

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
2. November 2006 (02.11.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/114249 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 33/00 (2006.01) **B05D 1/02** (2006.01)

B05B 17/06 (2006.01) **G01N 35/00** (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/003726

(22) Internationales Anmeldedatum:

22. April 2006 (22.04.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

0735/05 26. April 2005 (26.04.2005) CH

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH**
[DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHICK, Eginhard**
[DE/DE]; Nordschwabener Str. 8, 79618 Rheinfelden
(DE). **UTINGER, Dominic** [CH/CH]; Kirchbündtenstr.
48, CH-4107 Ettingen (CH). **CALONDER, Claudio**
[CH/CH]; Blauenstr. 37, CH-4054 Basel (CH).

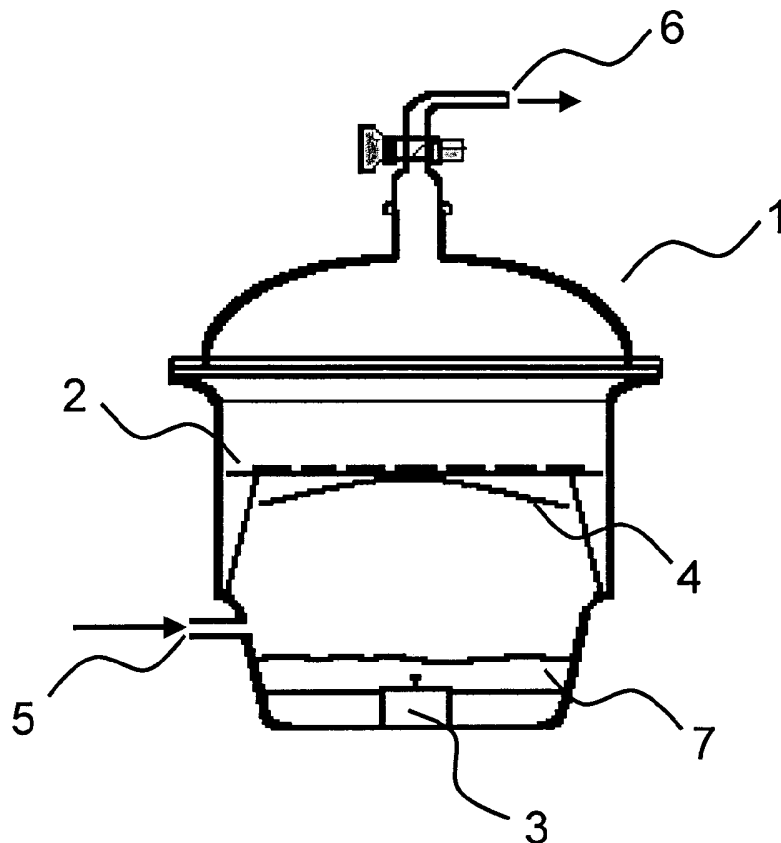
(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER TECHNOLOGY
SERVICES GMBH**; 51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL EQUIPMENT AND METHOD FOR COATING SUBSTRATES FOR ANALYTE DETECTION BY WAY OF
AN AFFINITY ASSAY METHOD

(54) Bezeichnung: NEUE APPARATUR UND VERFAHREN ZUR BESCHICHTUNG VON TRÄGERSUBSTRATEN FÜR EI-
NEN ANALYTNACHWEIS MITTELS AFFINITÄTS-NACHWEISVERFAHREN



(57) Abstract: The invention relates to several embodiments of equipment for coating substrates for detecting one or more analytes by way of an affinity assay method, comprising: a receptacle receiving a liquid to be atomized ("liquid receptacle") with substances (compounds) to be deposited onto at least one surface of said substrates and an atomized volume produced by the liquid in the operating state; an actuator for triggering the atomization process and; a fixture for receiving and storing the substrates during the coating process. The invention is characterized in that the substrates are not in contact with the surface of the liquid to be atomized. The invention also relates to several embodiments of methods for coating substrates with coupler and/or passivation layers for use in the detection of one or more analytes by way of an affinity assay method.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/114249 A1



LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

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

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind verschiedene Ausführungsformen einer Apparatur zur Beschichtung von Trägersubstraten zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren, umfassend: - ein Behältnis zur Aufnahme zu vernebelnder Flüssigkeit ("Flüssigkeitsbehältnis") mit darin enthaltenen, auf mindestens einer Oberfläche besagter Trägersubstrate abzuscheidenden Stoffen (Verbindungen) sowie eines über der Flüssigkeit im Betriebszustand erzeugten Nebelvolumens, - einen Aktuator zur Veranlassung des Vernebelungsprozesses und - eine Halterung zur Aufnahme und Lagerung der Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Trägersubstrate in keinem Kontakt zur Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit befinden. Die vorliegende Erfindung umfasst auch verschiedene Ausführungsformen von Verfahren zur Beschichtung von Trägersubstraten zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren, mit Haftvermittlungs- und / oder Passivierungsschichten.

Neue Apparatur und Verfahren zur Beschichtung von Trägersubstraten für einen Analytnachweis mittels Affinitäts-Nachweisverfahren

Technischer Hintergrund der Erfindung

Für zahlreiche Anwendungsgebiete ist es erforderlich, eine Vielzahl von Analyten in einer Probe von eventuell komplexer Zusammensetzung und Beschaffenheit zu bestimmen, beispielsweise in diagnostischen Verfahren zur Bestimmung des Gesundheitszustandes eines Individuums oder in der Pharmaforschung und -entwicklung zur Bestimmung der Beeinflussung eines Organismus und dessen komplexer Funktionsweise durch Zuführung biologisch aktiver Verbindungen.

Während bekannte analytische Trennverfahren im allgemeinen dahingehend optimiert sind, innerhalb möglichst kurzer Zeit eine möglichst grosse Anzahl von in einer gegebenen Probe enthaltenen Verbindungen gemäss eines vorgegebenen physikalisch-chemischen Parameters, wie beispielsweise des Molekulargewichts oder des Quotienten aus molekularer Ladung und Masse, aufzutrennen, beruhen Bioaffinitäts-Nachweisverfahren darauf, mit jeweils einem biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselement möglichst hoher Spezifizität, nachfolgend auch bezeichnet als „Bindungspartner“ bzw. „spezifischer Bindungspartner“, den entsprechenden (einzelnen) Analyten hochselektiv in einer komplex zusammengesetzten Probe zu erkennen und zu binden. Der Nachweis einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen erfordert also die Verwendung einer entsprechenden Anzahl unterschiedlicher spezifischer Erkennungselemente.

Ein Nachweisverfahren basierend auf Bioaffinitätsreaktionen kann sowohl in einer homogenen Lösung als auch an der Oberfläche eines festen Trägers („Trägersubstrat“) erfolgen. Je nach dem spezifischen Aufbau des Verfahrens sind nach Bindung der Analyten an die entsprechenden Erkennungselemente und gegebenenfalls weitere Nachweissubstanzen sowie gegebenenfalls zwischen verschiedenen Verfahrensschritten jeweils Waschschrte notwendig, um die gebildeten Komplexe aus den Erkennungselementen und den nachzuweisenden Analyten sowie gegebenenfalls weiteren Nachweissubstanzen vom Rest der Probe und der gegebenenfalls eingesetzten zusätzlichen Reagentien zu trennen.

Zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten oder Untersuchung einer Vielzahl von Proben sind, vor allem in industriellen Analytiklabors, Verfahren verbreitet, in denen in sogenannten Mikrotiterplatten der Nachweis unterschiedlicher Analyten in diskreten Probenbehältnissen oder "Wells" dieser Platten erfolgt. Am weitesten verbreitet sind dabei Platten mit einem Raster von 8 x 12 Wells auf einer Grundfläche von typischerweise ca. 8 cm x 12 cm, wobei zur Füllung eines einzelnen Wells ein Volumen von einigen hundert Mikrolitern erforderlich ist. Für zahlreiche Anwendungen wäre es jedoch wünschenswert, mehrere Analyten in einem einzigen Probenbehältnis, unter Einsatz eines möglichst kleinen Probenvolumens, gleichzeitig zu bestimmen.

In den WO 84/01031, US-P 5807755, US-P 5837,551 und US-P 5432,099 wird die Immobilisierung für den Analyten spezifischer Erkennungselemente in Form kleiner "Spots" als diskreten Messbereichen mit teilweise deutlich unter 1 mm² Fläche auf einem gemeinsamen Trägersubstrat vorgeschlagen, um durch Bindung eines nur kleinen Teils vorhandener Analytmoleküle eine nur von der Inkubationszeit abhängige, aber – in Abwesenheit eines kontinuierlichen Flusses – vom absoluten Probenvolumen im wesentlichen unabhängige Konzentrationsbestimmung des Analyten vornehmen zu können. Eine Vielzahl solcher „Spots“ als Messbereiche stellt in einer zweidimensionalen Anordnung auf einem gemeinsamen Trägersubstrat ein sogenanntes „Mikroarray“ dar.

Relativ weit verbreitet sind inzwischen Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren in einer Probe mithilfe entsprechender komplementärer, auf einem Trägersubstrat in diskreten, räumlich getrennten Messbereichen immobilisierter Nukleinsäuren als Erkennungselementen. Beispielsweise sind, basierend auf einfachen Glas- oder Mikroskop-Plättchen als Trägersubstraten, Arrays von Oligonukleotiden als Erkennungselementen mit einer sehr hohen Feature-Dichte (Dichte von Messbereichen auf einem gemeinsamen festen Träger) bekannt. Beispielsweise werden in der US-Patentschrift No. 5,445,934 (Affymax Technologies) Arrays von Oligonukleotiden mit einer Dichte von mehr als 1000 Features pro Quadratzentimeter beschrieben und beansprucht.

Seit kurzem häufen sich auch Beschreibungen von Arrays und damit ausgeführter Nachweisverfahren ähnlicher Art zur gleichzeitigen Bestimmung einer Vielzahl von Proteinen, beispielsweise in der US-Patentschrift No. 6,365,418 B1.

Die einfachste Form der Immobilisierung der Bindungspartner für den Analytnachweis besteht in physikalischer Adsorption, beispielsweise infolge hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern und dem Trägersubstrat. Diese Wechselwirkungen können jedoch durch die Zusammensetzung des Mediums und dessen physikalisch-chemische Eigenschaften, wie beispielsweise Polarität und Ionenstärke, in ihrem Ausmass stark verändert werden. Insbesondere im Falle sequentieller Zugabe verschiedener Reagentien in einem mehrstufigen Assay ist das Haftvermögen der Bindungspartner nach rein adsorptiver Immobilisierung auf der Oberfläche oft unzureichend.

Es wird daher oft bevorzugt, die Bindungspartner auf einer auf dem Trägersubstrat aufgetragenen Haftvermittlungsschicht zu immobilisieren. Als für die Herstellung der Haftvermittlungsschicht geeignet sind eine Vielzahl von Materialien bekannt, beispielsweise nicht funktionalisierte oder funktionalisierte Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Mehrschichten", Alkylphosphate und -phosphonate, multifunktionellen Block-Copolymere, wie beispielsweise Poly(L)ysin/Polyethylenglycole.

Beispielsweise in der WO 00/65352 werden Beschichtungen von bioanalytischen Sensorplattformen oder Implantaten für medizinische Anwendungen als Trägersubstraten mit Pfropf-Copolymeren („graft copolymers“) als Haftvermittlungsschicht, mit einer polyionischen, z. B. an ein Trägersubstrat (elektrostatisch) bindenden Hauptkette und „nicht interaktiven“ (adsorptionresistenten) Seitenketten, beschrieben.

Zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen oder anderen Bindungspartnern, insbesondere in den (unbedeckten) Bereichen zwischen den durch lokal adressierte Aufgabe erzeugten Messbereichen (Spots) zum Analytnachweis, wird es vielfach bevorzugt, diese Bereiche zu „passivieren“. Dazu werden zwischen den räumlich getrennten Messbereichen auf den Trägersubstraten Verbindungen aufgebracht, welche gegenüber den Analyten oder gegenüber deren Nachweissubstanzen oder anderen Bindungspartnern „chemisch neutral“, d. h. nicht-bindend, sind.

Besagte gegenüber den Analyten oder deren Nachweissubstanzen oder anderen Bindungspartnern „chemisch neutralen“, d.h. diese nicht bindenden, Komponenten (nachfolgend auch als „Passivierungsverbindungen“ bezeichnet) können bekanntermassen

ausgewählt sein aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifischen, polyklonalen oder monoklonalen, artfremden oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten unspezifischen Antikörpern (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 - , nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise ein Extrakt von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycolen oder Dextranen, gebildet werden.

Um die Erzeugung verlässlich quantifizierbarer Daten aus den Bindungssignalen, beispielsweise mithilfe von Fluoreszenzdetektion, von verschiedenen Messbereichen (Spots) eines Mikroarrays zu ermöglichen, ist es notwendig, eine einheitliche Oberflächendichte und Bindungsaktivität immobilisierter Bindungspartner in miteinander zu vergleichenden Messbereichen zu gewährleisten. Zur Erfüllung dieser Anforderung ist eine hohe räumliche Homogenität der Haftvermittlungsschicht, auf der die diskreten Messbereiche (Spots) erzeugt werden, eine wesentliche Voraussetzung. Ähnliche Anforderungen an die räumliche Homogenität bestehen auch für die aufgebrachte Passivierungsschicht, zur Gewährleistung eines einheitlichen, möglichst niedrigen Signalhintergrunds zwischen den ausgewiesenen Messbereichen (Spots).

In Abhängigkeit von der molekularen Beschaffenheit der Komponenten der zu erzeugenden Haftvermittlungsschicht sowie natürlich der thermischen und chemischen Stabilität der zu beschichtenden Trägersubstrate sind für die Aufbringung der Haftvermittlungsschicht auf dem Trägersubstrat verschiedene Methoden einsetzbar. Silanisierungen können beispielsweise sowohl in der Gas- und der Flüssigphase, beispielsweise mithilfe von Tauchverfahren, durchgeführt werden. Während die Beschichtungsverfahren in der Gasphase, bei ausreichend gross bemessenen Reaktionsgefässen (im Vergleich zur Grösse der zu beschichtenden Trägersubstrate), in der Regel zu einer guten Homogenität der abgeschiedenen Schicht führen, weisen aus der Flüssigphase abgeschiedene Schichten oft starke räumliche Inhomogenitäten auf, beispielsweise Ablaufspuren nach Anwendung von Tauchverfahren.

Da die Abscheidungen aus der Gasphase in der Regel erhöhte Prozesstemperaturen erfordern, erfolgt der Schritt der Aufbringung von Passivierungsschichten, nach Auftragung der in den

meisten Fällen nicht hitzebeständigen Erkennungselemente zum Analytnachweis, in der Regel aus der Flüssigphase. Für den Passivierungsschritt wird typischerweise ein Tauchverfahren benutzt. Dabei wird das Trägersubstrat in ein Gefäß fallen gelassen, welches mit einer Lösung der gegenüber den Analyten oder deren Nachweissubstanzen oder anderen Bindungspartnern „chemisch neutralen“, d.h. diese nicht bindenden, Verbindungen („Passivierungslösung“) gefüllt ist, um die gesamte Oberfläche des Trägersubstrats möglichst schnell und gleichzeitig mit der Passivierungslösung zu benetzen. Nachfolgend wird das Trägersubstrat während eines vorbestimmten Zeitraumes in der Passivierungslösung belassen („inkubiert“), damit die zur Oberflächenpassivierung eingesetzten Verbindungen auf der Substratoberfläche adsorbiert werden können.

Ein Vorteil dieses herkömmlichen Verfahrens besteht darin, dass es ohne jegliche weitere Hilfsmittel durchgeführt werden kann und keine speziellen Anforderungen an die Fähigkeiten des Laborpersonals voraussetzt.

Eine nachteilige Eigenschaft dieses Verfahrens ist jedoch ein relativ hohes Risiko des „Verschmierens“ von Spots während des Moments des Eintauchens des Trägersubstrats durch an der Substratoberfläche entlangströmende Passivierungslösung. Dabei wird Material aus den diskreten Messbereichen (immobilisierte spezifische Bindungspartner) desorbiert und weggeschwemmt und kann in der Umgebung in Richtung der relativen Strömungsrichtung der Passivierungslösung (bezogen auf die Substratoberfläche) in noch nicht vollständig mit Passivierungsverbindungen bedeckten Bereichen wieder adsorbiert werden.

Das Ausmass des „Verschmierens“ von Spots ist unter anderem abhängig von der Oberflächendichte der immobilisierten spezifischen Bindungspartner in den diskreten Messbereichen und der Zusammensetzung der Passivierungslösung, insbesondere von der Löslichkeit der spezifischen Bindungspartner in dieser Passivierungslösung. Der Effekt des „Verschmierens“ kann bei einer hohen Feature-Dichte, d.h. bei einem geringen Abstand zwischen benachbarten Spots, die quantitative Analyse der Assay-Signale aus einem Array von Messbereichen stark beeinträchtigen oder sogar ausschliessen, aufgrund der resultierenden inhomogenen Verteilung der Hintergrundsignale aus den Bereichen zwischen den diskreten Messbereichen. Insbesondere wenn immobilisiertes Material sogar von einem Spot bis zu einem benachbarten Spot transportiert wird, kann dieser unerwünschte Effekt dazu führen, dass eine aussagekräftige Analyse der Assay-Signale nicht mehr möglich ist.

Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens besteht in dem inhärenten Bedarf an relativ grossen Volumina von Passivierungslösung und damit verbundenen relativ hohen Kosten.

