



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 28 972 T2** 2008.02.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 586 379 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 28 972.2**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **05 075 891.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **18.04.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.10.2005**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.02.2008**

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

C12M 1/22 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

198604 P **19.04.2000** **US**

258913 P **29.12.2000** **US**

(73) Patentinhaber:

Corning Inc., Corning, N.Y., US

(74) Vertreter:

PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,
80801 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT, NL

(72) Erfinder:

Clements, James G., Brentwood, NH, 03833, US;
Curtis, Michael, Stratham, NH, 03885, US; Gagnon,
Paul E., Wells, Maine, 04090, US; Martin, Gregory
R., Acton, ME, 04001, US; Root, David M.,
Lexington, MA, 02173, US; Tanner, Allison J.,
Portsmouth, NH, 03801, US; Lacey, William,
Portsmouth, NH, 03801, US

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung einer Mehrfachlochplatte**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Multiwell-Assayplatten zur Verwendung bei chemischen und biochemischen Analysen und insbesondere Multiwellplatten mit transparenten Wellböden und verbesserte Herstellungsverfahren.

Hintergrund

[0002] Das jüngste Wachstum in vielen Bereichen der Biotechnologie hat das Erfordernis zur Durchführung diverser Untersuchungen, die allgemein als Assays bezeichnet werden, von biochemischen Systemen verstärkt. Diese Assays umfassen beispielsweise biochemische Reaktionskinetik, DNA-Schmelzpunktbestimmungen, DNA-Spektralverschiebungen, DNA- und Proteinkonzentrationsmessungen, Anregung/Emission von fluoreszenten Sonden, Enzymaktivitäten, Enzym-Cofactorassays, homogene Assays, Arzneimittelmetabolitenassays, Arzneimittelkonzentrationsassays, Dispensions-, Volumen-Verifizierung, Lösungsmittelkonzentration und Solvatisierungskonzentration. Auch gibt es eine Anzahl von Assays, die sehr wohl intakte lebende Zellen verwenden und die eine visuelle Auswertung erfordern.

[0003] Assays biochemischer Systeme werden im großen Maßstab sowohl in der Industrie als auch an Hochschulen durchgeführt, sodass es wünschenswert ist, ein Gerät vorliegen zu haben, mit dem sich diese Assays zweckmäßig und kostengünstig durchführen lassen. Da sie relativ leicht zu handhaben sind, kostengünstig sind und im Allgemeinen nach einmaligem Gebrauch entsorgbar sind, werden oft Multiwellplatten für solche Untersuchungen verwendet. Multiwellplatten sind typischerweise aus einem polymeren Material geformt und bestehen aus einer geordneten Aneinanderreihung einzelner Vertiefungen. Jede Vertiefung umfasst Seitenwände und einen Boden, sodass ein Proben-Aliquot in jede Vertiefung gegeben werden kann. Die Vertiefungen können in einer Matrix von zueinander senkrechten Reihen und Spalten angeordnet sein. Die üblichen Größen für Multiwellplatten umfassen Matrizen mit Dimensionen von 8×12 (96 Vertiefungen) 16×24 (384 Vertiefungen) und 32×48 (1536 Vertiefungen).

[0004] Typischerweise werden die zum Aufbau einer Multiwellplatte verwendeten Materialien auf der Grundlage der zu testenden Proben und der zu verwendenden Analysetechniken ausgewählt. Beispielsweise sollten die Materialien, aus denen die Multiwellplatte hergestellt ist, gegenüber den Komponenten der Probe oder gegenüber jeder biologischen oder chemischen Beschichtung, die auf die Platte aufgebracht worden ist, chemisch inert sein. Außerdem sollten die Materialien gegenüber Strahlungs-

oder Wärmebedingungen undurchdringlich sein, denen die Multiwellplatte im Verlauf eines Experiments ausgesetzt ist, und sollten eine ausreichende Starrheit für die manuelle Anwendung aufweisen.

[0005] Bei vielen Anwendungen wird ein transparentes Fenster im Boden von jeder Probenvertiefung benötigt. Transparente Böden werden hauptsächlich bei Assaytechniken eingesetzt, die auf der Emission von Licht aus einer Probe und auf anschließenden spektroskopischen Messungen beruhen. Beispiele für solche Techniken umfassen Flüssigkeitsszintillationszählung, Techniken, die Licht messen, das von lumineszenten Marker emittiert wird, wie biolumineszente oder chemolumineszente Marker, fluoreszente Marker, oder Extinktionsniveaus. Vertiefungen mit optisch transparentem Boden ergeben auch den Vorteil des mikroskopischen Betrachtens von Proben und lebenden Zellen in der Vertiefung.

[0006] Derzeit sind Multiwellplatten mit optisch transparentem und UV-transparentem Boden auf dem Markt und werden für die beschriebenen Zwecke verwendet. Diese Platten sind typischerweise ein Hybrid aus verschiedenen polymeren Materialien, wobei ein Material die Vertiefungswände und das andere den Bodenteil der Vertiefungen aufbaut.

[0007] Idealerweise weisen die zur spektroskopischen und mikroskopischen Messung zu verwendeten Platten aus Glas hergestellte Vertiefungsböden auf. Glas besitzt den Vorteil, chemisch inert zu sein, besitzt überragende optische Eigenschaften im sichtbaren Bereich, ist starr und aufgrund seiner hohen Schmelztemperatur hochresistent gegenüber jedem Deformationsprozess, der durch Wärme verursacht wird. Weiterhin und im Gegensatz zu den meisten Polymeren kann Glas gestaltet und bearbeitet werden, um eine Oberfläche bereitzustellen, die ein sehr geringes Hintergrundsignal erzeugt, und die bis zur äußersten Glattheit gefertigt werden kann. Dennoch kann seine Oberfläche unschwer beschichtet oder anderweitig verändert werden, um das Anknüpfen von speziellen Zielmolekülen zu begünstigen. Beispielsweise kann eine Silanbeschichtung auf das Glas aufgebracht werden, um jede Diversität an funktionellen Gruppen, wie beispielsweise Aminfunktionalitäten auszudehnen. Eine solche Aminfunktionalität kann wirksam eingesetzt werden, um reaktive Moleküle der allgemein bei biologischen Assays und Testabläufen verwendeten Typen zu immobilisieren, z. B. um spezielle bindende Elemente (z. B. Antigene, Liganden und Haptene), ganze Zellen, Proteine (z. B. Bindungsproteine, Rezeptorproteine, Antikörper und Antikörperfragmente), Nukleinsäuren (z. B. RNA- und DNA-Moleküle), Gewebe und dergleichen zu immobilisieren. Außerdem ist die Verwendung einer Polylysinbeschichtung auf Glas-Deckgläsern, um Nervenzellen wachsen zu lassen, ein Standardverfahren.

[0008] Während es einfach ist, Glas in Lagen herzustellen, ist es leider nicht möglich, aus Glas hergestellte Gegenstände spritzzugießen, und es ist extrem schwierig, einen geschmolzenen Glasklumpen auf ein Industriestandardformat für Assayplatten zu pressen. Eine Lösung für das Problem, die die vorliegende Erfindung bietet, besteht in der Kombination einer spritzgegossenen polymeren oberen Platte, die pressgeformt wird, um die Vertiefungen einer Mikroplatte zu bilden, mit einer im Wesentlichen flachen transparenten unteren Platte aus Glas, um die Vertiefungsböden zu bilden. Um dieses Ergebnis zu erzielen, haben die Erfinder mehrere bekannte Verfahren zum Kombinieren von Glas und Kunststoff in Erwägung gezogen. Zwei allgemein eingesetzte Verfahren zum Verbinden dieser Typen von Materialien bestehen im adhäsiven Binden und im Insertionsformen.

[0009] Die Verwendung von Klebstoffen, um das Material, das die Vertiefungsböden bildet, und das Material, das die Vertiefungswände bildet, miteinander zu verbinden, ist teuer und führt zur Verunreinigung der biologisch empfindlichen Vertiefungsoberfläche. Niedermolekulare Spezies aus dem polymeren Material, welche die Seitenwände der Vertiefungen aufbauen, sowie Spezies innerhalb des Klebstoffs selbst neigen zur Migration durch den Klebstoff und auf die transparente Bodenoberfläche. Wenn dies eintritt, können Biomoleküle nicht ordnungsgemäß mit der Oberfläche, wie unter bestimmten Assaybedingungen beabsichtigt, reagieren. Klebstoffe, die UV-gehärtet oder UV-stabilisiert sind, besitzen ebenfalls die Neigung zur Absorption von UV-Licht, was zu veränderten fluoreszenten Messungen führen kann, die von einem Detektor abgelesen werden, der oberhalb oder unterhalb der Platte angeordnet ist. Die Auswirkung des UV-Lichts besteht in der nichtspezifischen Modifikation des Signals durch nichtspezifische Fluoreszenz und somit in der Erzeugung von unerwünschten Hintergrundmessungen, die von Vertiefung zu Vertiefung und von Platte zu Platte äußerst variabel sind.

[0010] Insertionsformen ist eine weitere übliche Technik zum Verbinden von polymeren und gläsernen Teilen miteinander. Bei diesem Fertigungsverfahren wird der Polymerteil gegen oder um das Glas teil pressgeformt. Da das Polymer eine weitaus niedrigere Schmelztemperatur als das Glas aufweist, verbleibt das Glas in fester Form, während das flüssige Polymer dagegen gepresst wird. Nach dem Härten bleibt die Polymer/Glasgrenzfläche nur durch schwache Wechselwirkungen gebunden. Ein Weg der Erhöhung der mechanischen Festigkeit der Verbindung besteht im Pressformen oder im Verkapseln des Glases mit dem Polymer, z. B. bei Aschenbechern mit Glasboden. Leider ist die Verwendung dieser Technik zur Kombination von polymeren Teilen mit Glaslagen von Objektträgerdicke, wie bei der Multiwellplattenherstellung beschrieben, nicht durchführbar, da die

mechanische Festigkeit von Glas bei einer solchen Dünne extrem niedrig ist.

Zusammenfassung

[0011] Die vorliegende Erfindung bietet eine verbesserte Multiwellplatte und ein Verfahren zur Herstellung einer Multiwellplatte mit einem transparenten Vertiefungsbodenteil, welcher die unverzerrte spektroskopische Messung von Lichtemissionen aus einer Probe erlaubt. Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte: Bereitstellen einer oberen Platte mit einer Aneinanderreihung von offenendigen Vertiefungen, wobei die Platte aus einem polymeren Material hergestellt ist, das ein Silan und infrarotabsorbierende Teilchen und/oder Teilchen enthält; Bereitstellen einer im Wesentlichen flachlagigen unteren Platte aus Glas, die im Wesentlichen gegenüber Infrarotstrahlung bei den gewählten Wellenlängen transparent ist; Inkontaktbringen der oberen Platte mit der unteren Platte zur Bildung einer Grenzfläche; und Erwärmen der oberen Platte an der Grenzfläche über ihre Übergangstemperatur, durch die untere Platte, mittels Infrarotstrahlung, wobei das geschmolzene Polymer der oberen Platte die untere Platte an der Grenzfläche benetzt und das Teil abgekühlt wird, so dass die obere Platte und die untere Platte miteinander durch kovalente Verbindung gebunden werden, die während des Benetzungs-, Erwärmungs- und Abkühlens gebildet wird.

[0012] Das vorliegende Verfahren erlaubt das Verknüpfen von Flachglas geringer Dicke als das Material für die transparente untere Platte. Glas besitzt den Vorteil, dass es nicht polarisiert oder sich ausdehnt und dadurch nicht die Emissionsmessungen verzerrt, die aus den Probenvertiefungen erhalten werden. Zusätzlich kann Glas bis auf extreme optische Flachheitsanforderungen gefertigt werden und besitzt einen weitaus höheren Schmelzpunkt als das Polymermaterial, das die obere Platte aufbaut. Als Ergebnis ist es gegenüber einer Verformung aufgrund von Schmelzen weitaus weniger empfindlich und erhält wahrscheinlicher seine ausgezeichneten optischen Eigenschaften aufrecht.

[0013] Das vorliegende Verfahren gestattet auch die Verknüpfung von gleichartigen Polymeren (z. B. eine schwarze opake obere Platte aus Polystyrol mit einer optisch transparenten Polystyrolfolie) oder das Verknüpfen von ungleichen Polymeren (z. B. eine schwarze opake obere Platte aus Polystyrol mit einer PTFE-Folie). Die resultierenden polymeren Platten besitzen einzigartige charakteristische Flachheit sowohl in den einzelnen Vertiefungen als auch über die gesamte Platte.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] [Fig. 1](#) ist eine dreidimensionale Ansicht der

erfindungsgemäßen Multiwellplatte.

[0015] **Fig. 2** ist ein Teilquerschnitt der erfindungsgemäßen Multiwellplatte. Die erfindungsgemäßen oberen und unteren Platten sind gezeigt, nachdem die beiden verbunden worden sind.

[0016] **Fig. 3** ist ein Teilquerschnitt einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Multiwellplatte, welcher die Bodenplatte zeigt, die mit einer chemisch aktiven Beschichtung behandelt wurde.

[0017] **Fig. 4** ist eine perspektivische Explosionsansicht der erfindungsgemäßen Multiwellplatte.

[0018] **Fig. 5** ist eine teilweise explodierte Querschnittsansicht einer Ausführungsform der Multiwellplatte, die die vorliegende Erfindung ausführt, die dünne Rillen um den Umfang der Vertiefungsböden zeigt.

