



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 016 509 A1** 2006.10.12

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 016 509.5**

(22) Anmeldetag: **09.04.2005**

(43) Offenlegungstag: **12.10.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

(71) Anmelder:

**Boehringer Ingelheim microParts GmbH, 44227 Dortmund, DE**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Gesthuysen, von Rohr & Eggert, 45128 Essen**

(72) Erfinder:

**Ballhorn, Ilse, 45527 Hattingen, DE; Blankenstein, Gert, Dr., 44139 Dortmund, DE; Peters, Ralf-Peter, Dr., 51467 Bergisch Gladbach, DE; Müller-Chorus, Birgit, Dr., 44797 Bochum, DE; Schlüter, Michael, Dr., 88437 Maselheim, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

**DE 103 02 720 A1**

**DE 102 57 004 A1**

**US2004/02 38 052 A1**

**US2004/01 80 377 A1**

**US2003/00 59 343 A1**

**US 61 43 247 A**

**EP 14 19 818 A1**

**EP 12 01 304 A2**

**WO 2004/0 58 406 A2**

**WO 03/0 72 254 A1**

**WO 02/1 00 543 A1**

**WO 02/0 83 310 A2**

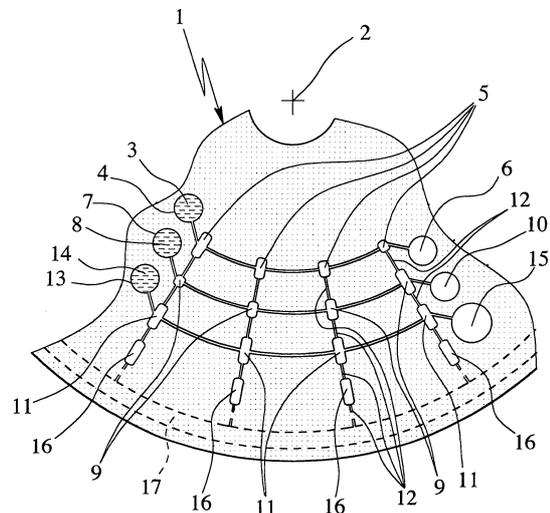
**WO 98/56 505 A1**

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

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

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

(57) Zusammenfassung: Es werden eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit vorgeschlagen, wobei insbesondere das ELISA-Verfahren sehr einfach, schnell und mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden kann. Hierzu werden eine Probenflüssigkeit und eine Verdünnungsflüssigkeit jeweils mehreren Dosierkammern unterschiedlicher Volumina zugeführt werden, so daß die Probenflüssigkeit in zugeordneten Reaktionskammern in einem Verdünnungsschritt in unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen verdünnbar ist. Den Reaktionskammern sind verschiedene Flüssigkeiten nacheinander mittels einer gemeinsamen Aufnahmekammer zuführbar. Zum Anhalten der Nachweisreaktion werden die Flüssigkeiten aus den Reaktionskammern in zugeordnete Untersuchungskammern überführt.



## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit, insbesondere mittels des ELISA-Verfahrens.

**[0002]** Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit mikrofluidischen Systemen bzw. Vorrichtungen, deren Strukturen eine Größe von etwa 1 bis 1000 µm und/oder deren Kavitäten jeweils ein Volumen von etwa 1 bis 1000 µl aufweisen. Die nachfolgenden Ausführungen beziehen sich insbesondere auf Vorrichtungen und Verfahren, bei denen Kapillar-, Druck- und/oder Zentrifugalkräfte wirken und insbesondere für die Funktion entscheidend sind.

**[0003]** Der Begriff "ELISA" kommt aus dem Englischen und bedeutet "enzymelinked immunosorbent assay". Dieser Begriff ist bei der vorliegenden Erfindung im Sinne eines Verfahrens zu verstehen, bei dem ein Enzym an einen Analyten, insbesondere an einen Komplex aus einem Analyten und einem Antikörper, gebunden wird. Mittels des Enzyms wird in einer Nachweisreaktion ein Substrat in ein Nachweis-substrat, insbesondere eine fluoreszierende Substanz oder dgl., modifiziert bzw. umgewandelt. Durch eine Erfassung des Nachweissubstrats ist eine quantitative Bestimmung des Analyten in der Probenflüssigkeit möglich. Um eine hohe Genauigkeit und einen entsprechenden Meßbereich zu ermöglichen, wird üblicherweise eine Verdünnungsreihe der Probenflüssigkeit auf diese Weise untersucht.

**[0004]** Bisher wird das ELISA-Verfahren üblicherweise manuell oder automatisiert – beispielsweise mittels Pipettienobotern – auf einer offenen Pipettierplatte mit beispielsweise 96 offenen Aufnahmekammern durchgeführt. Eine zu untersuchende Probenflüssigkeit wird in den Aufnahmekammern nacheinander mehrfach verdünnt, um unterschiedliche Verdünnungsverhältnisse zu erreichen. Anschließend wird die Probenflüssigkeit mit den unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen in vorbereitete Aufnahmekammern pipettiert, in denen ein Analyt in der Probenflüssigkeit an immobilisierten Antikörpern gebunden werden kann. Nach einer verhältnismäßig langen Reaktionszeit erfolgt ein mehrfaches Spülen mit einer Waschflüssigkeit. Dann wird ein an einen Nachweisantikörper gebundenes Enzym zugeben. Der Nachweisantikörper bindet an dem Komplex aus Analyt und immobilisierten Antikörper. Anschließend sind wieder verschiedene Waschschriffe erforderlich. Dann wird ein Substrat zugegeben, das von dem Enzym in ein Nachweissubstrat umgewandelt bzw. modifiziert wird. Diese Nachweisreaktion ist sehr zeitkritisch. Das Anhalten der Nachweisreaktion erfolgt beispielsweise durch Zugabe von Säure. Problematisch ist, daß dies nicht gleichzeitig in allen Aufnahmekammern erfolgen kann, in denen die Nachweisreaktion

abläuft, und daß bei größeren Volumina durch Diffusions- und/oder Mischvorgänge unterschiedliche Verzögerungen auftreten können. Schließlich wird das Nachweissubstrat beispielsweise optisch, insbesondere durch Fluoreszenzmessung oder dgl., bestimmt. Aus den ermittelten Werten läßt sich die Konzentration des Analyten in der Probenflüssigkeit bestimmen. Das erläuterte Verfahren ist sehr aufwendig und fehleranfällig. Insbesondere addieren sich Ungenauigkeiten aufgrund der Vielzahl der einzelnen Schritte. Des weiteren ist auch die Vorbereitung der Aufnahmekammern zur Immobilisierung des Antikörpers entsprechend aufwendig und ebenfalls mit dem Einsatz großer Flüssigkeitsmengen verbunden. Darüber hinaus laufen die Reaktionen aufgrund der großen Flüssigkeitsmengen und dementsprechend großen Diffusionswege oftmals sehr langsam ab, so daß das ELISA-Verfahren in der bisher üblichen Form sehr zeitaufwendig ist.