Zur Vermeidung des beschriebenen Effekts des „Verschmierens“ ist der Einsatz von Sprühverfahren bekannt, beispielsweise mithilfe von Zerstäubern. Dabei wird die Passivierungslösung in Form kleiner Flüssigkeitströpfchen auf der Substratoberfläche aufgetragen, bis sich auf dieser Oberfläche ein durchgehender Flüssigkeitsfilm ausgebildet hat. Anschliessend wird die Substratoberfläche in einer gesättigten Atmosphäre des Flüssigkeitsdampfes (d.h. bei 100 % Luftfeuchtigkeit im Fall einer wässrigen Passivierungslösung) während eines vorgegebenen Zeitraumes inkubiert, wiederum damit die zur Oberflächenpassivierung eingesetzten Verbindungen auf der Substratoberfläche adsorbiert werden können. Zur Vermeidung von Ablaufspuren werden die Trägersubstrate während der Durchführung dieses Passivierungsverfahrens horizontal (bezüglich der zu beschichtenden Substratoberfläche) gelagert.

Bei sachgemässer Durchführung dieses Verfahrens kann ein „Verschmieren“ der Spots weitgehend vermieden werden. Vorteilhaft ist auch der im Vergleich zum vorangehend beschriebenen Tauchverfahren um typischerweise einen Faktor 10 verminderte Bedarf an Passivierungslösung.

Die erforderliche gleichmässige Benetzung und recht genaue Dosierung der aufgetragenen Flüssigkeitsmenge, welche zur Ausbildung eines homogenen Flüssigkeitsfilms auf der Substratoberfläche erforderlich sind, stellen jedoch eine verfahrensinhärente Schwierigkeit mit damit verbundenen erhöhten Anforderungen an das Bedienungspersonal dar. Im Falle eines Überschusses an aufgetragener Passivierungslösung kann beispielsweise wieder ein „Verschmieren“ der Spots auftreten. Ein auf dieser Beschichtungsmethode basierendes modulares System zur Herstellung von Mikroarrays mit Nukleinsäuren, Proteinen oder anderen chemischen oder biologischen Verbindungen als in diskreten Messbereichen immobilisierten spezifischen Bindungspartnern ist beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 01/57254 beschrieben worden.

Trotz klarer Vorteile im Vergleich zum Tauchverfahren sind die Resultate des Sprühverfahrens ebenfalls nicht optimal. Aufgrund des Ausstossens der Tröpfchen über eine

Düse oder einen Zerstäuber besitzen die Tröpfchen im Moment des Auftreffens auf der zu beschichtenden Oberfläche einen mehr oder minder starken gegen diese Oberfläche gerichteten Impuls. Dieses ist mit dem Risiko des Zerspritzens in noch kleinere Tröpfchen beim Auftreffen auf der Oberfläche verbunden, so dass die Ränder der zu erzeugenden Messbereiche (Spots) in der Regel nicht wohldefiniert erzeugt werden. Ausserdem werden durch Sprühverfahren in der Regel relativ grosse Tröpfchen mit einer grossen Variation der Tröpfchengrösse erzeugt.

Aufgabenstellung

Es besteht daher das Bedürfnis nach Entwicklung eines Beschichtungsverfahrens aus der Flüssigphase sowie einer Apparatur zur Durchführung dieses Beschichtungsverfahrens, womit eine ähnlich hohe Homogenität der erzeugten Schichten wie bei einer Abscheidung aus der Gasphase erreicht werden kann und wofür der Einsatz einer möglichst kleinen Flüssigkeitsmenge erforderlich ist. Ausserdem ist es wünschenswert, dass ein entsprechendes neuartiges Beschichtungsverfahren und eine dafür zu verwendende Beschichtungsapparatur sowohl für die Aufbringung einer Haftvermittlungsschicht als auch einer Passivierungsschicht geeignet sind. Unter dem Aspekt der Wirtschaftlichkeit ist dabei eine möglichst kostengünstige Lösung anzustreben, d.h. der instrumentelle Aufwand möglichst gering zu halten. Eine entsprechende neue Beschichtungsapparatur sollte leicht bedienbar und ein damit auszuführendes Beschichtungsverfahren leicht automatisierbar sein.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Es wurde nun überraschend gefunden, dass die genannten Anforderungen mit dem nachfolgend beschriebenen erfindungsgemässen Verfahren, basierend auf einer Vernebelung von Lösung, welche die auf den Trägersubstraten aufzubringenden Verbindungen enthält und wobei kein wesentlicher Impuls aus dem Nebel auf den Trägersubstraten abzuschheidender Tröpfchen in Richtung der Trägersubstrate erforderlich ist, erfüllt werden kann. Die zur Durchführung dieses Verfahrens entwickelte erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur zeichnet sich durch eine sehr einfache Konstruktion, bei der kostengünstige kommerziell erhältliche Komponenten verwendet werden können, und auch einfache Bedienbarkeit aus.

Das erfindungsgemäße Verfahren, durchzuführen mit einer erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur entsprechend einer der nachfolgend beschriebenen Ausführungsformen, eignet sich zum Aufbringen von sowohl Haftvermittlungs- als auch Passivierungsschichten auf beliebigen, aber vorzugsweise planaren Trägersubstraten zum Nachweis von Analyten in Affinitäts-Nachweisverfahren.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine Weiterentwicklung des vorangehend beschriebenen Sprühverfahrens dar, wobei die Erzeugung feinsten Flüssigkeitströpfchen für das erfindungsgemäße Verfahren in einer bevorzugten Ausführungsform durch Ultraschallbehandlung erfolgt. Die für dieses Verfahren eingesetzte Beschichtungsapparatur umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform ein geschlossenes Behältnis mit einer Halterung zur horizontalen Lagerung der Trägersubstrate (bezogen auf die Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit) und einem darunter befindlichen Ultraschallgenerator, der in die zu vernebelnde Flüssigkeit eingetaucht ist. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die erzeugten Tröpfchen wesentlich kleiner als im Falle des Sprühverfahrens sind. Im Betriebszustand wird ein sehr dichter Nebel über der zu vernebelnden Flüssigkeit erzeugt, der in einer bevorzugten Ausführungsform durch Verwirbelung mithilfe eines schwachen zusätzlich eingesetzten Stickstoffstroms in dem Behältnis gleichmässig verteilt wird, wobei das Behältnis vorzugsweise bis auf Gaseinlässe und Gasauslässe geschlossen ist. Da keine Strömung der Beschichtungslösung bezüglich der zu beschichtenden Oberflächen der Trägersubstrate auftritt, wird ein „Verschmieren“ der Spots, wie es für das Tauchverfahren beschrieben wurde, bei dem erfindungsgemässen Verfahren verhindert. Demzufolge gibt es auch kaum verfahrensbedingte Beschränkungen hinsichtlich der Auswahl der Zusammensetzung sowohl einer Passivierungslösung als auch einer in einem vorangehenden Arbeitsschritt zur Immobilisierung der spezifischen Bindungspartner in diskreten Messbereichen einzusetzenden „Spottinglösung“ sowie der Konzentration dieser Lösung an spezifischen Bindungspartnern und damit der resultierenden Oberflächendichte immobilisierter spezifischer Bindungspartner in den Messbereichen. Aufgrund der Abwesenheit von Strömungen entlang der Oberfläche der Trägersubstrate während des Oberflächenpassivierungsschritts besteht insbesondere keinerlei Gefahr des „Verschmierens“ zwischen benachbarten Spots, so dass deren erzeugbare Dichte in einem Array von Messbereichen nur durch die Dosierfeinheit und Positioniergenauigkeit der zur Erzeugung der diskreten Messbereiche einzusetzenden Apparatur („Spotter“) beschränkt wird.

Das erfindungsgemässe Verfahren zeichnet sich ausserdem durch die Möglichkeit zur gleichzeitigen Beschichtung einer grossen Anzahl von Trägersubstraten in einem gemeinsamen, entsprechend dimensionierten Behältnis und einfache Automatisierbarkeit aus und ist auch für ungeschultes Personal leicht durchführbar. Die für die Beschichtung der Trägersubstrate notwendigen einzusetzenden Flüssigkeitsvolumina sind von ähnlicher Grössenordnung wie im Falle des Sprühverfahrens.

Kurzbeschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt schematisch eine erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur.

Fig. 2 zeigt die Geometrie einer Anordnung von Messbereichen mit 12 unterschiedlichen aufgetragenen Proben in einem zweidimensionalen Array („Mikroarray“) und eine lineare Anordnung von 6 Arrays auf einem gemeinsamen Trägersubstrat.

Fig. 3A – Fig. 3C zeigen die Fluoreszenzsignale von Mikroarrays, wobei die freien Oberflächen der zugehörigen Trägersubstrate mithilfe unterschiedlicher Beschichtungsverfahren passiviert wurden, jeweils mit darunter befindlichen Vergrösserungen der markierten Bildausschnitte (A: Tauchverfahren, B: Sprühverfahren, C: erfindungsgemässes Vernebelungsverfahren).

Fig. 4A zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Hintergrundsignalintensitäten, die jeweils zwischen allen Spots der Mikroarrays bestimmt wurden, wobei die freien Oberflächen der zugehörigen Trägersubstrate mithilfe unterschiedlicher Beschichtungsverfahren passiviert wurden (A: Tauchverfahren, B: Sprühverfahren, C: erfindungsgemässes Vernebelungsverfahren).

Fig. 4B zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten aller Referenzspots (zur Begriffserklärung siehe im Ausführungsbeispiel) der Mikroarrays, wobei die freien Oberflächen der zugehörigen Trägersubstrate mithilfe unterschiedlicher Beschichtungsverfahren passiviert wurden (A: Tauchverfahren, B: Sprühverfahren, C: erfindungsgemässes Vernebelungsverfahren).

Fig. 5A zeigt die gemittelten Intensitäten und Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale aus den zum Analytnachweis vorgesehenen Messbereichen der Mikroarrays, wobei die freien Oberflächen der zugehörigen Trägersubstrate mithilfe unterschiedlicher Beschichtungsverfahren passiviert wurden (A: Tauchverfahren, B: Sprühverfahren, C: erfindungsgemässes Vernebelungsverfahren) und die Mikroarrays danach mit Lösungen des Antikörpers A1 (anti-p53) und anschliessend jeweils für den Nachweis mittels Fluoreszenzdetektion mit Alexa 647 Fluor anti-Kaninchen Fab-Fragmenten inkubiert wurden.

Fig. 5B zeigt die gemittelten Intensitäten und Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale aus den zum Analytnachweis vorgesehenen Messbereichen der Mikroarrays, wobei die freien Oberflächen der zugehörigen Trägersubstrate mithilfe unterschiedlicher Beschichtungsverfahren passiviert wurden (A: Tauchverfahren, B: Sprühverfahren, C: erfindungsgemässes Vernebelungsverfahren) und die Mikroarrays danach mit Lösungen des Antikörpers A2 (anti-Phospho-p53) und anschliessend jeweils für den Nachweis mittels Fluoreszenzdetektion mit Alexa 647 Fluor anti-Kaninchen Fab-Fragmenten inkubiert wurden.

Genaue Beschreibung der Erfindung

Erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Apparatur zur Beschichtung von Trägersubstraten zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren, umfassend:

- ein Behältnis zur Aufnahme zu vernebelnder Flüssigkeit (“Flüssigkeitsbehältnis“) mit darin enthaltenen, auf mindestens einer Oberfläche besagter Trägersubstrate abzuscheidenden Stoffen (Verbindungen) sowie eines über der Flüssigkeit im Betriebszustand erzeugten Nebelvolumens,
- einen Aktuator zur Veranlassung des Vernebelungsprozesses und
- eine Halterung zur Aufnahme und Lagerung der Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses, dadurch gekennzeichnet,

dass sich die Trägersubstrate in keinem Kontakt zur Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit befinden.

Unter dem Begriff „zu vernebelnder Flüssigkeit“ soll dabei die Gesamtmenge an Flüssigkeit innerhalb der erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur verstanden werden, auf welche die Impulse des Aktuators zur Flüssigkeitsvernebelung einwirken, mit der Folge der Umwandlung eines Teils dieser Flüssigkeit in Nebel.

Vorzugsweise wird die Erzeugung des Nebels über der zu vernebelnden Flüssigkeit durch die Einwirkung von Ultraschall innerhalb dieser Flüssigkeit bewirkt. Entsprechend wird bevorzugt, dass besagter Aktuator der Erzeugung von Ultraschall dient.

Es sind verschiedene technische Verfahren zur Erzeugung von Ultraschall bekannt, beispielsweise mithilfe piezoelektrischer Kristalle, schwingender Membranen etc. Es wird bevorzugt, dass besagter Aktuator die Membran eines Ultraschall-Generators umfasst.

Ausserdem wird bevorzugt, dass besagter Aktuator im Betriebszustand in zu vernebelnde Flüssigkeit eingetaucht ist. Vorzugsweise befindet sich der Aktuator vollständig innerhalb der zu vernebelnden Flüssigkeit.

Des weiteren ist es vorteilhaft, wenn die Intensität und Frequenz des auf die zu vernebelnde Flüssigkeit einwirkenden Ultraschalls regulierbar sind und / oder mittels geeigneter Vorkehrungen gemessen werden können.

Wie in den Anforderungen an ein neues Beschichtungsverfahren genannt, ist die Gleichmässigkeit und hohe Homogenität der zu erzeugenden Schicht von grösster Wichtigkeit. Um dieses gewährleisten zu können, ist eine möglichst enge Grössenverteilung möglichst kleiner Tröpfchen eines abzuschheidenden Nebels wünschenswert. Im Falle einfacher, kommerzieller Vernebler, wie sie vor allem in der Terraristik Anwendung finden, muss jedoch auch mit dem Auftreten grosser Tropfen oder sogar von Spritzern aus der zu vernebelnden Flüssigkeit gerechnet werden.

Daher wird bevorzugt, dass die erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur einen Tropfenabscheider umfasst. Dieser Tropfenabscheider ist in dem Raumvolumen zwischen der Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit und der Halterung, auf der die zu beschichtenden Trägersubstrate während des Beschichtungsvorganges gelagert werden, anzuordnen.

Es sind unterschiedliche Ausführungsformen von Topfenabscheidern geeignet. Prinzipiell kann ein zu verwendender Tropfenabscheider für Dampf und Nebel undurchlässig sein (wenn es sich bei dem Tropfenabscheider zum Beispiel um einen geschlossenen festen Körper handelt). Es kann von Vorteil sein, wenn der Tropfenabscheider die geometrische Form eines konkaven Spiegels hat. Beispielsweise kann ein Uhrglas (mit einer konkaven Oberfläche) als Tropfenabscheider verwendet werden.

Ein zu verwendender Tropfenabscheider kann auch für Tropfen bis zu einer definierten Grösse, beispielsweise mit einem Durchmesser von weniger als 200 μm , durchlässig sein. Dieses lässt sich zum Beispiel dadurch technisch realisieren, dass der Tropfenabscheider ein feinmaschiges Netz umfasst, mit dessen Maschenabstand die maximale Grösse durchzulassender Tropfen festgelegt wird.

Es wird bevorzugt, dass die Trägersubstrate bei Lagerung in der Halterung während des Beschichtungsprozesses auf ihrer von der Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit abgewandten Seite / Oberfläche beschichtet werden, wobei eine Beschichtung auf anderen Oberflächen nicht ausgeschlossen sein muss.

Unter Verwendung von auf den zu beschichtenden Trägersubstraten aufzubringender Masken ist es auch möglich, mit einer erfindungsgemäßen Beschichtungsapparatur in einem erfindungsgemäßen Beschichtungsverfahren geometrisch strukturierte Beschichtungen durch gegebenenfalls sequentielle Vernebelung einer oder mehrerer gegebenenfalls unterschiedlicher Flüssigkeiten zu erzeugen. Voraussetzung für eine Erzeugung in ihrer Geometrie reproduzierbaren beschichteten Bereichen auf den Trägersubstraten ist dabei, dass jeweils nicht zu beschichtende Bereiche des Trägersubstrats durch eine entsprechende geeignete Maske fluidisch dichtend abgedeckt werden, so dass keine Nebeltröpfchen auf die nicht zu beschichtenden Bereiche gelangen.

Um das vorrangige Ziel der Erzeugung einer möglichst gleichmässigen und homogenen Beschichtung der Trägersubstrate erfüllen zu können, ist es des weiteren von Vorteil, wenn die erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Erzeugung einer gleichmässigen Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuschheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate umfasst.

Dafür kann es zum Beispiel hilfreich sein, wenn in das Behältnis der Apparatur (d.h. in den Luft- bzw. Gas- oder Nebelraum) ein Gas eingelassen wird, welches sich mit dem erzeugten Nebel mischt und / oder mit ihm verwirbelt.

Daher ist es von Vorteil, wenn die Beschichtungsapparatur zusätzlich mindestens einen Gas-Einlass umfasst. Die Apparatur kann zusätzlich auch ein oder mehrere Auslässe zum Auslassen von Gas und / oder Nebel umfassen.

Es kann ausserdem vorteilhaft sein, wenn besagte Vorkehrungen zur Erzeugung einer gleichmässigen Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuschcheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate einen Ventilator umfassen, mit dem der erzeugte Nebel und gegebenenfalls zusätzlich in das Behältnis der Apparatur eingelassene Gase verwirbelt werden, um eine bessere Durchmischung und damit Beseitigung von Inhomogenitäten der Nebelverteilung zu erzielen.

Zur Gewährleistung konstanter und wohldefinierter Bedingungen während des Beschichtungsprozesses kann es des weiteren vorteilhaft sein, wenn die erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung der Temperatur der zu vernebelnden Flüssigkeit und / oder einzelner oder aller Wände des Flüssigkeitsbehältnisses umfasst. Es wird auch bevorzugt, dass die Halterung der Beschichtungsapparatur zur Aufnahme und / oder Lagerung der Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses thermostatisierbar ist.

Aus demselben Grund kann es auch von Vorteil sein, wenn die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung des Drucks innerhalb des Flüssigkeitsbehältnisses während des Beschichtungsprozesses umfasst.