[0019] **Fig. 6** ist eine schematische Querschnittsansicht des Herstellungsgerätes, das bei der vorliegenden Erfindung vor Einleiten von Gas eingesetzt wird.

[0020] **Fig. 7** ist eine schematische Querschnittsansicht des Herstellungsgerätes, das bei der vorliegenden Erfindung nach Einleiten von Gas zum Aufblasen der Blase, die aus der PDMS-Schicht gebildet wird, verwendet wird.

[0021] **Fig. 8** ist eine Explosionsansicht einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

[0022] **Fig. 9** ist eine schematische explodierte Querschnittsansicht einer Aneinanderreihung von Teilen in dem Herstellungsgerät, das bei der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer Platte mit einem Dünnschichtboden verwendet wird.

[0023] **Fig. 10** ist eine schematische Darstellung der Teile von **Fig. 9**, wie zusammengebaut, und innerhalb des Herstellungsgerätes befestigt.

[0024] **Fig. 11** ist eine Balkengraphdarstellung, die die Flachheit entlang der Platte von 96-Wellplatten, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt wurden, und vergleichbare Platten, die mit einem Standardpressformverfahren hergestellt wurden, vergleicht.

[0025] **Fig. 12** ist eine Balkengraphdarstellung, die die Flachheit entlang der Vertiefung von 96-Wellplatten, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt wurden, und vergleichbare Platten, die mit einem Standardpressformverfahren hergestellt wurden, vergleicht.

[0026] **Fig. 13** ist eine Balkengraphdarstellung, die die Flachheit entlang der Vertiefung von 384-Well-

platten, die erfindungsgemäß hergestellt wurden, und vergleichbare Platten, die mit einem Standardpressformverfahren hergestellt wurden, vergleicht.

[0027] **Fig. 14** ist eine Aufnahme eines 300X-Rasterelektronenmikroskops von einem Querschnitt der Bindungszone zwischen einer oberen Platte aus Polystyrol und einer unteren Platte aus Polystyrol, die erfindungsgemäß zusammengefügt wurden.

[0028] **Fig. 15** ist eine 200fach vergrößerte Photographie von Zellen in einer Vertiefung einer 96-Wellplatte, die durch das erfindungsgemäße Zusammenbauverfahren erzeugt wurde. Die Oberfläche ist unbehandelt.

[0029] **Fig. 16** ist eine 200fach vergrößerte Photographie von Zellen in einer Vertiefung einer 96-Wellplatte, die durch das erfindungsgemäße Zusammenbauverfahren erzeugt wurde. Die Oberfläche ist mit Plasma behandelt.

[0030] **Fig. 17** ist eine 200fach vergrößerte Photographie von Zellen in einer Vertiefung einer 96-Wellplatte, die durch das erfindungsgemäße Zusammenbauverfahren erzeugt wurde. Die Oberfläche ist mit Plasma und Collagen behandelt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0031] Gezeigt in **Fig. 1** ist eine erfindungsgemäße Multiwelltestplatte **10**. Die Platte umfasst eine periphere Randleiste **12** und eine obere Oberfläche **13** mit einer Aneinanderreihung von Vertiefungen **14**, die jeweils in der Lage sind, ein zu testendes Probenaliquot aufzunehmen. Vorzugsweise entspricht die Platte Industriestandards für Multiwellplatten; das heißt, eine Platte ist durch eine periphere Randleiste **12** begrenzt, mit 96 Vertiefungen in einer 8 × 12-Matrix (zueinander senkrechte 8 und 12 Vertiefungsreihen) ausgelegt. Zusätzlich entsprechen Höhe, Länge und Breite vorzugsweise den Industriestandards. Allerdings kann die vorliegende Erfindung auf jeden Typ von Multiwellplattenanordnung, einschließlich 384 und 1536 Wells, implementiert werden und ist auf keine spezielle Anzahl von Vertiefungen oder auf irgendwelche speziellen Dimensionen beschränkt.

[0032] Die Platte weist einen zweiteiligen Aufbau auf. Unter Bezugnahme auf **Fig. 2**, ein Teilquerschnitt von Multiwellplatte **10**, bildet eine obere Platte **20** die Vertiefungswände **24** und die obere Oberfläche; eine untere Platte **22** bildet die Vertiefungsböden. Während des Fertigungsverfahrens, wie es nachstehend ausführlich beschrieben wird, werden die beiden Platten integral und chemisch miteinander an einer Grenzfläche **28** verbunden.

[0033] Jede Vertiefung **14** umfasst einen oberen Rand **16**, Seitenwände **24** und einen Boden **26**. Um

die Lichttransmission zwischen nebeneinander liegenden Vertiefungen zu verhindern, sind die Seitenwände **24** vorzugsweise aus einem opaken organischen polymeren Material gebildet oder sind mit einem anorganischen TiO_2 -Material gefüllt. Für die Assay-Techniken, die den Nachweis von sehr geringen Mengen an Licht erfordern, wie bei der Flüssigkeitszintillationszählung, ist die Pigmentierung, die verwendet wird, um das polymere Material opak zu machen, vorzugsweise hell farbig (z. B. weiß), so dass sie hochreflektiv und nicht absorptiv ist, um eine hohe Zähleffizienz bezüglich der radioaktiven Proben zu gewährleisten. Allerdings können die Wände optisch transparent sein. In einigen Fällen von Lumineszenz- und Fluoreszenzassays ist es bevorzugt, dass die Seitenwände **24** der Probenvertiefungen **14** nicht reflektiv und absorptiv sind, in welchem Fall die Vertiefungswände **24** aus einem schwarz pigmentierten Polymer geformt sind. Wie allgemein bekannt und praktiziert, kann die schwarze Färbung des Polymers durch Zugabe eines Pigmentmaterials, wie Ruß, zu der Polymermischung bei Konzentrationen, die bekannt sind und auf dem Fachgebiet unschwer praktiziert werden, erreicht werden. Die weiße Färbung wird typischerweise mit TiO_2 erzielt.

[0034] Der Boden der Vertiefungen **26** ist im Gegensatz zu den Seitenwänden **24** aus einem transparenten Material geformt. Vorzugsweise ist das Material anorganisch, wie Glas, kann allerdings reines Siliciumdioxid, Glimmer oder auch metallisch beschichtete Folien sein. Stärker bevorzugt ist das Glas von hoher optischer Qualität und Flachheit, wie Alumoborosilicatglas (Corning Inc. Code 1737). Die optische Flachheit des Vertiefungsbodens und der Platte ist besonders wichtig, wenn die Platte zum mikroskopischen Betrachten von Proben und lebenden Zellen in den Vertiefungen verwendet wird. Diese Flachheit ist wichtig bei der Bereitstellung einer gleichmäßigen Zellverteilung und bei der Begrenzung optischer Schwankung. Wenn die Vertiefungsböden kuppelförmig sind, neigen die Zellen beispielsweise dazu, sich in einem Ring um den äußeren Teil des Vertiefungsbodens zu vereinigen. Wenn umgekehrt die Vertiefungen nach unten gekrümmt sind, vereinigen sich die Zellen am tiefsten Punkt. Die Glas-Objektträger sind typischerweise innerhalb von Mikrometern flach, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Vorzugsweise sind die Vertiefungsböden aus einer Glaslage mit einer Dicke entsprechend den Deckgläsern für Objektträgern gebildet, die hergestellt werden, um auf die optischen Eigenschaften von bestimmten mikroskopischen Linsen zu passen. Obwohl die Vertiefungsböden jede beliebige Dicke besitzen können, ist es zum mikroskopischen Betrachten bevorzugt, dass die Vertiefungsbodendicke im Bereich von 5–100 Mikrometer liegt und dass sie eine Flachheit im Bereich von 0–10 Mikrometer über den Durchmesser der äußeren untersten Oberfläche einer einzelnen Vertiefung aufweisen. Die innere und

äußere Oberfläche dieser Vertiefungen sind koplanaar.

[0035] Das hier eingesetzte Glasmaterial kann von diversen Herstellern (z. B. Erie Scientific, Corning, Inc.) als Lage bezogen werden. Diese Lagen können dann zur Anpassung an die Dimensionen der gewünschten Plattengröße verändert werden. Dies bildet eine Wand mit transparentem Boden **26** für jede Probenvertiefung **14** und gestattet das Hindurchschauen. Die transparente untere Platte gestattet auch, dass Lichtemissionen durch den Boden der Probenvertiefungen **14** gemessen werden.

[0036] Die Multiwellplatte **10** besteht aus zwei getrennten Teilen. Eine getrennt pressgeformte obere Platte **20**, die eine Aneinanderreihung von offenendigen Probenvertiefungen **14** umfasst, wird zur Bildung der Seitenwände **24**, der peripheren Randleiste **12** und der oberen Oberfläche **13** verwendet. Die obere Platte ist vorzugsweise aus langkettigen Polymeren pressgeformt, die durch Erhitzen verflochten werden und sich miteinander in einem nicht kovalenten Mechanismus beim Abkühlen binden, wodurch ein durchdringendes polymeres Netzwerk gebildet wird. Außerdem ist die obere Platte vorzugsweise aus einer Gruppe von Polymeren, die eine Silanfunktionalität enthalten, gewählt. Silanfunktionelles Polymer kann mit anderen Monomeren copolymerisiert werden, um Polymere mit angehängten Silangruppen zu erzeugen. Diese Polymere vernetzen bei Exposition gegenüber Feuchtigkeit in der Umgebung und ergeben ein verstärktes Endpolymer. Ein Beispiel für ein geeignetes Material ist Poly(ethylen-co-trialkoxivinylsilan). Die Silanfunktionalität in dem Polymer ist von Bedeutung bei der Erzeugung einer kovalenten Verknüpfung mit der unteren Platte aus Glas, die verwendet wird, um die Vertiefungsböden **26** zu bilden. Die beiden Platten werden an einer Grenzfläche **28** in Kontakt gebracht, wo kovalente Verknüpfungen zwischen der Silanfunktionalität des organischen polymeren Materials, das die obere Platte **20** bildet, und der Hydroxylfunktionalität der unteren Platte aus Glas **22** die kovalente Verknüpfung erzeugen.

[0037] Es sollte angemerkt werden, dass die obere Platte nicht pressgeformt zu sein braucht. Beispielsweise kann eine Lage des Silanpolymers bereitgestellt werden, in die durch Laser Vertiefungen gebohrt, gestantzt oder anderweitig entnommen werden. Außerdem kann die obere Platte laminiert werden, so dass jede Schicht gewünschte Eigenschaften aufweist. Beispielsweise kann die oberste Schicht reflexionshemmend sein, eine mittlere Schicht, die die Seitenwände der Platte bildet, kann zur Meniskuskontrolle hydrophob sein, eine unterste Schicht, die die untere Platte aus Glas kontaktiert, ist ein Silanpolymer.

[0038] Die Vertiefungen **14** können jedes Volumen

oder jede Tiefe aufweisen, allerdings gemäß dem 96-Well-Industriestandard besitzen die Vertiefungen ein Volumen von ungefähr 300 µl und eine Tiefe von 12 µm. Der Abstand zwischen den Vertiefungen beträgt ungefähr 9 mm zwischen den Mittellinien von Reihen in x- und y-Richtung. Die gesamten Höhen-, Breiten- und Längendimensionen der Platte sind vorzugsweise bei 14 mm, 85 mm bzw. 128 mm standardisiert. Die Vertiefungen können in jeder beliebigen Querschnittsform (in der Draufsicht) hergestellt werden, einschließlich Quadrat, reine vertikale Wände mit flachen oder runden Böden, konische Wände mit flachen oder runden Böden und Kombinationen davon.

[0039] [Fig. 3](#) zeigt eine Teilquerschnittsansicht einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Diese Figur zeigt allerdings auch eine chemisch aktive Beschichtung **30**, die der inneren Oberfläche der unteren Platte **22** zugefügt werden kann. In Abhängigkeit von den Testanforderungen kann jede Anzahl von chemisch aktiven Beschichtungen, die nachstehend ausführlicher beschrieben werden, zur Behandlung der Glasoberfläche der Vertiefungsböden verwendet werden, sowohl auf der inneren als auch äußeren Vertiefungsbodenoberfläche.

[0040] [Fig. 4](#) ist eine explodierte perspektivische Ansicht der erfindungsgemäßen Multiwellplatte. Die obere Platte **20** kann gesehen werden, die die periphere Randleiste **12**, den oberen Rand **16**, Vertiefungen **14** und Seitenwände **24** enthält. Die untere Platte **22** ist vorzugsweise flach und bemessen, um Vertiefungsböden für sämtliche Vertiefungen der oberen Platte **20** zu bilden. Obwohl die untere Platte **22** als Ganzes im Wesentlichen flach ist, kann sie Reliefmerkmale aufweisen, die auf ihrer Oberfläche ausgebildet sind, wie Rillen, Kurven, Linsen, erhabene Abschnitte, Beugungsgitter, Dellen, konzentrische Kreise, vertiefte Regionen etc. Solche Merkmale können auf der unteren Platte derart angeordnet sein, dass sie die Vertiefungsböden selbst formen oder anderweitig Merkmale der Vertiefungsböden werden und können wiederum die Leistung eines Assays verstärken, den Nachweis verstärken oder ermöglichen (wie im Falle mit Linsen und Gittern) oder dazu dienen, das Binden mit der oberen Platte mechanisch zu erleichtern. Diese Reliefmerkmale können durch eine Anzahl von bekannten Verfahren gebildet werden, einschließlich Vakuumthermoformen, Pressen, chemisches Ätzen, Laserbearbeiten, abrasives Bearbeiten, Polieren oder Präzisionswalzen.

