



(10) **DE 10 2013 111 759 A1** 2015.04.30

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2013 111 759.7**

(22) Anmeldetag: **25.10.2013**

(43) Offenlegungstag: **30.04.2015**

(51) Int Cl.: **G01N 33/50 (2006.01)**

**G01N 33/543 (2006.01)**

**B81B 7/00 (2006.01)**

**G01N 33/53 (2006.01)**

(71) Anmelder:  
**Bürkert Werke GmbH, 74653 Ingelfingen, DE**

(74) Vertreter:  
**Prinz & Partner mbB Patentanwälte  
Rechtsanwälte, 80335 München, DE**

(72) Erfinder:  
**Steidle, Nicole, 76137 Karlsruhe, DE; Hahn,  
Thomas, 74653 Künzelsau, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	199 50 452	A1
US	7 981 664	B1
US	2003 / 0 148 401	A1
US	2005 / 0 069 458	A1
US	2005 / 0 214 935	A1
US	2008 / 0 261 830	A1

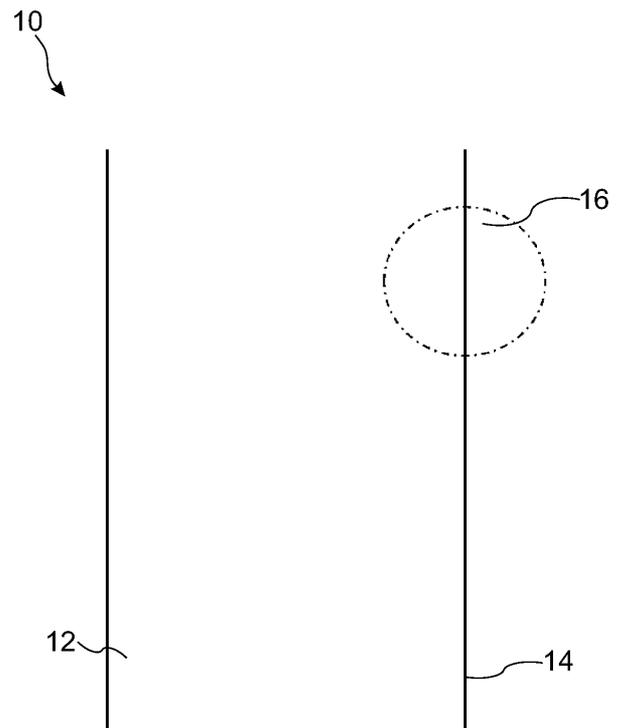
Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung und Verfahren zur Untersuchung von Probenflüssigkeit**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Untersuchung von Probenflüssigkeit in einem bioanalytischen Nachweisverfahren. Die Vorrichtung umfasst wenigstens einen Aufnahmeraum für die Probenflüssigkeit und eine den Aufnahmeraum begrenzende Wandung. Die Wandung hat wenigstens einen dem Aufnahmeraum zugewandten mikrostrukturierten Abschnitt mit einer Vielzahl von regelmäßig angeordneten Strukturelementen. Die Strukturelemente sind so geformt, dass sie mit einer wässrigen Flüssigkeit eine Dreiphasen-Grenze ausbilden. An der Dreiphasen-Grenze kann wenigstens ein Biomolekül dauerhaft physikalisch adsorbiert werden. Die Vorrichtung ist insbesondere eine Küvette, ein mikrofluidischer Chip oder eine Mikrotitrierplatte.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Untersuchung von Probenflüssigkeit sowie die Verwendung der Vorrichtung.

**[0002]** In sogenannten Immunoassays wird das Vorhandensein eines in flüssiger Phase vorliegenden Analyten durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper nachgewiesen. Der Bindungspartner des Analyten (Antigens) ist in der Regel an einen festen Träger aus Glas oder Kunststoff gebunden. Glasoberflächen werden üblicherweise durch eine Silanisierung vorbereitet, und der Bindungspartner wird dann kovalent an die Silanschicht angebunden. Die Immobilisierung des Bindungspartners auf Kunststoffoberfläche erfordert in der Regel eine Plasmabehandlung und eine anschließende chemische Modifikation der Oberfläche.

**[0003]** Es besteht daher weiterhin Bedarf an Vorrichtungen zur Durchführung von bioanalytischen Verfahren, insbesondere mikrofluidischen Vorrichtungen, die eine einfache und kostengünstige Immobilisierung von Testreagenzien gestatten.

**[0004]** Erfindungsgemäß wird zur Lösung dieser Aufgabe eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bereitgestellt.

**[0005]** Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen dargestellt, die wahlweise miteinander kombiniert werden können.

**[0006]** Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung der Vorrichtung in bioanalytischen Nachweisverfahren oder Biosensoren sowie ein Verfahren zur Untersuchung von Probenflüssigkeit.

**[0007]** Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Untersuchung von Probenflüssigkeit umfasst wenigstens einen Aufnahmeraum für die Probenflüssigkeit und eine den Aufnahmeraum begrenzende Wandung, wobei die Wandung wenigstens einen dem Aufnahmeraum zugewandten mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Oberflächenabschnitt mit einer Vielzahl von regelmäßig angeordneten Strukturelementen aufweist; wobei die Strukturelemente so geformt sind, dass sie mit einer wässrigen Flüssigkeit eine Dreiphasen-Grenze ausbilden, und wobei im Bereich der Dreiphasen-Grenze wenigstens ein Biomolekül physikalisch adsorbiert ist.

**[0008]** Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass die regelmäßig angeordneten Strukturelemente mit Abmessungen im Nano- oder Mikrometerbereich so ausgebildet werden können, dass die Strukturelemente bei Benetzung mit einer wässrigen Flüssigkeit nicht vollständig in die Flüssigkeit eintauchen. Vielmehr steht die Flüssigkeit dann vorzugsweise nur in

Kontakt mit den freien Enden der Strukturelemente und bildet an deren Rändern eine Dreiphasengrenze mit der eingeschlossenen Luft und dem Material der Strukturelemente. Die Flüssigkeit dringt also bei den Umgebungstemperaturen nicht in den gasgefüllten Hohlraum zwischen den Strukturelementen ein. Sie befindet sich dann im sogenannten Cassie-Zustand. Von der Erfindung umfasst ist auch die Ausbildung eines nicht idealen Cassie-Zustands, in dem die freien Enden der Strukturelemente zwar teilweise in die Flüssigkeit eingetaucht sind, jedoch nicht vollständig. An der Dreiphasengrenze liegt mit der Linienspannung eine zusätzliche Kraft vor, welche die physikalische Adsorption von Biomolekülen an den Strukturelementen ermöglicht.

