA) in benachbarten Reihen von Hand auf die Fläche der Folie getupft, indem die Fläche der Folie unter Abscheidung von etwa 50 Nanoliter der Lösung pro Punkt kurz mit der Öffnung des Kapillardispensers in Berührung gebracht wurde. Die getupfte Folie wurde über Nacht (16 Stunden) bei Raumtemperatur in eine abgedeckte Petri-Schale gelegt. Anschließend wurde die Folie in eine Ethanolaminlösung (50 mM in Wasser) gelegt. Die Folie wurde nach 45 Minuten entnommen und mit Wasser (2x) gewaschen, dem sich ein Waschen (30 Minuten) in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween **20** anschloss. Dann wurde die Folie erneut mit Wasser (2x) gewaschen und anschließend an Luft getrocknet. Mithilfe einer Dose Effa Duster™ (Ernest F. Fullam, Inc., Latham, NY) wurde Staub von der Fläche der Folie entfernt. Die Folie wurde mit Phosphatpuffer, pH 7,0, hydratisiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einem FITC/TRITC-Filtersatz (Chroma Technology) versehen war, betrachtet. In der Punktreihe, die der Oligonukleotid-Lösung mit endständigem Amin entsprach, wurde Fluoreszenz beobachtet. Jeder Punkt hatte einen Durchmesser von etwa 700 Mikron, was einer Fläche von 0,38 mm² entsprach. In der Reihe, die dem Oligonukleotid mit endständigem Hydroxyl entsprach, wurde eine ausgesprochen schwache Fluoreszenz beobachtet, was einen hohen Grad an kovalenter Bindung des aminreaktiven Oligonukleotids an das Azlacton-Verknüpfungsmittel nachweist.

[0091] Eine Heizplatte wurde auf eine Oberflächentemperatur von 155 °C erwärmt. Um ein Ankleben auf der Metallplatte während des Schrumpfungsschritts zu verhindern, wurde eine Silikonfolie (0,040", 3M Co.) auf die Fläche der Heizplatte gelegt. Die gebundenes Oligonukleotid enthaltende Folie wurde dann auf die Silikonfolie gelegt und schrumpfen gelassen. Die Folie wurde gelegentlich mit einer Pinzette umgedreht, um eine gleichmäßige Erwärmung bereitzustellen. Nachdem die beobachtbare Schrumpfung beendet war, wurde die Folie von der Heizplatte entfernt und zum Abkühlen stehen gelassen. Die Folie wurde mit Phosphatpuffer, pH 7,0, hydratisiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einem FITC/TRITC-Filtersatz versehen war, betrachtet. Nach der Schrumpfung war die Punktgröße auf eine Fläche von 0,023 mm² verkleinert. Entsprechend ist die Intensität des Punkts aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration des markierten Oktamers wesentlich größer, was in den folgenden Beispielen weiter gezeigt ist.

BEISPIEL 4

Einführung von Reaktanten in das Substrat unter Verwendung von Kapillarröhrchen

[0092] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung eines erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung ausgerichteter Kapillarröhrchen für die gleichzeitige Befestigung von Reaktanten auf einem gemäß Beispiel 2 hergestellten Substrat. Das Beispiel zeigt auch die erhöhte Konzentration von Fluorophor an jeder Stelle der Anordnung nach der Schrumpfung.

[0093] Ein lineares Aggregat aus 20 Glaskapillarröhrchen (Innendurchmesser 100 Mikron, Außendurchmesser 300 Mikron, Mittenabstand 500 Mikron, Länge etwa 300 cm) wurde registerhaltig an den proximalen Enden der Schläuche zusammengebaut. Die distalen Enden der Kapillarröhrchen wurden in eine Lösung aus 5-((5-Aminopentyl)thioureidyl)fluorescein (100 Mikrogramm/ml, Molecular Probes, Eugene, OR) in Na_2SO_4 (1 M)/AMPSO (50 Millimol)-Puffer (pH-Wert 9,5) gesetzt. Nach vollständigem Befüllen der Kapillarröhrchen wurde das proximale Ende des Kapillarröhrchenaggregats kurz mit der Fläche einer mit Azlacton derivatisierten, wie in Beispiel 2 beschrieben hergestellten Folie in Berührung gebracht. Beim Entfernen des Aggregats von der Folie wurde gleichzeitig eine geringe Menge der Lösung von dem Ende jedes Kapillarrohrs auf die Fläche der Folie abgeschieden. Die Folie wurde dann in eine abgedeckte Petri-Schale gelegt und über Nacht (16 Stunden) stehen gelassen. Die Folie wurde in Phosphatpuffer (50 mM, pH-Wert 8,5) gewaschen und an Luft trocknen gelassen. Dann wurde die Folie auf einen Objektträger gelegt, mit einem Tropfen Phosphatpuffer hydratisiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Folie wurde wie in Beispiel 3 beschrieben unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Mikroskop war mit einer CCD-Kamera (Photometrics, Inc.) ausgestattet, die zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität jedes Punkts verwendet wurde. Die Intensität wurde durch Erfassen eines Bildes der CCD mit anschließendem Import des Signals in eine Bildverarbeitungssoftware (UTHSCSA Image Tool V. 2.0, University of Texas) quantifiziert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität eines Punkts wurde anhand der Linienprofilfunktion der Software bestimmt. Abstände wurden unter Verwendung der Abstandsfunction, die mit einem 100-Mikron-Gitter geeicht war, bestimmt.

[0094] Vor der Schrumpfung hatte jeder Punkt einen Durchmesser von etwa 420 Mikron und einen Mittenabstand von 500 Mikron. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Flecken betrug 4940 relative Lichteinheiten (RLU). Die Folie wurde dann in Übereinstimmung mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren geschrumpft. Nach der Schrumpfung wurden Bilder unter Verwendung von Parametern erfasst, die mit denen, die vor der Schrumpfung verwendet wurden, identisch waren. Die durchschnittliche Intensität der Punkte hatte sich auf 22.500 RLU erhöht, ein Nachweis für die größere Konzentration von Fluorophor in jedem Punkt nach dem Schrumpfschritt. Die Punktgröße nahm entsprechend auf etwa 90 Mikron mit einem Mittenabstand von etwa 120 Mikron ab.