Infrarotbestrahlungs-Kaltschweißverfahren

[0041] Das bevorzugte Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Platte besteht im Einsatz von Infrarotbestrahlung, die an der Grenzfläche zwischen der oberen Platte und der unteren Platte, die in Kombination eine Multiwellplatte bilden, absorbiert

wird. Die obere Platte wird unter Verwendung von Standard-Spritzgusstechniken auf dem verwendeten organischen polymeren Material gebildet. Infrarot absorbierende Teilchen werden dem Batch-Gemisch zugesetzt. Im Falle einer rußpigmentierten oberen Platte, dient der Ruß an sich als Infrarotabsorptionsmaterial. Wenn transparente Vertiefungswände erforderlich sind, muss ein Infrarot absorbierendes transparentes Pigment verwendet werden (z. B. Laserfarbstoffe, wie IR-792-Perchlorat, erhältlich von Aldrich Chemical). Konzentrationen für die Laserfarbstoffe sind vorzugsweise größer als 5×10^{-6} g/cm² im Grenzflächenbereich zwischen oberer und unterer Platte. Das organische polymere Material der Wahl wird zu einer oberen Platte **20** pressgeformt, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, bestehend aus einer peripheren Randleiste **12**, einer Aneinanderreihung von offenkantigen zylindrischen Vertiefungen **14**, die durch Seitenwände **24** definiert sind, und mit oberen Rändern **16**.

[0042] Als Nächstes wird eine Glaslage als untere Platte erhalten, deren Längen- und Breitendimensionen im Allgemeinen einer Größe genügen, die in der Lage ist, eine gesamte Aneinanderreihung von Vertiefungen aus einer Industriestandard-Multiwellplatte abzudecken. Die Dicke ist variabel, allerdings vorzugsweise in dem zuvor besprochenen Bereich. Vor dem Zusammenbau wird das Glas intensiv durch Pyrolyse, Plasma, UV/Ozon oder Piranha-Lösung gereinigt. Die beiden Platten werden fest im gegenseitigen Kontakt unter Verwendung einer Infrarotzusammenbauemaschine gehalten, die beispielsweise von Branson Ultrasonics (Danbury, Connecticut) hergestellt wird. Eine schematische Querschnittszeichnung des Zusammenbaus ist in den [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) gezeigt. Eine untere Metallfunktion **50** richtet aus und hält die obere Platte **52**. Eine obere Funktion **54** besteht aus einer infraroten transparenten Polycarbonatlage **56** von ausreichender Dicke, um mindestens 25 psig stand zu halten, die mit einer platinkatalysierten Polydimethylsiloxan (PDMS)-Lage **58** von ausreichender Dicke verschraubt ist, die ebenfalls in der Lage ist, mindestens 25 psig stand zu halten. Eine entsprechende untere Platte **62** wird auf die obere Platte **52** aufgesetzt. Während des Schweißverfahrens halten die Metall-C-Klemmen **60** die obere Funktion **54** und die untere Funktion **50** zusammen. Die Klemme **60** ist an der oberen Funktion und der unteren Funktion durch entsprechende Scharniere, Bolzen und Klemmeneinrichtungen befestigt, die stark genug sind, um 25 psig stand zu halten und die aus Edelstahl oder beispielsweise Aluminium hergestellt sind. Ein Metallrahmen **51** ist im Inneren der Randleiste der oberen Platte angeordnet, um die untere Platte ordnungsgemäß über den Vertiefungen der oberen Platte auszurichten und zu lokalisieren.

[0043] Nachdem die Klemmen sicher befestigt wurden, wird ein geeignetes Gas, z. B. Stickstoff, in den

Raum zwischen der Polycarbonatlage **56** und der PDMS-Lage **58** mittels eines Gaseinlasses **64** eingeleitet. Wie in [Fig. 7](#) gezeigt, wird die PDMS-Lage durch die sich aufblähende Gastasche **66** nach unten gepresst. Dieses Aufblasen besitzt die Wirkung des gleichmäßigen Pressens der Teile (obere Platte und untere Platte) im innigen Kontakt. Der Druck kann eingestellt werden, allerdings ist der bevorzugte Bereich 4–25 psi, stärker bevorzugt 5–7 psig.

[0044] Anschließend wird durch eine Aneinanderreihung von Infrarotlaserdioden, die bei ungefähr 820 nm transmittieren, Energie zugeführt. Diese Energie passiert die Polycarbonatfolie, die PDMS-Folie und die untere Platte aus Glas und wird auf den Teil der oberen Platte gerichtet, der die untere Platte kontaktiert. Die Infrarot-absorbierenden Moleküle, die Teil des Matrixpolymers der oberen Platte bilden, absorbieren diese Energie, übertragen sie auf das Polymer und bringen dadurch den Teil der oberen Platte zum Schmelzen, der an das Glas der unteren Platte angrenzt. Das organische Polymermaterial der oberen Platte muss auf seine Schmelztemperatur gebracht werden, damit es das Glas benetzt und damit anschließend die kovalenten Verknüpfungen zwischen dem Silan in dem Polymer und den Hydroxylgruppen des Glases an der Grenzfläche erfolgen, da die Reaktion der kovalenten Verknüpfung durch die Gegenwart von Wärme und Feuchtigkeit vorangetrieben wird. Der Zusammenbau sollte vorzugsweise unter Reinraumbedingungen stattfinden. In der Tat entfernt ein Kohlefilter in der Einheit wirksam Rauch und restliche organische Stoffe, die aus dem Schweißverfahren herrühren, und schützt die Laser vor Ausgasen und führt dem System Reinluft zu. Außerdem ist es hilfreich, die Einheit mit Helium zu spülen, während das Schweißverfahren gestartet und durchgeführt wird. Dies unterstützt das Erzielen eines reinen Teils und begrenzt jegliche unerwünschte Oberflächenoxidation oder andere Reaktionen auf den exponierten Oberflächen.

[0045] Die Aneinanderreihung von Infrarotdioden wird fokussiert, um eine gleichmäßige Energielinie von etwa 2 mm Breite auf der Bodenfläche der oberen Platte zu ergeben. Die Klemme **60**, die in [Fig. 6](#) beschrieben wird, wird bei einer konstanten Geschwindigkeit verschoben, um die Energielinie über der gesamten Oberfläche, die zu binden ist, abzutasten. Die Abtastgeschwindigkeit ist variabel, allerdings vorzugsweise im Bereich von 0,1–1,0 Zoll/Sekunde. Die Betriebsenergie auf dem Instrument liegt typischerweise im Bereich zwischen 45 und 75 %. Der Laser kann am Ende der Abtastung ausgeschaltet werden, um Beschädigung an der Klemme oder an dem Schiebemechanismus zu verhindern. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird der Metallrahmen **51** zur Festlegung des abzutastenden Bereiches und zum Halten der unteren Platte aus Glas **62** in Ausrichtung verwendet. Dieser Metallrahmen

nimmt auch die Energie, bis die Laserausgabe stabil ist, und die Energie von jeder Überabtastung auf. Falls notwendig, kann der Rahmen gekühlt werden. Außerdem kann jede überschüssige Energie, die den gesamten Aufbau von oberer und unterer Platte (z. B. in den Vertiefungsbereichen) passiert, von der Basis der zusammengebauten Struktur absorbiert werden, die vorzugsweise mit einer Kühlvorrichtung ausgestattet ist. Die Kombination des Rahmens und der Basis des Instruments nimmt die beim Schweißen nicht verwendete Laserenergie auf. Da andere Materialien IR-transparent sind, ist der Wärmestau in dem Polycarbonatfenster **56**, der PDMS-Blase **58** und dem Glas **62** minimal. Ein Aufheizen tritt nur über der Abtastlinie auf, so dass nach Passieren der Abtastlinie über einen bestimmten Bereich die untere und obere Platte in dem Bereich gebunden werden, während der noch nicht abgetastete Bereich immer noch durch die Klemmmittel zusammengehalten wird, die vorstehend beschrieben wurden. Aufgrund des Klemmens verbleibt die Erfassung zwischen oberer und unterer Platte während des Schweißverfahrens unverändert; dies ist besonders wichtig, wenn eine exakte Ausrichtung von Funktionen in der unteren Platte erforderlich ist.

[0046] Das kovalente Pfropfen wird in einer Zweistufenreaktion erreicht. Als erstes erfolgt eine Hydrolysereaktion, wobei ein Wassermolekül eine Silicium-Ethoxy-Bindung in dem Silan hydrolysiert, wobei ein Molekül Ethanol freigesetzt wird und eine Bindung einer Siliciumhydroxidfunktion zurückbleibt. Als Zweites erfolgt eine Kondensationsreaktion, wobei zwei Siliciumhydroxidfunktionalitäten, eine von dem Silan und die andere von der Glasoberfläche, ein Wassermolekül eliminieren und eine Siloxanbindung entstehen lassen. Die resultierenden Siloxanbindungen, die die obere und untere Platte zusammenpfropfen, sind extrem stabil.

[0047] Die Infrarotschweißtechnik wird als "Kaltschweißtechnik" betrachtet, da sie das Erhitzen nur auf die Kontaktzonenrenzfläche am Boden der Seitenwände, die den offenen Boden der oberen Platte definieren, konzentriert. Dies erlaubt es, dass das organische Polymermaterial, das den Rest der oberen Platte bildet, starr und kalt bleibt, ebenso wie auch das Glasmaterial. Außerdem erlaubt die Verwendung eines Infrarotlasers, dass das organische Polymermaterial sehr schnell aufgeheizt und nur eine kleine Wärmemenge an der Grenzfläche hinzugeführt wird, die schnell abgestrahlt wird. Dies hat die Wirkung der Verhinderung, dass das polymere Material der oberen Platte sich ausdehnt und dafür unbiegsam bleibt. Im Gegensatz dazu würden herkömmliche Aufheizverfahren dazu führen, dass sich aufgrund des langsamen Aufheiz- und Abkühlverfahrens, das diesen Verfahren zu eigen ist, die Gesamtheit der oberen Platte dehnt und gegebenenfalls biegsam wird.

[0048] [Fig. 5](#) ist ein explodierter Teilquerschnitt, der eine alternative Ausgestaltung der oberen Platte zeigt, die für die Wechselwirkung zwischen dem Polymer und der unteren Platte aus Glas mehr Oberfläche bereitstellt. Eine Wulst **40** wird auf dem Boden der Seitenwände **42** der Probenvertiefungen, die die obere Platte **44** aufbauen, ausgeformt. Diese Wülste kontaktieren direkt und binden kovalent an die Oberfläche der unteren Platte **46**, wodurch der Kontaktbereich zwischen den Platten drastisch zunimmt.

[0049] Bei einer alternativen Ausführungsform kann, vor dem kovalenten Verschmelzen der oberen und unteren Platte miteinander und wie in [Fig. 3](#) gezeigt, eine biologisch oder chemisch aktive Beschichtung **30** auf die Oberfläche der unteren Platte **22** aufgebracht werden. Auf diese Weise, nachdem die untere und obere Platte unter Bildung einer Multiwellplatte verschmolzen sind, wird den Vertiefungsböden darauf die Beschichtung verliehen. Beschichtungen können durch jedes auf dem Fachgebiet bekannte geeignete Verfahren eingebracht werden, einschließlich Drucken, Sprühen, Kondensation, Strahlungsenergie, Ionisationstechniken oder Tauchen. Die Beschichtungen können anschließend entweder kovalente oder nicht kovalente Verknüpfungsstellen bereitstellen. Solche Stellen in oder auf der Oberfläche der Bodenvertiefung können zum Anknüpfen von Gruppierungen eingesetzt werden, wie Assaykomponenten (z. B. ein Element eines Bindungspaares), chemische Reaktionskomponenten (z. B. Festphasensynthesekomponenten für die Aminosäure- oder Nukleinsäuresynthese) und Zellkulturkomponenten (z. B. Proteine, die das Wachstum oder die Haftung erleichtern). Außerdem können die Beschichtungen auch zur Verstärkung des Anknüpfens von Zellen (z. B. Polylysin) verwendet werden. Es kann auch davon ausgegangen werden, dass eine Aneinanderreihung von Biomolekülen (z. B. DNA-Sequenzen) gedruckt oder anderweitig an der Oberfläche der unteren Platte aus Glas vor dem Zusammenbau mit der oberen Platte synthetisiert werden können. Nach dem Verknüpfen mit der oberen Platte kann jeder Vertiefungsboden eine solche getrennte Aneinanderreihung enthalten. Das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren ist besonders für jede Ausführungsform geeignet, die das Aufbringen einer Beschichtung oder einer anderen Einheit umfasst. Da nur eine begrenzte Region auf der polymeren oberen Platte und beabstandet von dem Bereich, der zu den Vertiefungsböden wird, tatsächlich erhitzt wird, um die obere und untere Platte miteinander zu verknüpfen, verbleibt die Beschichtung im Wesentlichen unverändert und unbeschädigt. Bei dieser Ausführungsform ist gewährleistet, dass keine Materialien den Beschichtungen zugesetzt werden, die bei der Wellenlänge der bestimmten Laserdioden, die eingesetzt werden, absorbieren.

[0050] Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass Beschichtungen auf die äußerste Oberfläche

der Vertiefungsböden aufgebracht werden. Beispielsweise können Beschichtungen, die die optischen Eigenschaften der Vertiefung beeinflussen (z. B. Farbfilter, IR-Filter, UV-Filter, Polarisationsfilter, Photonsiebe, reflexionshemmende Oberflächen etc.), auf der Grundlage der speziellen Assay-Anforderungen aufgebracht werden.