**[0009]** Die Ausbildung der Dreiphasengrenze kann durch einen deutlich erhöhten Kontaktwinkel der Flüssigkeit auf dem nanostrukturierten oder mikrostrukturierten Abschnitt gegenüber einem unstrukturierten Abschnitt aus dem gleichen Material nachgewiesen werden.

**[0010]** Des Weiteren kann gezeigt werden, dass sich Biomoleküle wie zum Beispiel Rinderserumalbumin (BSA) an den Strukturelementen vorzugsweise im Kontaktbereich mit der wässrigen Flüssigkeit anlagern und physikalisch adsorbieren. Die Anlagerung erfolgt dabei im Bereich der Dreiphasengrenze. Mit Hilfe von fluoreszierendem BSA ist nachweisbar, dass das Biomolekül nahezu ausschließlich an den Strukturelementen bindet, nicht aber an unstrukturierten Bereichen der Wandung. Die Adsorption des BSA bleibt stabil, auch wenn mit einer wässrigen Flüssigkeit nachgespült wird. Die Adsorption ist daher auch ohne kovalente chemische Bindung zwischen dem Biomolekül und der Oberfläche des Strukturelements langzeitstabil. Die erfindungsgemäße Ausbildung der Strukturelemente ermöglicht somit eine physikalische Immobilisierung von Biomolekülen, ohne weitere Vorbehandlung der Oberfläche.

**[0011]** Es bleibt jedoch auch eine wenn auch weniger bevorzugte Möglichkeit, die Oberfläche der Strukturelemente zusätzlich chemisch zu modifizieren, um die Adsorption von empfindlichen Biomolekülen zusätzlich zu stabilisieren.

**[0012]** Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung sind die Strukturelemente im Wesentlichen säulenförmig mit einem Durchmesser von 0,1 µm bis 100 µm und einem Aspektverhältnis von 0,1 bis 20 ausgebildet. Das Aspektverhältnis bezeichnet das Verhältnis von Strukturhöhe zur kleinsten lateralen Ausdehnung des Strukturelements.

**[0013]** Die im Wesentlichen säulenförmigen Strukturelemente können einen runden, vorzugsweise kreisförmigen oder ovalen Querschnitt aufweisen. Der Querschnitt kann jedoch auch polygonal, bei-

spielsweise dreieckig, viereckig, sechseckig oder achteckig sein.

**[0014]** Unter einer im Wesentlichen säulenförmigen Struktur werden im Sinne der Erfindung auch kegelförmige oder pyramidenstumpfförmige Strukturelemente verstanden.

**[0015]** Der Abstand der Strukturelemente zueinander beträgt vorzugsweise höchstens das 4-fache, bevorzugt höchstens das 3-fache und ganz besonders bevorzugt etwas das 1,5-fache bis 2,5-fache des Durchmessers.

**[0016]** Der Abstand der Strukturelemente zueinander kann im Allgemeinen umso größer sein, je größer das Aspektverhältnis ist. Hydrophobe Materialien tolerieren ebenfalls einen größeren Abstand.

**[0017]** Mit Abmessungen der Strukturelemente in den oben genannten Bereichen wird die Ausbildung einer Dreiphasen-Grenze mit einer auf den mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Abschnitt aufgetragenen wässrigen Flüssigkeit begünstigt.

**[0018]** Gegenstand der Erfindung ist somit auch eine Vorrichtung zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit mit einem Aufnahmeraum für die Probenflüssigkeit und einer den Hohlraum begrenzenden Wandung, wobei die Wandung wenigstens einen der Flüssigkeit zugewandten mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Abschnitt mit einer Vielzahl von regelmäßig angeordneten Strukturelementen aufweist, und wobei die Strukturelemente im Wesentlichen säulenförmig mit einem Durchmesser von 0,1 µm bis 100 µm und einem Aspektverhältnis von 0,1 bis 20 ausgebildet sind, und wobei der Abstand der einzelnen Strukturelemente zueinander höchstens das 4-fache des Durchmessers beträgt.

**[0019]** Die Strukturelemente weisen ihrem freien Ende eine Stirnfläche auf, die am Zusammentreffen mit der Mantelfläche der Strukturelemente scharfkantig ausgebildet ist. Runde Kanten, Fasen und konvexe Flächen können zu einem Abfließen der Flüssigkeit in den Zwischenraum zwischen den Strukturelementen führen und die Ausbildung der Dreiphasen-Grenze verhindern. In diesem Fall wäre dann der mikrostrukturierte oder nanostrukturierte Abschnitt vollständig benetzt.

**[0020]** Die Stirnfläche kann im Wesentlichen eben oder konkav sein. Der Winkel zwischen Stirnfläche und Mantelfläche ist vorzugsweise nicht größer als 120°, bevorzugt höchstens 90°.

**[0021]** Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die Strukturelemente eine konkave Stirnfläche auf. Die konkave Stirnfläche reduziert die Kontaktflächen zwischen Flüssigkeit und

Strukturelement und erleichtert zusätzlich die Ausbildung einer Dreiphasen-Grenze mit der wässrigen Flüssigkeit. Die konkave Stirnfläche führt daher zu einem nahezu idealen Cassie-Zustand. In diesem Zustand treten besonders hohe Linienspannungen auf, und es wird eine effektive physikalische Immobilisierung der Biomoleküle an den Rändern der Strukturelemente erreicht.

**[0022]** Bevorzugt beträgt der kleinste laterale Durchmesser der Strukturelemente von 0,1 µm bis 50 µm.

**[0023]** Bei einem Durchmesser der Strukturelemente von 10 µm oder größer beträgt das Aspektverhältnis mindestens 1,5. Das Aspektverhältnis liegt vorzugsweise im Bereich von 1,5 bis 10. Strukturelemente mit einem Durchmesser im Nanometerbereich können mit einem geringeren Aspektverhältnis ausgebildet werden.