Zur Gewährleistung der Gleichmässigkeit und Homogenität der Beschichtung der Trägersubstrate, insbesondere zum Ausschluss eines Einflusses möglicherweise trotz entsprechender Vorkehrungen noch vorhandener Inhomogenitäten des in dem Behältnis der erfindungsgemässen Apparatur zu erzeugenden Nebels, kann es ausserdem von Vorteil sein, wenn die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Rotation der Trägersubstrate um eine Achse senkrecht zur Halterungsebene umfasst.

Aufgrund einer inhärenten Eigenschaft des erfindungsgemässen Verfahrens, nämlich einer im wesentlichen räumlich ungerichteten Abscheidung, findet die Tröpfchenbildung und damit Aufbringung der enthaltenen Verbindungen zur Oberflächenbeschichtung nicht nur auf den freien Oberflächen der Trägersubstrate, sondern beispielsweise auch auf den Wänden des Flüssigkeitsbehältnisses der erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur statt. Da es sich bei den auf die Trägersubstrate aufzubringenden Verbindungen um sehr spezielle Substanzen in hochreiner Form handeln kann, welche demzufolge relativ teuer sein können, wird bevorzugt, dass die erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zum Auffangen und zur Rückführung / Wiedergewinnung an den Wänden des Flüssigkeitsbehältnisses abgeschiedener vernebelter Flüssigkeit umfasst.

Ausserdem ist es vorteilhaft, wenn die erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Erleichterung der Reinigung des Flüssigkeitsbehältnisses umfasst. Beispielsweise können die Vorkehrungen sowohl zur Rückführung an den Innenwänden des Flüssigkeitsbehältnisses und in die zu vernebelnde Flüssigkeit zurückzuführender Flüssigkeit als auch zur Erleichterung der Reinigung eine hydrophobe Beschichtung der Oberfläche besagter Behältniswände umfassen. Derartige Vorkehrungen können auch die geometrische Formgebung betreffen, beispielsweise indem Ecken, in denen sich Flüssigkeit sammeln kann und schwer wieder zu entfernen ist, vermieden werden oder zumindest abgerundet sind.

Vorzugsweise werden die zu beschichtenden Trägersubstrate in der Halterung der Beschichtungsapparatur im wesentlichen horizontal gelagert. Unter der Bezeichnung „im wesentlichen horizontal“ sollen dabei Abweichungen von bis zu $\pm 10^\circ$ von einer horizontalen Lagerung mit eingeschlossen sein.

Es ist ausserdem vorteilhaft, wenn die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur kontrollierten Einstellung und / oder Variation des Abstandes zwischen der Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit und zu beschichtenden Oberflächen der Trägersubstrate umfasst.

Vorzugsweise ist das Flüssigkeitsbehältnis, abgesehen von optionalen Einlässen für Gas und optionalen zusätzlichen Auslässen für Gas und / oder Nebel, geschlossen.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um niederviskose Flüssigkeiten mit einer Viskosität von weniger als 3 cP. Insbesondere kann es sich dabei um

wässrige Lösungen handeln. Die zu vernebelnden Flüssigkeiten können aber auch organische, insbesondere alkoholische Lösungen sein.

Ausserdem wird bevorzugt, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate im wesentlichen planar sind. Unter der Bezeichnung „im wesentlichen planar“ soll dabei verstanden werden, dass besagte Trägersubstrate eine Ebene umfassen, in welcher sich, abgesehen von einer möglicherweise vorhandenen dreidimensionalen Struktur (wie beispielsweise Seitenwänden von auf der Trägersubstratoberfläche bereitzustellenden Probenbehältnissen) die zu beschichtende Oberfläche befindet, und eine dazu im wesentlichen parallele zweite Ebene, in der sich die entgegengesetzte Oberfläche der Trägersubstrate befindet, wobei unter der Bezeichnung „im wesentlichen parallel“ Abweichungen von bis zu $\pm 10^\circ$ von Parallelität mit eingeschlossen sind. Als „im wesentlichen planar“ sollen Trägersubstrate mit sowohl glatten als auch rauhen zu beschichtenden Oberflächen verstanden werden.

Die zu beschichtenden Trägersubstrate können aus einer einzelnen (selbsttragenden) Schicht bestehen, wie z. B. Glasplättchen, oder auch aus mehreren Schichten.

Es wird bevorzugt, dass mindestens eine Schicht der zu beschichtenden Trägersubstrate in der Ausbreitungsrichtung eines eingestrahlten Anregungslichts oder Messlichts im wesentlichen optisch transparent ist.

Unter „optischer Transparenz“ eines Materials beziehungsweise eines Trägersubstrats soll dabei verstanden werden, dass die Lauflänge eines sich in besagtem Material oder in besagtem Trägersubstrat ausbreitenden Lichts oder im (hochbrechenden) wellenleitenden Film eines als optischer Wellenleiter ausgebildeten Trägersubstrats (siehe unten) geführten Lichts in mindestens einem Teilbereich des sichtbaren Spektrums (zwischen 400 nm und 750 nm) grösser als 2 mm ist, sofern diese Lauflänge nicht durch Strukturen zur Änderung der Ausbreitungsrichtung besagten Lichts begrenzt wird. Beispielsweise kann die Lauflänge von optisch sichtbarem Licht, d. h. die Strecke auf dem Weg des Lichts im entsprechenden Material, bis zur Abnahme der Lichtintensität auf einen Wert $1/e$ der Ursprungsintensität beim Eintritt des Lichts in dieses Material, in der Grössenordnung von etlichen Zentimetern (z. B. in Dünnschichtwellenleitern, siehe unten) bis zu Metern oder Kilometern (im Falle von Lichtleitern für die optische Signalübermittlung) liegen. Im Falle einer Gitter-Wellenleiter-Struktur, basierend auf einem Dünnschichtwellenleiter, kann die Ausbreitungslänge eines in

der wellenleitenden Schicht geführten Lichts durch ein auskoppelndes diffraktives Gitter (ausgebildet in der wellenleitenden Schicht) auf wenige Mikrometer begrenzt werden. Diese Begrenzung der Lauflänge ist dann jedoch durch die Strukturierung, und nicht durch die Materialeigenschaften der Struktur, bedingt. Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll eine solche Gitter-Wellenleiter-Struktur als „optisch transparent“ bezeichnet werden. Als „im wesentlichen optisch transparent“ sollen im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch solche Trägersubstrate oder Schichten bezeichnet werden, welche die Intensität eines diese Trägersubstrate oder Schichten durchstrahlenden Lichts um weniger als 50 % abschwächen.

Die mindestens eine in Ausbreitungsrichtung eines eingestrahnten Anregungslichts oder Messlichts im wesentlichen optisch transparente Schicht von zu beschichtenden Trägersubstraten kann beispielsweise ein Material umfassen, welches ausgewählt ist aus der Gruppe, welche Silikate, z. B. Glas oder Quarz, transparente thermoplastische form-, spritz- oder fräsbare Kunststoffe, beispielsweise Polycarbonate, Polyimide, Acrylate, insbesondere Polymethylmethacrylate, Polystyrole, Cyclo-Olefinpolymere und Cyclo-Olefinopolymere umfasst.

In einer speziellen Ausführungsform einer erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur umfassen die zu beschichtenden Trägersubstrate eine dünne Metallschicht, vorzugsweise aus Gold oder Silber, gegebenenfalls auf einer darunter befindlichen Zwischenschicht mit Brechungsindex vorzugsweise < 1.5 , wobei die Dicke der Metallschicht und der eventuellen Zwischenschicht so ausgewählt sind, dass ein Oberflächenplasmon bei der Wellenlänge eines eingestrahnten Anregungslichts und / oder bei der Wellenlänge einer erzeugten Lumineszenz angeregt werden kann. Die Dicke der Metallschicht beträgt vorzugsweise zwischen 10 nm und 1000 nm, besonders bevorzugt zwischen 30 nm und 200 nm.

Die Bedingungen zur Erzeugung einer Oberflächenplasmonenresonanz, sowie zur Kombination mit Lumineszenzmessungen, sowie mit wellenleitenden Strukturen sind vielfach in der Literatur beschrieben.

Mit dem Begriff „Lumineszenz“ wird in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Elektrolumineszenz und

insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff "Lumineszenz" mit eingeschlossen. Dabei sind Fluoreszenz und Phosphoreszenz besonders bevorzugte Formen der Lumineszenz.

Es wird bevorzugt, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate optische Wellenleiter, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfassen. Dabei können die Trägersubstrate durchgehend als optische Wellenleiter ausgebildet sein oder diskrete wellenleitende Bereiche umfassen.

Als „durchgehende wellenleitende Bereiche“ sollen entsprechend wellenleitende Bereiche verstanden werden, die sich ohne eine Unterbrechung der hochbrechenden, wellenleitenden Schicht im wesentlichen über den gesamten Bereich des Teils der für einen Analytnachweis benutzten Oberfläche eines Trägersubstrats erstrecken.

Optische Wellenleiter sind besonders gut geeignet als Trägersubstrat für einen Analytnachweis in einem Affinitätsnachweisverfahren, da mit der Wellenleitung die Ausbildung eines sogenannten „evaneszenten“ Feldes an den Grenzflächen der hochbrechenden wellenleitenden Schicht zu den benachbarten Schichten (worunter auch Luft verstanden werden kann) mit niedrigerem Brechungsindex verbunden ist. Die Eindringtiefe dieses evaneszenten Feldes in die Umgebung ist auf Dimensionen von weniger als der Wellenlänge des geführten Lichts (z. B. auf 200 nm bis 400 nm) beschränkt, so dass Wechselwirkungen von Analytmolekülen oder von Nachweismolekülen oder -molekülteilen (wie z. B. Fluoreszenzlabeln) mit diesem evaneszenten Feld räumlich hochselektiv an einer Oberfläche des Wellenleiters angeregt und beobachtet und Störsignale aus dem Fernfeld, z. B. aus der Tiefe eines Probenmediums, weitgehend ausgeschlossen werden können.

Daher wird in der Regel bevorzugt, dass die durchgehenden oder diskreten wellenleitenden Bereiche zu beschichtender Trägersubstrate eine zu beschichtende Oberfläche der Trägersubstrate umfassen.

Besonders bevorzugt wird, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate planare optische Dünnschichtwellenleiter mit einer im wesentlichen optisch transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer zweiten, ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und gegebenenfalls einer ebenfalls im

wesentlichen optisch transparenten Zwischenschicht (b') zwischen Schicht (a) und Schicht (b) mit ebenfalls niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfassen.

Bei gegebenem Material der Schicht (a) und gegebenem Brechungsindex ist die Empfindlichkeit bis zu einem unteren Grenzwert der Schichtdicke umso grösser, je geringer die Schichtdicke ist. Der untere Grenzwert wird bestimmt durch den Abbruch der Lichtleitung bei Unterschreiten eines von der Wellenlänge des zu führenden Lichts abhängigen Werts sowie einem zu beobachtenden Anstieg der Ausbreitungsverluste bei sehr dünnen Schichten mit weiterer Schichtdickenabnahme. Es wird bevorzugt, dass das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein Ganzes, bevorzugt ein Drittel bis zwei Drittel, der Wellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts oder Messlichts beträgt.

Für die Einkopplung von Anregungslicht oder Messlicht in einen optischen Wellenleiter sind eine Vielzahl von Methoden bekannt. Im Falle einer relativ dicken wellenleitenden Schicht bis hin zu einem selbsttragenden Wellenleiter ist es möglich, das Licht unter Verwendung von Linsen geeigneter numerischer Apertur so in eine Stirnfläche des Wellenleiters zu fokussieren, dass es über innere Totalreflexion geleitet wird. Im Falle von Wellenleitern mit grösserer Stirnbreite als Wellenleiterschichtdicke werden dafür bevorzugt Zylinderlinsen verwendet. Dabei können die Linsen sowohl räumlich entfernt vom Wellenleiter angeordnet als auch direkt mit diesem verbunden sein. Im Falle geringerer Wellenleiterschichtdicken ist diese Form der Stirnflächenkopplung weniger geeignet. Besser eingesetzt werden kann dann die Kopplung über Prismen, die bevorzugt zwischenraumfrei an den Wellenleiter angefügt oder über eine brechungsindexanpassende Flüssigkeit mit dem Wellenleiter verbunden sind. Es ist auch möglich, das Anregungslicht über eine optische Faser an den optischen Wellenleiter heranzuführen und über eine Stirnfläche einzukoppeln oder das in einen anderen Wellenleiter eingekoppelte Licht in den Wellenleiter überzukoppeln, indem beide Wellenleiter einander so nahe gebracht werden, dass ihre evaneszenten Felder überlappen und damit eine Energieübertragung stattfinden kann.

Es wird daher bevorzugt, dass die diskreten oder durchgehenden wellenleitenden Bereiche der zu beschichtenden Trägersubstrate während des Detektionsschritts eines Affinitäts-Nachweisverfahrens mit besagten Trägersubstraten in optische Wechselwirkung mit einem oder mehreren optischen Koppelementen zur Einkopplung von Anregungs- oder Messlicht

von einer oder mehreren Lichtquellen gebracht werden können, wobei besagte optische Koppellemente ausgewählt sind aus der Gruppe, welche Prismenkoppler, evaneszente Koppler mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkoppler mit vor einer Stirnseite einer wellenleitenden Schicht der Trägersubstrate angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkoppler umfasst.

Besonders bevorzugt wird, dass die diskreten oder durchgehenden wellenleitenden Bereiche der zu beschichtenden Trägersubstrate in Kontakt zu einer oder mehreren Gitterstrukturen (c), welche die Einkopplung von Anregungslicht oder Messlicht in wellenleitende Schichten besagter Trägersubstrate ermöglichen, und / oder zu einer oder mehreren Gitterstrukturen (c'), welche die Auskopplung von Anregungslicht oder Messlicht aus wellenleitenden Schichten besagter Trägersubstrate ermöglichen, stehen, wobei im Falle von gleichzeitig auf einem Trägersubstrat vorhandenen Gitterstrukturen (c) und (c') diese gleiche oder unterschiedliche Gitterperioden haben können.

Bei besagten Gitterstrukturen handelt es sich vorzugsweise um Reliefgitter mit beliebigem Profil, beispielsweise mit Rechteck-, Dreieck-, Sägezahn-, halbkreis- oder sinusförmigem Profil, oder um Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren Schicht (a). Vorzugsweise sind Gitterstrukturen (c) als Oberflächenreliefgitter ausgebildet.

Die Gitterstrukturen (c) und / oder (c') können mono- oder multidiffraktiv sein und eine Tiefe von 2 nm – 100 nm, bevorzugt von 10 nm – 30 nm, sowie eine Periode von 200 nm – 1000 nm, bevorzugt von 300 nm – 700 nm, haben. Das Verhältnis der Stegbreite der Gitterlinien zur Gitterperiode kann zwischen 0.01 und 0.99 betragen, wobei ein Verhältnis zwischen 0.2 und 0.8 bevorzugt wird.

Es wird bevorzugt, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist. Es wird auch bevorzugt, dass die erste optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe umfasst, welche Silicium-Nitrid, TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , und ZrO_2 , besonders bevorzugt TiO_2 , Ta_2O_5 oder Nb_2O_5 umfasst.

Es wird ausserdem bevorzugt, dass die zweite optisch transparente Schicht (b) der zu beschichtenden Trägersubstrate ein Material aus der Gruppe umfasst, welche Silikate, z. B. Glas oder Quarz, transparente thermoplastischen form- spritz- oder fräsbare Kunststoffe, beispielsweise Polycarbonate, Polyimide, Acrylate, insbesondere Polymethylmethacrylate, Polystyrole, Cyclo-Olefinpolymere und Cyclo-Olefinopolymere umfasst.

Verschiedene Ausführungsformen von planaren optischen Dünnschichtwellenleitern, welche als Trägersubstrate geeignet sind, sind beispielsweise in den internationalen Patentanmeldungen WO 95/33197, WO 95/33198, WO 96/35940, WO 98/09156, WO 01/79821, WO 01/88511, WO 01/55691 und WO 02/79765 beschrieben. Die in diesen Patentanmeldungen beschriebenen Ausführungsformen von speziellen Trägersubstraten, dort meistens bezeichnet als Sensorplattformen, und damit auszuführenden Verfahren zum Analytnachweis sowie der Inhalt dieser Anmeldungschriften werden hiermit vollumfänglich als Bestandteil der vorliegenden Erfindung eingeführt.

Kennzeichnend für eine bevorzugte Gruppe von Ausführungsformen von erfindungsgemässen Beschichtungsapparaturen ist, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate den Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren mittels Detektion einer oder mehrerer angeregter Lumineszenzen ermöglichen.

Kennzeichnend für eine weitere Gruppe von Ausführungsformen ist, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate den Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren mittels Detektion von Änderungen des effektiven Brechungsindex im Nahfeld (evaneszenten Feld) an einer Oberfläche besagter Trägersubstrate ermöglichen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Beschichtung von Trägersubstraten zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren, dadurch gekennzeichnet, dass

- besagte zu beschichtende Trägersubstrate in eine Halterung einer erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur nach einer der beschriebenen Ausführungsformen eingelegt werden,
- in dem Flüssigkeitsbehältnis besagter Beschichtungsapparatur enthaltene Flüssigkeit vernebelt wird und

- aus dem erzeugten Nebel eine Abscheidung von in der vernebelten Flüssigkeit enthaltenen Stoffen (Verbindungen) auf den zu beschichtenden Trägersubstraten erfolgt,

wobei sich die Trägersubstrate in keinem Kontakt zur Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit befinden.

Vorzugsweise wird die Erzeugung des Nebels über der zu vernebelnden Flüssigkeit durch die Einwirkung von Ultraschall innerhalb dieser Flüssigkeit bewirkt. Entsprechend wird bevorzugt, dass besagter Aktuator der Erzeugung von Ultraschall dient.

Es sind verschiedene technische Verfahren zur Erzeugung von Ultraschall bekannt, beispielsweise mithilfe piezoelektrischer Kristalle, schwingender Membranen etc. Es wird bevorzugt, dass besagter Aktuator die Membran eines Ultraschall-Generators umfasst und die Vernebelung von Flüssigkeit mittels darin erzeugter Ultraschallwellen geschieht.