[0051] Zusätzlich kann die untere Platte eine gleichmäßige Beschichtung auf der kontaktierenden Oberfläche aufweisen, von der Bindungsbereiche durch Laser ablatiert werden. Diese Technik kann in Fällen erforderlich sein, wobei eine extrem dicke Beschichtung die Integrität der unter Verwendung des IR-Zusammenbauinstrumentes gebildeten Bindung beeinflussen kann. Da die Beschichtung von den Bereichen entfernt wird, in denen die untere und obere Platte sich schneiden, ist nichts vorhanden, um die Bindungsfestigkeit zu beeinflussen. Alternativ kann die Beschichtung als Designdruck aufgebracht werden, bei dem die Bindungsbereiche beschichtungsfrei sind. Diese Drucktechnik kann auch zur Erzeugung von Bodenvertiefungen eingesetzt werden, die jeweils eine verschiedene funktionalisierte Oberfläche auf der Grundlage verschiedener Beschichtungen aufweisen. Dies kann durch Aufdrucken der diversen Beschichtungen über die Kontaktoberfläche der unteren Platte erreicht werden. Die beschichteten Regionen richten sich jeweils mit einer bestimmten Vertiefung aus der oberen Platte aus. Nach dem sie gebunden ist, wird eine Platte mit verschiedenen Beschichtungen in den Böden von jeder Vertiefung erreicht.

Dichtung

[0052] Bei einem zu dem vorstehend beschriebenen und wie in [Fig. 8](#) gezeigten alternativen Konstruktionsverfahren kann, statt eine gesamte aus einem Silanpolymer hergestellte obere Platte heranzuziehen, eine Grenzflächendichtung, die aus dem Silanpolymermaterial mit IR-Absorptionsmerkmalen pressgeformt ist, wie zuvor beschrieben, eingesetzt werden. Bei einer solchen Ausführungsform dient die Dichtung **70** als Bindungserleichterung zum Verknüpfen des Glasbodens **72** mit der polymeren oberen Platte **74**. Diese dünnschichtartige Dichtung, die auch durch Schneiden oder Stanzen einer Folie gebildet werden kann, besitzt vorzugsweise die gleichen Grundflächendimensionen wie der fertig gestellte Plattenboden. Obwohl die Dichtungsdicke variieren kann, ist es bevorzugt, dass sie zwischen 0,5 bis 5 Mil Dicke liegt, so dass die gesamte Dichtung ordnungsgemäß und vollständig von Strahlung, die nur auf eine Seite gerichtet ist, erhitzt werden kann. Eine Aneinanderreihung von Löchern oder Ausstanzungen wird darin gebildet, um sich exakt mit den Vertiefungen der oberen Platte auszurichten und ihnen zu entsprechen. Wie vorstehend, wird ein polymeres Material zu einer oberen Platte pressgeformt,

die aus einer peripheren Randleiste und einer Aneinanderreihung von Vertiefungen mit Seitenwänden und oberen Rändern besteht. Es ist allerdings nicht notwendig, dass diese Platte ein Silanmaterial enthält. Vorzugsweise ist die obere Platte aus einem Polymermaterial pressgeformt, das IR-transparent ist, wie Polystyrol, Polypropylen, Polymethacrylat, Polyvinylchlorid, Polymethylpenten, Polyethylen, Polycarbonat, Polysulfon, Polystyrolcopolymer, cyclische Olefincopolymer, Polypropylencopolymer, Fluorpolymere, Polyamide, vollständig hydrierte Styrolpolymere, Polystyrolbutadien-Copolymer und Polycarbonat-PDMS-Copolymer. Nach dem Pressformen wird die obere Platte mit der Grenzflächendichtung kontaktiert und ausgerichtet, die anschließend mit einer unteren Platte kontaktiert wird, die eine transparente Glaslage einschließt, indem das Infrarot-Zusammenbauinstrument und das zuvor beschriebene Verfahren eingesetzt werden. Anschließend wird die Infrarotstrahlung durch die untere Platte aus Glas auf die Grenzflächendichtung zwischen oberer und unterer Platte gerichtet. Die Strahlung passiert das Glas und wird durch die IR-absorbierenden Teilchen (z. B. Ruß) in dem Polymermaterial, aus dem die Dichtung gebildet ist, absorbiert. Diese Energieabsorption heizt nur die Dichtung auf und führt dazu, dass das Polymer seine Schmelztemperatur erreicht. Dieses geschmolzene Dichtungsmaterial benetzt das Glas, wo kovalentes Siloxanbinden zwischen dem Silan in dem Dichtungspolymer und den Hydroxylgruppen des Glases durch den gleichen zuvor beschriebenen Mechanismus auftritt. Das geschmolzene Dichtungsmaterial benetzt und schmilzt gleichzeitig die Grenzfläche zwischen ihm und der oberen Platte, wodurch eine interpenetrierende polymere Netzwerkbindung erzeugt wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird IR-Strahlung durch eine IR-transparente obere Platte auch auf die Dichtung gerichtet. Auf diese Weise wird nicht nur die Grenzfläche zwischen Glas und Dichtung, sondern auch die Grenzfläche zwischen oberer Platte und Dichtung erhitzt, wodurch die Bindungsfestigkeit an beiden Grenzflächen verstärkt wird.

[0053] Wie bei der vorherigen Verfahrensausführungsform ist dieses Verfahren zweckmäßig bei der Glaslage, die vor dem Zusammenfügen mit einer biologisch oder chemisch aktiven Beschichtung behandelt werden kann. Da das Aufheizen nur in dem Polymermaterial der Dichtung auftritt und nicht auf dem Glas selbst, verbleibt die Beschichtung oder die angeknüpfte biologische/chemische Gruppierung größtenteils durch das Fertigungsverfahren unbeeinflusst.

[0054] Es ist auch wichtig anzumerken, dass das Dichtungsmaterial als undurchdringbare Barriere für den Fluidtransfer zwischen den Vertiefungen und als Barriere für jede optische Querkommunikation dient.

Silanbeschichtung

[0055] Noch eine weitere Ausführungsform zur Herstellung der erfindungsgemäßen Platten mit Glasboden besteht im Aufbringen einer Silanbeschichtung auf den Teil der oberen Platte, der mit der unteren Platte aus Glas während des Zusammenbaus wechselwirkt. Bei dieser Ausführungsform wird ein Lösungsmittel, das sowohl die Silanfunktionalität, wie ein Epoxysilan (z. B. 2-7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl-ethyl]silan; Aldrich Chemical) sowie IR-absorbierende Pigmente oder Farbstoffe in Aceton enthält, beispielsweise auf dem Bodenteil einer polymeren (z. B. ein Styrolpolymer) oberen Platte mittels Sprühen, Drucken, Tauchen, Bürsten, Beschichten, Warmhärten oder durch ein anderes Mittel aufgebracht. Obwohl zur Durchführung der Erfindung nicht notwendig, wird angenommen, dass das Epoxysilamaterial in das Polymermaterial der oberen Platte interkaliert und damit vernetzt, während die Silanfunktionalität weiterhin aktiv gestreckt verbleibt. Wiederum, wie bei den bisherigen Ausführungsformen, wird die beschichtete obere Platte mit der unteren Platte aus Glas unter Verwendung des Infrarot-Zusammenbauinstruments und des zuvor beschriebenen Verfahrens kontaktiert. Die Infrarotstrahlung wird anschließend durch die untere Platte aus Glas auf die Silanbeschichtung an der Grenzfläche zwischen oberer und unterer Platte gerichtet. Die Strahlung passiert das Glas und wird durch die IR-Absorptionsteilchen (z. B. Ruß) in der Silanbeschichtung absorbiert. Diese Energieabsorption heizt nur die Beschichtung auf, was die kovalente Bindungsreaktion zwischen dem Silan und dem Glas vorantreibt, wo kovalentes Siloxanbinden zwischen den Silan- und den Hydroxylgruppen des Glases durch den gleichen zuvor beschriebenen Mechanismus auftritt.

[0056] Wie bei der vorherigen Verfahrensausführungsform ist dieses Verfahren bei den Glaslagen zweckmäßig, die vor dem Zusammenfügen mit einer biologisch oder chemisch aktiven Beschichtung behandelt werden können. Da das Aufheizen nur in dem IR-Absorptionsmaterial an der Grenzfläche und nicht auf dem Glas selbst auftritt, verbleibt der Überzug oder die angeknüpfte biologische/chemische Gruppierung größtenteils durch das Fertigungsverfahren unbeeinflusst.

Magnetische Teilchen

[0057] Bei einem zu dem vorstehend beschriebenen alternativen Konstruktionsverfahren werden anstelle von Infrarot absorbierenden Teilchen magnetische Teilchen oder ferromagnetische Teilchen in die Silanpolymermischung beim Pressformen einer Dichtung eingemischt. Die magnetischen Teilchen sind vorzugsweise mit einer Plasma-polymerisierten Beschichtung beschichtet, um zu verhindern, dass

das ferromagnetische Material mit dem Vertiefungsinhalt wechselwirkt. Wie vorstehend, wird eine Aneinanderreihung von Löchern oder Ausstanzungen darin zur Ausrichtung und zur exakten Entsprechung mit den Vertiefungen der oberen Platte gebildet. Gleichermaßen wird ein polymeres Material zu einer oberen Platte pressgeformt, die aus einer peripheren Randleiste und einer Aneinanderreihung von Vertiefungen mit Seitenwänden und oberen Rändern besteht. Nach dem Pressformen wird die obere Platte mit der Grenzflächendichtung kontaktiert und ausgerichtet, die anschließend mit einer unteren Platte kontaktiert wird, die eine transparente Glaslage einschließt, deren Länge- und Breite-Dimensionen im Allgemeinen bemessen sind, um sämtliche Vertiefungen des Industriestandards für Multiwellplatten abzudecken. Anschließend wird elektromagnetische Strahlung auf die Grenzflächendichtung zwischen der oberen und unteren Platte gerichtet. Die Strahlung passiert das Glas und wird durch die magnetischen Teilchen in dem Polymermaterial, das die Dichtung aufbaut, absorbiert. Diese Energieabsorption führt zur Schwingung der magnetischen Teilchen, die wiederum nur die Dichtung aufheizen, was dazu führt, dass das Polymer seine Schmelztemperatur erreicht. Das geschmolzene Dichtungsmaterial benetzt das Glas, wo kovalentes Siloxanbinden zwischen dem Silan in dem Dichtungspolymer und den Hydroxylgruppen des Glases durch den gleichen zuvor beschriebenen Mechanismus erfolgt. Das geschmolzene Dichtungsmaterial benetzt und schmilzt gleichzeitig die Grenzflächen zwischen ihm und der oberen Platte und erzeugt dadurch eine interpenetrierende polymere Netzwerkbindung. Wie vorstehend, wird bei einer bevorzugten Ausführungsform die elektromagnetische Energie auch durch die obere Platte auf die Dichtung gerichtet, um eine stärkere Bindung zwischen oberer Platte und Dichtung zu erzeugen.

[0058] Wie bei der vorherigen Verfahrensausführungsform ist das Verfahren zweckmäßig bei der Glaslage, die vor dem Zusammenbau mit einer biologisch oder chemisch aktiven Beschichtung behandelt werden kann. Da das Aufheizen nur in dem Polymermaterial der Dichtung erfolgt und nicht auf dem Glas selbst, bleibt die Beschichtung oder die angeknüpfte biologische/chemische Gruppierung größtenteils durch das Fertigungsverfahren unbeeinflusst.

[0059] Es kann auch davon ausgegangen werden, dass anstelle einer Dichtung eine Transferfolie oder -druckfarbe, die magnetische Teilchen enthält, auf die unterste Ebene der oberen Platte durch Heißstempeln, Tauchen oder andere bekannte Mittel übertragen wird. Wenn diese Region mit der unteren Platte, z. B. der Glaslage, die Grenzfläche bildet, ist sie das Ziel der vorgeschriebenen Bestrahlung.

Aufheizen der unteren Platte

[0060] Ein weiteres alternatives Verfahren zur Herstellung besteht im Aufheizen der unteren Platte derart, dass ihre Temperatur auf die Schmelztemperatur des polymeren Materials, das die obere Platte aufbaut, erhöht wird. Nach Kontakt mit der aufgeheizten unteren Platte wird die Temperatur der oberen Platte bis auf ihren Schmelzpunkt erhöht. Wiederum, wie bei den zuvor beschriebenen Ausführungsformen, tritt das Aufheizen der oberen Platte nur an der Grenzfläche mit der unteren Platte auf. Im Gegensatz zu den anderen Ausführungsformen wird allerdings die Glasplatte selbst aufgeheizt, was diese Ausführungsform für Fälle, bei denen eine Beschichtung oder eine biologische/chemische Gruppierung vor dem Zusammenfügen angeknüpft wird, weniger attraktiv. Wiederum ist der kovalente Siloxanbindungsverknüpfungsmechanismus der gleiche wie bereits beschrieben. Das Verfahren sollte unter Inertgasbedingungen zur Verhinderung der schnellen Oxidation gefahren werden.

[0061] Weiterhin sollte, obwohl nicht notwendigerweise zur besten Qualität bevorzugt, es angemerkt werden, dass die erfindungsgemäße Platte mit Glasboden auch unter Verwendung von Standardinsertionspressformtechniken hergestellt werden kann, wobei die untere Platte aus Glas in einer Pressform eingeführt und die silanfunktionelle polymere obere Platte auf ihrer Oberfläche pressgeformt wird. Die Verknüpfung zwischen den Platten ist aufgrund der angehängten Silangruppen in dem polymeren Material der oberen Platte und den Hydroxylgruppen auf der Glasoberfläche weitgehend kovalent.