**[0024]** Der Abstand der Strukturelemente zueinander beträgt bevorzugt höchstens das 3-fache und ganz besonders bevorzugt etwas das 1,5-fache bis 2,5-fache des Durchmessers.

**[0025]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der Aufnahmeraum vorzugsweise eine Reaktionskammer oder ein Mikrokanal.

**[0026]** Die Wandung mit dem mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Abschnitt kann aus Kunststoff, Glas, Metall oder Keramik gebildet sein, oder auch aus Verbundmaterialien daraus sowie beispielsweise metallischen Gläsern. Es sind verschiedene Verfahren zur Mikrostrukturierung dieser Materialien bekannt, wie beispielsweise Heißprägen, Mikrospritzgießen, Pulverspritzgießen oder Mikroätzen.

**[0027]** Bevorzugt ist die Wandung jedoch aus einem thermoplastischen Kunststoff gebildet. Beispiele für thermoplastische Kunststoffe sind Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonat (PC), Polysulfon (PSU), Polystyrol (PS) oder Cycloolefin-Copolymere (COC). Die thermoplastischen Kunststoffe eignen sich insbesondere für den Einsatz in der Massenproduktion.

**[0028]** Ganz besonders bevorzugt ist die Wandung wenigstens teilweise aus einem optisch transparenten Kunststoff gebildet. Dies ermöglicht die Einkopplung von Licht in die Vorrichtung, beispielsweise über optische Spiegel, sowie die fotometrische Untersuchung und Auswertung einer in die Vorrichtung eingebrachten Probe.

**[0029]** An den Strukturelementen im mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Abschnitt ist vorzugsweise wenigstens ein Biomolekül physikalisch immobilisiert. Die Vorrichtung kann dann als ein vorgefertigter Testkit bereitgestellt werden. Die physikalische Immobilisierung ist unter den Bedingungen

eines bioanalytischen Nachweisverfahrens langzeitstabil, d. h. das Biomolekül wird weder durch Behandeln mit wässriger Pufferlösung, einer Probenlösung oder der Lösung eines Nachweisreagenz abgelöst.

**[0030]** Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die den Aufnahmeraum begrenzende Wandung vollständig mit den Strukturelementen versehen. Dadurch lässt sich die Menge des an den Strukturelementen immobilisierten Biomoleküls gezielt steuern.

**[0031]** Das an den Strukturelementen physikalisch immobilisierte Biomolekül ist vorzugsweise ein gegenüber einem Analyten in der Probenflüssigkeit reaktiver Bindungspartner. Beispiele für derartige Bindungspartner sind Streptavidin, Avidin, Biotin, Antikörper, biotinylierte Antikörper und deren Komplexe.

**[0032]** Die nicht mit dem reaktiven Biomolekül besetzten Stellen der Strukturelemente können mit einem weiteren, gegenüber dem Analyten nicht reaktiven Agens blockiert sein. Als nicht reaktives Agens kann beispielsweise BSA oder ein wasserlösliches Polymer wie Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon dienen, das ebenfalls physikalisch immobilisiert wird.

**[0033]** Die Vorrichtung zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit ist vorzugsweise ein mikrofluidischer Chip, eine Küvette oder eine Mikrotiterplatte.

**[0034]** Zur Herstellung der Vorrichtung kann zunächst eine Kunststoffolie durch Heißprägen strukturiert werden, wobei die Strukturelemente entweder auf der ganzen Folie oder in einem vordefinierten Oberflächenabschnitt gebildet werden können.

**[0035]** Das Heißprägen erfolgt durch Einbringen der Kunststoffolie in eine Form und Erwärmen der Kunststoffolie unter Druck auf eine Temperatur über dem Glasübergangspunkt des Kunststoffs. Dadurch werden die von der Form vorgegebenen Strukturen in die weiche Kunststoffolie eingepresst.

**[0036]** In einem nächsten Schritt kann die Kunststoffolie durch Thermoformen in eine vorbestimmte dreidimensionale Form gebracht werden. Auf diese Weise können insbesondere Mikrokanäle in die Folie eingebracht werden.

**[0037]** Das Thermoformen kann durch Einlegen der heißgeprägten Folie in eine Form und Erwärmen der Folie auf eine Temperatur unterhalb des Glasübergangspunktes erreicht werden. Die Umformung der Folie erfolgt durch Einpressen von Stickstoff in den Formhohlraum. Auf diese Weise wird eine Zerstörung der zuvor durch Heißprägen in die Folie eingebrachten Strukturelemente vermieden.

**[0038]** In einem letzten Schritt kann die umgeformte Folie mit einer Trägerplatte verbunden werden, welche alle notwendigen fluidischen Anschlüsse aufweist. Das Verbinden der Folie mit der Trägerplatte kann beispielsweise durch Laserschweißen, aber auch durch andere Verbindungstechniken wie Lösungsmittelbunden, thermisches Bonden oder Kleben erreicht werden.

**[0039]** Die Folie und die Trägerplatte bestehen vorzugsweise aus dem gleichen Material. Es können aber auch unterschiedliche Materialien zum Einsatz kommen.

**[0040]** Alternativ kann die Vorrichtung auch durch andere bekannte Verfahren wie Mikrospritzgießen oder Spritzprägen hergestellt werden.

**[0041]** Die erfindungsgemäße Vorrichtung eignet sich insbesondere zur Durchführung von bioanalytischen Testverfahren und/oder als Biosensor.

**[0042]** Das Testverfahren ist bevorzugt ein Immunoassay, und besonders bevorzugt ein enzymatisches Immunoabsorptionsverfahren wie ELISA (enzym linked immuno sorbent assay). Bei diesem Verfahren wird ein Enzym an einen Analyten, insbesondere an einen Komplex aus einem Analyten und einem Antikörper gebunden. Mittels des Enzyms wird in einer Nachweisreaktion ein Substrat in ein Nachweissubstrat, insbesondere eine fluoreszierende Substanz umgewandelt. Durch die Erfassung des Nachweissubstrats ist eine quantitative Bestimmung des Analyten in der Probenflüssigkeit möglich.