BEISPIEL 5

Einführung von Reaktanten in das Substrat unter Verwendung von in Mustern angeordneten Stäben

[0095] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung eines erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung einer Anordnung von Säulen für die gleichzeitige Übertragung und Abscheidung der Reaktantenlösung auf der Fläche des Foliensubstrats.

[0096] Aus einem Aluminiumblock von 1 Zoll X 1 Zoll wurde aus dem Vollen eine 6-X-6-Anordnung von quadratischen Stäben mit folgenden Abmessungen gefertigt: Stabhöhe = 1,8 mm, Breite = 0,75 mm, Mittenabstand = 4,0 mm. In die Spitze jedes Stabs wurde eine kleine Nut mit einem Innenwinkel von etwa 90 Grad geschnitten. Eine Schale mit kreisförmigen Mulden mit einem Durchmesser von 3,1 mm, einer Tiefe von 2,0 mm und einem Mittenabstand von 4,0 mm wurde aus einem Polyethylenblock gebohrt. In jede Mulde wurde eine Lösung aus 5-((5-Aminopentyl)thioureidyl)fluorescein (vorstehend beschrieben) eingebracht (12 Mikroliter pro Mulde). Die Spitzen der Stabanordnung wurden in die Lösungen getaucht. Nach Entfernen der Anordnung verblieb ein Tröpfchen der Lösung auf jeder Stabspitze. Die Stabanordnung wurde dann mit der Fläche einer mit Azlacton funktionalisierten Folie in Berührung gebracht. Die Folie wurde wie vorstehend beschrieben stehen gelassen, gewaschen und bildgebend dargestellt. Es wurde festgestellt, dass die Punkte einen Durchmesser von etwa 800 Mikron und einen Mittenabstand von 4,0 mm hatten. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität wurde mit 3960 RLU ermittelt. Nach dem Schrumpfen der Folie wie vorstehend beschrieben wurde festgestellt, dass die Intensität auf eine relative Fluoreszenz von 19.130 RLU angestiegen war, während der Durchmesser auf etwa 200 Mikron abgefallen und der Mittenabstand auf etwa 860 Mikron abgefallen war.

BEISPIEL 6

DNS-Hybridisierung auf Schrumpffoliensubstrat nach Verkleinerung der Oberfläche des Substrats

[0097] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung der DNS-Hybridisierung einer modifizierten Schrumpffolie, die kovalent gebundenes Oligonukleotid enthält.

[0098] Ein 2 cm × 2 cm großer Abschnitt einer mit Azlacton funktionalisierten Folie wurde in Übereinstimmung mit Beispiel 2 hergestellt. Oligonukleotidlösungen wurden unter Verwendung der folgenden Sequenzen wie in Beispiel 3 beschrieben hergestellt: 3'-(C3-amino)-TCC TAA GGC CCA ATA-5' ("Übereinstimmung") und 3'-(C3-amino)-CTT CGG AAT TTG GCG-5' ("Abweichung") (Genemed Synthesis). Die Lösungen wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, in benachbarten Reihen aufgetüpfelt und zum Reagieren stehen gelassen. Nach der Reaktion wurde die Folie auf eine Heizplatte gelegt und wie in Beispiel 1 beschrieben geschrumpft.

[0099] Dann wurde die Folie 5 Minuten lang in eine Lösung aus 5X SCC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat, pH-Wert 7,0) mit L-Sarcosin (0,1 %), Casein (1 %) und Natriumdodecylsulfat (0,02 %) eingebracht. Anschließend wurde die Folie in ein kleines Fläschchen überführt, das 300 Mikroliter der vorstehenden Lösung mit 3'-(FITC)-TAT TGG GCC TTA GGA-5'-OH (15 Nanomol/ml) enthielt. Die Hybridisierungsreaktion wurde auf einem Kreiselmischer 16 Stunden lang bei 25 °C vorsichtig geschüttelt. Die Folie wurde aus der Hybridisierungslösung genommen und mit 5X SCC (2X) gewaschen. Dann wurde die Folie auf einen Objektträger gelegt und mit einem Tropfen Phosphatpuffer (50 Millimol, pH-Wert 7,0) hydratisiert. Über die hydratisierte Folie wurde ein Deckglas gelegt.

[0100] Die Folie wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einem Fluorescein-Filtersatz versehen war, betrachtet. Fluoreszenz wurde in der Reihe Punkte festgestellt, die die immobilisierte "Übereinstimmungssequenz" (3'-(C3 amino)-TCC TAA GGC CCA ATA-5') enthielt. In der Reihe, die der "Abweichungssequenz" (3'-(C3-amino)-CTT CGG AAT TTG GCG-5') entsprach, wurde keine Fluoreszenz beobachtet, ein Nachweis dafür, dass ein Oligonukleotid kovalent an die Fläche einer biaxial gereckten Folie gebunden, Wärme zum Schrumpfen der Folie angewendet und ein komplementäres Oligonukleotid an das Oligonukleotid der gebildeten Folie hybridisiert werden kann.

BEISPIEL 7

Perspektivisches Beispiel für die Funktionalisierung eines elastomeren Substrats

[0101] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung eines Verfahrens, das nicht Teil der beanspruchten Erfindung ist, mit dem die Fläche eines elastomeren Kautschuksubstrats chemisch reaktiv gemacht wird.

[0102] In diesem Beispiel kann ein Bogen Kautschuk (erhältlich von einer Reihe von Quellen, beispielsweise Lloyd Manufacturing, Warren, Rhode Island) behandelt werden, um einen geringen Prozentsatz an Doppelbindungen der Polymerhauptkette in Epoxide umzuwandeln. Für dieses Beispiel kann der Bogen Carbon Black enthalten, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Die Epoxidierung kann über mehrere Wege erreicht werden, die im Fachgebiet gut bekannt sind, einschließlich Behandlung mit Perbenzoesäure, Pephthallinsäure und Peressigsäure. Im Fachgebiet ist gut bekannt, dass die Ringöffnung bei Epoxiden mit einer Vielfalt von Nukleophilen, einschließlich Wasser, Alkohole, Wasserstoffhalogenide, Thiole und Amine, durchgeführt werden kann. Epoxidierte Kautschuk, der mittels eines der vorstehend umrissenen Verfahren vorbereitet wurde, kann mit einem Überschuss an O,O'-Bis-(2-aminopropyl)polyethylen in Übereinstimmung mit dem in Beispiel 2 umrissenen Verfahren behandelt werden. Falls erforderlich, kann die Reaktion zur Beschleunigung der Ringöffnung des Epoxids erwärmt werden. Der mit Amin funktionalisierte Kautschuk kann anschließend mit einem Copolymer aus Vinyltrimethylazlacton/Dimethylacrylamid, wie in Beispiel 2 beschrieben, unter Erzeugung einer hoch funktionellen Fläche, die gegenüber nukleophilen Gruppierungen, beispielsweise Oligonukleotiden mit endständigem Amin, reaktiv ist, behandelt werden. Als Alternative kann der epoxidierte Kautschuk, sofern ein geringerer Substitutionsgrad erforderlich ist, in einem einzigen Schritt direkt mit Oligonukleotid mit endständigem Amin behandelt werden.