Polymer-Polymer-Plattenherstellung

[0062] Es sollte auch bemerkt werden, dass, obwohl die obigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung die Verwendung einer unteren Platte aus Glas vorsehen, das Herstellungsverfahren zum Anbringen einer unteren Platte, bestehend aus einem Polymermaterial oder auch aus einer Polymerfolie, ebenso wirksam ist. In diesem Fall ist die Anknüpfung nicht kovalent, wie beschrieben, sondern beruht auf einer Schmelzverbindung. Bei einer solchen Ausführungsform wird eine Polymerfolie anstelle der unteren Platte aus Glas verwendet. Die Folie ist im Wesentlichen gegenüber Infrarotstrahlung transparent. Beispiele für IR-transparentes Material, welches als unterer Plattenteil dienen kann, umfassen Polystyrol, Polypropylen, Polymethacrylat, Polyvinylchlorid, Polymethylpenten, Polyethylen, Polycarbonat, Polysulfon, Polyolefine, cyclische Olefincopolymere, Polystyrolcopolymere, Polypropylencopolymere, Fluoropolymere, Polyester, Polyamide, Polystyrol-Butadiencopolymere, vollständig hydrierte Styrolpolymere und Polycarbonat-PDMS-Copolymere. Die Wahl des Materials hängt von dem bestimmten Typ von Assay,

den die Multiwellplatte ermöglichen soll, ab. Bei dieser Ausführungsform kann die untere Platte die Form einer Platte, einer Folie (porös oder nicht-porös), eines Filters, von Pigment enthaltenden Folien und von Hohlraum enthaltenden Folien annehmen. Im Falle von Folien kann die Dicke in Abhängigkeit von Material- und Assay-Anforderungen variieren, allerdings umfasst das vorliegende Verfahren die Plattenherstellung mit Folien von so gering wie 1 Mil in der Dicke. Multiwellplatten, die mit Folien mit Dicken unter 5 Mil hergestellt werden, sind unter Verwendung von Standardspritzgusstechniken schwer, falls nicht unmöglich, herzustellen. Die extrem dünnen Folien, die als Bodenvertiefungen eingesetzt werden können, können den Gasaustausch durch den Vertiefungsboden erlauben, der wiederum das Zellwachstum und die biologische Aktivität fördert. Wie bei der Ausführungsform der unteren Platte aus Glas, die zuvor beschrieben wurde, kann die polymere untere Platte Reliefmerkmale enthalten, die auf ihrer Oberfläche ausgebildet sind, wie Rillen, Kurven, Linsen, erhabene Abschnitte, Beugungsgitter, Dellen, konzentrische Kreise, vertiefte Regionen etc. Solche Merkmale können auf der unteren Platte derart lokalisiert sein, dass sie die Vertiefungsböden an sich formen oder anderweitig Merkmale der Vertiefungsböden werden und wiederum die Leistung eines Tests verbessern können, den Nachweis verbessern oder ermöglichen können (wie im Falle mit Linsen und Gittern) oder dazu dienen, das Binden mit der oberen Platte mechanisch zu erleichtern.

[0063] Eine obere Platte ist entweder aus Material mit IR-Absorptionseigenschaften (z. B. Ruß) pressgeformt oder besitzt IR-Absorptionsmerkmale an der Grenzfläche, an der die obere und untere Platte gebunden werden. Beispielsweise kann eine IR-transparente obere Platte auf deren Boden ein IR-Absorptionsmaterial heiß aufgestempelt, gedruckt, warmgehärtet, gesprüht oder anderweitig übertragen wurde, eingesetzt werden. Beispiele für geeignete IR-absorbierende Materialien umfassen Ruß-Pigment, Laserfarbstoffmoleküle oder andere IR-absorbierende Materialien, die den Fachleuten allgemein bekannt sind. Es ist auch davon auszugehen, dass die untere Platte einen gemusterten Bereich aus IR-Absorptionsmaterial, welches auf ihre Bindungsoberfläche übertragen wurde, die sich ordnungsgemäß mit einer vollständig IR-transparenten oberen Platte ausrichten würde, aufweist.

[0064] Vor dem Zusammenfügen sollte die polymere untere Platte, gleich ob Folie oder starre Platte, mit einem ionisierten Luftstrom gereinigt werden, um sämtliches teilchenförmige Material zu entfernen und um elektrostatische Aufladung abzubauen. Das Polymer kann auch mit Plasma behandelt sein, um jede unerwünschte Feuchtigkeit zu entfernen und um die Oberfläche mit reaktiven funktionellen Gruppen zu aktivieren. Diese Aktivierung kann ihrerseits die Poly-

mer-Polymer-Wechselwirkung zwischen oberer und unterer Platte verstärken sowie eine biologisch reaktive Oberfläche erzeugen. In der Tat kann das Binden bestimmter ungleicher Polymere durch das offenbarte Verfahren Plasmabehandlung der interaktiven Grenzflächen erfordern. Die Plasmabehandlung kann durch Verwendung einer Plasmakammer (Branson 7150, Branson Ultrasonics, Danbury Connecticut) erreicht werden. Die HF-Frequenz wird vorzugsweise auf 13,56 MHz eingestellt, der Druck beträgt 180 Millitorr, unter Verwendung von Sauerstoff, und die Behandlungsdauer beträgt ungefähr 1,0 Minuten.

[0065] Wiederum, wie bei den vorherigen Ausführungsformen, wird die obere Platte mit der unteren Platte zusammengebracht, wobei das Infrarot-Zusammenbauinstrument und das zuvor beschriebene Verfahren eingesetzt werden. Die Infrarotstrahlung wird anschließend durch die IR-transparente untere Platte auf das IR-absorbierende Material an der Grenzfläche zwischen der oberen und unteren Platte gerichtet. Das Aufheizen erfolgt nur in Bereichen, von denen zuvor festgelegt wurde, dass sie IR-Strahlung absorbieren. Das Aufheizen in Kombination mit angelegtem Druck zur Verstärkung des Schweißverfahrens gestattet die Fusion entlang der Grenzfläche zwischen den Teilen. Im Gegensatz zum Spritzgussvorgang, wobei Bedingungen wie extreme Hitze das Polymer polarisieren und spannen, das den Vertiefungsboden aufbaut, gewährleistet dieses selektive Aufheizverfahren, dass nur die Grenzfläche aufgeheizt wird, wodurch die Verformung der Vertiefung verhindert und die optischen Qualitäten der unteren Platte/Folie beibehalten werden.

[0066] Wenn eine nicht selbsttragende Dünnschicht als untere Platte verwendet wird, ist es bevorzugt, dass eine Lage von Glas in den IR-Zusammenbauinstrument als Rückschicht für die Folie eingesetzt wird, um die Erzeugung des notwendigen Druckes zum Binden der oberen Platte zu unterstützen. Die [Fig. 9](#) bis [Fig. 10](#) sind schematische Querschnittsdarstellungen der Klemmmechanismen in dem IR-Zusammenbauinstrument. [Fig. 9](#) ist eine Explosionsansicht der Teile und des bei dieser Ausführungsform eingesetzten Klemmmechanismus. Eine obere Platte **80**, die die Form einer Polystyrol-Multiwellplatte mit offenen Vertiefungen einnimmt, wird mit dem Instrument an Ort und Stelle fixiert. Die untere Platte **82**, die die Form einer Polystyrolfolie einnimmt, wird über der oberen Platte **80** angeordnet. Eine Glaslage **84**, die bemessen ist, um im Wesentlichen die untere Platte/Folie zu bedecken, wird über der unteren Platte **82** angeordnet. Eine Polycarbonatschicht **86** wird innerhalb eines Aluminiumrahmens **88** gehalten. Eine PDMS-Blase **90** wird an dem Aluminiumrahmen **88** festgeklemmt. In [Fig. 10](#) sind sämtliche Teile in innigem Kontakt, Gas wurde in den Bereich zwischen dem Polycarbonat **86** und der Blase **90** gepumpt, wodurch ein einheitlicher Druck auf die Glaslage **84** er-

zeugt wird. Der an das Glas angelegte Druck durch die Blase kann zwischen 4–25 psi betragen, allerdings liegt er vorzugsweise zwischen 5–7 psi. Wie zuvor beschrieben, wird die IR-Strahlung durch das Polycarbonat **86**, die PDMS-Blase **90**, das Glas **84** und die Polystyrolfolie **82** auf die Kontaktfläche der oberen Platte aus Polystyrol **80** gerichtet. Die IR-Strahlung wandert direkt durch die obere Platte in die Abschnitte mit offener Vertiefung ein, ohne aufzuheizen. Die obere und untere Platte werden miteinander thermisch verbunden, und das Teil wird aus dem Instrument genommen. Die Glaslage bindet nicht an die untere Platte und wird darum unschwer entfernt. Es ist auch wichtig anzumerken, dass überall in diesem Verfahren nichts den Teil der Folie kontaktiert, der zum Boden der Vertiefungen werden soll. Dies ist von Bedeutung, da es die optische Integrität und biologische Integrität des Vertiefungsbodens beibehält.

[0067] Das so beschriebene Verfahren erzeugt bei Verwendung mit nicht selbsttragenden Folien eine Flachheit, die bei Platten mit oberen und unteren Platten, die miteinander über nicht klebende Mittel, wie Insertionspressformen, Ultraschallschweißen und Wärmeschweißen verbunden wurden, zuvor nicht festgestellt wurde. Nicht selbsttragende Folien sind diejenigen, die nicht in der Lage sind, sich selbst in einer horizontalen Ebene beim Festklemmen an einem Ende zu stützen. Dies kann durch Festklemmen einer Probe von 6 cm × 1 cm an einem Ende und nach außen Halten in einer horizontalen Position getestet werden. Wenn die Probe nicht ausreichend starr ist, um die Ebene beizubehalten, soll sie für die Zwecke der Offenbarung als nicht selbsttragend angesehen werden.

[0068] Wie bei den vorherigen Ausführungsformen kann die Folien- oder Polymerplatte (untere Platte) mit einem biologisch oder chemisch aktiven Überzug vor dem Zusammenbauen behandelt werden. Da das Aufheizen nur an der Grenzfläche zwischen Polymerteilen erfolgt, bleibt der IR-transparente überzogene Teil, der den Vertiefungsboden aufbaut, unbeeinflusst. Außerdem erlaubt ein einzigartiges Merkmal dieses Zusammenbauverfahrens, dass nur die Vertiefungsböden und nicht die Vertiefungswände beschichtet oder funktionalisiert werden. Dies kann bedeutende Vorteile bei vielen Assay-Systemen aufweisen, wo biomolekulare Anknüpfung an die Vertiefungswände zu Problemen mit den Assay-Ergebnissen führen kann. Beispielsweise ist es bei zellbasierten Assays wichtig, dass Zellen an dem transparenten Boden der Vertiefung in einer Monoschicht anhaften. Wenn sich die Zellen an den Seitenwänden der Vertiefung anheften, ziehen sie sich später zurück und setzen sich auf dem Vertiefungsboden ab und töten die Zellen von Interesse, die dort angeheftet sind, ab. In einer Platte mit Vertiefungen mit nicht funktionalisierten Seitenwänden und funktionalisierten Böden kann man sicher sein, dass die gewünschte Assay-

say-Aktivität auf den Vertiefungsböden auftritt. Es sollte festgestellt werden, dass dieser Vorteil gleichermaßen auf die Ausführungsform der Platte mit Glasboden zutrifft.

Experiment 1

[0069] Um die einzigartigen Flachheitsmerkmale sowohl über die einzelnen Vertiefungen wie auch über den gesamten Boden einer Multiwellplatte zu zeigen, wurden Messungen von Platten, die durch das vorliegende Verfahren hergestellt wurden, sowie von Platten vorgenommen, die durch Standardspritzguss/Insertionsformtechniken hergestellt wurden. **Fig. 11** zeigt die Flachheit von mehreren Platten, wie durch ein Tencor (Modell P20) Profilometer gemessen. Die Messungen wurden über den Bodenteil von mehreren Typen von Multiwellplatten vorgenommen. Jede Platte wurde über mehrere verschiedene Linien gemessen, und die Ergebnisse wurden gemittelt. Zuerst wurden mehrere Greiner μ Clear™ 96-Well-Schwarz/Klarplatten, die durch Insertionsformtechniken hergestellt wurden gemessen, wobei eine 5 Mil dicke optisch klare Polystyrolfolie in einer Pressform vorgelegt und eine obere Platte gegen sie pressgeformt wird. Wie in **Fig. 11**, Spalte A gezeigt, waren die Böden dieser Platten über ihre Länge nicht gleichmäßig flach genug, um durch das Instrument registriert zu werden. Als Nächstes wurden mehrere Corning Costar™ 96-Well-Schwarz/Klarplatten gemessen, die ebenfalls durch eine Insertionspressformtechnik hergestellt wurden, wobei eine 25 Mil dicke separat pressgeformte optisch klare untere Platte aus Polystyrol in einer Pressform vorgelegt und eine schwarze obere Platte aus Polystyrol gegen sie pressgeformt wird. Die schwarze Polystyrolplatte wurde durch Standardpraxis der Zugabe von Ruß zu der Batch-Mischung in einer Konzentration von 1 Teil Rußmaterial (Furnace Black-Black Pearl 430, Clarion Corp.) auf 50 Teile unbehandeltes Polystyrol (685D, Dow Chemical Corp.) und Spritzgießen der Platte erreicht. Wie in **Fig. 11**, Spalte B gezeigt, lag die durchschnittliche Flachheit über die Platten im Bereich von 70 Mikrometern. Als Nächstes wurden mehrere Corning Costar™ 96-Well-Schwarz/Klarplatten gemessen, die durch eine Insertionsformtechnik hergestellt wurden, wobei eine 5 Mil dicke optisch klare Polystyrolfolie in einer Pressform vorgelegt und eine schwarze obere Platte aus Polystyrol gegen sie pressgeformt wird. Wie in **Fig. 11**, Spalte C gezeigt, lag die durchschnittliche Flachheit über diese Platten im Bereich von 80 Mikrometern. Schließlich wurden mehrere Platten gemessen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren aus einer 5 Mil optisch klaren Polystyrolfolie IR-strahlungsgebunden an eine schwarze obere Platte aus Polystyrol hergestellt wurden. Wie in **Fig. 11**, Spalte D gezeigt, beträgt die durchschnittliche Flachheit über diese Platten ungefähr 55 Mikrometer.