**[0043]** Der Analyt bindet an ein spezifisches Biomolekül als Bindungspartner, das an einer Festphase adsorbiert ist. Der Bindungspartner kann ein Komplex aus einem Bindungsprotein wie Streptavidin und einem Bindungsantikörper wie einem biotinylierten Antikörper sein. Erfindungsgemäß dient als Festphase der mikrostrukturierte oder nanostrukturierte Oberflächenabschnitt der oben beschriebenen Vorrichtung. Während der Durchführung des Testverfahrens bleibt das Biomolekül an den Strukturelementen physikalisch gebunden. Insbesondere geht das Biomolekül dabei nicht in Lösung.

**[0044]** Weitere Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsformen und der Zeichnung. In der Zeichnung zeigen:

**[0045]** Fig. 1 eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung;

**[0046]** Fig. 2 die schematische Darstellung eines strukturierten Abschnitts der Vorrichtung aus Fig. 1;

**[0047]** Fig. 3 die schematische Darstellung einer weiteren erfindungsgemäßen Vorrichtung;

**[0048]** Fig. 4 die schematische Darstellung eines Strukturelements mit immobilisierten Biomolekülen.

**[0049]** In Fig. 1 ist eine Vorrichtung zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit **10** gezeigt, die beispielsweise als Küvette oder Vertiefung einer Mikrotiterplatte ausgebildet sein kann. Die Vorrichtung **10** umfasst einen Aufnahmeraum **12** für Probenflüssigkeit, der von einer Wandung **14** begrenzt ist. Die Wandung weist einen mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Abschnitt **16** auf, der an seiner dem Aufnahmeraum **12** zugewandten Oberfläche mit einer Vielzahl von regelmäßig angeordneten Strukturelementen **18** versehen ist.

**[0050]** Der nano- oder mikrostrukturierte Abschnitt **16** ist in Fig. 2 im Detail gezeigt. Die Strukturelemente **18** im Abschnitt **16** sind so geformt, dass sie mit einer in den Aufnahmeraum eingebrachten wässrigen Flüssigkeit **20** eine Dreiphasen-Grenze ausbilden können. Dies bedeutet, dass die Strukturelemente **18** nicht oder nur teilweise in die wässrige Flüssigkeit **20** eintauchen und die wässrige Flüssigkeit **20** nicht vollständig in den Hohlraum **24** zwischen die Strukturelemente eindringt. Der strukturierte Abschnitt **16** ist daher wesentlich hydrophober als nicht-strukturierte Bereiche der Wandung **14**, und die Flüssigkeit **20** zeigt in dem strukturierten Abschnitt **16** einen deutlich erhöhten Kontaktwinkel.

**[0051]** Ein in der wässrigen Flüssigkeit vorhandenes Biomolekül **26** kann sich aufgrund der an der Dreiphasen-Grenze zwischen Strukturelement **18**, Flüssigkeit **20** und dem gasgefüllten Hohlraum **24** herrschenden Linienspannung an das Strukturelement **18** anlagern und wird vorzugsweise im Bereich der Stirnfläche **22** physikalisch, ohne vorherige chemische Modifikation der Oberfläche, adsorbiert.

**[0052]** Die physikalische Adsorption des Biomoleküls **26** am Strukturelement **18** ist langzeitstabil. Das Biomolekül **26** ist somit am Strukturelement **18** physikalisch immobilisiert.

**[0053]** Wie Fig. 2 weiter zu entnehmen ist, sind die Strukturelemente **18** im Abschnitt **16** im Wesentlichen säulenförmig ausgebildet. Die Strukturelemente **18** weisen vorzugsweise einen Durchmesser von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  und ein Aspektverhältnis von 0,1 bis 20 auf. Das Aspektverhältnis bezeichnet hier das Verhältnis von Strukturhöhe  $h$  zum kleinsten lateralen Durchmesser  $d$  der Strukturelemente **18**.

**[0054]** Der Durchmesser der Strukturelemente **18** beträgt vorzugsweise von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 50  $\mu\text{m}$  und das Aspektverhältnis vorzugsweise 0,5 bis 10, und bei ei-

nem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  oder größer mindestens 1,5.

**[0055]** Die Strukturelemente **18** sind regelmäßig voneinander beabstandet. Der Abstand  $a$  von Mittelpunkt zu Mittelpunkt zweier benachbarter Strukturelemente beträgt höchstens das 4-fache, bevorzugt höchstens das 3-fache des Durchmessers  $d$ . Besonders bevorzugt liegt der Abstand der Strukturelemente im Bereich des 1,5-fachen bis 2,5-fachen des Durchmessers.

**[0056]** Die freie Stirnfläche **22** der Strukturelemente **18** kann im Wesentlichen eben ausgebildet sein. Am Zusammentreffen der freien Stirnfläche **22** und der Mantelfläche der Strukturelemente ist eine scharfe Kante gebildet, ohne Kantenrundung oder Fasen, vorzugsweise mit einem Winkel von höchstens  $120^\circ$ , bevorzugt höchstens  $90^\circ$ , zwischen Stirnfläche und Mantelfläche. Die scharfkantige Ausbildung der Strukturelemente **18** begünstigt das Entstehen einer Dreiphasen-Grenze beim Aufbringen der wässrigen Flüssigkeit **20**.

**[0057]** Besonders bevorzugt ist die Stirnfläche **22** der Strukturelemente **18** konkav ausgebildet, wie in Fig. 2 dargestellt. Durch diese Ausgestaltung der Strukturelemente **18** entstehen besonders hohe Linienspannungen an der Dreiphasen-Grenze, sodass die in der wässrigen Flüssigkeit **20** enthaltenen Biomoleküle **26** effektiv immobilisiert werden können.

**[0058]** Die in den Fig. 1 und Fig. 2 dargestellte Vorrichtung **10** dient vorzugsweise als Küvette oder Vertiefung einer Mikrotiterplatte (hier nicht dargestellt). Der Aufnahmeraum **12** kann hier insbesondere eine Reaktionskammer sein.

**[0059]** Die Wandung **14** der Vorrichtung **10** kann aus Kunststoff, Glas, Metall, Keramik oder aus Verbundwerkstoffen dieser Materialien hergestellt sein. Besonders bevorzugt ist die Wandung **16** bzw. die gesamte Vorrichtung **10** aus einem thermoplastischen Kunststoff gebildet. Damit wird eine kostengünstige Massenproduktion der Vorrichtung ermöglicht.