Ausserdem wird bevorzugt, dass besagter Aktuator im Betriebszustand in die zu vernebelnde Flüssigkeit eingetaucht ist. Vorzugsweise befindet sich der Aktuator vollständig innerhalb der zu vernebelnden Flüssigkeit.

Des Weiteren ist es vorteilhaft, wenn die Intensität und Frequenz des auf die zu vernebelnde Flüssigkeit einwirkenden Ultraschalls regulierbar sind und / oder mittels geeigneter Vorkehrungen gemessen werden können.

Ausserdem wird bevorzugt, dass die Beschichtungsapparatur einen Tropfenabscheider umfasst, welcher den Kontakt von Spritzern und grossen Tropfen aus der zu vernebelnden Flüssigkeit mit den zu beschichtenden Trägersubstraten verhindert. Unter einem „großen“ Tropfen soll ein Tropfen mit einem Durchmesser von mehr als 200 µm verstanden werden. Dabei kann der Tropfenabscheider für Gas und Nebel undurchlässig sein. Beispielsweise kann es sich bei dem Tropfenabscheider um einen geschlossenen festen Körper handeln. Es kann von Vorteil sein, wenn der Tropfenabscheider die geometrische Form eines konkaven Spiegels hat. Beispielsweise kann ein Uhrglas (mit einer konkaven Oberfläche) als Tropfenabscheider verwendet werden.

Ein zu verwendender Tropfenabscheider kann auch für Tropfen bis zu einer definierten Grösse durchlässig sein. Dieses lässt sich zum Beispiel dadurch technisch realisieren, dass der Tropfenabscheider ein feinmaschiges Netz umfasst, mit dessen Maschenabstand die maximale Grösse durchzulassender Tropfen festgelegt wird.

Um das vorrangige Ziel der Erzeugung einer möglichst gleichmässigen und homogenen Beschichtung der Trägersubstrate erfüllen zu können, ist es des weiteren von Vorteil, wenn die erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur Vorkehrungen zur Erzeugung einer gleichmässigen Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuscheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate umfasst.

Dafür kann es zum Beispiel hilfreich sein, wenn die Beschichtungsapparatur zusätzlich mindestens einen Gas-Einlass umfasst, über den ein Gas in das Flüssigkeitsbehältnis eingelassen wird, welches Gas sich mit dem erzeugten Nebel vermischt. Die Apparatur kann zusätzlich auch ein oder mehrere Auslässe zum Auslassen von Gas und / oder Nebel umfassen.

Vorteilhaft für die Gleichmässigkeit und Homogenität der Beschichtung kann auch sein, wenn mithilfe eines Ventilators eine gleichmässige Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuscheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate erzeugt wird.

Zur Gewährleistung konstanter und wohldefinierter Bedingungen während des Beschichtungsprozesses kann es des weiteren vorteilhaft sein, wenn die erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung der Temperatur der zu vernebelnden Flüssigkeit und / oder einzelner oder aller Wände des Flüssigkeitsbehältnisses umfasst und die Temperatur der zu vernebelnden Flüssigkeit und / oder einzelner oder aller Wände des Flüssigkeitsbehältnisses während des Beschichtungsprozesses kontrolliert und / oder variiert wird. Es wird auch bevorzugt, dass die Halterung der Beschichtungsapparatur zur Aufnahme und / oder Lagerung der Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses thermostatisiert wird.

Aus demselben Grund kann es auch von Vorteil sein, wenn die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung des Drucks innerhalb des

Flüssigkeitsbehältnisses während des Beschichtungsprozesses umfasst und der Druck während des Beschichtungsprozesses kontrolliert und / oder variiert wird.

Zur Gewährleistung der Gleichmässigkeit und Homogenität der Beschichtung der Trägersubstrate, insbesondere zum Ausschluss eines Einflusses möglicherweise trotz entsprechender Vorkehrungen noch vorhandener Inhomogenitäten des in dem Behältnis der erfindungsgemässen Apparatur zu erzeugenden Nebels, kann es ausserdem von Vorteil sein, wenn die Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses um eine Achse senkrecht zur Halterungsebene rotiert werden.

Es wird bevorzugt, dass die Trägersubstrate bei Lagerung in der Halterung während des Beschichtungsprozesses auf ihrer von der Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit abgewandten Seite / Oberfläche beschichtet werden, wobei eine Beschichtung auf anderen Oberflächen nicht ausgeschlossen sein muss.

Eine besondere Variante des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass unter Verwendung von auf den zu beschichtenden Trägersubstraten aufzubringenden Masken mit einer erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur in einem erfindungsgemässen Beschichtungsverfahren geometrisch strukturierte Beschichtungen durch gegebenenfalls sequentielle Vernebelung einer oder mehrerer gegebenenfalls unterschiedlicher Flüssigkeiten erzeugt werden. Voraussetzung für eine Erzeugung von in ihrer Geometrie reproduzierbaren beschichteten Bereichen auf den Trägersubstraten ist dabei, dass jeweils nicht zu beschichtende Bereiche des Trägersubstrats durch eine entsprechende geeignete Maske fluidisch dichtend abgedeckt werden, so dass keine Nebeltröpfchen auf die nicht zu beschichtenden Bereiche gelangen.

Vorzugsweise werden die zu beschichtenden Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses in der Halterung der Beschichtungsapparatur im wesentlichen horizontal gelagert.

Es ist ausserdem vorteilhaft, wenn die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur kontrollierten Einstellung und / oder Variation des Abstandes zwischen der Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit und zu beschichtenden Oberflächen der Trägersubstrate umfasst und

damit ein wohldefinierter Abstand zwischen besagter Flüssigkeit und den zu beschichtenden Flüssigkeitsoberflächen für den Zeitraum des Beschichtungsprozesses eingestellt wird.

Zur Verminderung des Verbrauchs an zu vernebelnder Flüssigkeit wird ausserdem bevorzugt, dass an den Wänden des Flüssigkeitsbehältnisses abgeschiedene Flüssigkeit aufgefangen und zu der zu vernebelnden Flüssigkeit zurückgeführt wird.

Vorzugsweise ist das Flüssigkeitsbehältnis der Beschichtungsapparatur, abgesehen von optionalen Einlässen für Gas und optionalen zusätzlichen Auslässen für Gas und / oder Nebel, geschlossen.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um niederviskose Flüssigkeiten mit einer Viskosität von weniger als 3 cP. Insbesondere kann es sich dabei um wässrige Lösungen handeln. Die zu vernebelnden Flüssigkeiten können aber auch organische, insbesondere alkoholische Lösungen sein.

Ausserdem wird bevorzugt, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate im wesentlichen planar sind.

Die zu beschichtenden Trägersubstrate können aus einer einzelnen (selbsttragenden) Schicht bestehen, wie z. B. Glasplättchen, oder auch aus mehreren Schichten.

Es wird bevorzugt, dass mindestens eine Schicht der zu beschichtenden Trägersubstrate in der Ausbreitungsrichtung eines eingestrahnten Anregungslichts oder Messlichts im wesentlichen optisch transparent ist.

Die mindestens eine in Ausbreitungsrichtung eines eingestrahnten Anregungslichts oder Messlichts im wesentlichen optisch transparente Schicht von zu beschichtenden Trägersubstraten kann beispielsweise ein Material umfassen, welches ausgewählt ist aus der Gruppe, welche Silikate, z. B. Glas oder Quarz, transparente thermoplastische form-, spritz- oder fräsbare Kunststoffe, beispielsweise Polycarbonate, Polyimide, Acrylate, insbesondere Polymethylmethacrylate, Polystyrole, Cyclo-Olefinpolymere und Cyclo-Olefinocopolymere umfasst.

In einer speziellen Ausführungsform einer erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur umfassen die zu beschichtenden Trägersubstrate eine dünne Metallschicht, vorzugsweise aus Gold oder Silber, gegebenenfalls auf einer darunter befindlichen Zwischenschicht mit Brechungsindex vorzugsweise < 1.5 , wobei die Dicke der Metallschicht und der eventuellen Zwischenschicht so ausgewählt sind, dass ein Oberflächenplasmon bei der Wellenlänge eines eingestrahlten Anregungslichts und / oder bei der Wellenlänge einer erzeugten Lumineszenz angeregt werden kann.

Es wird bevorzugt, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate optische Wellenleiter, umfassend eine oder mehrere Schichten, umfassen. Dabei können die Trägersubstrate durchgehend als optische Wellenleiter ausgebildet sein oder diskrete wellenleitende Bereiche umfassen.

Dabei wird in der Regel bevorzugt, dass die durchgehenden oder diskreten wellenleitenden Bereiche zu beschichtender Trägersubstrate eine zu beschichtende Oberfläche der Trägersubstrate umfassen.

Besonders bevorzugt wird, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate planare optische Dünnschichtwellenleiter mit einer im wesentlichen optisch transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer zweiten, ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und gegebenenfalls einer ebenfalls im wesentlichen optisch transparenten Zwischenschicht (b') zwischen Schicht (a) und Schicht (b) mit ebenfalls niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) umfassen.

Dabei wird bevorzugt, dass die diskreten oder durchgehenden wellenleitenden Bereiche der zu beschichtenden Trägersubstrate während des Detektionsschritts eines Affinitäts-Nachweisverfahrens mit besagten Trägersubstraten in optische Wechselwirkung mit einem oder mehreren optischen Koppelementen zur Einkopplung von Anregungs- oder Messlicht von einer oder mehreren Lichtquellen gebracht werden können, wobei besagte optische Koppelemente ausgewählt sind aus der Gruppe, welche Prismenkoppler, evaneszente Koppler mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkoppler mit vor einer Stirnseite einer wellenleitenden Schicht der Trägersubstrate angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkoppler umfasst.

Besonders bevorzugt wird, dass die diskreten oder durchgehenden wellenleitenden Bereiche der zu beschichtenden Trägersubstrate in Kontakt zu einer oder mehreren Gitterstrukturen (c), welche die Einkopplung von Anregungslicht oder Messlicht in wellenleitende Schichten besagter Trägersubstrate ermöglichen, und / oder zu einer oder mehreren Gitterstrukturen (c'), welche die Auskopplung von Anregungslicht oder Messlicht aus wellenleitenden Schichten besagter Trägersubstrate ermöglichen, stehen, wobei im Falle von gleichzeitig auf einem Trägersubstrat vorhandenen Gitterstrukturen (c) und (c') diese gleiche oder unterschiedliche Gitterperioden haben können.

Es wird bevorzugt, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist. Es wird auch bevorzugt, dass die erste optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe umfasst, welche Silicium-Nitrid, TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , und ZrO_2 , besonders bevorzugt TiO_2 , Ta_2O_5 oder Nb_2O_5 umfasst.

Es wird ausserdem bevorzugt, dass die zweite optisch transparente Schicht (b) der zu beschichtenden Trägersubstrate ein Material aus der Gruppe umfasst, welche Silikate, z. B. Glas oder Quarz, transparente thermoplastischen form-, spritz- oder fräsbare Kunststoffe, beispielsweise Polycarbonate, Polyimide, Acrylate, insbesondere Polymethylmethacrylate, Polystyrole, Cyclo-Olefinpolymere und Cyclo-Olefinopolymere umfasst.

Kennzeichnend für eine bevorzugte Gruppe von Ausführungsformen des erfindungsgemässen Beschichtungsverfahrens ist, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate den Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren mittels Detektion einer oder mehrerer angeregter Lumineszenzen ermöglichen.

Kennzeichnend für eine weitere Gruppe von Ausführungsformen ist, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate den Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren mittels Detektion von Änderungen des effektiven Brechungsindex im Nahfeld (evaneszenten Feld) an einer Oberfläche besagter Trägersubstrate ermöglichen.

Eine Gruppe von Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der auf den Trägersubstraten abzuschheidenden Schicht um eine Haftvermittlungsschicht handelt.

Dabei wird bevorzugt, dass besagte Haftvermittlungsschicht eine Dicke von weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm hat.

Für die Herstellung der Haftvermittlungsschicht in einem erfindungsgemässen Beschichtungsverfahren eignen sich eine Vielzahl von Verbindungen. Beispielsweise kann die Haftvermittlungsschicht eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfassen, welche Silane, funktionalisierte Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Mehrfachschichten", Thiole, Alkylphosphate und -phosphonate, multifunktionelle Block-Copolymere, wie beispielsweise Poly(L)ysin/Polyethylenglycole, umfassen.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Trägersubstrate einer oder mehrere spezifische Bindungspartner zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren (unter Bindung des Bindungspartners aus einer zugeführten Lösung an den immobilisierten Bindungspartner) immobilisiert sind.

Diese spezifischen Bindungspartner können auf einer mithilfe des erfindungsgemässen Beschichtungsverfahrens aufgetragenen Haftvermittlungsschicht oder auch direkt auf der unbeschichteten Oberfläche der Trägersubstrate aufgebracht sein, wobei vorzugsweise in einem nachfolgenden Beschichtungsschritt gemäss des erfindungsgemässen Verfahrens verbliebene, von spezifischen Bindungspartnern freie Bereiche der Oberfläche mit einer Passivierungsschicht versehen werden (siehe unten).

In einer breit anwendbaren Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens handelt es sich bei den auf der Oberfläche besagter Trägersubstrate immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung eines oder mehrerer in einer zugeführten Probe befindlicher Analyten.

Dabei liegen unterschiedliche derartige spezifische Erkennungselemente jeweils in einer möglichst hochreinen Form im allgemeinen in unterschiedlichen diskreten Messbereichen vor, so dass an Messbereiche mit unterschiedlichen Erkennungselementen im allgemeinen unterschiedliche Analyten aus der Probe binden. Solche Arrays von Messbereichen werden auch als „Capture Arrays“ bezeichnet.

Da sich unterschiedliche Erkennungselemente mehr oder minder stark in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (z. B. in ihrer Polarität) unterscheiden, gibt es auch entsprechende Unterschiede in den Bedingungen für eine optimale Immobilisierung dieser Erkennungselemente, beispielsweise durch Adsorption oder kovalente Bindung, in diskreten Messbereichen auf einem gemeinsamen festen Träger, gegebenenfalls auf einer darauf aufgetragenen Haftvermittlungsschicht. Demzufolge können die zur Immobilisierung einer Vielzahl unterschiedlicher Erkennungselemente gewählten Immobilisierungsbedingungen (wie z. B. Art der Haftvermittlungsschicht) kaum gleichzeitig für alle Erkennungselemente ein Optimum, sondern lediglich einen Kompromiss zwischen den Immobilisierungseigenschaften der verschiedenen Erkennungselemente darstellen.

Bei dieser Art des Assays ist ausserdem nachteilig, dass zum Nachweis von Analyten in einer Vielzahl unterschiedlichen Proben im allgemeinen die Bereitstellung einer entsprechenden Anzahl diskreter Arrays von Erkennungselementen, denen die unterschiedlichen Proben zugeführt werden, auf gemeinsamen oder diskreten Trägern erforderlich ist. Zur Untersuchung einer Vielzahl unterschiedlicher Proben bedeutet dieses den Bedarf einer hohen Anzahl diskreter Arrays, deren Herstellung relativ aufwendig ist.

In den internationalen Patentanmeldungen PCT/EP 03/09561 und PCT/EP 03/09562, deren Inhalt hiermit vollumfänglich als Bestandteil der vorliegenden Erfindung eingeführt wird, wird ein neuartiger Assay-Aufbau vorgeschlagen, welcher es ermöglicht, eine Vielzahl von Proben in einem Array auf einem gemeinsamen Träger gleichzeitig auf in den Proben enthaltene Analyten zu untersuchen. Dazu werden nicht die unterschiedlichen spezifischen Erkennungselemente, sondern die zu untersuchenden Proben selbst unbehandelt oder nach möglichst wenigen Vorbereitungsschritten, in diskreten Messbereichen in einem Array auf einem Trägersubstrat aufgetragen. Ein solcher Assay-Aufbau wird in den beiden genannten Anmeldungsschriften als eine „invertierte Assay-Architektur“ bezeichnet.

Kennzeichen einer weiteren breit anwendbaren Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist daher, dass es sich bei den auf der Oberfläche besagter Trägersubstrate immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um den einen oder die mehreren Analyten selbst handelt, welche eingebettet in eine native Probenmatrix oder in einer mit einem oder mehreren Aufbereitungsschritten modifizierten Form der Probenmatrix immobilisiert sind.

Besagte Bindungspartner, d.h. die selbst immobilisierten nachzuweisenden oder in einer zugeführten Probe nachzuweisenden Analyten und / oder deren immobilisierte oder in einem zugeführten Nachweisreagens zugeführte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente können ausgewählt sein aus der Gruppe, welche Proteine, beispielsweise mono- oder polyklonale Antikörper und Antikörperfragmente, Peptide, Enzyme, Glycopeptide, Oligosaccharide, Lektine, Antigene für Antikörper, mit zusätzlichen Bindungsstellen funktionalisierte Proteine („Tag-Proteine“, wie beispielsweise „Histidin-Tag-Proteine“) sowie Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotide) und Nukleinsäureanaloge (z. B. PNA), Aptamere, membrangebundene und isolierte Rezeptoren und deren Liganden, durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürliche und künstliche Polymere, etc. umfasst.

Dabei können besagte auf der Oberfläche der Trägersubstrate aufgebrachte spezifische Bindungspartner in diskreten Messbereichen (Spots) immobilisiert sein, welche eine beliebige Geometrie, beispielsweise kreisförmige, ovale, dreieckige, rechteckige, polygonartige Form etc. haben können, wobei ein einzelner Messbereich gleichartige oder unterschiedliche spezifische Bindungspartner enthalten kann.