BEISPIEL 8

Perspektivisches Beispiel für die Befestigung eines Reaktanten an einem elastomeren Substrat

[0103] Das wie in dem perspektivischen Beispiel 7 beschrieben ausgebildete funktionalisierte elastomere

Substrat kann beispielsweise durch Anbringen des Substrats über einem Rahmen oder einem Dorn mechanisch in entweder der "x-" oder der "y-"Richtung oder gleichzeitig in sowohl der "x-" als auch der "y-"Richtung verlängert werden. Reaktanten in Form von beispielsweise Oligonukleotiden können auf das verlängerte Elastomer aufgetragen werden. Zur Ausbildung der Anordnung kann eine Vielfalt von Verfahren verwendet werden, einschließlich Abgabe durch eine Anordnung von Schläuchen, Nadeln, Tintenstrahldüsen, Stiften oder mittels Übertragung von einer Anordnung an Mulden unter Verwendung eines Stempels. Nach Abscheiden der Lösungen auf der Fläche und dem Reagierenlassen der Biomoleküle wird die mechanische Kraft entfernt, wodurch die Größe der Anordnung verkleinert und gleichzeitig die lokale Konzentration der Reaktanten an jeder Stelle der Anordnung vergrößert wird.

BEISPIEL 9

Registrierung von Reaktanten auf dem Substrat

[0104] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung eines Verfahrens zum Auffinden der Reaktanten nach Befestigung an einer biaxial gereckten Folie unter Verwendung eines Reportermoleküls, das an jeder Stelle der Anordnung eingeführt wurde. Das zum Auffinden der Anordnungs-elemente verwendete Reportermolekül wird bei einer Wellenlänge erfasst, die sich von der des für den Versuch verwendeten Reportermoleküls unterscheidet.

[0105] Es wurde eine Lösung "1" enthaltend 5-(2-Aminoethylamino)-1-naphthalin (EDANS, 200 Mikromol in Phosphatpuffer mit pH-Wert 8,5) hergestellt. Durch Verdünnen der Stammlösung aus Beispiel 3 in der EDANS-Lösung "1" (endgültige $\text{H}_2\text{N}(\text{T})_8$ -FITC-Konzentration 5 Mikromol) wurde eine zweite Lösung "2" enthaltend 3'-C3-amino(thymidin)₈-5'-fluoresceinisothiocyanat ($\text{H}_2\text{N}(\text{T})_8$ -FITC) hergestellt. Unter Verwendung eines Mikrokapillar-Spotters wurden wie in Beispiel 3 beschrieben Reihen mit Punkten aus Lösung "1" erzeugt. In jeder Reihe wurde willkürlich ein Platz frei gelassen, auf den anschließend Lösung "2" getüpfelt wurde. Auf diese Weise wurden Punktreihen erzeugt, in denen alle Punkte EDANS enthielten und ein Punkt EDANS sowie gebundenes fluoresceingekennzeichnetes Oligonukleotid enthielt. Die getüpfelte Folie wurde eine Stunde lang in eine abgedeckte Petri-Schale gelegt, wonach sie entfernt und mit Wasser gewaschen, getrocknet und wie in Beispiel 1 beschrieben geschrumpft wurde. Nach dem Schrumpfschritt wurde die Folie unter einem Fluoreszenzmikroskop zuerst unter Verwendung eines Bandpasserregungsfilters (350 +/-20 nm) und eines Langpasssemissionsfiltersatzes (>420 nm, Chroma Technology) betrachtet. Mit diesem Filtersatz wurde die EDANS-Fluoreszenz jedes Punkts betrachtet und das Bild und die Position jedes Punkts mit einer CCD-Kamera und Bildsoftware, wie in Beispiel 4 umrissen, erfasst. Dann wurde die Folie unter Verwendung eines FITC/TRITC-Filtersatzes (Chroma Technology) betrachtet. Dabei wurden nur die einzelnen Punkte in jeder Reihe, die gebundenes $\text{H}_2\text{N}(\text{T})_8$ -FITC enthielten, betrachtet. Eine "Überlagerung" der beiden Bilder ergibt die Position der Punkte, die das markierte Oligonukleotid enthalten, ein Nachweis, dass ein Reportermolekül in jedes Element der Anordnung eingeführt werden und zur Ermittlung der räumlichen Position jedes Punkts der Anordnung dienen kann. Diese Information wurde anschließend gespeichert und zur Bestimmung der Identität derjenigen Punkte verwendet, in denen sich ein zweiter Reporter befindet, beispielsweise ein Reporter, der während einer Hybridisierungsreaktion an einer Stelle der Anordnung an Stellen gebunden wurde.

BEISPIEL 10

Herstellung von Copolymeren, die Verknüpfungsmittel aufweisen

[0106] Die Herstellung von Copolymeren wird problemlos durch im Fachgebiet gut bekannte Verfahren erreicht, wie die Verfahren entsprechend der Lehre von US-Patent Nr. 4,304,705. Es folgt ein typisches Beispiel: In ein Reaktionsgefäß mit Rührer, Thermometer, Rückflusskühler, Heizmittel und Mitteln zur Aufrechterhaltung einer Stickstoffatmosphäre im Gefäß wurden 2-Vinyl-4,4-dimethyl-2-oxazolin-5-on (Vinyl-dimethylazlacton 12 Teile), N,N-Dimethylacrylamid (28 Teile), 2-Butanon (60 Teile) und Azobisisobutyronitril (0,15 Teile) eingebracht (Gew.-Teile). Durch die Lösung wurde Stickstoff geperlt und die Lösung unter Rühren 24 Stunden lang auf 55 °C erwärmt. Danach betrug der prozentuale Anteil Polymerfeststoffe in der erhaltenen Lösung, mittels eines üblichen gravimetrischen Verfahrens ermittelt, 39,8 %, ein Anzeichen für eine 100%ige Umsetzung der Monomere in Polymer. Diese Polymerlösung wurden dann zur Senkung des prozentualen Feststoffanteils mit zusätzlichem 2-Butanon oder anderen Lösungsmitteln zur Herstellung der Beschichtungs-lösungen verdünnt.