**[0060]** In Fig. 3 ist eine weitere Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung **10** in Form eines mikrofluidischen Chips gezeigt. Der Chip weist eine Wandung **14** aus einer Kunststoffolie auf, die einen Aufnahmeraum **12**, beispielsweise einen Mikrokanal oder eine Reaktionskammer, begrenzt. Auf der Kunststoffolie **14** ist ein strukturierter Abschnitt **16** gebildet, der die im Zusammenhang mit Fig. 2 gezeigten und beschriebenen Strukturelemente **18** aufweist.

**[0061]** Die Kunststoffolie **14** ist mit einer Trägerplatte **30** verbunden, die fluidische Anschlüsse **32** bzw. Bereiche zum Vorhalten von Flüssigkeit aufweist. Au-

ßerdem ist der Chip mit einem optischen Spiegel **34** versehen, durch den Licht in die Vorrichtung eingekoppelt werden kann. Das Licht wird durch den vom mikrostrukturierten Abschnitt **16** der Folie **14** begrenzten Aufnahmebereich **12** geleitet und dient zur fotometrischen Auswertung des Analyten, beispielsweise auf der Grundlage einer Fluoreszenz.

**[0062]** Fig. 4 zeigt die Beladung eines Strukturelements **18** mit Biomolekülen **26** bei der Durchführung eines ELISA-Tests.

**[0063]** Zur Vorbereitung des Tests wird der mikrostrukturierte oder nanostrukturierte Abschnitt **14** in Kontakt mit einer wässrigen Flüssigkeit gebracht, die einen biotinylierten Antikörper **36**, vorzugsweise in einer Pufferlösung, enthält. Der Antikörper lagert sich im Bereich der Stirnfläche **22** des Strukturelements **18** an und wird dort physikalisch immobilisiert. Anschließend wird mit einer BSA-haltigen Pufferlösung gewaschen. Dadurch lagert sich das BSA **38** an die noch freien Stellen auf der Stirnfläche **22** des Strukturelements **18** an. Diese Stellen sind dann für die Aufnahme von weiteren Biomolekülen geblockt.

**[0064]** Anschließend wird eine Probenflüssigkeit mit dem zu analysierenden Analyten **40** durch die Vorrichtung geleitet. Der Analyt **40** bindet als Antigen an den biotinylierten Antikörper **36** an.

**[0065]** Im darauffolgenden Schritt kann der Komplex aus dem biotinylierten Antikörper **36** und dem Analyten **40** mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper **42** umgesetzt werden. Über die Fluoreszenz ist ein Nachweis des Analyten **40** in der Probe möglich. Alternativ kann die Umsetzung des Analyten **40** auch mit einem Enzymverknüpften Antikörper erfolgen, der eine enzymatische Nachweisreaktion erlaubt.

**[0066]** Der beschriebene Test ist rein beispielhaft zu verstehen. Es sind alle bekannten Tests durchführbar, die eine stabile Immobilisierung eines Bindungspartners für den Analyten an einer Festphase erfordern. Beispielsweise kann der biotinylierte Antikörper auch an ein weiteres Bindungsprotein wie Streptavidin oder Avidin gebunden sein, das auf dem Strukturelement **18** immobilisiert ist.

**[0067]** Die Herstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung **10** kann durch Spritzgießen, Spritzprägen, Heißpressen und Thermoformen, oder durch eine Kombination dieser Techniken erfolgen. Bevorzugt wird die Wandung mit dem strukturierten Abschnitt **16** durch Heißpressen hergestellt. Dazu wird eine Kunststoffolie in eine Pressform eingebracht, die einen Stempel mit einem Negativabdruck des Abschnitts mit den Strukturelementen enthält. Die Folie wird unter Druck in der Pressform auf eine Temperatur über dem Glasübergangspunkt des Kunststoffs erwärmt und mit dem Stempel verpresst. Nach dem Abkühlen

wird die strukturierte Kunststoffolie von dem Stempel abgezogen.

**[0068]** Im Anschluss an das Heißprägen des strukturierten Abschnitts kann die Folie umgeformt und in eine gewünschte dreidimensionale Form gebracht werden. Auf diese Weise können beispielsweise zusätzliche Mikrokanäle und/oder Reaktionskammern in der Folie ausgebildet werden.

**[0069]** Im Anschluss an den Umformschritt wird die Folie mit einer Trägerplatte verbunden, welche gegebenenfalls Flüssigkeitsspeicher und fluidische Anschlüsse enthält. Die Verbindung zwischen Folie und Trägerplatte erfolgt durch bekannte Verfahren wie Laserschweißen, thermisches Bonden, Lösungsmittelbonden oder Verkleben.

**[0070]** Die Immobilisierung von Biomolekülen auf einer erfindungsgemäß strukturierten Kunststoffolie wurde mit den nachfolgend beschriebenen Tests nachgewiesen.

#### Immobilisierung von BSA

**[0071]** In einer Kunststoffolie wurden durch Heißprägen und Thermoformen ein Mikrokanal mit sechs verschiedenen, nacheinander angeordneten Feldern gebildet. In jedem der Felder waren säulenförmige Strukturelemente mit einer Strukturhöhe von etwa 80 µm eingeprägt. Die Durchmesser der Strukturelemente variierten von Feld zu Feld und betragen 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm und 35 µm. Der Abstand der Strukturelemente zueinander betrug das 4-fache des Durchmessers.

**[0072]** Der strukturierte Bereich der Kunststoffolie wurde mit einer wässrigen Lösung aus einem Fluoreszenz-markierten Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 1,25 mg/ml und einer Pufferlösung behandelt (Phosphat in Kochsalzlösung, PBS). Die Mischung aus BSA und PBS-Pufferlösung wurde in einem Verhältnis von 1:19 eingesetzt. Nach drei Stunden Inkubationszeit wurde der Mikrokanal mit einer reinen Pufferlösung gespült, getrocknet und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In allen Feldern konnte eine deutliche Fluoreszenz festgestellt werden.

#### Immobilisierung von Streptavidin

**[0073]** Eine Kunststoffolie wurde durch Heißprägen mit säulenförmigen Strukturelementen mikrostrukturiert. Der Durchmesser der Strukturelemente betrug etwa 35 µm bei einem Aspektverhältnis von etwa 2,5. Der Abstand der Strukturelemente betrug etwa das 2-fache des Durchmessers. Der strukturierte Abschnitt der Folie wurde in einen Mikrokanal umgeformt und mit einer Trägerplatte unter Bildung eines mikrofluidischen Chips verbunden.