## Stand der Technik

**[0005]** Der Artikel "Design of a Compact Disk-like Microfluidic Platform for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" von Siyi Lai et al, Analytical Chemistry, Band 76, Nr. 7, 1. April 2004, Seiten 1832 bis 1837, beschreibt ein mikrofluidisches System in Form einer sogenannten Compact Disk (CD) für einzelne Schritte des ELISA-Verfahrens. Es werden eine Probenflüssigkeit, eine Waschflüssigkeit, eine Flüssigkeit mit einem Nachweisantikörper und eine Substratflüssigkeit in entsprechende Aufnahmekammern gefüllt, die nacheinander durch entsprechend unterschiedliche Rotation der CD in eine einzige zugeordnete Reaktionskammer zur entsprechenden Reaktion geleitet werden. So können einzelne Schritte in dem mikrofluidischen System durchgeführt werden. Jedoch verringert sich der Pipettieraufwand noch nicht wesentlich, da gegenüber dem herkömmlichen ELISA-Verfahren lediglich die jeweils mehrfachen Waschschriffe vermieden werden konnten.

**[0006]** Generell sind bereits eine Vielzahl von mikrofluidischen Systemen in Form von CDs bekannt, bei denen eine Steuerung von Flüssigkeitsströmen durch Rotation der CD, also durch Zentrifugalkräfte, erfolgt.

**[0007]** Die WO 03/018198 A1, WO 03/072257 A1 und WO 2004/061414 A2 offenbaren mikrofluidische Vorrichtungen, bei denen eine Flüssigkeit, insbesondere eine Probenflüssigkeit, von einer Aufnahmekammer in angeschlossene Kammern geleitet und in definierte Einzelmengen aufgeteilt werden kann und/oder mit einer anderen Flüssigkeit gemischt werden und vorzugsweise reagieren kann. Ähnliche mikrofluidische Systeme sind auch aus den US 6,706,519 B1, US 6,719,682 B2, US 2004/0203136 A1, WO 00/78455 A1 und WO 01/87485 A2 bekannt.

## Aufgabenstellung

**[0008]** Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit anzugeben, wobei eine kostengünstige, schnelle und/oder genaue quantitative Untersuchung, insbesondere mittels des ELISA-Verfahrens, ermöglicht wird.

**[0009]** Die obige Aufgabe wird durch eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1 oder ein Verfahren gemäß Anspruch 7 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind Gegenstand der Unteransprüche.

**[0010]** Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt darin, eine dritte gemeinsame Aufnahmekammer für mehrere Reaktionskammern vorzusehen. Insbesondere können in der Aufnahmekammer mehrere Flüssigkeiten nacheinander – also sequentiell – beispielsweise durch Pipettieren zugeführt werden. So wird eine gemeinsame Einfüllöffnung für die verschiedenen Flüssigkeiten geschaffen.

**[0011]** Vorzugsweise wird die dritte Aufnahmekammer jeweils – insbesondere selbsttätig durch Kapillarkräfte und/oder durch Zentrifugalkräfte – geleert, bevor die nächste Flüssigkeit eingefüllt wird. So kann ein ungewolltes Vermischen verschiedener Flüssigkeiten in der gemeinsamen Aufnahmekammer vermieden werden. Insbesondere wird es so möglich, mehrere oder alle Reaktionskammern mit minimalem Aufwand – insbesondere mit besonders wenigen Pipettiervorgängen – in geeigneter Weise vorzubereiten, also beispielsweise ein Reagenz, wie einen Antikörper oder dgl., in den Reaktionskammern zu immobilisieren. Alternativ oder zusätzlich gestattet die den Reaktionskammern zugeordnete, gemeinsame Aufnahmekammer ein Durchführen der Nachweisreaktion, beispielsweise durch Zuführen entsprechender Flüssigkeiten mit dem Enzym, dem Substrat oder dgl., mit minimalem Pipettieraufwand.

## Ausführungsbeispiel

**[0012]** Weitere Vorteile, Merkmale, Eigenschaften und Aspekte der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den Ansprüchen und der folgenden Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen anhand der Zeichnung. Es zeigt:

**[0013]** [Fig. 1](#) eine nicht maßstabgerechte Ansicht eines Teils einer vorschlagsgemäßen Vorrichtung gemäß einer ersten Ausführungsform; und

**[0014]** [Fig. 2](#) eine schematische Ansicht eines Teils einer vorschlagsgemäßen Vorrichtung gemäß einer zweiten Ausführungsform.

**[0015]** In den Figuren werden für gleiche oder ähnliche Teile dieselben Bezugszeichen verwendet, wo-

bei entsprechende oder vergleichbare Eigenschaften und Vorteile erreicht werden, auch wenn eine wiederholte Beschreibung weggelassen ist.

**[0016]** [Fig. 1](#) zeigt in einer nicht maßstabgerechten, sehr schematischen Ansicht einen Teil einer vorschlagsgemäßen Vorrichtung **1** gemäß einer ersten Ausführungsform. Bei der vorschlagsgemäßen Vorrichtung **1** handelt es sich insbesondere um ein mikrofluidisches System, das vorzugsweise die Form einer runden Scheibe, beispielsweise einer Compact Disk (CD) oder dgl., aufweist und dementsprechend um eine in [Fig. 1](#) angedeutete Drehachse **2** zur Erzeugung von Zentrifugalkräften rotierbar ist. Jedoch sind auch andere Konfigurationen und Gestaltungen möglich.

**[0017]** Die vorschlagsgemäße Vorrichtung **1** dient einer Untersuchung einer Probenflüssigkeit **3**, insbesondere mittels des ELISA-Verfahrens. Die nachfolgende Beschreibung ist daher im wesentlichen auf die Anwendung bzw. Durchführung des ELISA-Verfahrens gerichtet, wobei bedarfsweise auch ergänzende oder alternative Maßnahmen bzw. Verfahrensschritte durchgeführt werden können. Jedoch kann die vorschlagsgemäße Vorrichtung **1** bzw. das vorschlagsgemäße Verfahren grundsätzlich auch für sonstige Untersuchungen bzw. Verfahren eingesetzt werden.