Experiment 2

[0070] Gleichermaßen wurden die Platten von Beispiel 1 über die Böden von mehreren statistisch ausgewählten einzelnen Vertiefungen auf Flachheit gemessen. [Fig. 12](#) zeigt die Ergebnisse des Experiments. Die Greiner µClear™-Platte, Spalte A, besitzt Vertiefungsböden mit einer durchschnittlichen Flachheit von nahezu 60 Mikrometern. Die Corning Costar-25-Mil-Bodenplatten, Spalte B, besitzen eine durchschnittliche Vertiefungsflachheit von ungefähr 35 Mikrometern. Die Corning Costar-5-Mil-Bodenplatten, Spalte C, besitzen eine durchschnittliche Bodenflachheit von etwa 40 Mikrometern. Die 5-Mil-Bodenplatten, die durch das vorliegende Verfahren hergestellt wurden, besitzen eine durchschnittliche Vertiefungsflachheit von weniger als 5 Mikrometern.

Experiment 3

[0071] Die Flachheit über die Vertiefung wurde auch für Platten gemessen, die auf die gleiche Weise mit den gleichen Materialien wie in Beispiel 1, allerdings eines 384-Wellformates anstelle von 96, hergestellt wurden. Wiederum sind die Flachheitsmessungen für die erfindungsgemäß hergestellte Platte in der Flachheit den Platten überlegen, die durch standardmäßige Insertionspressformtechniken für Flachheit über eine einzelne Vertiefung hergestellt wurden. [Fig. 13](#) zeigt die Ergebnisse des Experiments. Die Greiner µClear™-384-Wellplatte, Spalte A, besitzt Vertiefungsböden, von nahezu einer durchschnittlichen Flachheit von 16 Mikrometern. Die Corning Costar™-25-Mil-Bodenplatten, Spalte B, besitzen ebenfalls eine durchschnittliche Bodenflachheit von ungefähr 16 Mikrometern. Die Corning Costar™-5-Mil-Bodenplatten, Spalte C, besitzen eine durchschnittliche Vertiefungsflachheit von etwa 12 Mikrometern. Die 5-Mil-Boden-384-Wellplatten, die erfindungsgemäß hergestellt wurden, besitzen eine durchschnittliche Vertiefungsflachheit von weniger als 5 Mikrometern.

Experiment 4

[0072] Mehrere Glasobjektträger mit 1 × 3 Zoll wurden zur Bestimmung der relativen Festigkeit der Silan/Glasbindungswechselwirkung eingesetzt, die eine wesentliche Rolle bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung spielt. Zwei Typen von Wechselwirkungen wurden untersucht. Als Erstes wurde ein 20-Mil dickes Silan-freies Polymermaterial auf einem Glas-Objektträger unter Verwendung des IR-Zusammenbauinstruments und des Verfahrens, wie bereits beschrieben, angebracht. Als Nächstes wurde ein 20 Mil dickes Silan-enthaltendes Polymermaterial auf einem Glasobjektträger unter Verwendung des IR-Zusammenbauinstruments und des Verfahrens, wie bereits beschrieben, angebracht. Das Polymermaterial war in jedem Fall bemessen, um ungefähr ein Zoll über das Glas zu über-

lappen.

[0073] Nach dem Zusammenfügen wurde jedes Teil mit einer Klemme stabilisiert, der überlappende Polymerenteil wurde festgeklemmt und mit einer Kraft in einem rechten Winkel zu der Ebene gezogen, die durch den Glasobjektträger festgelegt wurde. Die Pounds insgesamt an Kraft, die zum Trennen des Glases von dem Polymer auf jedem Objektträger erforderlich waren, wurden registriert.

[0074] Das Silan-freie Polymermaterial registrierte ein Ergebnis von 0 Pounds an Kraft, die zur Trennung erforderlich war. Das Silan-enthaltende Material konnte bei Aufbringen der maximalen Kraftmenge (40 lbs.) aus dem Messinstrument nicht von dem Glas abgetrennt werden. Dieses Experiment zeigt die Wirksamkeit der Bindungswechselwirkung, die durch die Siloxanverknüpfungen ermöglicht wird.

Experiment 5

[0075] Mehrere 96-Wellplatten wurden unter Verwendung des erfindungsgemäßen Zusammenbauverfahrens konstruiert. Die Platten wurden aus einer oberen Platte aus Polyethylen mit hoher Dichte und einem 1 mm dicken Glasboden, die miteinander über eine Vinylsilandichtung verbunden waren, aufgebaut. Die Platten wurden anschließend einem Drucktest unterzogen, um die Kraft zu unterscheiden, die erforderlich ist, um die Teile zu trennen. Ein Ametec™-Manometer wurde verwendet, wobei die Manometereinheit in verschiedene Vertiefungen eingeführt und gegen die Vertiefungsböden gepresst wurde. Keine Trennung oder Verzerrung der Platte trat bis 20 Pounds an Druck auf, die Obergrenze des Instruments. Dieser Test zeigt die Wirksamkeit der Bindung, die durch Einsatz einer Dichtungsvorrichtung, wie hier beschrieben, erzeugt wurde.

Experiment 6

[0076] Eine schwarze obere 96-Wellplatte aus Polystyrol- wurde mit einer 5 Mil dicken optisch klaren unteren Platte aus Polystyrolfolie unter Verwendung des Infrarot-Zusammenbauverfahrens, das hier beschrieben ist, gebunden. Anschließend wurde die Platte im Querschnitt zerschnitten, um die Bindungszone zu exponieren. [Fig. 14](#) ist eine REM-Aufnahme des Querschnitts bei einer Auflösung, die den schwarzen oberen Teil von dem optisch klaren unteren Teil nicht differenziert. Eine Schweißnaht **100** markiert die Grenze zwischen oberer Platte **102** und unterer Platte **104**. Der Boden **106** der Multiwellplatte ist durch den Übergang zu Luft **108** markiert. Diese Aufnahme zeigt, dass die Polystyrolteile so gut miteinander verschweißt sind, dass die Schnittlinie zwischen oberer und unterer Platte nur für die Schweißnaht **100** bestimmt werden kann.

[0077] Um die Auswirkungen des erfindungsgemäßen Schweißverfahrens auf eine vorbehandelte Oberfläche zu zeigen, wurde ein Experiment durchgeführt, dass die biologische Kompatibilität von durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Platten untersucht. Drei Gruppen von 96-Wellplatten wurden nach dem vorliegenden Verfahren unter Kombination einer schwarzen obere 96-Wellplatte aus Polystyrol mit einer optisch klaren 5 Mil dicken unteren Platte aus Polystyrolfolie zusammengefügt. Vor dem Zusammenfügen wurden die unteren Platten auf verschiedene Art und Weise behandelt. Bei einer ersten Serie von Platten waren die unteren Platten unbehandelt; bei einer zweiten Serie von Platten wurde die untere Plattenoberfläche, die zu den Vertiefungsböden werden sollte, mit Plasmastrahlung, wie vorstehend beschrieben, behandelt; und in der dritten Gruppen von Platten wurden die unteren Platten mit Plasmastrahlung behandelt und mit Collagen beschichtet. Nach dem Zusammenfügen wurden alle vollständig zusammengefügten 96-Wellplatten auf die biologische Kompatibilität durch den Versuch, Zellen auf den Vertiefungsoberflächen wachsen zu lassen, getestet.

[0078] Bei der ersten Gruppe von Platten, wie in der Photographie von [Fig. 15](#) gezeigt, war die unbehandelte Oberfläche nicht mit dem Erreichen einer Monoschicht von Zellwachstum kompatibel. Die Zellen **110** sind weit verstreut und nicht konfluent. Einige Zellen sind um den Rand der Vertiefung **112** gebündelt, während andere Bereiche um den Vertiefungsrand vollkommen frei von Zellenanknüpfung sind.

[0079] Bei der zweiten und dritten Gruppe von Platten, wie durch die jeweiligen Photographien der [Fig. 16–Fig. 17](#) gezeigt, ist das Zellwachstum robust, und die Zellen **110** sind gleichmäßig über die Vertiefungsbodenoberfläche verteilt. Die Zellen haben sich ausgebreitet, was eine gute Haftung an der Oberfläche anzeigt. Außerdem und wichtigerweise tritt das Zellanknüpfen und -wachstum bis unmittelbar zu dem Rand der Vertiefungen **114**, **116** auf. Dies zeigt, dass das Kaltschweißzusammenfügeverfahren diese vorbehandelten Oberflächen nicht nachteilig beeinträchtigt.

[0080] Obwohl die Erfindung ausführlich für den Zweck der Erläuterung beschrieben wurde, ist es selbstverständlich, dass solche Einzelheit nur für diesen Zweck gedacht ist, und dass darin Variationen durch die Fachleute vorgenommen werden können, ohne von dem Schutzzumfang der Erfindung, der in den folgenden Ansprüchen definiert ist, abzuweichen.

1. Verfahren zur Herstellung einer Multiwellplatte mit den Schritten:

Bereitstellen einer oberen Platte mit einer Anordnung von Wells mit offenem Ende, wobei die obere Platte aus einem organischen Polymermaterial mit einem vorherbestimmten Schmelzpunkt ausgebildet ist; Bereitstellen einer unteren Platte, wobei die untere Platte von einem organischen Polymermaterial mit einem vorherbestimmten Schmelzpunkt umfasst wird;

Inkontaktbringen der oberen Platte mit der unteren Platte an einer Grenzfläche, wobei die Grenzfläche geeignet ist, Infrarotstrahlung zu absorbieren; und Erhitzen der Grenzfläche durch Infrarotstrahlung auf den Schmelzpunkt von entweder dem Polymermaterial der unteren Platte, dem Polymermaterial der oberen Platte oder beider; und wodurch die obere Platte und die untere Platte miteinander verbunden werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die untere Platte für Infrarotstrahlung transparent ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei die obere Platte für Infrarotstrahlung transparent ist.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–3, wobei die obere Platte und die untere Platte aus dem gleichen organischen Polymermaterial hergestellt sind.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–3, wobei die obere Platte und die untere Platte aus unterschiedlichen organischen Polymermaterialien hergestellt sind.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–5, wobei die obere Platte aus einer Batch-Mischung geformt ist, zu welcher im Infraroten absorbierendes Material zugegeben wurde.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei das im Infraroten absorbierende Material Ruß ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei das im Infraroten absorbierende Material ein Laserfarbstoff ist.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–5, wobei die oberen und unteren Platten aus einem im Infraroten transparenten Material hergestellt sind, und wobei ein im Infraroten absorbierendes Material auf einen Teil der oberen Platte aufgebracht wird, welcher die untere Platte während des Kontaktierens kontaktiert.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–5, wobei die oberen und unteren Platten aus einem im Infraroten transparenten Material hergestellt sind, und wobei ein im Infraroten absorbierendes Material

auf einen Teil der unteren Platte aufgebracht wird, welcher die obere Platte während des Kontaktierschritts kontaktiert.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–10, das des Weiteren den Schritt des Reinigens der oberen und unteren Platten vor dem Kontaktierschritt umfasst.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–11, das des Weiteren das Behandeln einer Kontaktfläche der unteren Platte, das Behandeln einer Kontaktfläche der oberen Platte oder das Behandeln der Kontaktfläche von sowohl der oberen als auch der unteren Platten mit Gammastrahlung vor dem Kontaktierschritt umfasst.

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1–5, das des Weiteren den Schritt des Aufbringens einer reaktiven Beschichtung auf eine obere Oberfläche der unteren Platte vor dem Kontaktierschritt umfasst.