[0107] Auf ähnliche Weise können andere Polymere mit unterschiedlichen Monomerverhältnissen, unterschiedlichen Comonomeren oder unterschiedlichen Monomeren für Verknüpfungsmittel hergestellt und in der Erfindung verwendet werden.

Grundier- und Beschichtungsverfahren

[0108] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung von Verfahren zum Grundieren der Fläche des Substrats sowie Verfahren zur Bereitstellung einheitlicher, dünner Verknüpfungsmittel umfassender Beschichtungen auf den Substraten.

[0109] Für die in Tabelle 1 beschriebenen Beispiele 11a-11i wurde eine Rolle verstreckter Substratfolie vor dem Beschichten in Übereinstimmung mit auf dem Fachgebiet gut bekannten Techniken entweder nicht grundiert (keines), koronabehandelt (Cr) oder Ammoniak-plasmabehandelt (AP). Das Grundieren mit Polyethylenimin (PEI, durchschnittliches M_w etwa 750.000, 50 Gew.-% Lösung in Wasser) (Aldrich) wurde durch Verdünnen der Stammlösung auf 0,05 Gew.-% mit Methanol mit anschließendem Extrusionsdüsenbeschichten auf das passende Foliensubstrat erreicht.

[0110] Zum Beschichten wurden die Verknüpfungsmittel umfassenden Copolymere, die wie in Beispiel 10 beschrieben hergestellt wurden, mit passenden Lösungsmitteln verdünnt, um die Beschichtungslösungen mit üblicherweise weniger als 10 Gew.-% Feststoff, vorzugsweise <5 % Feststoff, bereitzustellen. Es wurden folgende Beschichtungsverfahren verwendet: (1) Extrusionsdüsenbeschichten, "E", und (2) Umkehrgravurwalzbeschichten, "G". Die Beschichtungslösung wurde vor dem Beschichten fakultativ mit einem Vernetzungsmittel formuliert. Beim Extrusionsbeschichten wurde dies durch Verwendung von zwei Behältern erreicht, eine für die Polymerlösung, eine für die Vernetzungsmittellösung. Die Lösungen wurden kurz vor Eintritt in die Beschichtungsdüse durch einen Linienmischer gepumpt. Bei jedem Beispiel wurde das Lösungsmittel durch 1 Minute langes Führen der Folie durch einen auf 38 °C erwärmten Ofen abgezogen.

Tabelle 1

Bsp.	Substrat	Grund.	Verwendete Copolymer-beschichtungen	Lösungsmittel (% Feststoff)	Beschichtungsverfahren	Vernetzungsmittel (Gew.-%)
11a	A	None	70:30 p(DMA/VDM)	MEK (1,5)	E	ED (10 %)
11b	A	Cr	70:30 p(DMA/VDM)	MEK (1,0)	E	ED (10 %)
11c	A	Cr	70:30 p(DMA/VDM)	MEK (1,5)	E	ED (10 %)
11d	B	AP	70:30 p(DMA/VDM)	IPA (5,0)	G	Keines
11e	A	Keines	50:30:20 p(BA/DMA/VDM)	MEK (1,5)	E	Keines
11f	B	Cr	70:30 p(DMA/VDM)	IPA (1,0)	G	Keines
11g	B	Keines	70:30 p(DMA/VDM)	IPA (1,0)	G	Keines
11h	A	Cr/PEI	70:30 p(DMA/VDM)	MEK (1,5)	E	Keines
11i	C	Cr	70:30 p(DMA/VDM)	MEK (1,0)	E	ED (2,5 %)

A = Biaxial gerecktes Polyethylen, Cryovac D955 1,0 mil, Sealed Air Co., Duncan, SC.
 B = Biaxial gerecktes Polyethylen, Cryovac D955 0.6 mil, Sealed Air.
 C = Biaxial gerecktes Polyethylen, Clysar 1,0 mil, DuPont Co., Wilmington, DE.
 Copolymere: DMA = Dimethylacrylamid; VDM = Vinyl dimethylazlacton; BA = Butylacrylat
 Lösungsmittel: MEK = 2-Butanon; IPA = Isopropylalkohol
 Vernetzungsmittel: ED = 1,2-Ethylendiamin (Aldrich);

[0111] Andere Abkürzungen wie vorstehend in den Verfahren beschrieben.

BEISPIEL 12

Ausbildung einer welligen Fläche

[0112] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung der Ausbildung von welligen Flächen aus einer Verknüpfungsmittel umfassenden Beschichtung auf dem Substrat.

[0113] Ein Abschnitt beschichtete Folie aus Beispiel 11a wurde in Übereinstimmung mit dem in Beispiel 3 umrissenen Verfahren entspannt. Unter Verwendung üblicher Präparationstechniken (Rasterelektronenmikroskop, Modell XL 30 Series, Philips Electronic Instruments, Mahwah, NJ) wurden REM-Aufnahmen erstellt. Kurz gesagt wurden die Proben auf einer kleinen Menge Kohleband auf der Einbetteinrichtung angebracht, sodass sie nur die Unterseite der Probe an gegenüberliegenden Ecken berührte. Die eingebetteten Proben wurden dann über einen Zeitraum, der zum Abscheiden von etwa 7-9 nm einer Goldbeschichtung ausreichte, in eine Sprühkammer (Hummer XP, Anatech LTD) gegeben. Die Proben wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 15 kV bei einer Punktgröße von 4 untersucht, wobei die Proben um 40 Grad geneigt waren. Dabei wurden Bilder einer Proben mit einer gerichteten und einer entspannten Substratprobe erhalten ([Fig. 6a](#) bzw. [Fig. 6b](#)). [Fig. 6a](#) zeigt, dass die Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung vor dem Schrumpfen im Wesentlichen glatt ist. [Fig. 6b](#) zeigt, dass die Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung eine wellige Fläche ausgebildet hat. Es konnte gezeigt werden, dass Beispiel 11b, 11c, 11d, 11f, 11g, 11h, 11i ebenfalls wellige Flächen ausgebildet hatten.