**[0018]** [Fig. 1](#) zeigt die Probenflüssigkeit **3** unmittelbar nach dem Einfüllen in eine erste, gemeinsame Aufnahmekammer **4**. Mehrere erste Dosierkammern **5** sind an die erste Aufnahmekammer **4** durch entsprechende Kanäle oder dgl. angeschlossen und vorzugsweise in einer Reihe in Umfangsrichtung angeordnet.

**[0019]** Die Probenflüssigkeit **3** strömt von der ersten Aufnahmekammer **4** in die angeschlossenen, ersten Dosierkammern **5**, wobei Luft und/oder überschüssige Probenflüssigkeit **3** in eine optionale erste Sammelkammer **6** weiterströmen kann. [Fig. 1](#) zeigt die Vorrichtung **1** in einem Zustand unmittelbar nach dem Einfüllen der Probenflüssigkeit **3** in die erste Aufnahmekammer **4**, also bevor die Probenflüssigkeit **3** in die ersten Dosierkammern **5** strömt.

**[0020]** Die Vorrichtung **1** weist eine zweite gemeinsame Aufnahmekammer **7** zur Aufnahme einer Verdünnungsflüssigkeit **8** auf. An die zweite Aufnahmekammer **7** sind mehrere zweite Dosierkammern **9** angeschlossen, die beim Darstellungsbeispiel ebenfalls in einer Reihe und zumindest im wesentlichen parallel zu den ersten Dosierkammern **5** angeordnet sind. Die Verdünnungsflüssigkeit **8** strömt in die zweiten Dosierkammern **9**. Überschüssige Verdünnungsflüssigkeit **8** kann bedarfsweise in eine optional vorgesehene zweite Sammelkammer **10** strömen. Die [Fig. 1](#) zeigt die Vorrichtung **1** in dem Zustand unmittelbar

nach dem Einfüllen der Verdünnungsflüssigkeit **8** in die zweite Aufnahmekammer **7**, also bevor die Verdünnungsflüssigkeit **8** die zweiten Dosierkammern **9** und die damit verbundene Kanäle und ggf. die Sammelkammer **10** füllt.

**[0021]** Die Dosierkammern **5** und **9** sind vorzugsweise so ausgebildet, beispielsweise durch nicht dargestellte Führungselemente für die Flüssigkeiten **3** bzw. **8**, daß die Dosierkammern **5**, **9** und ggf. die Kanäle vollständig ohne Gas- bzw. Lufteinschluß gefüllt werden. Verdrängte Luft kann über die vorzugsweise offen ausgebildeten Sammelkammern **6**, **10** und/oder über nicht dargestellte Entlüftungsöffnungen, die insbesondere den Kanälen und/oder Dosierkammern **5**, **9** zugeordnet sind, entweichen.

**[0022]** Den ersten und zweiten Dosierkammern **5** und **9** sind Reaktionskammern **11** zugeordnet, die beim Darstellungsbeispiel vorzugsweise in einer Reihe parallel und/oder bezüglich der Drehachse **2** radial außerhalb der ersten und zweiten Dosierkammern **5**, **9** angeordnet sind.

**[0023]** Die ersten und zweiten Dosierkammern **5**, **9** sind vorzugsweise paarweise einander und jeweils einer Reaktionskammer **11** zugeordnet, wobei jedes Paar mit der zugeordneten Reaktionskammer **11** durch entsprechende, insbesondere radial verlaufende, vorzugsweise kanalartige Verbindungen **12** fluidisch verbunden ist.

**[0024]** Beim Darstellungsbeispiel füllen sich die ersten Dosierkammern **5** und **9** mit der Probenflüssigkeit **3** bzw. der Verdünnungsflüssigkeit **8** vorzugsweise selbsttätig aufgrund von Druck- und/oder Kapillarkräften. Jedoch können auch sonstige Kräfte, ggf. sogar Zentrifugalkräfte, je nach Anordnung und Ausbildung, alternativ oder zusätzlich hierzu eingesetzt werden.

**[0025]** Anschließend können durch entsprechende Zentrifugalkräfte (verursacht durch entsprechende Rotation der Vorrichtung **1** um die Drehachse **2**) die in den ersten Dosierkammern **5** vorhandenen Volumina an Probenflüssigkeit **3** und die in den zweiten Dosierkammern **9** vorhandenen Volumina an Verdünnungsflüssigkeit **8** in die jeweils zugeordnete Reaktionskammer **11** überführt werden, wobei sich die Probenflüssigkeit **3** und Verdünnungsflüssigkeit **8** jeweils mischen. Jedoch können zur Überführung der genannten Volumina in die Reaktionskammern **11** zusätzlich oder alternativ auch sonstige Kräfte, beispielsweise Druckkräfte, Kapillarkräfte oder dgl. wirken.

**[0026]** Die ersten Dosierkammern **5** und/oder zweiten Dosierkammern **9** variieren in ihren Volumina. Und zwar sind die Volumina derart gewählt, daß in den Reaktionskammern **11** unterschiedliche Verdün-

nungsverhältnisse der Probenflüssigkeit **3** erzielt werden.

**[0027]** Insbesondere variieren sowohl die Volumina der ersten Dosierkammern **5** als auch die Volumina der zweiten Dosierkammern **9**. Vorzugsweise ist einer ersten Dosierkammer **5** eine zweite Dosierkammer **9** mit großem Volumen und umgekehrt zugeordnet. Beim Darstellungsbeispiel wird dies dadurch erreicht, daß die Volumen der ersten Dosierkammern **5** in einer Umfangsrichtung zu- oder abnehmen und die Volumina der zweiten Dosierkammern **9** in dieser Umfangsrichtung umgekehrt ab- oder zunehmen. Dies gestattet eine Verdünnungsreihe mit einem großen Verdünnungsbereich – also insbesondere von einem niedrigen Verdünnungsverhältnis bis zu einem großen Verdünnungsverhältnis, beispielsweise von 1:1 bis 1:1000 – und/oder eine sehr platzsparende, kompakte Anordnung der Dosierkammern **5**, **9** mit entsprechend geringem Platz- bzw. Flächenbedarf.