**[0074]** Anschließend wurde eine Lösung aus fluoreszierendem Streptavidin in einer Konzentration von 10 µg/ml in einer PBS-Pufferlösung durch den Mikrokanal geleitet. Das Streptavidin immobilisiert dabei spezifisch nur in demjenigen Abschnitt des Mikrokanals, der die säulenförmigen Strukturelemente aufweist. Die dauerhafte Adsorption des Streptavidins kann durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

#### Blockierung mit BSA und DNS-Nachweis

**[0075]** Eine wie zuvor beschrieben mit Streptavidin behandelte strukturierte Oberfläche eines Mikrokanals wurde nach Trocknen mit einer wässrigen Lösung aus BSA mit einer Konzentration von 0,0625 µg/µl in PBS-Pufferlösung zwei Stunden lang inkubiert. Das BSA besetzt die noch freien Positionen an den säulenförmigen Strukturelementen und sorgt dafür, dass sich keine weiteren Biomoleküle an die Säulen anlagern können. Die Oberfläche des Mikrokanals ist damit so präpariert, dass die Vorrichtung in einem beliebigen Nachweisverfahren eingesetzt werden kann.

**[0076]** Zur Durchführung eines Tests auf Einzelstrang-DNS wurde eine 22 Basenpaare lange, einzelsträngige DNS mit Biotin am 5'-Ende und einem rot emittierenden Fluoreszenzfarbstoff am 3'-Ende durch den präparierten Chip geleitet. Der Biotin-verknüpfte DNS-Strang bindet an das auf der Oberfläche des strukturierten Abschnitts immobilisierte Streptavidin. In einer Negativkontrolle unter Verwendung einer nur mit BSA geblockten Oberfläche konnte keine Anbindung des DNS-Strangs im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

**[0077]** Wenn die Sequenz des DNS-Stranges komplementär zu einem genetischen Defekt ist, kann das Vorliegen einer diesen Gendefekt anzeigenden Einzelstrang-DNS in einem Analyten nachgewiesen werden, beispielsweise mithilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen, die sich nur in doppelsträngige DNS einlagern.

#### ELISA-Verfahren

**[0078]** Als ELISA-Test wurde ein Nachweis für CRP (C-reaktives Protein) gewählt, das in Blutproben eine Entzündung anzeigt. In einem ersten Schritt wurde Streptavidin auf der erfindungsgemäß strukturierten Oberfläche einer Kunststoffolie immobilisiert. Danach wurden die noch freien Stellen auf der strukturierten Oberfläche mit BSA geblockt und anschließend ein biotinylierter Antikörper an das Streptavidin gebunden.

**[0079]** Im Anschluss daran wurde ein CRP-haltiger Analyt in unterschiedlichen Konzentrationen in den so vorbereiteten mikrofluidischen Chip gegeben. Das CRP bindet an den Antikörper und kann mithilfe eines

weiteren fluoreszenzmarkierten Antikörpers nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen CRP-Konzentrationen konnten durch Unterschiede in der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden.

#### Desorptionstest

**[0080]** Da die Biomoleküle lediglich physikalisch an den nanostrukturierten oder mikrostrukturierten Abschnitt gebunden sind, ist es möglich, die Oberflächenspannung in der Umgebung der Biomoleküle so stark zu reduzieren, dass es zu einer Ablösung der Biomoleküle von den Strukturelementen kommt. Zum Nachweis der Desorption wurde eine mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin behandelte strukturierte Kunststoffolie mit einem Gemisch aus Isopropanol und Wasser (50 % v/v) behandelt. Im Fluoreszenzmikroskop zeigt sich, dass eine nahezu vollständige Desorption des Streptavidins erreicht wurde.

**[0081]** Alternativ zum Gemisch aus Isopropanol und Wasser kann auch eine Tensidlösung verwendet werden.

**[0082]** Die erfindungsgemäße Vorrichtung eignet sich insbesondere zur Verwendung in bioanalytischen Nachweisverfahren, insbesondere in Form einer Küvette, einer Mikrotiterplatte oder eines mikrofluidischen Chips.

**[0083]** Insbesondere kann die erfindungsgemäße Vorrichtung in einem Biosensor verwendet werden, der sowohl die Durchführung der Nachweisreaktion als auch deren qualitative und/oder quantitative Auswertung erlaubt.

**[0084]** Das bioanalytische Nachweisverfahren ist insbesondere ein Immunoassay wie beispielsweise ein ELISA-Test.

**[0085]** Mit der Erfindung kann eine dauerhafte Immobilisierung von Biomolekülen auf strukturierten Oberflächen, insbesondere Kunststoffoberflächen erreicht werden. Dadurch ist die Herstellung von vorgefertigten Testkits in Massenproduktion möglich. Die Beladung der strukturierten Oberfläche mit spezifischen Biomolekülen kann aber auch direkt beim Anwender erfolgen. Es lassen sich somit in der gleichen Vorrichtung unterschiedliche Nachweisverfahren durchführen.

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Untersuchung von Probenflüssigkeit mit wenigstens einem Aufnahmeraum für die Probenflüssigkeit und einer den Aufnahmeraum begrenzenden Wandung, wobei die Wandung wenigstens einen dem Aufnahmeraum zugewandten mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Oberflächenabschnitt mit einer Viel-

zahl von regelmäßig angeordneten Strukturelementen aufweist;  
wobei die Strukturelemente so geformt sind, dass sie mit einer wässrigen Flüssigkeit eine Dreiphasen-Grenze ausbilden, und  
wobei im Bereich der Dreiphasen-Grenze wenigstens ein Biomolekül physikalisch adsorbiert ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strukturelemente im Wesentlichen säulenförmig mit einem Durchmesser von 0,1 µm bis 100 µm und einem Aspektverhältnis von 0,1 bis 20 ausgebildet sind.

3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strukturelemente regelmäßig voneinander beabstandet sind, wobei der Abstand zwischen einzelnen Strukturelementen höchstens das 4-fache des Durchmessers beträgt.