BEISPIEL 13

Stabilität der Beschichtungen

[0114] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung einer verbesserten Haftung der Verknüpfungsmittel umfassenden Beschichtung nach der Entspannung des Substrats.

[0115] Die Stabilität von Beschichtungen auf einer beschichteten Probe von Beispiel 11c wurde hinsichtlich Waschungen bei hohem pH-Wert, hohen Temperaturen und in der Gegenwart von Tensiden wie folgt untersucht.

[0116] Ein 50 mM Natriumphosphatpuffer wurde bei pH 8,38 mit 1 Gew.-% Natriumdodecylsulfat (SDS) in DI-Wasser hergestellt. Verstreckte und entspannte Stücke der vorstehend genannten Probe wurden 5 Stunden lang bei 80 °C in die vorstehend genannte Pufferlösung eingetaucht.

[0117] Die Proben wurden mittels abgeschwächter Totalreflexion (ATR) (Modell Bomem MB 102, Golden Gate Diamond ATR Series, Graseby Specac) IR-Spektroskopie untersucht, um die Gegenwart der Beschichtung nachzuweisen. Die entspannte Probe enthielt die folgenden Absorptionsbänder, was mit der Gegenwart einer Copolymer-Beschichtung übereinstimmt: 1618 (kräftiges, breites Band aufgrund von Amidcarbonyl), 1498, 1398, 1355 (mittlere, scharfe Bänder) cm^{-1} . Diese Bänder fehlten in der verstreckten Probe, ein Anzeichen dafür, dass das Verfahren der Entspannung mit Wärme die Haftung der Beschichtung auf dem Substrat unter diesen Bedingungen verbessert.

BEISPIEL 14

PEI-Beschichtung

[0118] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung eines Verfahrens zur Herstellung einer welligen PEI-Beschichtung.

[0119] Eine Probe verstreckte Folie (Cryovac D955, 1,0 mil) wurde koronabehandelt (Cr) und mit einer 0,05 Gew.-% Lösung von PEI in Methanol (Aldrich) wie in Beispiel 11 beschrieben behandelt. Ein Abschnitt der Probe wurde in Übereinstimmung mit dem in Beispiel 3 umrissenen Verfahren entspannt. Die REM der Beschichtung ist in [Fig. 7a](#) dargestellt, ein Nachweis, dass die Beschichtung im Wesentlichen glatt ist. Demgemäß wurde keine wellige Fläche geformt.

[0120] Zur Herstellung einer PEI-Fläche, die wellig war, wurde das mit Azlacton/Dimethylacrylamid beschichtete Substrat aus Beispiel 11a mittels Extrusion mit einer 0,3 Gew.-% Lösung aus linearem Polyethylenimin (PEI M_n ca. 423) (Aldrich) in Methanol überschichtet. Ein Abschnitt der Probe wurde in Übereinstimmung mit dem in Beispiel 3 umrissenen Verfahren entspannt. Die REM dieser mehrschichtigen Beschichtung ist in [Fig. 7b](#) dargestellt, ein Nachweis, dass die Beschichtung mit PEI-Verknüpfungsmitteln in Form einer welligen Fläche vorhanden ist.

BEISPIEL 15

Beschichtung aus carboxyliertem Polyvinylchlorid

[0121] Dieses Beispiel veranschaulicht eine weitere Verknüpfungsmittel umfassende Polymerbeschichtung, die eine erfindungsgemäße wellige Fläche ausbildete.

[0122] Eine 1 Gew.-% Lösung aus carboxyliertem Polyvinylchlorid (1,8 % carboxyliert) (Aldrich) wurde in Tetrahydrofuran (THF) (Aldrich), mit und ohne 1 % DI-Wasser hergestellt. Diese beiden Lösungen wurden von Hand mit einer Dicke von 0,005 Zoll, 125 Mikron, nass auf die Schrumpffolie (Cryovac D955, 1,0 mil) aufgebracht. Nach dem Beschichten wurde das Lösungsmittel bei Raumtemperatur etwa 20 Minuten lang abgedampft. Die verstreckten und entspannten Proben der ohne Wasser beschichteten Proben wurden mittels REM-Techniken analysiert. Die Mikroskopaufnahmen zeigten, dass vor der Entspannung eine glatte Beschichtung vorhanden war ([Fig. 8a](#)), wohingegen nach der Entspannung eine wellige Oberfläche beobachtet wurde ([Fig. 8b](#)). Die aus der wasserhaltigen Lösung ausgebildete Beschichtung bildete ebenfalls Wellen aus.

BEISPIEL 16

Schwankung der polymeren Glasübergangstemperatur

[0123] Dieses Beispiel dient der Veranschaulichung, dass ein Verknüpfungsmittel enthaltendes Polymer mit einer Glasübergangstemperatur, die wesentlich niedriger ist als die Glasübergangstemperatur (T_g) des Substrats, keine Wellen ausbilden kann.

[0124] Ein Abschnitt der beschichteten Folie aus Beispiel 11e wurde in Übereinstimmung mit dem in Beispiel 3 umrissenen Verfahren entspannt. Die (T_g) des in diesem Beispiel verwendeten Copolymers wurde mit etwa 0 °C ermittelt. Die REM der Beschichtung ist in [Fig. 9a](#) dargestellt, ein Nachweis, dass das Copolymer mit niedriger T_g eine im Wesentlichen glatte Fläche ausbildet. Im Vergleich dazu zeigt [Fig. 9b](#) die REM der entspannten Folie aus Beispiel 11d, wobei die T_g des Copolymers mittels modulierter Differentialkalorimetrie (MDSC 2920, TA Instruments, Inc., New Castle, DE) mit 110 °C ermittelt wurde. Diese Probe bildete eine wellige Fläche aus.