**[0028]** Besonders bevorzugt sind die Summen der Volumina der paarweise einander zugeordneten ersten und zweiten Dosierkammern **5**, **9** zumindest im wesentlichen gleich. Auf diese Weise kann neben einem besonders kompakten Aufbau erreicht werden, daß die einzelnen Volumina an unterschiedlich verdünnter Probenflüssigkeit **3** gleich groß sind und die Reaktionskammern **11** und eventuelle sonstige nachgeordnete Kammern oder dgl. einheitlich groß ausgebildet sein können.

**[0029]** In der bisherigen und in der nachfolgenden Beschreibung wird immer auf das jeweilige Volumen der Dosierkammern **5** bzw. **9** abgestellt. Um genaue, definierte Verdünnungsverhältnisse zu erhalten, sind genau definierte Volumina erforderlich. Damit bei der Überführung der Probenflüssigkeit **3** und der Verdünnungsflüssigkeit **8** aus den ersten und zweiten Dosierkammern **5** und **9** in die zugeordneten Reaktionskammern **11** jeweils nur definierte Volumina der Flüssigkeiten **3**, **8** vorliegen und überführt und gemischt werden, sind nicht dargestellte Ventileinrichtungen, Hindernisse oder Flüssigkeitsstops, beispielsweise zu den Verbindungen **12** hin, den Kanälen zugeordnete Belüftungsöffnungen und/oder dgl. vorgesehen. Hinsichtlich der erforderlichen und/oder möglichen konstruktiven Lösungen, um definierte Volumina sicherzustellen und/oder geeignete Strukturen und Anordnungen zum Aufteilen und/oder Mischen von Flüssigkeitsmengen bereitzustellen, wird auf den eingangs genannten Stand der Technik verwiesen, der hiermit diesbezüglich ergänzend als Offenbarung eingeführt wird.

**[0030]** Die voranstehend erläuterte "parallele Verdünnung" gestattet die Erzeugung einer Verdünnungsreihe in einem einzigen Schritt, so daß allenfalls nur geringe Verdünnungsfehler auftreten. Insbesondere kann so das bei der bisher üblichen, sequen-

tiellen Verdünnung auftretende Problem der Summierung von Einzelfehlern vermieden werden.

**[0031]** In jeder Reaktionskammer **11** können dann eine gewünschte Reaktion und insbesondere mehrere gewünschte Reaktionen ablaufen bzw. durchgeführt werden, worauf später noch näher eingegangen wird. Zur Durchführung des ELISA-Verfahrens werden die Reaktionskammern **11** vorzugsweise vor Zuführung der verdünnten Probenflüssigkeit **3** zunächst vorbereitet. Diese Vorbereitung erfolgt insbesondere vor dem Einfüllen der Probenflüssigkeit **3** in die erste Aufnahmekammer **4** und der Verdünnungsflüssigkeit **8** in die zweite Aufnahmekammer **7** und wird nachfolgend näher erläutert.

**[0032]** Die Vorrichtung **1** weist vorzugsweise eine, insbesondere nur eine einzige, gemeinsame Aufnahmekammer **13** zur Aufnahme einer Flüssigkeit **14**, insbesondere sequentiellen Aufnahme verschiedener Flüssigkeiten **14**, wie einer Reaktionsflüssigkeit, einer Waschflüssigkeit, einer Fixierflüssigkeit, einer Substratflüssigkeit oder dgl., auf. Die Reaktionskammern **11** sind an die dritte Aufnahmekammer **13** angeschlossen, so daß insbesondere durch Druck-, Kapillar- und/oder Zentrifugalkräfte eine in die Aufnahmekammer **13** eingefüllte Flüssigkeit **14** über entsprechende Kanäle oder dgl. in die Reaktionskammern **11** strömen kann. Überschießende und/oder verdrängte Flüssigkeit **14** wird vorzugsweise in einer optional vorgesehenen Sammelkammer **15** auffangen.

**[0033]** Insbesondere ist die Vorrichtung **1** derart ausgebildet, daß die dritte Aufnahmekammer **13** zunächst wieder vollständig geleert wird oder geleert werden kann, bevor eine weitere Flüssigkeit **14** der dritten Aufnahmekammer **13** – beispielsweise durch Pipettieren – zugeführt wird. Das Leeren der dritten Aufnahmekammer **13** kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß nach dem Füllen der dritten Aufnahmekammer **13** mit einer Flüssigkeit **14** diese durch Kapillarkräfte selbsttätig in die Reaktionskammern **11** und ggf. die Sammelkammer **15** durchströmt, bis die dritte Aufnahmekammer **13** vollständig geleert ist. Zusätzlich oder alternativ kann dies durch Zentrifugalkräfte, insbesondere entsprechende Rotationen der Vorrichtung **1**, oder sonstige Kräfte erreicht werden.

**[0034]** Zusätzlich können auch die Reaktionskammern **11** bei Bedarf zunächst wieder geleert werden, bevor eine neue Flüssigkeit **14** in die dritte Aufnahmekammer **13** eingefüllt wird und diese neue Flüssigkeit **14** in die Reaktionskammern **11** strömt. Das vorherige Leeren der Reaktionskammer **11** erfolgt dann vorzugsweise durch Zentrifugalkräfte, nicht dargestellte Ventileinrichtungen oder dgl., um ein gesteuertes Leeren der Reaktionskammern **11** zu ermöglichen.

**[0035]** Zur Vorbereitung der Reaktionskammer **11** für das ELISA-Verfahren wird insbesondere zunächst eine Flüssigkeit **14** mit einem Reagenz, vorzugsweise einem Antikörper, in die dritte Aufnahmekammer **13** eingefüllt und in die Reaktionskammern **11** geleitet, um das Reagenz in den Reaktionskammern **11** zu immobilisieren, insbesondere die Reaktionskammern **11** mit dem Antikörper zu beschichten.

**[0036]** Nach einer bestimmten Inkubations- bzw. Reaktionszeit werden die Reaktionskammern **11** mit einer Waschflüssigkeit, die als nächste Flüssigkeit **14** in die dritte Aufnahmekammer **13** gefüllt wird, gespült um ungebundenes Reagenz zu entfernen.

**[0037]** Mit einer weiteren Flüssigkeit **14** folgt bedarfsweise eine Blockierung bzw. Fixierung des immobilisierten Reagenzes bzw. der immobilisierten Antikörper in den Reaktionskammern **11**.