4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strukturelemente eine Mantelfläche sowie eine Stirnfläche aufweisen, und am Zusammentreffen der Mantelfläche und der Stirnfläche scharfkantig ausgebildet sind.

5. Vorrichtung zur Untersuchung von Probenflüssigkeit mit wenigstens einem Aufnahmeraum für die Probenflüssigkeit und einer den Aufnahmeraum begrenzenden Wandung,  
wobei die Wandung wenigstens einen dem Aufnahmeraum zugewandten mikrostrukturierten oder nanostrukturierten Oberflächenabschnitt mit einer Vielzahl von regelmäßig angeordneten Strukturelementen aufweist;  
wobei die Strukturelemente im Wesentlichen säulenförmig mit einem Durchmesser von 0,1 µm bis 100 µm und einem Aspektverhältnis von 0,1 bis 20 ausgebildet sind, und der Abstand zwischen einzelnen Strukturelementen höchstens das 4-fache des Durchmessers beträgt, und  
wobei die Strukturelemente eine Mantelfläche sowie eine Stirnfläche aufweisen und am Zusammentreffen der Mantelfläche und der Stirnfläche eine scharfe Kante ausgebildet ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass wenigstens im Bereich der scharfen Kante ein Biomolekül physikalisch adsorbiert ist. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Abstand zwischen einzelnen Strukturelementen das 1,5-fache bis 2,5-fache des Durchmessers beträgt.

7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strukturelemente einen Durchmesser von 0,1 µm bis 50 µm aufweisen.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Durchmesser größer oder gleich 10µm ist und das Aspektverhältnis von 1,5 bis 10 beträgt.

9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Strukturelemente eine im Wesentlichen ebene Stirnfläche oder eine konkave Stirnfläche aufweisen.

10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Aufnahmeraum eine Reaktionskammer oder ein Mikrokanal ist.

11. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wandung aus Kunststoff, Glas, Metall, Keramik oder einem Verbundstoff aus diesen Materialien besteht.

12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wandung aus einem thermoplastischen Kunststoff gebildet ist, der aus der aus Polymethylmetacrylat, Polycarbonat, Polysulfon, Polystyrol oder Cycloolefin-Copolymeren bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

13. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wandung aus einem optisch transparenten Kunststoff gebildet ist.

14. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wandung vollständig mit den Strukturelementen versehen ist.

15. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Biomolekül wenigstens eines von Streptavidin, Biotin, Avidin, BSA, Antikörpern, biotinylierten Antikörpern, fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Proteinen sowie deren Komplexe ist.

16. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung ein mikrofluidischer Chip, eine Küvette oder eine Mikrotiterplatte ist.

17. Verwendung der Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in einem bioanalytischen Testverfahren.

18. Verwendung nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass das bioanalytische Testverfahren ein Immunoassay, insbesondere ein ELISA-Test, ist.

19. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung ein Biosensor ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Analyt in einer Probenflüssigkeit nachgewiesen wird, wobei wenigstens ein Teil der Strukturelemente mit einem gegenüber dem Analyten nicht-reaktiven Agens geblockt ist.

21. Verwendung nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Agens ein wasserlösliches Protein, insbesondere Rinderserumalbumin, oder ein wasserlösliches Polymer, insbesondere Polyethylenglykol und Polyvinylpyrrolidon, ist.

22. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probenflüssigkeit, bei dem eine Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche mit einem Bindungspartner für den Analyten inkubiert und der Bindungspartner auf dem nanostrukturierten oder mikrostrukturierten Oberflächenabschnitt physikalisch immobilisiert wird, und bei dem der Oberflächenabschnitt anschließend wahlweise mit einer wässrigen Lösung eines gegenüber dem Analyten nicht reaktiven Agens zur Anlagerung und Immobilisierung des Agens behandelt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Bindungspartner aus der Gruppe bestehend aus Streptavidin, Biotin, Avidin, Antikörpern, biotinylierten Antikörpern und fluoreszenzmarkierten Antikörpern sowie deren Komplexen ausgewählt wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Agens aus der aus wasserlöslichen Proteinen wie BSA und wasserlöslichen Polymeren wie Polyethylenglykol und Polyvinylpyrrolidon ausgewählt wird.