BEISPIEL 17

Vergleich der Oligonukleotid-Hybridisierung auf Glasobjektträgern und beschichteter Schrumpffolie

[0125] Dieses Beispiel veranschaulicht die stärkeren Signale, die während einer Oligonukleotid-Hybridisierung unter Verwendung einer erfindungsgemäßen beschichteten Folie erhalten wurden.

[0126] Zur Herstellung einer reaktiven Oberfläche auf einem Glasobjektträger wurde das Verfahren von Guo et al. (Nucleic Acids Research, 1994, Band 22, Nr. 24) verwendet. Ein Objektträger, der mit Aminopropyltrimethoxysilan (Newcomer Supply, Middletown, WI) behandelt worden war, wurde in 1,4-Phenylendiisothiocyanat (0,2 % Lösung in 1:9 Pyridin:Dimethylformamid) eingetaucht. Nach zwei Stunden wurde der Objektträger mit Methanol (2X) und Aceton (2X) gespült und anschließend an Luft getrocknet. In den folgenden Schritten wurden zwei Abschnitte (1 Zoll mal 1 Zoll) einer Schrumpffolie verwendet, die mit Azlacton/Dimethylacrylamid-Copolymer wie in Beispiel 11c beschrieben beschichtet war.

[0127] Lösungen der drei Oligonukleotide (Genosys, The Woodlands, TX, 250 mM in AMPSO-Puffer, pH-Wert 9,0) wurden wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt und anschließend unter Verwendung eines Kapillarröhrchens wie in Beispiel 3 beschrieben in benachbarten Reihen aufgetüpfelt (Reihe 1=FITC-markiert, Reihe 2="Übereinstimmung", Reihe 3="Abweichung"). Nach dem Auftüpfeln wurden die Glas- und Folienproben in eine abgedeckte befeuchtete Petri-Schale gelegt. Nach zwei Stunden wurden die Proben mit destilliertem Wasser, AMPSO-Puffer (50 mM, pH-Wert 9,0), destilliertem Wasser, SDS (0,1 % in Wasser) und destilliertem Wasser gespült. Eine der Schrumpffolienproben wurde in Übereinstimmung mit dem Verfahren in Beispiel 1 entspannt. FITC-markiertes Oligonukleotid, das zu der immobilisierten "Übereinstimmungspunktreihe" komplementär war, wurde auf Objektträger, verstrecker Folie und entspannter Folie in Übereinstimmung mit dem Verfahren aus Beispiel 6 hybridisiert, indem ein kleiner Tropfen der Hybridisierungslösung auf jede Probe gegeben und diese anschließend mit einem Deckglas abgedeckt wurde.

[0128] Die Proben wurden 30 Minuten lang in einem 45 °C-Inkubator zum Hybridisieren stehen gelassen. Nach der Hybridisierung wurden die Proben wie vorstehend beschrieben gespült. Die Fluoreszenzintensität je-

der Punktreihe wurde mit einer Rasterabtastvorrichtung, die mit einem 488-Nanometer-Laser, Fluoresceinflitern und einem Photoelektronenvervielfacher ausgestattet war, ermittelt. Es wurden durchschnittliche Intensitäten ermittelt, die in relativen Lichteinheiten (RLU) ausgedrückt wurden. Bei den Folienproben, die den Detektor unter den zum Messen des Glasobjektträgers verwendeten Bedingungen sättigten, waren Justierungen aufgrund einer Detektorverstärkung erforderlich. Zur Berechnung normalisierter RLU-Werte für die drei Proben wurde ein verstärkungsabhängiger Umwandlungsfaktor verwendet. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen eindeutig einen Anstieg der Intensität bei den Proben beschichteter Folie aufgrund einer höheren Konzentration an Reaktanten. Eine weitere 10-fache Erhöhung ist das Ergebnis einer Entspannung der Probe, die auf die erhöhte Dichte der Reaktanten zurückzuführen ist.

Probe	Reihe 1 - FITC- markiert	Reihe 2 - Überein- stimmung (RLU)	Reihe 3 - Abweichung (RLU)
Glasobjektträger	198	75	Kein Signal
Nicht geschrumpfte Folie	15.100	14.100	Kein Signal
Geschrumpfte Folie	165.000	162.000	Kein Signal

Patentansprüche

1. Anordnung, umfassend:
ein polymeres Substrat;
eine mindestens teilweise an dem Substrat haftende Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung; und
ein zur Ausbildung von Bindungsstellen an den Verknüpfungsmitteln befestigter Reaktant, wobei die Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung eine projizierte Oberfläche und eine topographische Oberfläche aufweist und die topographische Oberfläche größer als die projizierte Oberfläche ist.
2. Anordnung nach Anspruch 1, wobei die Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung eine wellige Oberfläche umfaßt.
3. Anordnung nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei die topographische Oberfläche mindestens doppelt so groß wie die projizierte Oberfläche ist.
4. Anordnung nach den Ansprüchen 1, 2 und 3, wobei die Anordnung eine Bindungsstellendichte von mehr als 2000 Bindungsstellen pro Quadratcentimeter aufweist.
5. Material zur Verwendung bei der Herstellung der Anordnung nach Anspruch 1, umfassend:
ein gerichtetes polymeres Substrat und eine mindestens teilweise daran haftende Verknüpfungsmittel umfassende Beschichtung.
6. Verfahren zur Herstellung der Anordnung nach Anspruch 1, umfassend:
das Bereitstellen eines gerichteten polymeren Substrats;
das Auftragen einer Verknüpfungsmittel umfassenden Beschichtung auf das polymere Substrat;
das Befestigen von Reaktanten daran zur Ausbildung von Bindungsstellen; und
das Entspannen des Substrats, wobei die Beschichtung eine topographische Oberfläche und eine projizierte Oberfläche aufweist und die topographische Oberfläche größer als die projizierte Oberfläche ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Beschichtung eine wellige Oberfläche ausbildet.
8. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung, wie etwa der Anordnung nach Anspruch 1, umfassend:
a. das Befestigen eines Reaktanten an ein gerichtetes polymeres Substrat, das eine Hauptfläche mit einer Oberfläche zur Erzeugung von Bindungsstellen auf dem Substrat aufweist; und
b. das Verkleinern der Oberfläche der Hauptfläche durch Erwärmen des polymeren Substrats, wodurch die

Dichte der Bindungsstellen auf dem Substrat erhöht wird.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