**[0038]** Nach einem ggf. nochmaligem Spülen mit einer Waschflüssigkeit und ggf. Leeren sind dann die Reaktionskammern **11** vorbereitet, um die verdünnte Probenflüssigkeit **3** – also die Probenflüssigkeit **3** und die Verdünnungsflüssigkeit **8** aus den zugeordneten ersten und zweiten Dosierkammern **5** und **9** – aufzunehmen.

**[0039]** Nach dem Überführen der Probenflüssigkeit **3** zusammen mit der Verdünnungsflüssigkeit **8** in die Reaktionskammern **11** kann die eigentliche Nachweisreaktion bzw. eine erste Reaktion zur Untersuchung der Probenflüssigkeit **3** erfolgen. Ein in der Probenflüssigkeit **3** enthaltener Analyt kann an das immobilisierte Reagenz, insbesondere den immobilisierten Antikörper, binden. Nach einer vorzugsweise bestimmten Reaktionszeit wird nicht gebundener Analyt aus den Reaktionskammern **11** gespült bzw. gewaschen, insbesondere durch einmaliges Einfüllen einer Waschflüssigkeit **14** in die dritte Aufnahmekammer **13**, um die vorhandenen Flüssigkeiten **3**, **8** aus den Reaktionskammern **11** zu verdrängen, und/oder durch Zentrifugalkräfte oder sonstige Kräfte.

**[0040]** Anschließend wird eine weitere Flüssigkeit **14**, die insbesondere ein an einen Nachweisantikörper gebundenes Enzym enthält, den Reaktionskammern **11** zugeführt, indem diese Flüssigkeit **14** wiederum der dritten Aufnahmekammer **13** zugeführt wird. Der Nachweisantikörper ist derart ausgebildet, daß er zusammen mit dem Enzym an den Komplexen bindet, die aus den immobilisierten Antikörpern und dem Analyten in den Reaktionskammern **11** gebildet sind.

**[0041]** Ungebundene Enzyme werden anschließend in einem Waschschrift durch vorzugsweise einmaliges Zuführen einer weiteren Waschflüssigkeit **14** aus den Reaktionskammern **11** gespült.

**[0042]** Schließlich wird eine Substratlösung als weitere Flüssigkeit **14** vorzugsweise wiederum über die dritte Aufnahmekammer **13** den Reaktionskammern **11** zugeführt. Das Substrat wird von den Enzymen in den Reaktionskammern **11** in einer enzymatischen Nachweisreaktion umgewandelt bzw. modifiziert, so daß ein später nachweisbares Nachweissubstrat, insbesondere ein fluoreszierender oder sonstiger Farbstoff oder dgl., gebildet wird. Auf das Anhalten der Nachweisreaktionen in den Reaktionskammern **11** und die weitere Untersuchung wird später noch näher eingegangen.

**[0043]** Die Zuführung der verschiedenen Flüssigkeiten **14**, die vorzugsweise ausschließlich über die gemeinsame dritte Aufnahmekammer **13** durch sequentielle Zuführung der Flüssigkeiten **14** erfolgt, gestattet eine sehr schnelle und einfache Vorbereitung der Reaktionskammern **11** und/oder Führung der Reaktionen in den Reaktionskammern **11**, wobei der Pipettieraufwand, die erforderlichen Waschschriffe und/oder die erforderlichen Flüssigkeitsmengen gegenüber dem Stand der Technik – insbesondere gegenüber dem herkömmlichen ELISA-Verfahren in einer offenen Pipettierplatte – wesentlich verringert werden.

**[0044]** Bisher wurden die in den Reaktionskammern **11** ablaufenden, bereits genannten, insbesondere enzymatischen Nachweisreaktionen durch Zugabe von Säure oder dgl. angehalten. Dies ist grundsätzlich auch bei der vorschlagsgemäßen Vorrichtung **1** möglich.

**[0045]** Vorzugsweise erfolgt das Anhalten der Nachweisreaktionen jedoch mittels zusätzlich vorgesehener Untersuchungskammern **16**, indem die in den Reaktionskammern **11** befindliche Flüssigkeit mit dem Nachweissubstrat zum Anhalten der Nachweisreaktionen jeweils in eine zugeordnete Untersuchungskammer **16** überführt wird. Dieses Überführen erfolgt vorzugsweise für mehrere oder alle Reaktionskammern **11** gleichzeitig, so daß die Nachweisreaktionen zeitgleich angehalten werden. Insbesondere erfolgt das genannte Überführen bzw. Anhalten durch Zentrifugalkräfte, indem die Vorrichtung **1** entsprechend rotiert wird. Jedoch ist das Überführen zusätzlich oder alternativ auch durch sonstige Kräfte, beispielsweise Druck- oder Kapillarkräfte, mittels entsprechender Ventile oder dgl. möglich.

**[0046]** Das genannten Überführen der Flüssigkeiten aus den Reaktionskammern **11**, in denen die Enzyme und/oder sonstige für die Nachweisreaktionen erforderliche Reagenzien immobilisiert sind, in die Untersuchungskammern **16** ermöglicht ein sehr einfaches und hochgradig simultanes Anhalten der Nachweisreaktionen, so daß gegenüber dem Stand der Technik ein wesentlich definierterer Verfahrensablauf und damit eine wesentlich genauere Bestimmung des

Analyten ermöglicht werden.

**[0047]** Nach der Überführung der Flüssigkeiten mit dem Nachweissubstrat in die Untersuchungskammern **16** kann eine sequentielle Untersuchung bzw. Detektion des Nachweissubstrats in den Untersuchungskammern **16** – insbesondere optisch, beispielsweise durch Fluoreszenzmessung – erfolgen. Aus den gewonnenen Werten und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungsverhältnisse kann dann eine äußerst genaue, insbesondere quantitative Bestimmung des Analyten in der Probenflüssigkeit **3** erfolgen.