Es wird bevorzugt, dass diskrete Messbereiche durch räumlich selektive Aufbringung von spezifischen Bindungspartnern auf besagten Trägersubstraten erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, welche „Ink jet spotting“, mechanisches Spotting, „micro contact printing“, fluidische Kontaktierung der Bereiche für die zu erschaffenden Messbereiche mit den zu immobilisierenden Verbindungen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen, sowie photochemische und photolithographische Immobilisierungsverfahren umfasst.

Wie schon vorangehend erwähnt, wird es zwecks Minimierung unspezifischer Bindung von Analytmolekülen oder von deren Nachweisreagentien in von immobilisierten spezifischen Bindungspartnern der Trägersubstratoberflächen freien Bereichen bevorzugt, dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen oder in unbesetzten Teilbereichen innerhalb dieser Messbereiche gegenüber den Analyten und / oder gegenüber seinen Bindungspartnern “chemisch neutrale” Verbindungen aufgebracht sind. Vorzugsweise sind diese gegenüber den Analyten und / oder gegenüber seinen Bindungspartnern “chemisch neutralen” Verbindungen beispielsweise ausgewählt aus den Gruppen, welche Albumine, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifische, polyklonale oder monoklonale, artfremde oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten und deren Bindungspartner unspezifische Antikörper (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 -, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierende, fragmentierte natürliche oder synthetische DNA, wie beispielsweise Extrakte von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladene, aber hydrophile Polymere, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, umfassen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein erfindungsgemässes Verfahren nach einer der genannten Ausführungsformen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es sich bei der auf den Trägersubstraten abgeschiedenen Schicht um eine Passivierungsschicht handelt, welche zwischen den räumlich getrennten Messbereichen oder in unbesetzten Teilbereichen innerhalb dieser Messbereiche gegenüber den Analyten und / oder gegenüber seinen Bindungspartnern “chemisch neutrale” Verbindungen nach der Erzeugung dieser Messbereiche aufgebracht wird und vorzugsweise beispielsweise Verbindungen umfasst aus den Gruppen, welche Albumine, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifische, polyklonale oder monoklonale, artfremde oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten und deren Bindungspartner unspezifische Antikörper (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 -, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierende, fragmentierte natürliche oder synthetische DNA, wie beispielsweise Extrakte von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladene, aber hydrophile Polymere, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, umfassen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Trägersubstrat zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren umfassend eine Haftvermittlungsschicht, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Haftvermittlungsschicht mit einem erfindungsgemässen Beschichtungsverfahren nach einer der genannten Ausführungsformen erzeugt wird.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Trägersubstrat zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren umfassend eine das Trägersubstrat zumindest in Teilbereichen bedeckende Passivierungsschicht, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Passivierungsschicht mit einem erfindungsgemässen Beschichtungsverfahren nach einer der genannten Ausführungsformen erzeugt wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Trägersubstrat nach einer der genannten Ausführungsformen zur Anwendung in der Human- und / oder Tierdiagnostik.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend beispielhaft in einem Ausführungsbeispiel näher erläutert.

Beispiele:

1. Erfindungsgemässe Beschichtungsapparatur und Beschichtungsverfahren

Eine schematische Darstellung einer erfindungsgemässen Beschichtungsapparatur ist in Fig. 1 dargestellt. In dem vorliegenden Beispiel sollen mit der erfindungsgemässen Apparatur die von spezifischen Bindungspartnern unbedeckten Bereiche von für ein Affinitäts-Nachweisverfahren vorbereiteten Trägersubstraten „passiviert“, d.h. in diesen Bereichen eine „Passivierungsschicht“ aufgebracht werden. Die erfindungsgemässe Apparatur umfasst in dieser beispielhaften Ausführungsform einen Exsikkator (1) mit einem Volumen von ca. 2 l als Behältnis für die zu vernebelnde Flüssigkeit und des über der Flüssigkeit zu erzeugenden Nebelvolumens, eine Halterung (2) zur Aufnahme der zu beschichtenden Trägersubstrate, einen Ultraschallzerstäuber („Lucky Reptile Mini-Nebler“, Reptilica, D-90431 Nürnberg, Deutschland) als Aktuator (3) zur Flüssigkeitsvernebelung, ein Uhrglas als Tropfenabscheider (4) sowie einen Gaseinlass (5) und einen Auslass (6) für Gas und / oder erzeugten Nebel.

Im Betriebszustand ist der Ultraschallgenerator in die zu vernebelnde Flüssigkeit (7) eingetaucht. Um das erforderliche Flüssigkeitsvolumen zu minimieren, wurde in der Ausführungsform des vorliegenden Beispiels der Ultraschallgenerator, angebracht auf dem Boden des Exsikkators, dort bis knapp unterhalb der schallgebenden Schwingmembran in Polydimethylsiloxan (PDMS) eingegossen, so dass nur die Aufbringung einer dünnen Schicht zu vernebelnder Flüssigkeit erforderlich ist.

Die unter Einwirkung des Ultraschalls erzeugten und sich über den Flüssigkeitsspiegel erhebenden feinsten Tröpfchen werden mithilfe eines schwachen Stromes von Stickstoff, der über den Einlass (5) in das Behältnis eingeführt wird, zusätzlich verwirbelt, um im gesamten Behältnis eine möglichst homogene Verteilung des resultierenden Nebels zu erzeugen.

Zu beschichtende planare optische Dünnschichtwellenleiter als Trägersubstrate, mit den äusseren Abmessungen 14 mm Breite x 57 mm Länge x 0.7 mm Dicke (weitere Details hierzu siehe unten), werden in der Halterung (2) während des Beschichtungsvorganges in einem Abstand von ca. 8 cm über der Flüssigkeitsoberfläche horizontal (bezüglich der Flüssigkeitsoberfläche) gelagert. Die Halterung ist im vorliegenden Beispiel als ein mit Löchern versehener Träger aus Kunststoff ausgebildet, so dass durch diese Löcher

überschüssige aus dem Nebel abgeschiedene Flüssigkeit abfliessen kann. In der vorliegenden beispielhaften Ausführungsform kann die Halterung zehn Dünnschichtwellenleiter als Trägersubstrate mit den genannten Abmessungen aufnehmen.

Das Uhrglas als Tropfenabscheider ist im vorliegenden Beispiel an die Unterseite der Halterung (2) angeklebt und schirmt die zu beschichtenden Trägersubstrate gegen Spritzer aus der Vernebelungslösung (Beschichtungslösung) ab.

Der erzeugte, sehr homogen verteilte Nebel scheidet sich auf den Trägersubstraten, mit im vorliegenden Beispiel auf der Oberseite (bezüglich der Lagerung in der Beschichtungsapparatur) angeordneter hochbrechender wellenleitender Schicht (a), in Form kleinster Tröpfchen ab, und bereits innerhalb von 5 Minuten bis 10 Minuten bildet sich auf den Oberseiten dieser Trägersubstrate ein dünner, durchgehender Flüssigkeitsfilm aus. Nach einer Gesamt-Inkubationszeit von 30 Minuten werden die Trägersubstrate aus der Beschichtungsapparatur entnommen, sorgfältig mit fliessendem Reinstwasser (Millipore) gespült und abschliessend in Stickstoffstrom getrocknet.

Im vorliegenden Beispiel wird für einen Dünnschichtwellenleiter der genannten Abmessungen als Trägersubstrat ein Volumen von ca. 2 ml Passivierungslösung (zu vernebelnder Flüssigkeit) benötigt.

2. Durchführung herkömmlicher Beschichtungsverfahren

2.1. Trägersubstrate

Als Trägersubstrat für ein später damit auszuführendes Affinitäts-Nachweisverfahren dienen in den vorliegenden Beispielen (wie auch schon erwähnt unter 1.) planare optische Dünnschichtwellenleiter, jeweils mit den äusseren Abmessungen 14 mm Breite x 57 mm Länge x 0.7 mm Dicke. Diese Trägersubstrate umfassen jeweils ein Glassubstrat (AF 45) und eine darauf aufgebraute 150-nm dünne, hochbrechende Schicht aus Tantalpentoxid. In dem Glassubstrat sind, parallel zur Länge, zwei Oberflächenreliefgitter (Gitterperiode: 318 nm, Gittertiefe: (12 ± 2) nm) im Abstand von 9 mm moduliert, welche als diffraktive Gitter der Lichteinkopplung in die hochbrechende Schicht dienen sollen.

Auf der Oberfläche der Metalloxidschicht dieser Trägersubstrat ist eine durch spontane Selbstorganisation („Self Assembly“) gebildete Monoschicht aus Mono-Dodecylphosphat (DDP) als Haftvermittlungsschicht aufgebracht. Die mit dieser Haftvermittlungsschicht versehene Oberfläche der Trägersubstrate zeichnet sich durch grosse Hydrophobizität aus. Auf den mit der hydrophoben Haftvermittlungsschicht versehenen Trägersubstraten werden jeweils 6 identische Mikroarrays von je 144 diskreten Messbereichen (Spots), ihrerseits in einer Anordnung von jeweils 16 Reihen und 9 Spalten, mit einem Inkjet-Spotter (Modell NP1.2, GeSiM, Grosserkmannsdorf, Deutschland) aufgetragen. Jeder Spot wird durch die Auftragung eines einzelnen Tröpfchens von ca. 350 pL Volumen auf die Chipoberfläche erzeugt.

2.2. Reagentien und Erzeugung von Arrays von Messbereichen auf den Trägersubstraten

In dem vorliegenden Beispiel sollen in einem nachfolgenden Affinitäts-Nachweisverfahren auf den vorbereiteten Trägersubstraten die nachzuweisenden Analyten selbst immobilisiert werden, eingebettet in eine native Probenmatrix bzw. in eine mit wenigen Probenvorbereitungsschritten aufbereitete Form der Probenmatrix (Zellysat). Diese Formen der Proben sollen nachfolgend auch als „natur-identische Proben“ bezeichnet werden. Der Nachweisschritt soll dann nach Zuführung weiterer Nachweis-Reagentien erfolgen.

Für den Nachweis von biologisch relevanten Proteinanalyten in den „natur-identischen“ Proben wird eine humane Darmkrebszelllinie (HT29) benutzt. Diese adherenten Zellen werden in modifiziertem McCoy's 5A Medium bei 37°C in herkömmlichen, aus Kunststoff bestehenden Kulturflaschen (Greiner Bio-One, St. Gallen, Schweiz, Kat-Nr. 658170) kultiviert. Gleichartige Zellkulturen unterschiedlicher Kulturflaschen werden dann entweder 10 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt oder mit 10 µM Doxorubicin behandelt. Als Vergleichsprobe zu diesen behandelten Zellkulturen wird eine ansonsten gleichartige Zellkultur benutzt, die unbehandelt bleibt und im analytischen Nachweisverfahren als Negativ-Kontrolle dienen wird.

Nach der Behandlung werden die unterschiedlichen Zellkulturen mit je 10 ml PBS (phosphatgepufferter Kochsalzlösung, gekühlt auf 4°C) gewaschen.

Danach werden die Zellen mittels Zugabe von Lysepuffer, enthaltend 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff und Complete (Proteaseinhibitor, Roche AG, 1 Tablette/50 ml) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und gleichzeitig vollständig lysiert, wobei alle proteinhaltigen Zellbestandteile spontan denaturiert und solubilisiert werden. Das so erhaltene Zelllysate wird zur Abtrennung von unlöslichen Zellbestandteilen (z.B. von DNA und Zellmembranfragmenten) 5 Minuten lang bei 13 000xg in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und für die folgenden Messungen verwendet, wobei die Totalproteinkonzentration typischerweise zwischen 5 mg/ml und 10 mg/ml liegt.

Die beschriebenen Behandlungen der HT29-Zellkulturen führen zu Schädigungen der DNA, und zwar bei UV-Bestrahlung u.a. durch Kettenbruch oder durch Bildung von Thymin-Dimeren und bei Doxorubicin-Zugabe durch dessen Interkalation zwischen benachbarte Basen der DNA. Dieses hat zur Folge, dass innerhalb geschädigter Zellen bestimmte Signalwege aktiviert oder deaktiviert werden, was z.B. den programmierten Zelltod (Apoptose) zur Folge haben kann. Verantwortlich für die Aktivierung oder Deaktivierung von Signalwegen sind bestimmte Schlüsselproteine (sogenannte „Markerproteine“), die durch Phosphorylierung an einer oder mehreren unterschiedlichen Stellen einen oder mehrere Signalwege regeln.

Ein Beispiel für die Regulation eines Signalwegs über ein Markerprotein ist das Tumorsuppressorprotein p53, welches über dessen Phosphorylierungsgrad die Zellteilung, die Apoptose sowie gewisse Reparaturmechanismen für geschädigte DNA steuert. Diese Signalwege sind in Krebszellen oft an einer bestimmten oder an mehreren Stellen durch Mutationen oder Fehlen eines oder mehrerer Markerproteine in ihrer Regulation gestört, was letztlich für ein unkontrolliertes Wachstum verantwortlich sein kann.

Die Detektion und die Bestimmung der relativen Gehalte an p53 und P-p53 (phosphorylierte Form des p53) erfolgt mithilfe von hochspezifischen Antikörpern, die an diese Proteine binden, welche als Analyten in den gewonnenen und weiterbehandelten Zelllysaten direkt auf

den Trägersubstraten (vorzugsweise nach Aufbringung einer Haftvermittlungsschicht wie vorangehend beschrieben) immobilisiert werden sollen.

Die gewonnenen Zellysate werden um einen Faktor 10 - 20 auf eine Totalproteinkonzentration von etwa 0.4 mg/ml verdünnt und anschliessend in diskreten Messbereichen zur Erzeugung eines Arrays von Messbereichen auf der mit der Haftvermittlungsschicht versehenen Metalloxide-Oberfläche der Dünnschichtwellenleiter als Trägersubstraten aufgetragen. Zusätzlich zu den Messbereichen mit darin aufgetragenen Zellysaten enthält jedes Mikroarray weitere Messbereiche mit darin immobilisiertem Cy5-fluoreszenzmarkiertem Rinderserumalbumin (Cy5-BSA), die zur Referenzierung von lokalen Unterschieden und / oder zeitlichen Variationen der Anregungslichtintensität bei der Messung verwendet werden („Referenz-Spots“). Cy5-BSA wird in einer Konzentration von 0.5 nM in 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff aufgetragen (Markierungsrate: ca. 3 Cy5-Moleküle pro BSA-Molekül).

Die Geometrie der Anordnung der Messbereiche in einem zweidimensionalen Array und eine lineare Anordnung von sechs (identischen) Arrays auf einem Trägersubstrat sind in Fig. 2 dargestellt. Der Durchmesser der Spots, mit einem Abstand (Zentrum-zu-Zentrum) von 300 μm , beträgt etwa 120 μm . Ein Array von Messbereichen umfasst für diese Beispiele jeweils eine Anordnung von Messbereichen mit 12 verschiedenen, in 4 Replikaten aufgetragenen Proben, wobei die 4 gleichartigen Messbereiche jeweils in einer gemeinsamen Spalte senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des während des Detektionsschritts in der wellenleitenden Schicht dieser Trägersubstrate geführten Lichts angeordnet sind. Mithilfe der jeweils 4 gleichartigen Messbereiche soll die Reproduzierbarkeit der Mess-Signale innerhalb des Arrays von Messbereichen bestimmt werden. Zwischen und neben den Spalten von Messbereichen mit darin aufgetragenen zu analysierenden Proben sind jeweils Spalten von Messbereichen mit darin aufgetragtem Cy5-BSA (zu Referenzierungszwecken) angeordnet. Die erfindungsgemässe analytische Plattform umfasst in diesem Beispiel 6 gleichartige derartige Arrays von Messbereichen, wie in Fig. 2 dargestellt.

2.3. Passivierung der freien Bereiche zwischen und innerhalb der Messbereiche

Nach Aufbringen der „natur-identischen“ Proben und Cy5-BSA werden die Trägersubstrate in staubfreier Raumluft getrocknet, bevor die freien, nicht bedeckten hydrophoben Oberflächenbereiche der Trägersubstrate in einem weiteren Arbeitsschritt zur Minimierung unerwünschter unspezifischer Bindung von Nachweis-Reagentien, in diesem Fall von Antikörpern und/oder fluoreszenzmarkierten Molekülen, mit Rinderserumalbumin (BSA) abgesättigt (passiviert) werden.

Mit der bereits unter 1. beschriebenen erfindungsgemässen Methode der Oberflächenpassivierung werden zwei weitere Methoden (2.3.1. Tauchverfahren und 2.3.2. Sprühverfahren) verglichen, wobei in allen Fällen frisch filtrierte Passivierungslösung (50 mM Imidazol, 100mM NaCl, 3% BSA (w/v) pH 7.4) benutzt wird. Nach erfolgter Passivierung der freien Oberfläche durch die unter 1. bzw. nachfolgend beschriebenen Verfahren werden die Trägersubstrate bei 4°C in geschlossenen Polystyrol-Röhrchen bis zur Messung im Rahmen des nachfolgend auszuführenden Affinitäts-Nachweisverfahrens aufbewahrt.

2.3.1. Tauchverfahren

Die planaren optischen Dünnschichtwellenleiter als Trägersubstrate werden senkrecht in ein mit Passivierungslösung gefülltes Gefäss (Polystyrol-Röhrchen) fallen gelassen, so dass die gesamte Oberfläche der Trägersubstrate möglichst gleichzeitig und schnell benetzt wird. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Trägersubstrate unter fliessendem Reinstwasser (Millipore) sorgfältig gespült und anschliessend im Stickstoffstrom (Qualität 50) getrocknet. Pro Dünnschichtwellenleiter der genannten Abmessungen als Trägersubstrat wird ein Volumen von ca. 25 ml Passivierungslösung benötigt.