Es folgen 3 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

10

Fig. 1

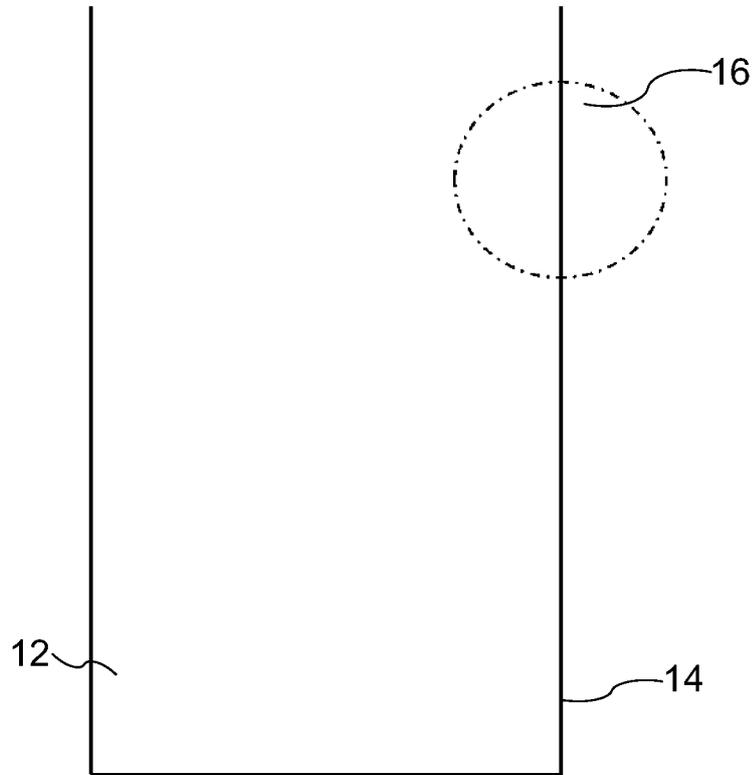
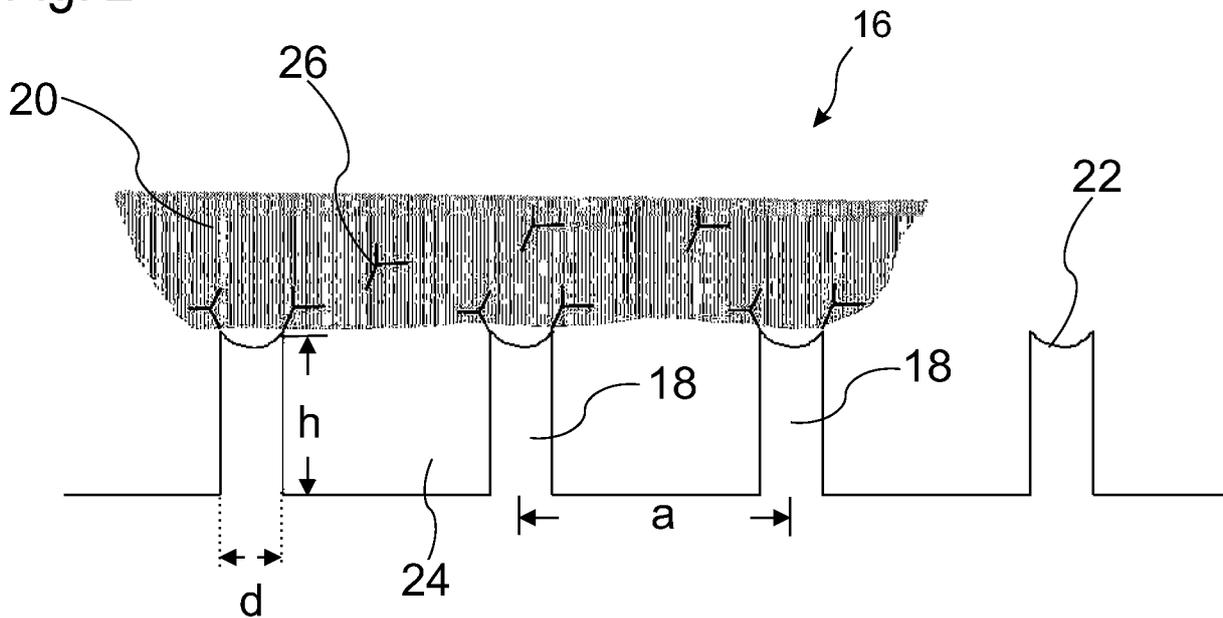


Fig. 2



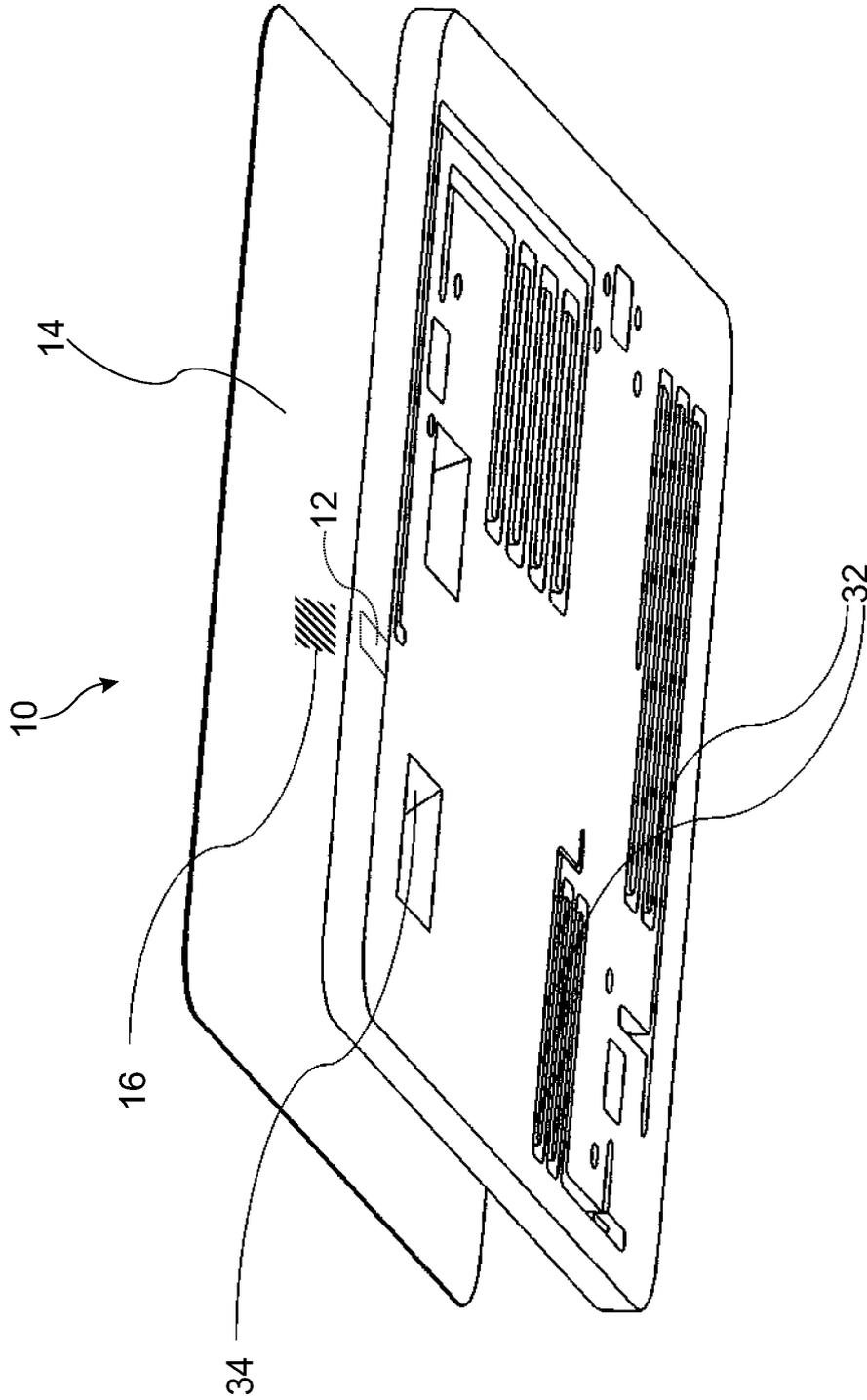


Fig. 3

Fig. 4