**[0048]** Zusätzlich oder alternativ kann den Reaktionskammern **11** auch ein optional vorgesehener, in [Fig. 1](#) gestrichelt angedeuteter Sammelkanal **17** zugeordnet sein, der beispielsweise über die Untersuchungskammern **16** und entsprechende, vorzugsweise radiale Verbindungen **12** an die Reaktionskammern **11** angeschlossen ist, um zur Leerung der Reaktionskammern **11** (Flüssigkeiten) aus den Reaktionskammern **11** aufzunehmen, insbesondere wenn die Reaktionskammern **11** durch Zentrifugalkräfte durch entsprechendes Rotieren der Vorrichtung **1** geleert werden. Diese Flüssigkeiten können dann durch die Untersuchungskammern **16** hindurch oder durch nicht dargestellte, direkte Verbindungen oder dgl. in den Sammelkanal **17** ausgetragen werden. Ein derartiges Leeren der Reaktionskammern **11** kann beispielsweise zum Entfernen von Flüssigkeiten **3**, **8** und/oder **14** vor Zuführung einer neuen Flüssigkeit **14** in die Reaktionskammern **11** erfolgen.

**[0049]** Hinsichtlich der parallelen Verdünnung ist anzumerken, daß vorzugsweise in einem einzigen Verdünnungsschritt – also bei einer parallelen Verdünnung – **3** bis **20**, insbesondere etwa **10** Verdünnungen bzw. unterschiedliche Verdünnungsverhältnisse erzeugt werden. Selbstverständlich können auch mehrere parallele Verdünnungen gleichzeitig auf der Vorrichtung **1** erfolgen. Entsprechend kann die Vorrichtung **1** bedarfsweise auch mehrere Anordnungen, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, aufweisen.

**[0050]** Nachfolgend wird eine zweite Ausführungsform der vorschlagsgemäßen Vorrichtung **1** und des vorschlagsgemäßen Verfahrens anhand von [Fig. 2](#) näher erläutert, wobei die nachfolgenden Ausführungen lediglich auf wesentliche Unterschiede gegenüber der ersten Ausführungsform beschränkt werden. Sonstige Vorteile, Aspekte und Eigenschaften ergeben sich also in entsprechender Weise wie bei der ersten Ausführungsform.

**[0051]** Bei der Darstellung gemäß [Fig. 2](#) wurde auf die vorzugsweise vorgesehene Krümmung bei der vorzugsweise vorgesehenen Ringstruktur zur Anordnung auf einer runden Scheibe, wie einer CD oder dgl., weggelassen, um eine bessere Übersichtlichkeit

zu ermöglichen. Weiter ist die Darstellung gemäß [Fig. 2](#) ebenfalls nicht maßstabsgerecht. Insbesondere entsprechen die dargestellten Längen, Breiten, Größenverhältnisse und dgl. nicht den unbedingt erforderlichen bzw. bevorzugten Verhältnissen. Dies ist ebenso bei der Darstellung gemäß [Fig. 1](#) der Fall.

**[0052]** In [Fig. 2](#) sind aus Vereinfachungsgründen außerdem keine Flüssigkeiten **3**, **8**, **14** dargestellt. Jedoch gelten die diesbezüglichen Ausführungen bei der ersten Ausführungsform und auch hinsichtlich des sonstigen Verfahrensablaufs entsprechend für die in [Fig. 2](#) dargestellte, zweite Ausführungsform.

**[0053]** Weiter ist in [Fig. 2](#) aus Vereinfachungsgründen der optionale Sammelkanal **17** weggelassen.

**[0054]** Bei der zweiten Ausführungsform erfolgt im Gegensatz zu der ersten Ausführungsform nach der parallelen Verdünnung eine weitere Verdünnung, also eine Unterverdünnung. Diese weitere Verdünnung ist bei dem in [Fig. 2](#) gezeigten Darstellungsbeispiel wiederum als parallele Verdünnung ausgeführt. Beim Darstellungsbeispiel erfolgt lediglich eine weitere Verdünnung nur einer bereits einmal verdünnten Probenflüssigkeit aus nur einer Reaktionskammer **11**. Jedoch kann bedarfsweise auch eine Unterverdünnung bzw. weitere Verdünnung für mehrere oder alle Reaktionskammern **11** vorgesehen sein.

**[0055]** Die weiter parallele Verdünnung erfolgt im wesentlichen entsprechend wie die bereits oben erläuterte parallele Verdünnung mittels der ersten und zweiten Dosierkammern **5** und **9** sowie der nachgeordneten Reaktionskammern **11**. Für die weitere parallele Verdünnung sind daher zusätzliche erste Dosierkammern **5'** und zusätzliche zweite Dosierkammern **9'** sowie zusätzliche Reaktionskammern **11'** vorgesehen. Die zusätzlichen Dosierkammern **5'** und **9'** weisen vorzugsweise entsprechende Volumenverhältnisse – bei insbesondere entsprechend verringertem Absolutvolumen – wie die ersten und zweiten Dosierkammern **5** und **9** auf.

**[0056]** Die Zuführung von bereits einmal verdünnter Probenflüssigkeit in die zusätzlichen ersten Dosierkammern **5'** erfolgt von der vorgeschalteten Reaktionskammer **11**, die im Fall der Weiterverdünnung eigentlich nur eine Mischkammer darstellt. Den zusätzlichen zweiten Dosierkammern **9'** wird wiederum Verdünnungsflüssigkeit **8**, insbesondere die überschüssige Verdünnungsflüssigkeit **8** für die erste Verdünnung zugeführt, beispielsweise über die Sammelkammer **10**.

**[0057]** Die Überführung der einzelnen Flüssigkeitsvolumina in die zugeordneten zusätzlichen Reaktionskammern **11'** erfolgt wiederum vorzugsweise durch Zentrifugalkräfte. Jedoch können alternativ oder zusätzlich auch sonstige Kräfte, insbesondere

Druck- und/oder Kapillarkräfte wirken, bzw. Ventile oder dgl. eingesetzt werden.

**[0058]** Jedoch kann für die weitere Verdünnung auch nochmals separat eine andere oder zusätzliche Verdünnungsflüssigkeit über eine nicht dargestellte zusätzliche Aufnahmekammer den zusätzlichen zweiten Dosierkammern **9'** zugeführt werden.

**[0059]** Sofern nur eine teilweise weitere Verdünnung erfolgt, wie in [Fig. 2](#) dargestellt, sind vorzugsweise aber nicht zwingend auch diejenigen Reaktionskammern **11**, deren Inhalt nicht weiter verdünnt wird, jeweils zusätzliche Reaktionskammern **11'** zugeordnet, die insbesondere auf einen entsprechenden Umfang wie die der weiteren Verdünnung dienenden zusätzlichen Reaktionskammern **11'** angeordnet sind, um für alle Verdünnungsstufen eine gleichzeitige Untersuchung, insbesondere Bindung des Analyten an das immobilisierte Reagenz, sicherzustellen bzw. zu erleichtern.