2.3.2. Sprühverfahren

Die Passivierungslösung wird hier mittels eines Chromatographie-Zerstäubers (Glas Keller Kat.-Nr. 12.159.603, Basel, Schweiz) und einem Druck von ca. 3.5 bar auf die Trägersubstrate gesprüht, bis sich auf deren zu beschichtender Oberfläche ein durchgehender

Flüssigkeitsfilm gebildet hat. Der Abstand zwischen der Ausgangsdüse des Zerstäubers und der Trägersubstratoberfläche beträgt hierbei ca. 30 cm. Anschliessend werden die so behandelten Trägersubstrate in einem geschlossenen Behältnis bei 100% Luftfeuchte eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert, danach unter fliessendem Reinstwasser (Millipore) sorgfältig gespült und zuletzt im Stickstoffstrom (Qualität 50) getrocknet. Pro Trägersubstrat der in diesen Beispielen genannten Ausführungsform wird ein Volumen von ca. 3 ml Passivierungslösung benötigt.

3. Affinitäts-Nachweisverfahren

3.1. Assay-Architektur

Der Nachweis bestimmter Proteine allgemein (d. h. z. B. mit oder ohne Phosphorylierung) bzw. bestimmter Proteine speziell in aktivierter (z.B. phosphorylierter) Form in den immobilisierten in diskreten Messbereichen aufgetragenen Zellysaten erfolgt durch sequentielle Zugabe entsprechender Nachweisreagentien vor der Vermessung der resultierenden Fluoreszenzsignale: Zur Vorbereitung für einen ersten Assay-Schritt werden polyklonale analytspezifische Kaninchen-Antikörper (Antikörper A1 (#9282): anti-p53; Antikörper A2 (#9284): anti-Phospho-p53 (Ser15); beide Antikörper bezogen von Cell Signaling Technology, INC., Beverly, MA, USA) im Verhältnis 1:500 in Assay-Puffer (50 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 5% BSA, 0.1% Tween 20 pH 7.4) verdünnt. Von diesen verschiedenen Antikörperlösungen werden jeweils 30 µl auf jeweils eines der 6 identischen Arrays von Messbereichen aufgebracht, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht (erster Assay-Schritt). Überschüssige, nicht spezifisch gebundene Antikörper werden durch Waschen eines jeden Arrays mit Assaypuffer (2 x 200 µl) entfernt.

Für den Nachweis von in diskreten Messbereichen an dort in den immobilisierten Zellysaten enthaltene gebundene analytspezifische Antikörper erfolgt ein zweiter Assay-Schritt unter Benutzung eines Alexa Fluor 647-markierten anti-Kaninchen-Fab-Fragments (Molecular Probes, Kat.-Nr. Z-25308, Leiden, Niederlande), welches an die vorangehend genannten Antikörper A1 und A2 bindet. Dieses fluoreszenzmarkierte Fab-Fragment wird, ausgehend von der kommerziell erhältlichen Stammlösung, in einer Verdünnung von 1:500 in Assay-Puffer auf die Arrays aufgebracht (je 30 µl) und anschliessend 1 Stunde lang bei

Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschliessend werden die Arrays mit Assay-Puffer (jeweils zweimal mit 200 µl) gewaschen, um nicht spezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte Fab-Fragmente zu entfernen. Danach werden die so vorbereiteten analytischen Plattformen bis zum Detektionsschritt mittels Anregung und Detektion resultierender Fluoreszenzsignale im ZeptoREADER™ (siehe unten) gelagert.

3.2. Bestimmung der Fluoreszenzsignale aus den Arrays von Messbereichen

Die Fluoreszenzsignale aus den verschiedenen Arrays von Messbereichen werden mit einem ZeptoREADER™ (Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil, Schweiz) sequentiell automatisch gemessen. Für jedes Array von Messbereichen wird der planare optische Dünnschichtwellenleiter als Trägersubstrat (gemäss 2.1.) justiert zur Erfüllung der Resonanzbedingung für die Lichteinkopplung über eine Gitterstruktur (c) in die wellenleitende Tantalpentoxid-Schicht und zur Maximierung des in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichts. Anschliessend wird von jedem Array eine vom Benutzer wählbare Anzahl von Bildern der Fluoreszenzsignale aus dem betreffenden Array erzeugt, wobei unterschiedliche Belichtungszeiten gewählt werden können. Die Anregungswellenlänge beträgt bei den Messungen für das vorliegende Beispiel 635 nm, die Detektion des Fluoreszenzlicht erfolgt mit einer gekühlten Kamera bei der Fluoreszenzwellenlänge von Cy5, unter Verwendung eines Interferenzfilters (Transmission (675 ± 20) nm) zur Unterdrückung von Streulicht bei der Anregungswellenlänge, der vor dem Objektiv der Kamera positioniert ist. Die erzeugten Fluoreszenzbilder werden automatisch auf der Speicherplatte des Steuer-Computers abgespeichert. Weitere Details des optischen Systems (ZeptoREADER™) sind in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP 01/10012 beschrieben, welche hiermit vollumfänglich als Bestandteil dieser Anmeldung eingeführt wird.

3.3. Auswertung und Referenzierung

Die mittlere Signalintensität aus den Messbereichen (Spots) wird bestimmt mithilfe einer Bildanalyse-Software (ZeptoVIEW™, Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil), welche es

ermöglicht, die Fluoreszenzbilder einer Vielzahl von Arrays von Messbereichen halbautomatisch auszuwerten.

Die Rohdaten der einzelnen Pixel der Kamera stellen eine zweidimensionale Matrix digitalisierter Messwerte dar, mit der gemessenen Intensität als Messwert eines einzelnen Pixels entsprechend der auf ihn abgebildeten Fläche auf der Sensorplattform. Für die Auswertung der Daten wird zunächst manuell ein zweidimensionales (Koordinaten-) Netz über die Bildpunkte (Pixelwerte) gelegt derart, dass das Teilbild jedes Spots in ein individuelles zweidimensionales Netzelement fällt. Innerhalb dieses Netzelements wird jedem Spot ein kreisförmiger möglichst gut anzupassender „Auswertebereich“ (area of interest, AOI) mit einem vom Benutzer vorzugebenden Radius (typischerweise 120 μm) zugeordnet. Durch die Bildanalysesoftware wird der Ort der einzelnen AOIs individuell als Funktion der Signalintensität der einzelnen Pixel bestimmt. Dabei bleibt der zu Beginn vom Nutzer vorgegebene Radius der AOIs erhalten. Als mittlere Bruttosignalintensität eines jeden Spots wird das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb eines gewählten Auswertebereichs bestimmt.

Die Hintergrundsignale werden bestimmt aus den gemessenen Signalintensitäten zwischen den Spots. Dazu werden pro Spot vier weitere kreisförmige Flächen (mit typischerweise zusammengenommen gleichem Radius wie für die Auswertebereiche der Spots) als Auswertebereiche zur Hintergrundsignalbestimmung definiert, welche vorzugsweise in der Mitte zwischen zwischen benachbarten Spots angeordnet sind. Aus diesen vier Kreisflächen wird die mittlere Hintergrundsignalintensität beispielsweise als das arithmetische Mittel der Pixelwerte (Signalintensitäten) innerhalb eines hierfür gewählten AOIs bestimmt. Die mittlere Nettosignalintensität aus den Messbereichen (Spots) wird dann als Differenz zwischen der lokalen mittleren Brutto- und der lokalen mittleren Hintergrundsignalintensität des jeweiligen Spots berechnet.

Die Referenzierung der Netto-Signalintensität aller Spots erfolgt jeweils mit Hilfe von Referenzspots (Cy5-BSA) eines jeden Arrays von Messbereichen. Dazu wird die Netto-Signalintensität eines jeden Spots durch den Mittelwert der Netto-Signalintensitäten der benachbarten Referenzspots derselben Reihe (angeordnet parallel zur Ausbreitungsrichtung des in der Evaneszentfeld-Sensorplattform geführten Lichts) dividiert. Durch diese Referenzierung werden die lokalen Unterschiede der verfügbaren Anregungslichtintensität

orthogonal zur Lichtausbreitungsrichtung sowohl innerhalb eines jeden Mikroarrays als auch zwischen verschiedenen Mikroarrays kompensiert.

3.4. Ergebnisse

Fig. 3A zeigt ein typisches Bild der Fluoreszenzsignale eines Mikroarrays nach einem Assay zum Nachweis von p53, wobei freie Flächen zwischen den Messbereichen mithilfe des Tauchverfahrens (gemäß 2.3.1.) passiviert wurden. Die Signalintensität innerhalb eines jeden einzelnen Referenzspots und zwischen unterschiedlichen Referenzspots (Cy5-BSA) ist sehr gleichmässig und homogen verteilt, und der Rand der nahezu ideal kreisförmigen Spots ist scharf vom Hintergrund abgegrenzt (siehe Detailbild). Demgegenüber sind die Messbereiche der immobilisierten Zellysate durch schweifartige „Verschmierungen“ gekennzeichnet, was besonders deutlich bei hohen Signalintensitäten zu erkennen ist. Diese „Verschmierungen“ werden, wie vorangehend beschrieben, während des Moments des Eintauchens der mit den Spots versehenen Trägersubstrate in die Passivierungslösung verursacht, und zwar durch von der Passivierungslösung aus den Messbereichen gelöste, nicht fest adsorbierte Probenanteile, die entlang der Strömung in entgegengesetzter Eintauchrichtung in unmittelbarer Nähe eines solchen Messbereiches auf der freien, noch nicht passivierten Trägersubstratoberfläche adsorbiert werden, noch bevor diese mit dem in der Passivierungslösung enthaltenen BSA passiviert werden können. Da diese aus den Messbereichen herausgelöst und in der Nachbarschaft wieder adsorbierten Probenanteile auch immer einen gewissen Gehalt an nachzuweisenden Analyten enthalten, wird beim Auslesen an besagten Stellen ein entsprechendes Fluoreszenzsignal sichtbar.

Fig. 3B zeigt ein typisches Bild der Fluoreszenzsignale eines Mikroarrays nach einem Assay zum Nachweis von p53, wobei freie Flächen zwischen den Spots mittels des Sprühverfahrens (gemäß 2.3.2.) passiviert wurden. Die Signale aus den Referenzspots sind sowohl hinsichtlich ihrer Form und Gleichmässigkeit bzw. Homogenität als auch ihrer Intensität vergleichbar mit denen eines Mikroarrays nach Einsatz des Tauchverfahrens. Die Signale aus den Messbereichen mit immobilisierten Zellysaten sind hinsichtlich ihrer Intensität ebenfalls mit den entsprechenden Messsignalen aus den Mikroarrays vergleichbar, welche dem Tauchverfahren unterzogen worden waren. Aufgrund der beim Sprühverfahren, im Gegensatz

zum Tauchverfahren, zu vernachlässigenden Strömungen von Passivierungslösung auf der Trägersubstratoberfläche zeigen die Zellysatspots jedoch nicht die oben beschriebenen „Verschmierungen“, sondern lediglich kleinere „Auswüchse“ mit geringerer Fluoreszenzintensität, die offensichtlich annähernd statistisch um die vorgesehenen Spots herum angeordnet sind. Diese werden mit grosser Wahrscheinlichkeit durch das lokale Lösen und Ausfliessen von nicht fest gebundenem Zellysats an den Rändern der Messbereiche verursacht, da die hier auftreffenden kleinen Spray-Tröpfchen der Passivierungslösung beim Auftreffen auf der Oberfläche einen nicht zu vernachlässigenden Impuls senkrecht zur beschichtenden Oberfläche aufweisen, was zur Erzeugung von Spritzern führen kann.

Fig. 3C zeigt ein typisches Bild der Fluoreszenzsignale eines Mikroarrays nach einem Assay zum Nachweis von p53, wobei freie Flächen zwischen den Messbereichen mittels des erfindungsgemässen Verfahrens durch Vernebelung von Passivierungslösung, wie unter 1. beschrieben, passiviert wurden. Auffallend ist hier, im Vergleich zu den mit den anderen beschriebenen Methoden passivierten Mikroarrays, die hohe Qualität mit vergleichbar guter Homogenität und Form von Referenzspots und Zellysatspots. „Verschmierungen“ oder „Auswüchse“ der Zellysatspots können hier vermieden werden aufgrund der, abgesehen von Einflüssen der Schwerkraft, im wesentlichen ungerichteten und impulsfreien Aufbringung der Passivierungslösung in Form feinsten Nebeltröpfchen, deren Grösse deutlich unter derjenigen durch Versprühen hergestellter Tröpfchen liegt.

Die Effizienz der Passivierung der von Komponenten aus der immobilisierten Probe freien Oberfläche, d.h. das Ausmass der Unterdrückung unspezifischer Bindung mittels des in der Passivierungslösung enthaltenen BSA, lässt sich aus der in den von Spots freien Bereichen gemessenen Signalintensität (zwischen den Spots, „Hintergrundsignale“) semiquantitativ ermitteln. Eine unvollständig mit BSA bedeckte Oberfläche würde demnach aufgrund zumindest teilweise auftretender unspezifischer Bindung der im Assay verwendeten fluoreszenzmarkierten Detektionsreagentien (Alexa 647 anti-rabbit-Fab) auf die BSA-freie Oberfläche ein höheres Signal ergeben als eine durchgehend mit BSA beschichtete Oberfläche.

Fig. 4A zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Hintergrundsignalintensitäten, die zwischen allen Spots der mithilfe der drei verschiedenen Verfahren passivierten freien Trägersubstratoberflächen mit den darauf erzeugten Mikroarrays bestimmt wurden. Die

Bezeichnungen A, B und C beziehen sich, ebenso wie in Fig. 4B, Fig. 5A und Fig. 5B auf Passivierung mittels des Tauchverfahrens (A), Sprühverfahrens (B) bzw. Verfahren durch Vernebelung der Passivierungslösung (C). Es zeigt sich anhand der gemessenen (niedrigeren) Hintergrundsignalintensitäten überraschenderweise, dass die Passivierungseffizienz nach Behandlung mit dem Sprühverfahren und dem erfindungsgemässen Vernebelungsverfahren deutlich höher als nach Anwendung des Tauchverfahrens zur Oberflächenpassivierung ist. Ausserdem ist die Standardabweichung der Hintergrundsignalintensitäten nach Anwendung des Sprüh- oder des erfindungsgemässen Vernebelungsverfahrens mit 11 - 12% jeweils deutlich niedriger als nach Einsatz des Tauchverfahrens zur Oberflächenpassivierung, was zu einer Standardabweichung der Hintergrundsignalintensitäten von 34% führte. Hieraus wird geschlossen, dass auch die Gleichmässigkeit bzw. Homogenität der Beschichtung nach Anwendung des Sprüh- oder des Vernebelungsverfahrens höher als nach Einsatz des Tauchverfahrens ist.

Fig. 4B zeigt die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller Referenzspots der Mikroarrays, wobei die freien Oberflächen der zugehörigen Trägersubstrate wiederum mit den drei unterschiedlichen Beschichtungsverfahren behandelt wurden. Überraschend zeigt sich aus dem Vergleich, dass die Signalintensität nach Anwendung des Sprühverfahrens leicht und nach Anwendung des Vernebelungsverfahrens deutlich (nämlich um etwa 60 %), im Vergleich zu den Signalen nach Anwendung des Tauchverfahrens, erhöht ist. Diese Unterschiede werden auf die Verminderung des Volumens an aufgebrachtener Passivierungslösung, welche wahrscheinlich die zur Referenzierung aufgetragenen Cy5-BSA-Verbindungen teilweise ablösen kann, sowie auf die nahezu impulsfreie Aufbringung der Passivierungslösung im Falle des Vernebelungsverfahrens zurückgeführt.

Fig. 5A zeigt die gemittelten Intensitäten und Standardabweichungen der Fluoreszenzsignale aus den zum Analytnachweis vorgesehenen Messbereichen der Mikroarrays, deren Trägersubstratoberflächen jeweils mit den unterschiedlichen Passivierungsverfahren behandelt wurden und welche danach mit Lösungen des Antikörpers A1 (anti-p53) (Fig. 5A, oben) und A2 (anti-Phospho-p53) (Fig. 5A, unten) und anschliessend jeweils für den Nachweis mittels Fluoreszenzdetektion mit Alexa 647 Fluor anti-Kaninchen F_{ab} -Fragmenten inkubiert wurden. Die gemessenen Fluoreszenzsignalintensitäten korrelieren mit dem jeweils in einem Zellysat enthaltenen relativen Gehalt an Analyten (entsprechend der

Zellysatkonzentration; höheres Signal entsprechend einer höheren Analytkonzentration, wobei die Korrelation offensichtlich nicht linearer Natur ist).

Im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Vorbehandlung (jeweils gekennzeichnet in Fig. 5A und Fig. 5B als „Control“) zeigen das Lysat der mit UV-Licht (jeweils gekennzeichnet in Fig. 5A und Fig. 5B mit „+UV“) und insbesondere der mit Doxorubicin behandelten HT29-Zellkultur (jeweils gekennzeichnet in Fig. 5A und Fig. 5B mit „+Dx“) einen deutlich erhöhten Gehalt an p53, hervorgerufen durch einen Anstieg der Expression dieses Proteins in den betreffenden Zellen.

Demgegenüber zeigt Fig. 5B, dass der Gehalt an Phospho-p53 in der mit UV-Licht behandeltem Probe ebenfalls deutlich im Vergleich zu der Kontrollprobe erhöht ist, während der Gehalt an Phospho-p53 in der mit Doxorubicin behandelten Probe trotz massiv erhöhter Gesamtkonzentration an p53 nur geringfügig über (im Fall der Lysatkonzentrationen von 0.2 mg/ml bis 0.4 mg/ml) oder sogar unter (im Fall der Lysatkonzentration von 0.1 mg/ml) demjenigen der Kontrollprobe liegt. Dieses zeigt, dass der durch DNA-Schädigung induzierte Signalweg, in dem Phospho-p53 als Schlüsselprotein zur Regulation fungiert, in dieser Zelllinie deutlich auf Behandlung mit UV-Licht, jedoch offensichtlich nur schwach auf Behandlung mit Doxorubicin anspricht.