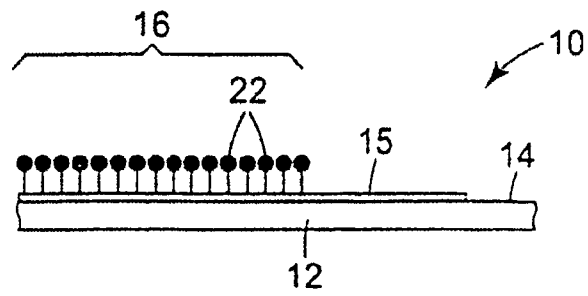


Fig. 1a

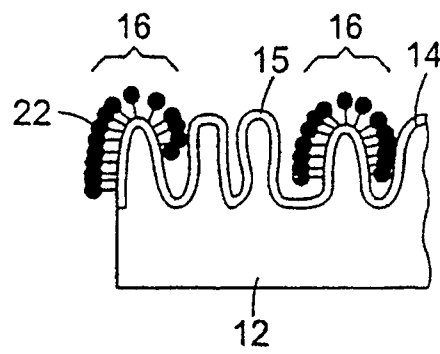


Fig. 1b

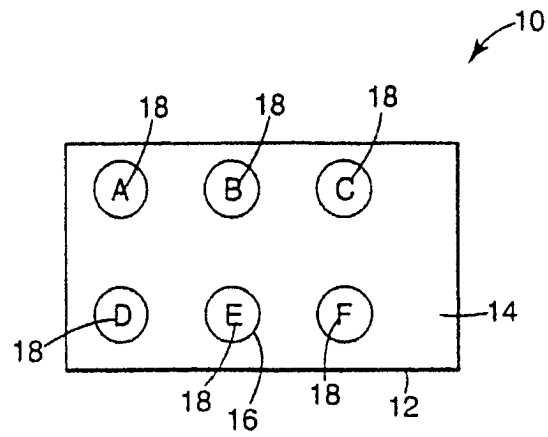


Fig. 2

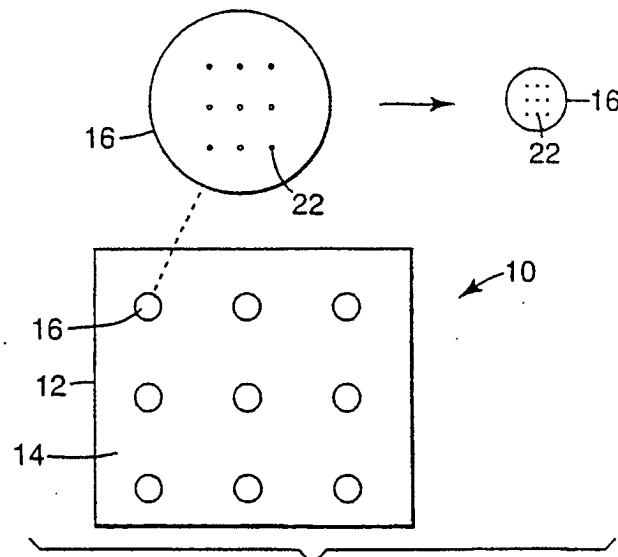
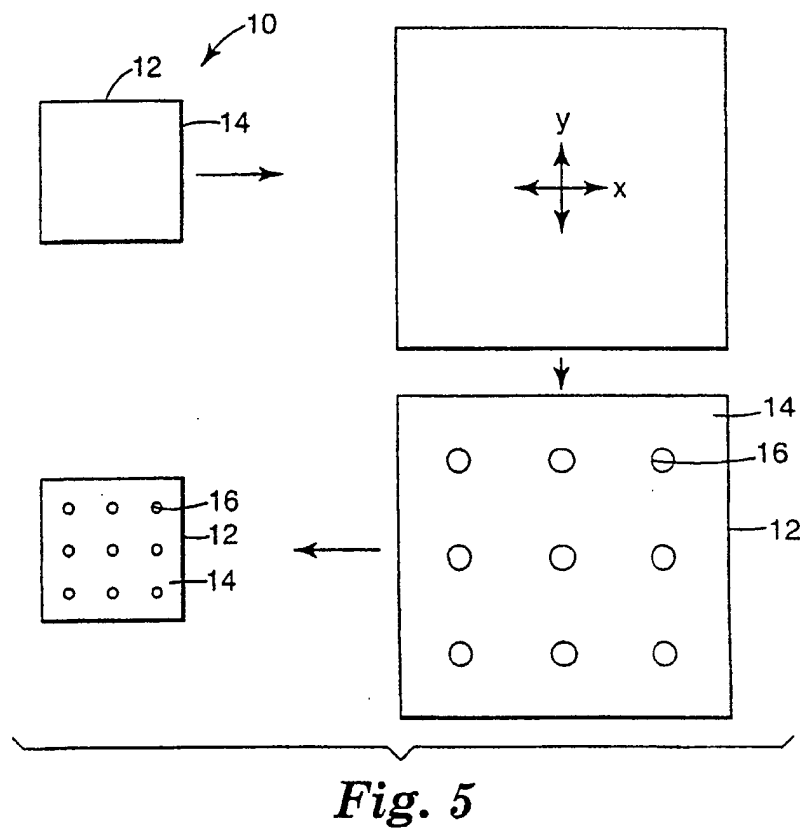
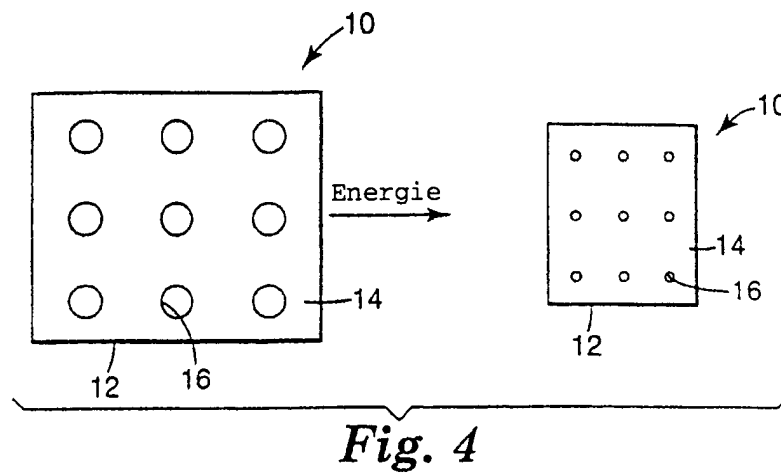