**[0060]** Optional kann auch eine zusätzliche erste Sammelkammer **6'** vorgesehen sein, die zur Aufnahme von überschüssiger Probenflüssigkeit **3** an die zusätzlichen erste Dosierkammern **5'** angeschlossen ist. Optional kann auch eine zusätzliche zweite Sammelkammer **10'** vorgeschlossen sein, die zur Aufnahme von überschüssiger Verdünnungsflüssigkeit **8** an die zusätzlichen zweiten Dosierkammern **9'** angeordnet ist.

**[0061]** Der Durchmesser der Vorrichtung **1** bzw. der CD, beträgt vorzugsweise etwa 50 bis 250 mm, insbesondere etwa 125 mm. Die Dicke beträgt vorzugsweise 1 bis 6 mm, insbesondere etwa 3 mm. Die Vorrichtung **1** ist vorzugsweise aus einem geeigneten Kunststoff hergestellt.

**[0062]** Die Tiefe bzw. Breite der Mikrostrukturen, also insbesondere der beschriebenen Kammern, Kanäle, Verbindungen und dgl. beträgt beim Darstellungsbeispiel vorzugsweise 20 bis 1000 µm, insbesondere etwa 200 µm.

**[0063]** Alle Mikrostrukturen sind vorzugsweise durch eine geeignete, nicht dargestellte bzw. transparente Abdeckung überdeckt. Lediglich die Aufnahmekammern **3**, **7** und **13**, ggf. die Sammelkammern **6**, **10**, **15** bedarfsweise der Sammelkanal **17** und/oder sonstige nicht dargestellte Entlüftungsöffnungen oder dgl. sind nach außen hin offen ausgebildet. So können die Verdunstungsverluste minimiert und dementsprechend mit hoher Genauigkeit mit geringen Flüssigkeitsvolumina gearbeitet werden.

**[0064]** Die einzusetzenden Volumen an Flüssigkeiten betragen pro Flüssigkeit etwa 10 bis 2.000 µl, vorzugsweise nur etwa 50 bis 200 µl.

**[0065]** Die Summe der Volumina der paarweise zugeordneten ersten und zweiten Dosierkammern **5, 9** beträgt vorzugsweise 1 bis 100 µl, insbesondere etwa 10 µl. Entsprechendes gilt für die Volumina der Reaktionskammern **11** und der Untersuchungskammern **16**. Insbesondere sind die genannte Summe und die jeweiligen Volumina der Reaktionskammern **11** und der Untersuchungskammern **16** gleich.

**[0066]** Mit der vorschlagsgemäßen Vorrichtung **1** und dem vorschlagsgemäßen Verfahren kann das ELISA-Verfahren oder ein sonstiges Verfahren sehr einfach und sehr schnell und insbesondere unter Einsatz von sehr geringen Flüssigkeitsmengen und damit auch kostengünstig durchgeführt werden. Des Weiteren wird eine Minimierung der erforderlichen Pipettierschritte oder sonstiger Vorgänge zur Zuführung von Flüssigkeiten ermöglicht. Insbesondere wird eine sehr genaue Untersuchung in Form einer genauen quantitativen Bestimmung eines Analyten in der Probenflüssigkeit ermöglicht.

### Patentansprüche

1. Vorrichtung (**1**) zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit (**3**), insbesondere mittels des ELISA-Verfahrens, mit einer ersten Aufnahmekammer (**4**) zur Aufnahme der Probenflüssigkeit (**3**) und ggf. mit einer zweiten Aufnahmekammer (**7**) zur Aufnahme einer Verdünnungsflüssigkeit (**8**) für die Probenflüssigkeit (**3**), und mit einer dritten Aufnahmekammer (**13**) zur sequentiellen Aufnahme verschiedener Flüssigkeiten (**14**), mit mehreren Reaktionskammern (**11, 11'**), denen die Probenflüssigkeit (**3**), ggf. die Verdünnungsflüssigkeit (**8**) und die sonstigen bzw. verschiedenen Flüssigkeiten (**14**) nacheinander zuführbar sind.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung (**1**) derart ausgebildet ist, daß die dritte Aufnahmekammer (**13**) jeweils vor Aufnahme einer neuen Flüssigkeit (**14**) geleert wird, insbesondere selbsttätig durch Kapillarkräfte und/oder durch Zentrifugalkräfte.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung (**1**) derart ausgebildet ist, daß eine Flüssigkeit mit einem Antikörper, eine Waschflüssigkeit, eine Fixierflüssigkeit, insbesondere zur Fixierung des Antikörpers in der Reaktionskammer (**11, 11'**) eine Flüssigkeit mit einem Enzym, das insbesondere an einen Nachweisantikörper gebunden ist und/oder eine Flüssigkeit mit einem Substrat, von der dritten Aufnahmekammer (**14**) sequentiell aufnehmbar sind.

4. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere oder alle Reaktionskammern (**11**) zur sequentiellen Aufnahme der Flüssigkeiten (**14**) durch Druck-, Ka-

pillar- und/oder Zentrifugalkräfte an die dritte Aufnahmekammer (**13**) angeschlossen sind.

5. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung (**1**) mindestens eine den Reaktionskammern (**11'**) zugeordnete Sammelkammer (**15**) und/oder einen Sammelkanal (**17**) zur Aufnahme der Flüssigkeiten (**3, 8, 14**) aufweist.

6. Vorrichtung nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung (**1**) als mikrofluidisches System, insbesondere in Form einer runden Scheibe, wie einer CD, ausgebildet ist.