Wesentlich bezüglich des Einflusses der unterschiedlichen eingesetzten Verfahren zur Passivierung der freien Trägersubstratoberflächen ist, dass die gemessenen Signalintensitäten aus den Messbereichen zum Analytnachweis unter Berücksichtigung der experimentell bedingten Variationen (Fehlerbalken) nicht statistisch signifikant unterschiedlich, d.h. unabhängig von der durchgeführten Beschichtungsmethode zur Oberflächenpassivierung sind. Dieses bedeutet, dass – offensichtlich im Gegensatz zu den Effekten auf die zur Referenzierung eingesetzten Cy5-BSA-Verbindungen - die unterschiedlichen Passivierungsmethoden sich im Einfluss auf die auf den Trägersubstraten adsorbierten Zellysate nicht unterscheiden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das erfindungsgemäße Verfahren zum Aufbringen der Passivierungslösung auf die Trägersubstratoberfläche mittels Vernebelung, im Gegensatz zum herkömmlichen Tauchverfahren und auch zum Sprühverfahren, deutliche Vorteile bietet und die gestellten Anforderungen vollumfänglich erfüllt. Für den Fachmann ist

ersichtlich, dass das in den vorangehenden Ausführungsbeispielen dargestellte Verfahren für die Trägersubstratbeschichtung zur Oberflächenpassivierung direkt auf Beschichtungen mit geeigneten Haftvermittlungsschichten übertragbar und in dieser Weise verallgemeinerbar ist.

Ansprüche:

1. Apparatur zur Beschichtung von Trägersubstraten zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren, umfassend:
 - ein Behältnis zur Aufnahme zu vernebelnder Flüssigkeit
("Flüssigkeitsbehältnis") mit darin enthaltenen, auf mindestens einer Oberfläche besagter Trägersubstrate abzuscheidenden Stoffen (Verbindungen) sowie eines über der Flüssigkeit im Betriebszustand erzeugten Nebelvolumens,
 - einen Aktuator zur Veranlassung des Vernebelungsprozesses und
 - eine Halterung zur Aufnahme und Lagerung der Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses, dadurch gekennzeichnet,
dass sich die Trägersubstrate in keinem Kontakt zur Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit befinden.
2. Apparatur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Aktuator der Erzeugung von Ultraschall dient.
3. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Aktuator die Membran eines Ultraschall-Generators umfasst.
4. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Aktuator im Betriebszustand in zu vernebelnde Flüssigkeit eingetaucht ist.
5. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich einen Tropfenabscheider umfasst.
6. Apparatur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider für Dampf und Nebel undurchlässig ist.
7. Apparatur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider für Tropfen bis zu einer definierten Grösse durchlässig ist.
8. Apparatur nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider die Form eines konkaven Spiegels hat.

9. Apparatur nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider ein feinmaschiges Netz umfasst, mit dessen Maschenabstand die maximale Grösse durchzulassender Tropfen festgelegt wird.
10. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 – 9, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich mindestens einen Gas-Einlass umfasst.
11. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –10, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich Vorkehrungen zur Erzeugung einer gleichmässigen Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuschheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate umfasst.
12. Apparatur nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Vorkehrungen zur Erzeugung einer gleichmässigen Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuschheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate einen Ventilator umfassen.
13. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –12, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung der Temperatur der zu vernebelnden Flüssigkeit und / oder einzelner oder aller Wände des Flüssigkeitsbehältnisses umfasst.
14. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –13, dadurch gekennzeichnet, dass die Halterung der Beschichtungsapparatur zur Aufnahme und / oder Lagerung der Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses thermostatisierbar ist.
15. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –14, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung des Drucks innerhalb des Flüssigkeitsbehältnisses während des Beschichtungsprozesses umfasst.
16. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –15, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich Vorkehrungen zur Rotation der Trägersubstrate um eine Achse senkrecht zur Halterungsebene umfasst.

17. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –16, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich Vorkehrungen zum Auffangen und zur Rückführung / Wiedergewinnung an den Wänden des Flüssigkeitsbehältnisses abgeschiedener vernebelter Flüssigkeit umfasst.
18. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –17, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich Vorkehrungen zur Erleichterung der Reinigung des Flüssigkeitsbehältnisses umfasst.
19. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –18, dadurch gekennzeichnet, dass diese zusätzlich Vorkehrungen zur kontrollierten Einstellung und / oder Variation des Abstandes zwischen der Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit und zu beschichtenden Oberflächen der Trägersubstrate umfasst.
20. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –18, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägersubstrate in der Halterung im wesentlichen horizontal gelagert sind.
21. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –20, dadurch gekennzeichnet, dass das Flüssigkeitsbehältnis, abgesehen von optionalen Einlässen für Gas und optionalen zusätzlichen Auslässen für Gas und / oder Nebel, geschlossen ist.
22. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –21, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um niederviskose Flüssigkeiten mit einer Viskosität von weniger als 3 cP handelt.
23. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –22, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um wässrige Lösungen handelt.
24. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –22, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um organische Lösungen handelt.
25. Apparatur nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um alkoholische Lösungen handelt.

26. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –25, dadurch gekennzeichnet, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate im wesentlichen planar sind.
27. Apparatur nach einem der Ansprüche 1 –26, dadurch gekennzeichnet, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate aus einer oder mehreren Schichten bestehen.
28. Verfahren zur Beschichtung von Trägersubstraten zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren, dadurch gekennzeichnet, dass
- besagte zu beschichtende Trägersubstrate in eine Halterung einer Beschichtungsapparatur nach einem der Ansprüche 1 – 40 eingelegt werden,
 - in dem Flüssigkeitsbehältnis besagter Beschichtungsapparatur enthaltene Flüssigkeit vernebelt wird und
 - aus dem erzeugten Nebel eine Abscheidung von in der vernebelten Flüssigkeit enthaltenen Stoffen (Verbindungen) auf den zu beschichtenden Trägersubstraten erfolgt,
- wobei sich die Trägersubstrate in keinem Kontakt zur Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit befinden.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass besagter Aktuator der Erzeugung von Ultraschall dient.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 - 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Aktuator besagter Beschichtungsapparatur die Membran eines Ultraschall-Generators umfasst und die Vernebelung von Flüssigkeit mittels darin erzeugter Ultraschallwellen geschieht.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 30, dadurch gekennzeichnet, dass der Aktuator besagter Beschichtungsapparatur im Betriebszustand in zu vernebelnde Flüssigkeit eingetaucht ist.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtungsapparatur zusätzlich einen Tropfenabscheider umfasst, welcher den

Kontakt von Spritzern und grossen Tropfen aus der zu vernebelnden Flüssigkeit mit den zu beschichtenden Trägersubstraten verhindert.

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider besagter Beschichtungsapparatur für Dampf und Nebel undurchlässig ist.
34. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider besagter Beschichtungsapparatur für Tropfen bis zu einer definierten Grösse durchlässig ist.
35. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider besagter Beschichtungsapparatur die Form eines konkaven Spiegels hat.
36. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass der Tropfenabscheider besagter Beschichtungsapparatur ein feinmaschiges Netz umfasst, mit dessen Maschenabstand die maximale Grösse durchzulassender Tropfen festgelegt wird.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtungsapparatur zusätzlich mindestens einen Gas-Einlass umfasst, über den ein Gas in das Flüssigkeitsbehältnis eingelassen wird, welches Gas sich mit dem erzeugten Nebel vermischt.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 - 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Erzeugung einer gleichmässigen Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuscheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate umfasst.
39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass mithilfe eines Ventilators eine gleichmässige Verteilung des erzeugten und auf den Trägersubstraten abzuscheidenden Nebels in der Umgebung besagter Trägersubstrate erzeugt wird.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 –39, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung der Temperatur der zu vernebelnden Flüssigkeit und / oder einzelner oder aller Wände

des Flüssigkeitsbehältnisses umfasst und die Temperatur der zu vernebelnden Flüssigkeit und / oder einzelner oder aller Wände des Flüssigkeitsbehältnisses während des Beschichtungsprozesses kontrolliert und / oder variiert wird.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Halterung der Beschichtungsapparatur zur Aufnahme und / oder Lagerung der Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses thermostatisiert wird.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 - 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur Kontrolle und / oder Regelung des Drucks innerhalb des Flüssigkeitsbehältnisses während des Beschichtungsprozesses umfasst und der Druck während des Beschichtungsprozesses kontrolliert und / oder variiert wird.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägersubstrate während des Beschichtungsprozesses um eine Achse senkrecht zur Halterungsebene rotiert werden.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 43, dadurch gekennzeichnet, dass an den Wänden des Flüssigkeitsbehältnisses abgeschiedene Flüssigkeit aufgefangen und zu der zu vernebelnden Flüssigkeit zurückgeführt wird.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 - 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtungsapparatur zusätzlich Vorkehrungen zur kontrollierten Einstellung und / oder Variation des Abstandes zwischen der Oberfläche der zu vernebelnden Flüssigkeit und zu beschichtenden Oberflächen der Trägersubstrate umfasst und damit ein wohldefinierter Abstand zwischen besagter Flüssigkeit und den zu beschichtenden Flüssigkeitsoberflächen für den Zeitraum des Beschichtungsprozesses eingestellt wird.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 45, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägersubstrate der Beschichtungsapparatur in der Halterung im wesentlichen horizontal gelagert werden.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 46, dadurch gekennzeichnet, dass das Flüssigkeitsbehältnis der Beschichtungsapparatur, abgesehen von optionalen Einlässen für Gas und optionalen zusätzlichen Auslässen für Gas und / oder Nebel, geschlossen ist.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 47, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um niederviskose Flüssigkeiten mit einer Viskosität von weniger als 3 cP handelt.
49. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 48, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um wässrige Lösungen handelt.
50. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 49, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um organische Lösungen handelt.
51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den zu vernebelnden Flüssigkeiten um alkoholische Lösungen handelt.
52. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 - 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung der Trägersubstrate geometrisch strukturiert unter Verwendung von auf den zu beschichtenden Trägersubstraten aufgetragenen Masken erfolgt.
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 52, dadurch gekennzeichnet, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate im wesentlichen planar sind.
54. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 53, dadurch gekennzeichnet, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate aus einer oder mehreren Schichten bestehen.
55. Verfahren nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Schicht der zu beschichtenden Trägersubstrate in der Ausbreitungsrichtung eines eingestrahnten Anregungslichts oder Messlichts im wesentlichen optisch transparent ist.
56. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 55, dadurch gekennzeichnet, dass die zu beschichtenden Trägersubstrate den Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem

Affinitäts-Nachweisverfahren mittels Detektion einer oder mehrerer angeregter Lumineszenzen ermöglichen.

57. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 56, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der auf den Trägersubstraten abgeschiedenen Schicht um eine Haftvermittlungsschicht handelt.
58. Verfahren nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Haftvermittlungsschicht eine Dicke von weniger als 200 nm, bevorzugt von weniger als 20 nm hat.
59. Verfahren nach einem der Ansprüche 57 – 58, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Haftvermittlungsschicht eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, welche Silane, funktionalisierte Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und “selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Mehrfachschichten”, Thiole, Alkylphosphate und –phosphonate, multifunktionelle Block-Copolymere, wie beispielsweise Poly(L)ysin/Polyethylenglycole, umfassen.
60. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 – 59, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Trägersubstrate ein oder mehrere spezifische Bindungspartner zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren (unter Bindung des Bindungspartners aus einer zugeführten Lösung an den immobilisierten Bindungspartner) immobilisiert sind.
61. Verfahren nach Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche besagter Trägersubstrate immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um den einen oder die mehreren Analyten selbst handelt, welche eingebettet in eine native Probenmatrix oder in einer mit einem oder mehreren Aufbereitungsschritten modifizierten Form der Probenmatrix immobilisiert sind.
62. Verfahren nach Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche besagter Trägersubstrate immobilisierten spezifischen Bindungspartnern um biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung eines oder mehreren in einer zugeführten Probe befindlicher Analyten handelt.

63. Verfahren nach einem der Ansprüche 60 – 62, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Bindungspartner, d.h. die selbst immobilisierten nachzuweisenden oder in einer zugeführten Probe nachzuweisenden Analyten und / oder deren immobilisierte oder in einem zugeführten Nachweisreagens zugeführte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ausgewählt sind aus der Gruppe, welche Proteine, beispielsweise mono- oder polyklonale Antikörper und Antikörperfragmente, Peptide, Enzyme, Glycopeptide, Oligosaccharide, Lektine, Antigene für Antikörper, mit zusätzlichen Bindungsstellen funktionalisierte Proteine („Tag-Proteine“, wie beispielsweise „Histidin-Tag-Proteine“) sowie Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotide) und Nukleinsäureanaloge (z. B. PNA), Aptamere, membrangebundene und isolierte Rezeptoren und deren Liganden, durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürliche und künstliche Polymere, etc. umfasst.
64. Verfahren nach einem der Ansprüche 60 – 63, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche besagter Trägersubstrate aufgebrachte spezifische Bindungspartner in diskreten Messbereichen (Spots) immobilisiert sind, welche eine beliebige Geometrie, beispielsweise kreisförmige, ovale, dreieckige, rechteckige, polygonartige Form etc. haben können, wobei ein einzelner Messbereich gleichartige oder unterschiedliche spezifische Bindungspartner enthalten kann.
65. Verfahren nach Anspruch 64, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen oder in unbesetzten Teilbereichen innerhalb dieser Messbereiche gegenüber den Analyten und / oder gegenüber seinen Bindungspartnern „chemisch neutrale“ Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, welche Albumine, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifische, polyklonale oder monoklonale, artfremde oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten und deren Bindungspartner unspezifische Antikörper (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 -, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierende, fragmentierte natürliche oder synthetische DNA, wie beispielsweise Extrakte von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für

Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladene, aber hydrophile Polymere, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, umfassen.

66. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 - 64, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der auf den Trägersubstraten abgeschiedenen Schicht um eine Passivierungsschicht handelt, welche zwischen den räumlich getrennten Messbereichen oder in unbesetzten Teilbereichen innerhalb dieser Messbereiche gegenüber den Analyten und / oder gegenüber seinen Bindungspartnern "chemisch neutrale" Verbindungen nach der Erzeugung dieser Messbereiche aufgebracht wird und vorzugsweise beispielsweise Verbindungen umfasst aus den Gruppen, welche Albumine, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifische, polyklonale oder monoklonale, artfremde oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten und deren Bindungspartner unspezifische Antikörper (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 -, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierende, fragmentierte natürliche oder synthetische DNA, wie beispielsweise Extrakte von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladene, aber hydrophile Polymere, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, umfassen.
67. Trägersubstrat zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren umfassend eine Haftvermittlungsschicht, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Haftvermittlungsschicht mit einem Beschichtungsverfahren nach einem der Ansprüche 28 – 66 erzeugt wird.
68. Trägersubstrat zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einem Affinitäts-Nachweisverfahren umfassend eine das Trägersubstrat zumindest in Teilbereichen bedeckende Passivierungsschicht, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Passivierungsschicht mit einem Beschichtungsverfahren nach einem der Ansprüche 28 – 66 erzeugt wird.
69. Trägersubstrat nach einem der Ansprüche 67 – 68 zur Anwendung in der Human- und / oder Tierdiagnostik.

Fig. 1:

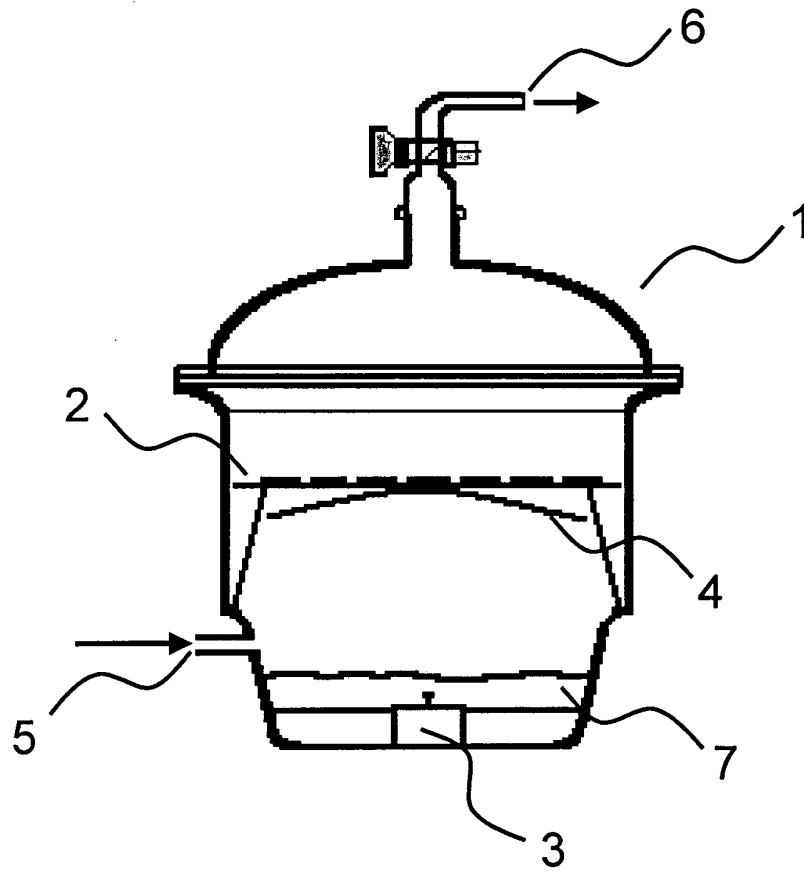


Fig. 2:

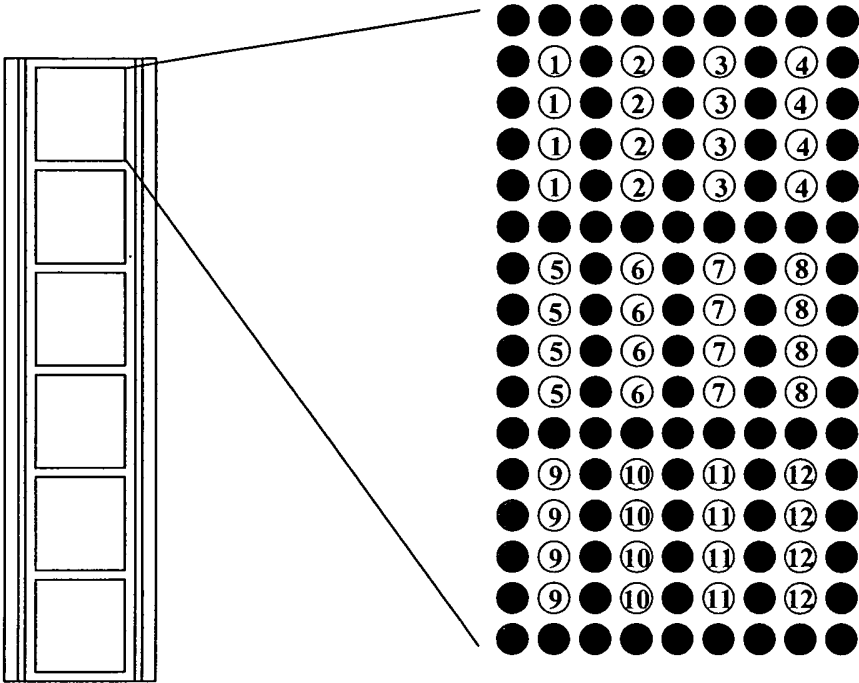


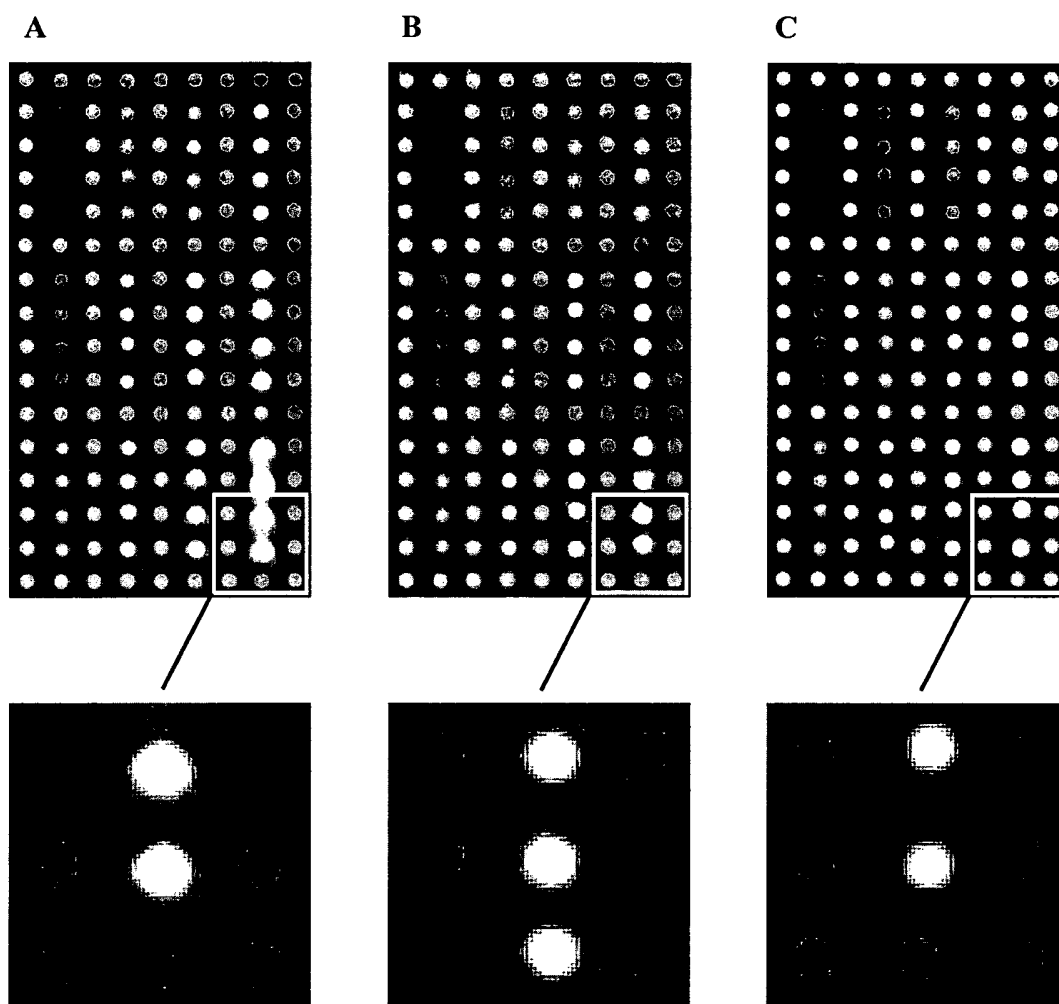
Fig. 3:

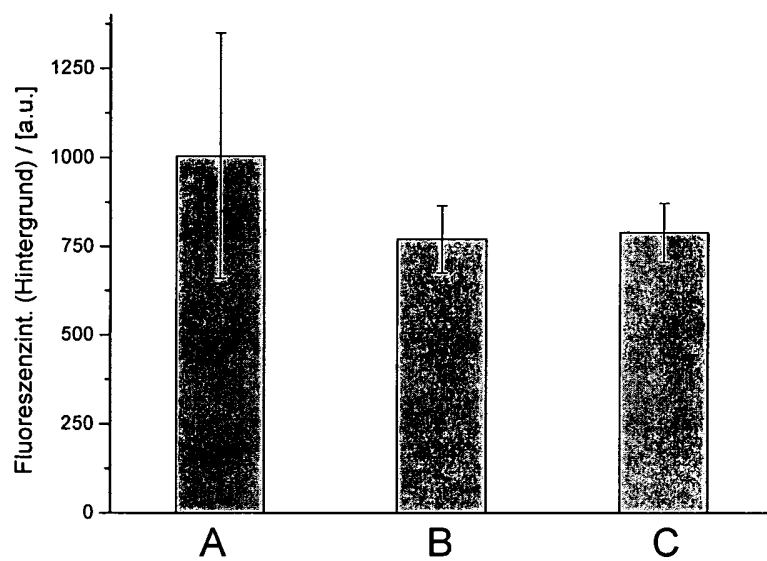
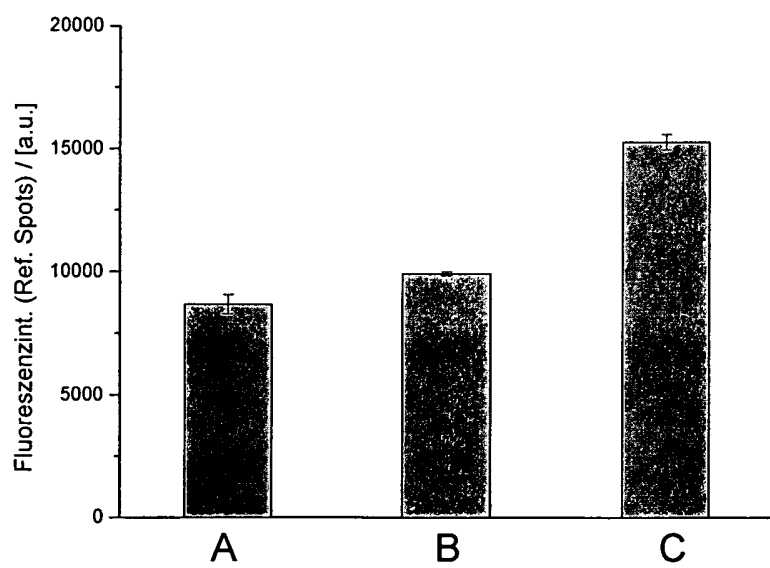
Fig. 4A:**Fig. 4B:**

Fig. 5A:

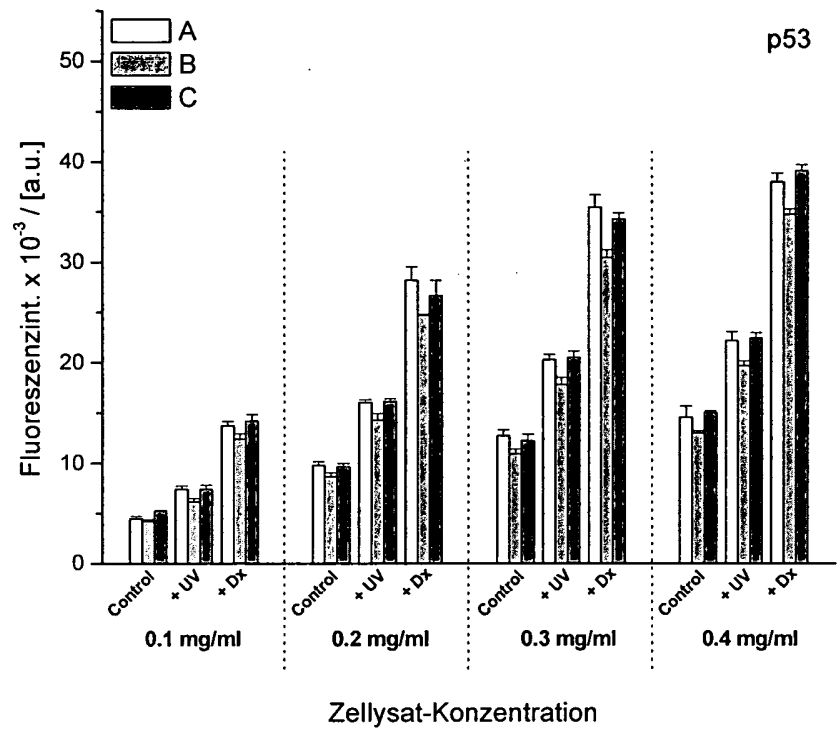
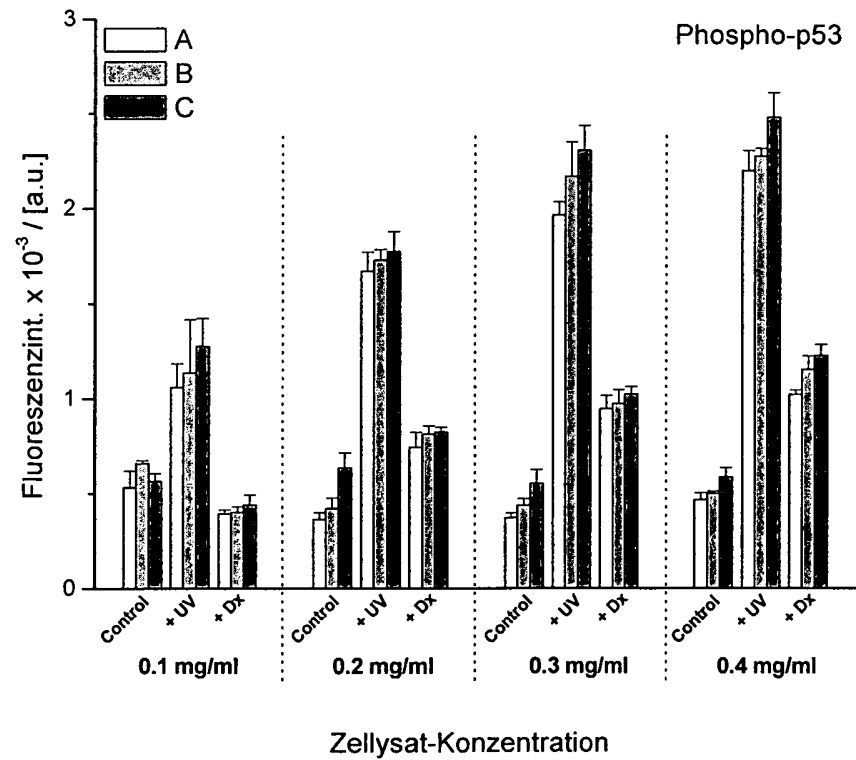


Fig. 5B:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/003726

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/00 B05B17/06 B05D1/02
ADD. G01N35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B05B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 336 (C-623), 27 July 1989 (1989-07-27) -& JP 01 115450 A (SEIKO EPSON CORP), 8 May 1989 (1989-05-08) abstract	1-4, 10-14, 16-19, 22-27
A		28
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 437 (C-1238), 16 August 1994 (1994-08-16) -& JP 06 134367 A (MURATA MFG CO LTD), 17 May 1994 (1994-05-17) abstract	1-4, 13, 14, 17, 18, 22-27
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2006

Date of mailing of the international search report

06/09/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brévier, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/003726

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 133 (C-0925), 6 April 1992 (1992-04-06) -& JP 03 296460 A (FUJITSU GENERAL LTD), 27 December 1991 (1991-12-27) abstract -----	1-4, 13, 14, 17, 18, 20, 22-27
X	EP 0 614 055 A (BONZI, MARIO) 7 September 1994 (1994-09-07) -----	1-15, 17, 21-27
X	EP 0 486 393 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; COMMISSARIAT A L'ENERGIE) 20 May 1992 (1992-05-20) page 6, line 50 - page 7, line 19; figure 1 -----	1-5, 10-14, 17, 18, 22-27
X	WO 03/050517 A (ZEPTOSENS AG; KRESBACH, GERHARD, M; OROSZLAN, PETER; SCHAER, MARTIN) 19 June 2003 (2003-06-19) page 12, paragraph 3 -----	67, 69
X	WO 2004/099430 A (FRIZ BIOCHEM GMBH; HARTWICH, GERHARD) 18 November 2004 (2004-11-18) page 20, lines 23-30 -----	68, 69
A	US 5 881 714 A (YOKOI ET AL) 16 March 1999 (1999-03-16) column 5, lines 7-35; figure 3 -----	6-8
A	US 5 832 176 A (JUNG ET AL) 3 November 1998 (1998-11-03) column 5, line 55 - column 6, line 24; figures -----	13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/003726

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 01115450	A	08-05-1989	NONE	
JP 06134367	A	17-05-1994	NONE	
JP 03296460	A	27-12-1991	NONE	
EP 0614055	A	07-09-1994	DE 69404698 D1 DE 69404698 T2 IT 1271969 B US 5464572 A	11-09-1997 08-01-1998 10-06-1997 07-11-1995
EP 0486393	A	20-05-1992	FR 2669246 A1 JP 4290578 A	22-05-1992 15-10-1992
WO 03050517	A	19-06-2003	AU 2002357547 A1 EP 1454127 A1	23-06-2003 08-09-2004
WO 2004099430	A	18-11-2004	DE 10320312 A1 EP 1656556 A2	02-12-2004 17-05-2006
US 5881714	A	16-03-1999	WO 9702856 A1	30-01-1997
US 5832176	A	03-11-1998	JP 9119686 A KR 144065 B1	06-05-1997 01-08-1998

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N33/00 B05B17/06 B05D1/02
ADD. G01N35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

B05B G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 013, Nr. 336 (C-623), 27. Juli 1989 (1989-07-27) -& JP 01 115450 A (SEIKO EPSON CORP), 8. Mai 1989 (1989-05-08) Zusammenfassung	1-4, 10-14, 16-19, 22-27
A		28
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 018, Nr. 437 (C-1238), 16. August 1994 (1994-08-16) -& JP 06 134367 A (MURATA MFG CO LTD), 17. Mai 1994 (1994-05-17) Zusammenfassung	1-4, 13, 14, 17, 18, 22-27
	----- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. August 2006

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/09/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Brévier, F

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 016, Nr. 133 (C-0925), 6. April 1992 (1992-04-06) -& JP 03 296460 A (FUJITSU GENERAL LTD), 27. Dezember 1991 (1991-12-27) Zusammenfassung -----	1-4, 13, 14, 17, 18, 20, 22-27
X	EP 0 614 055 A (BONZI, MARIO) 7. September 1994 (1994-09-07) -----	1-15, 17, 21-27
X	EP 0 486 393 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; COMMISSARIAT A L'ENERGIE) 20. Mai 1992 (1992-05-20) Seite 6, Zeile 50 - Seite 7, Zeile 19; Abbildung 1 -----	1-5, 10-14, 17, 18, 22-27
X	WO 03/050517 A (ZEPTOSENS AG; KRESBACH, GERHARD, M; OROSZLAN, PETER; SCHAER, MARTIN) 19. Juni 2003 (2003-06-19) Seite 12, Absatz 3 -----	67, 69
X	WO 2004/099430 A (FRIZ BIOCHEM GMBH; HARTWICH, GERHARD) 18. November 2004 (2004-11-18) Seite 20, Zeilen 23-30 -----	68, 69
A	US 5 881 714 A (YOKOI ET AL) 16. März 1999 (1999-03-16) Spalte 5, Zeilen 7-35; Abbildung 3 -----	6-8
A	US 5 832 176 A (JUNG ET AL) 3. November 1998 (1998-11-03) Spalte 5, Zeile 55 - Spalte 6, Zeile 24; Abbildungen -----	13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/003726

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
JP 01115450	A	08-05-1989	KEINE		
JP 06134367	A	17-05-1994	KEINE		
JP 03296460	A	27-12-1991	KEINE		
EP 0614055	A	07-09-1994	DE	69404698 D1	11-09-1997
			DE	69404698 T2	08-01-1998
			IT	1271969 B	10-06-1997
			US	5464572 A	07-11-1995
EP 0486393	A	20-05-1992	FR	2669246 A1	22-05-1992
			JP	4290578 A	15-10-1992
WO 03050517	A	19-06-2003	AU	2002357547 A1	23-06-2003
			EP	1454127 A1	08-09-2004
WO 2004099430	A	18-11-2004	DE	10320312 A1	02-12-2004
			EP	1656556 A2	17-05-2006
US 5881714	A	16-03-1999	WO	9702856 A1	30-01-1997
US 5832176	A	03-11-1998	JP	9119686 A	06-05-1997
			KR	144065 B1	01-08-1998