14. Verfahren zur Herstellung einer Multiwellplatte mit den Schritten:

Bereitstellen einer oberen Platte mit einer Anordnung von Wells mit offenem Ende, wobei die obere Platte aus einem organischen Polymermaterial mit einem vorherbestimmten Schmelzpunkt ausgebildet ist;

Bereitstellen einer unteren Platte, wobei die untere Platte von einem organischen Polymermaterial mit einem vorherbestimmten Schmelzpunkt umfasst wird;

Inkontaktbringen der oberen Platte mit der unteren Platte an eine Grenzfläche, wobei die Grenzfläche geeignet ist, elektromagnetische Strahlung zu absorbieren; und

Erhitzen der Grenzfläche durch elektromagnetische Strahlung auf den Schmelzpunkt von entweder dem Polymermaterial der unteren Platte, dem Polymermaterial der oberen Platte oder beider; und
wodurch die obere Platte und die untere Platte miteinander verbunden werden.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

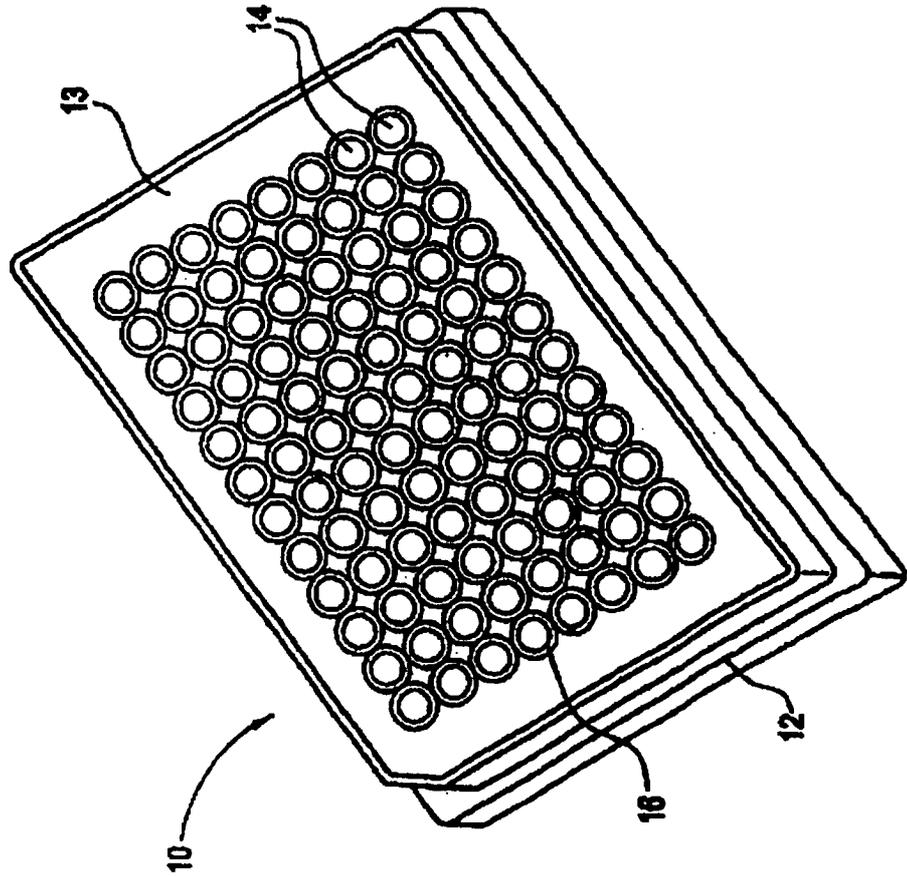


FIG. 2

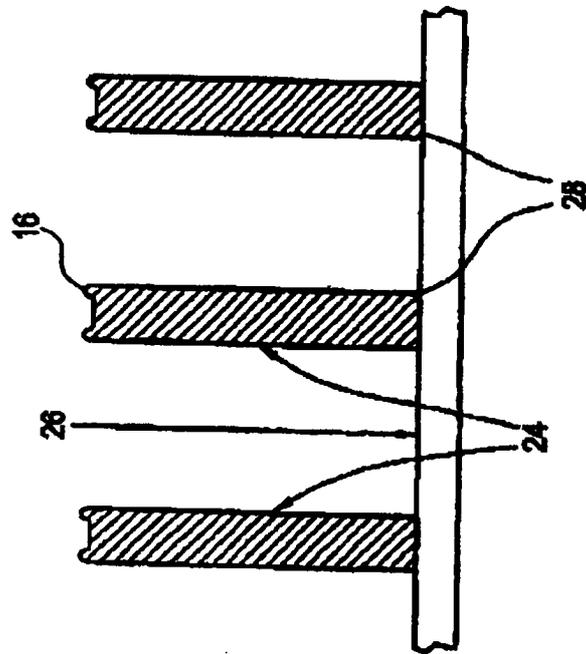


FIG. 3

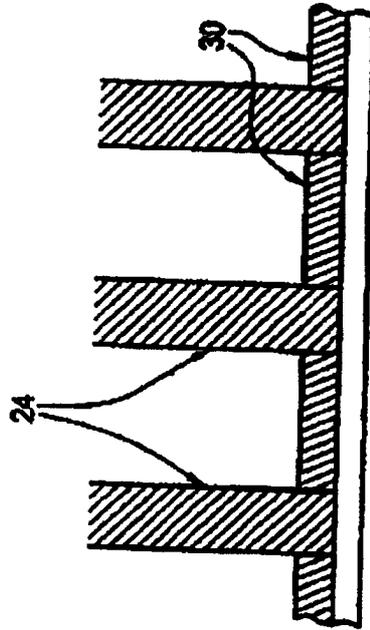


FIG. 5

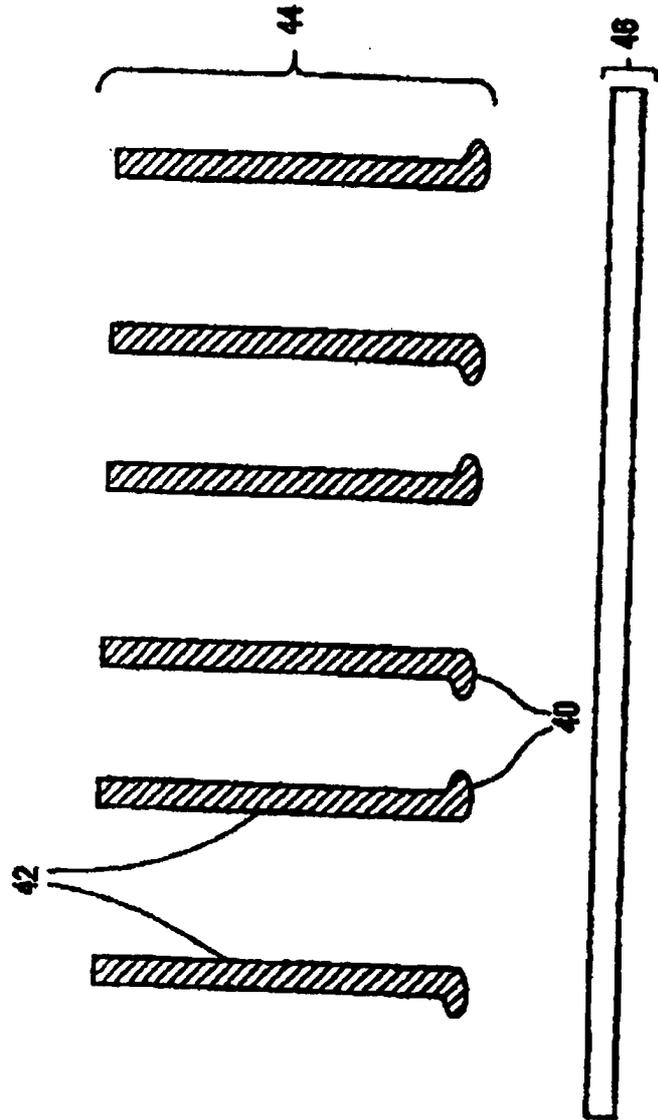


FIG. 6

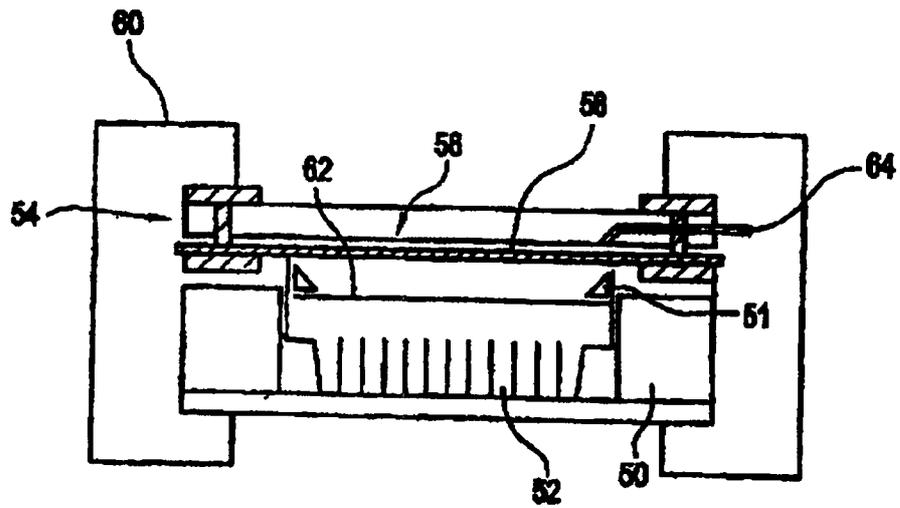


FIG. 7

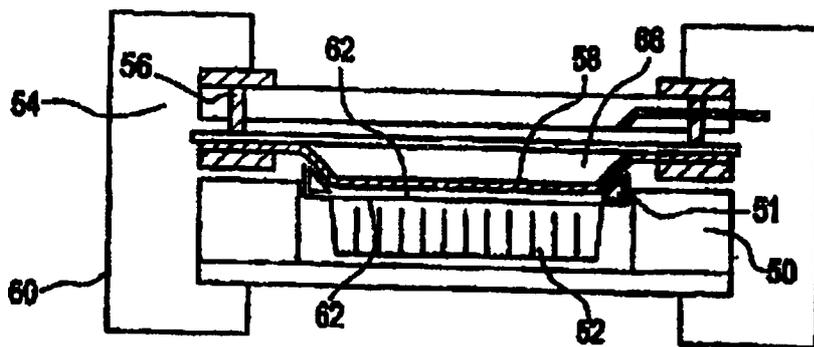


FIG. 8

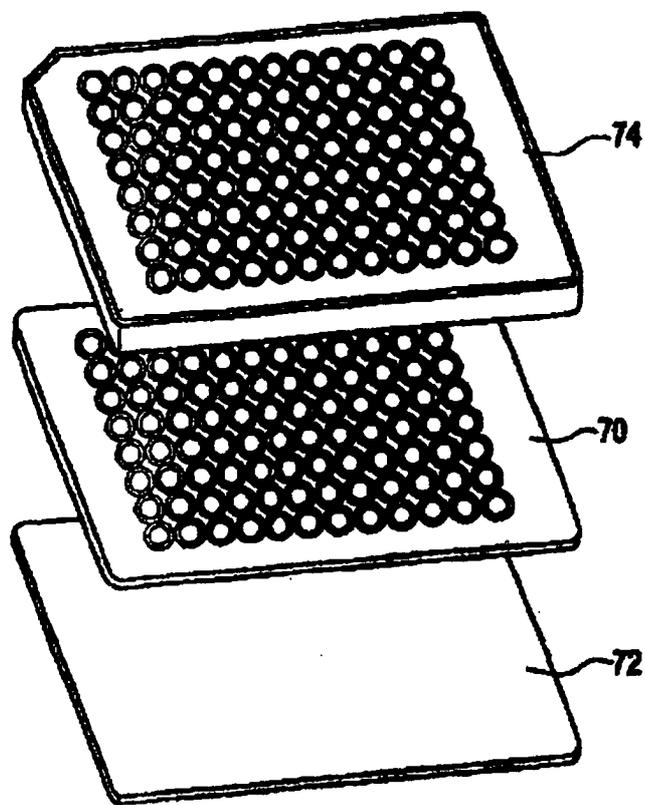


FIG. 9

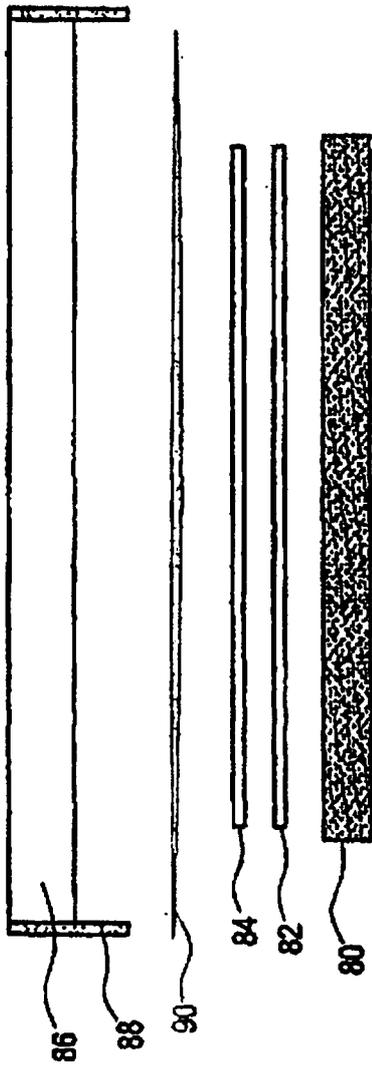


FIG. 10

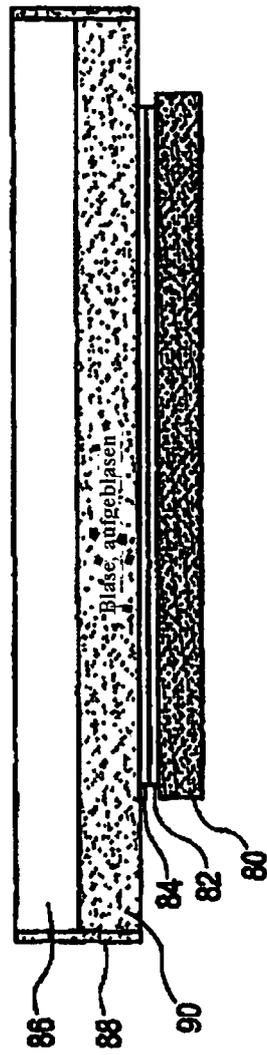


FIG. 11

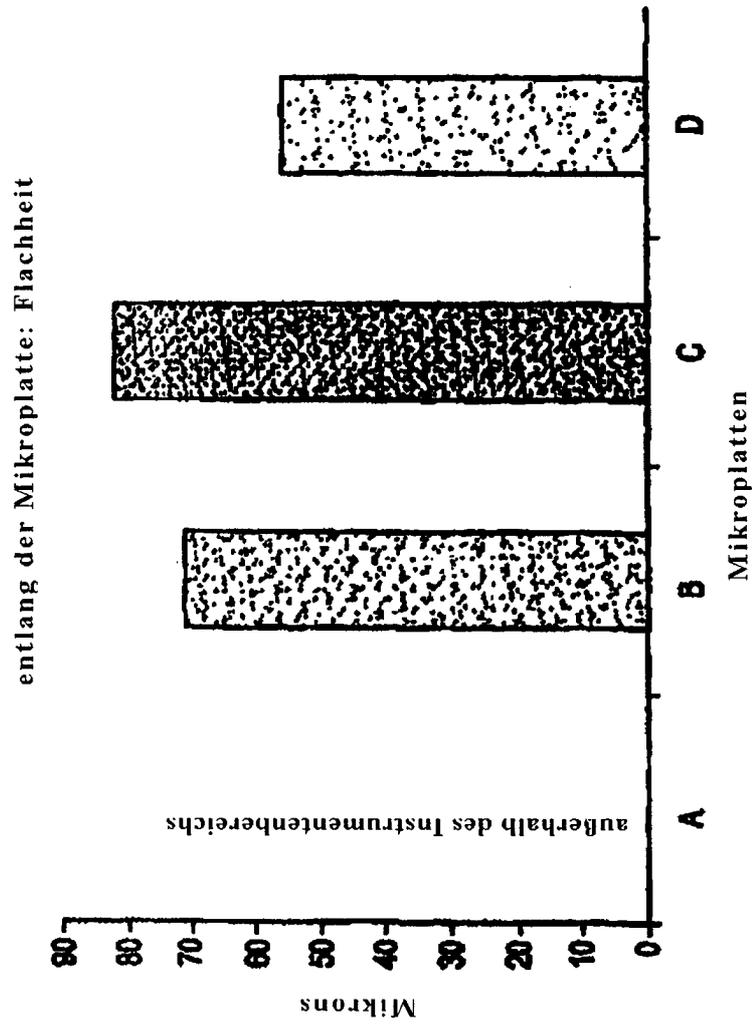


FIG. 12

entlang der Mikroplatte: Flachheit

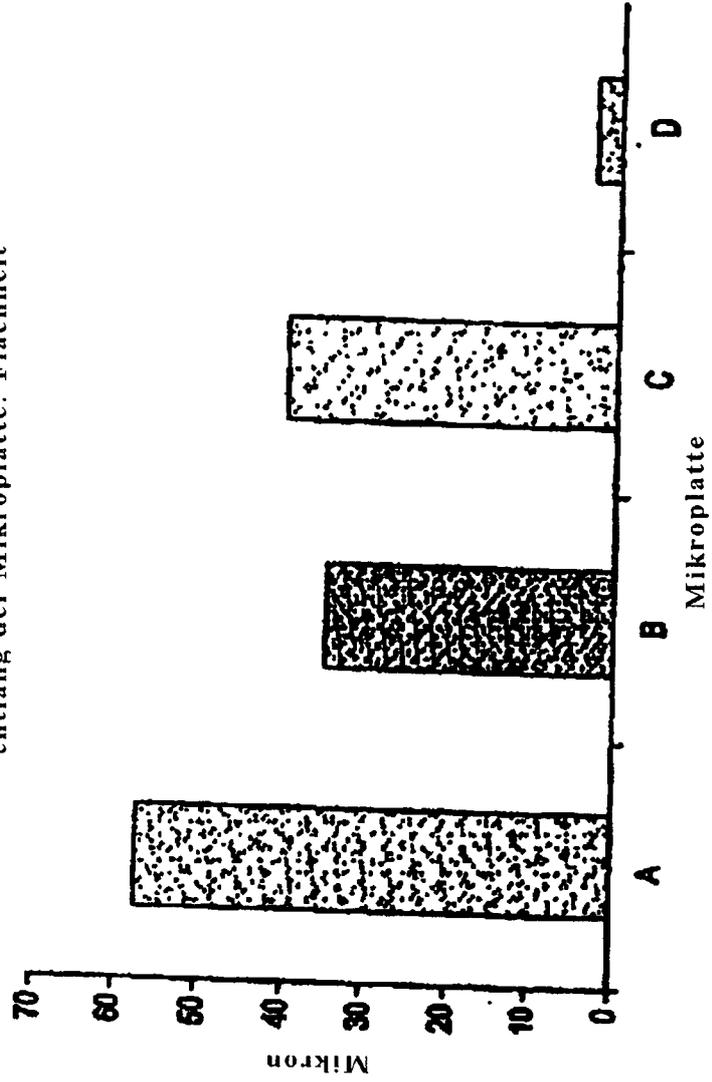


FIG. 13

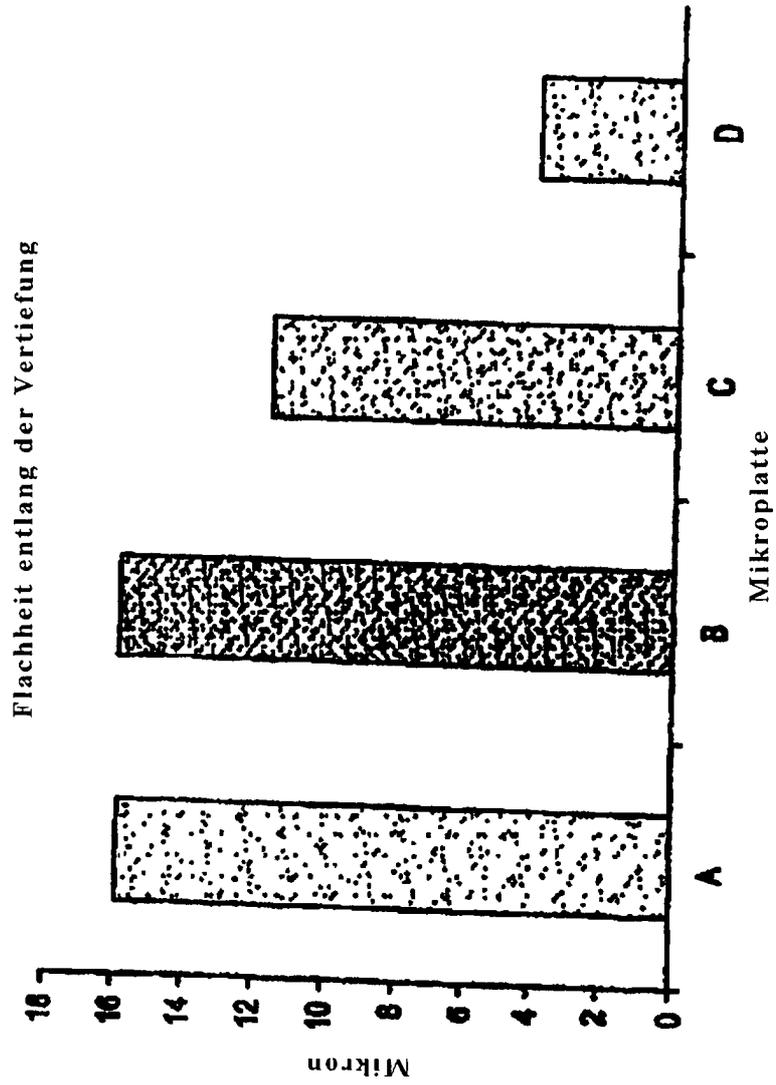


FIG. 14

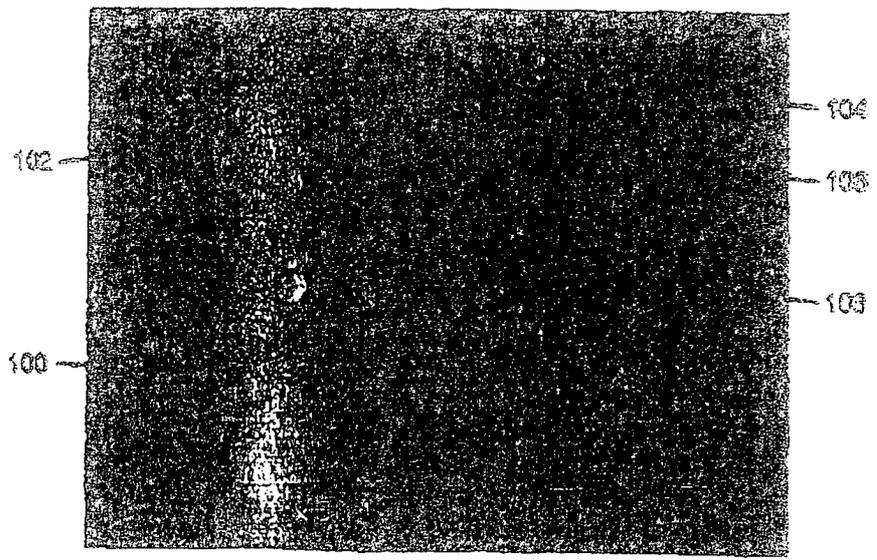


FIG. 15

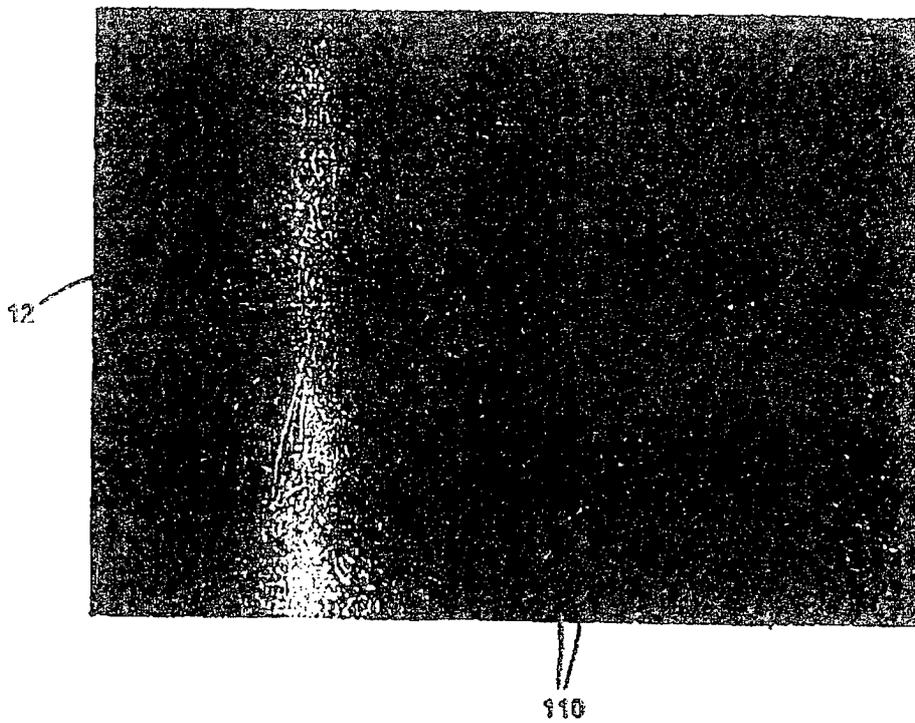


FIG. 16

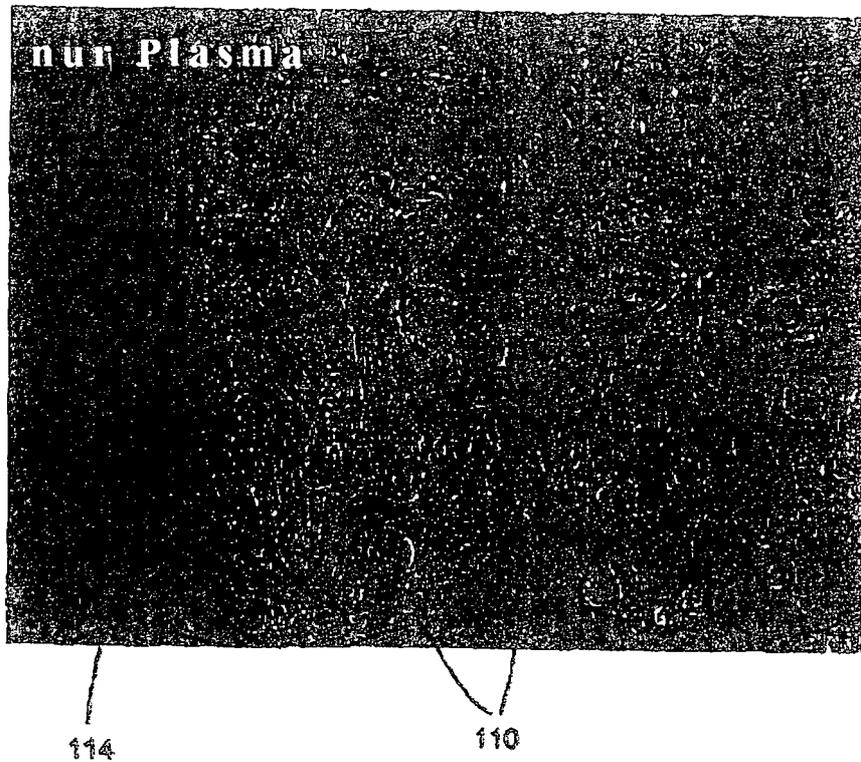


FIG. 17