Fig. 3



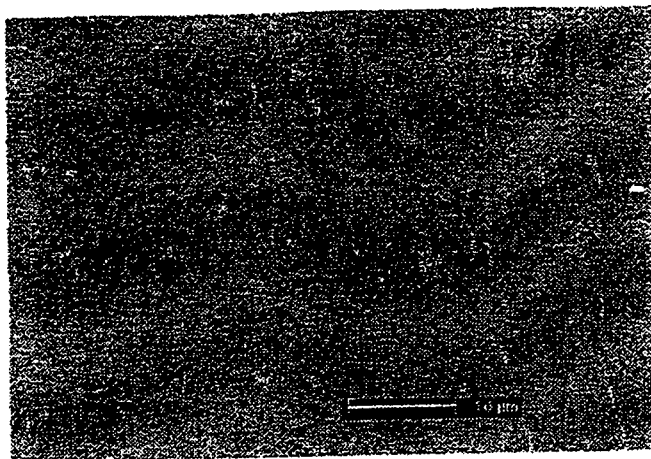


Fig. 6a



Fig. 6b

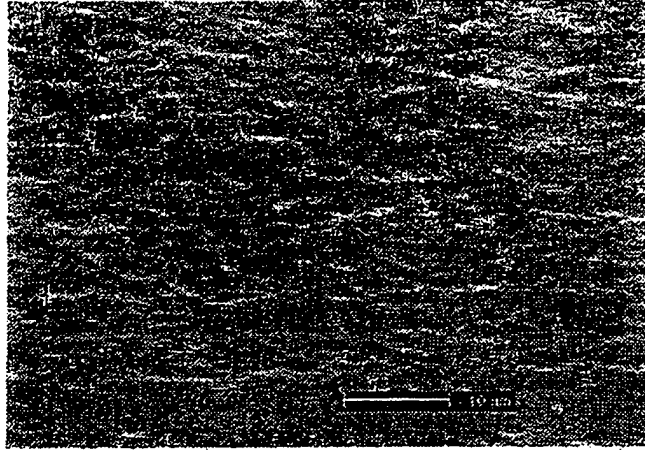


Fig. 7a

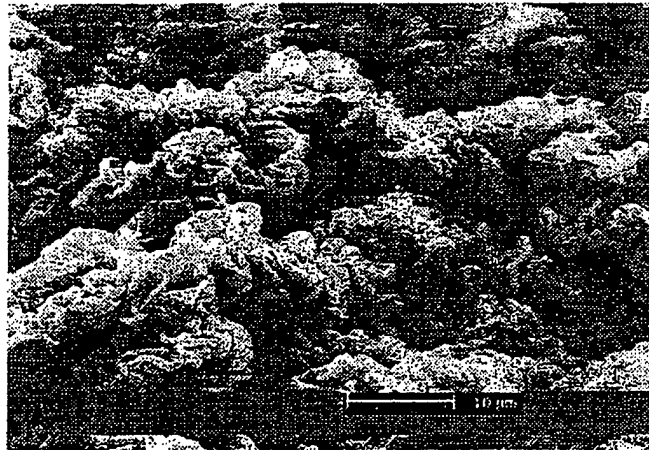


Fig. 7b

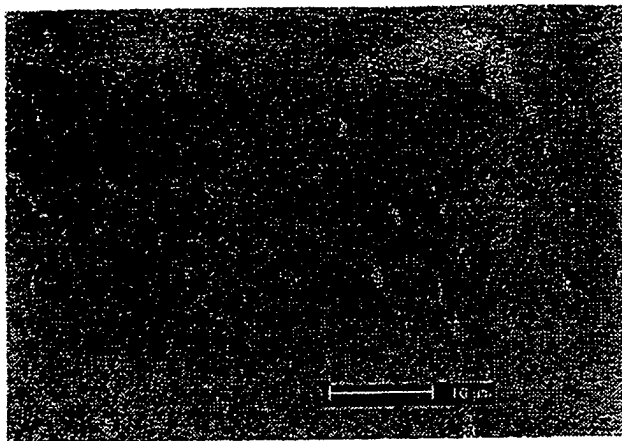


Fig. 8a

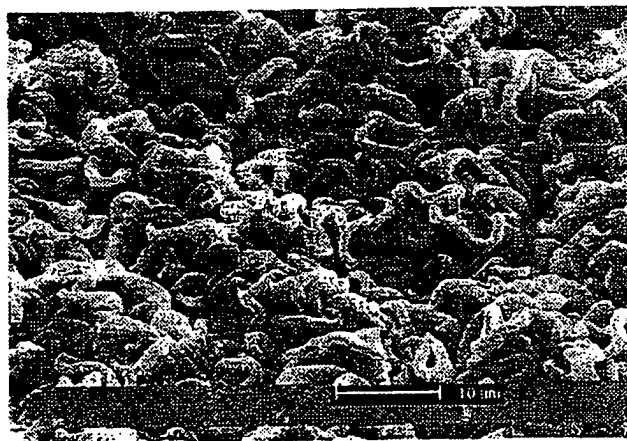


Fig. 8b

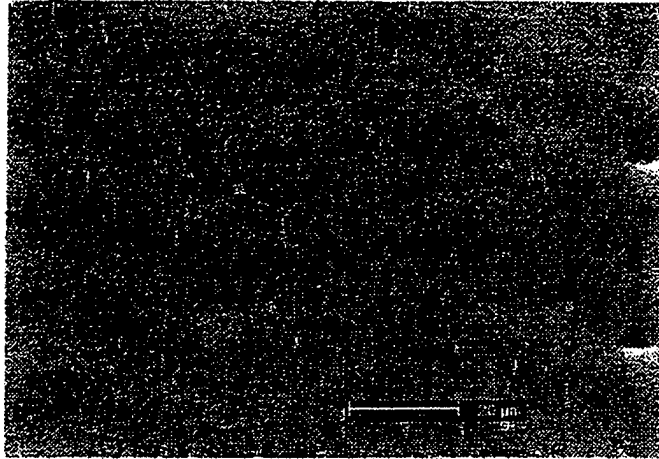


Fig. 9a



Fig. 9b