7. Verfahren zur Untersuchung einer Probenflüssigkeit (**3**), insbesondere mittels des ELISA-Verfahrens, wobei in Reaktionskammern (**11, 11'**) Nachweisreaktionen zum Nachweis eines Analyten in der Probenflüssigkeit (**3**) ablaufen, wobei den Reaktionskammern (**11, 11'**) nacheinander verschiedene Flüssigkeiten (**14**) über eine gemeinsame dritte Aufnahmekammer (**13**) zugeführt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeiten (**14**) durch Druck-, Zentrifugal- und/oder Kapillarkräfte den Reaktionskammern (**11, 11'**) zugeführt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß den Reaktionskammern (**11, 11'**) nacheinander eine Flüssigkeit mit einem Antikörper, eine Waschflüssigkeit, eine Fixierflüssigkeit, insbesondere zur Fixierung eines Antikörpers in den Reaktionskammern (**11, 11'**), eine Flüssigkeit mit einem Enzym, das insbesondere an einen Nachweisantikörper gebunden ist, und/oder eine Flüssigkeit mit einem Substrat zugeführt werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die dritte Aufnahmekammer (**13**) jeweils vor Aufnahme einer neuen Flüssigkeit (**14**) geleert wird, insbesondere selbsttätig durch Kapillarkräfte und/oder durch Zentrifugalkräfte.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionskammern (**11, 11'**) vor Zuführung der Probenflüssigkeit (**3**) mit einem immobilisierten Antikörper versehen, insbesondere beschichtet, werden, insbesondere wobei der Antikörper in den Reaktionskammern (**11, 11'**) mittels einer Fixierflüssigkeit fixiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß jeweils nach dem Beschichten und/oder Fixieren, insbesondere jeweils nur einmalig, eine Waschflüssigkeit zum Spülen durch die Re-

aktionskammern (11, 11') geleitet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß anschließend die Probenflüssigkeit (3), vorzugsweise mit einem gewünschten Verdünnungsverhältnis, insbesondere durch Druck-, Kapillar- und/oder Zentrifugalkräfte, in die jeweilige Reaktionskammer (11, 11') geleitet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß nach einer bestimmten Reaktionszeit und/oder Bindung eines Analyten in der Probenflüssigkeit (3) an den Antikörper die Reaktionskammern (11, 11') gespült werden, dann ein an die Verbindung aus dem Antikörper und Analyten bindende Nachweisreagenz, insbesondere ein Enzym, in die Reaktionskammern (11, 11') geleitet wird und schließlich das ungebundene Nachweisreagenz bzw. Enzym wieder ausgewaschen wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Auswaschen des ungebundenen Nachweisreagenzes bzw. Enzyms ein Substrat in die Reaktionskammern (11, 11') geleitet wird, das von dem Nachweisreagenz bzw. Enzym, insbesondere enzymatisch, in der Nachweisreaktion in eine Nachweissubstanz modifiziert oder umgewandelt wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in einem mikrofluidischen System, insbesondere in Form einer runden Scheibe durchgeführt wird, insbesondere wobei zur Erzeugung von Zentrifugalkräften zur Steuerung des Verfahrenablaufs das mikrofluidische System zu bestimmten Zeitpunkten, für bestimmte Zeitdauern und/oder mit bestimmten Rotationsgeschwindigkeiten rotiert wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

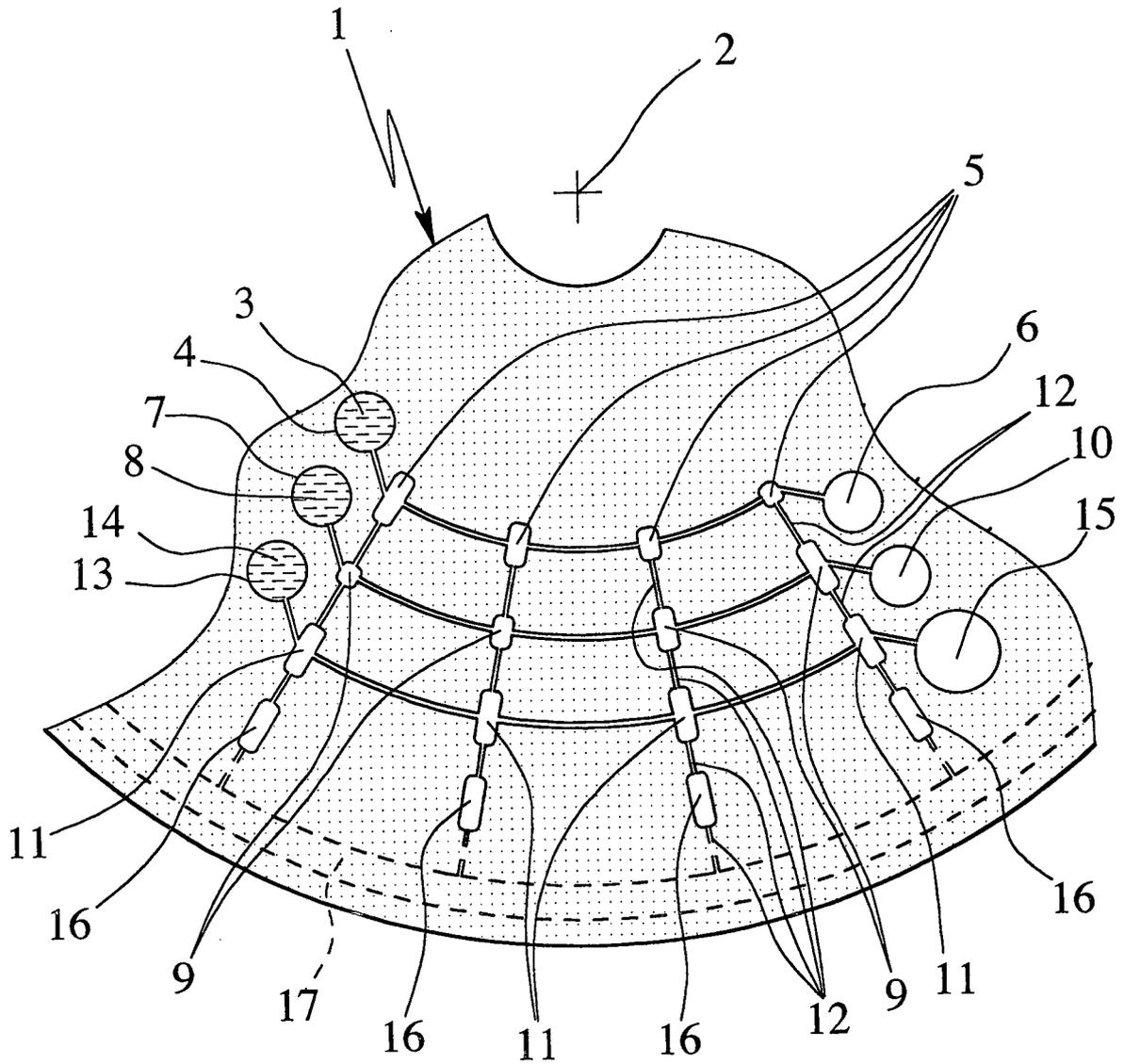


Fig. 1

