



⑫ PATENTSCHRIFT A5

615 759

⑪ Gesuchsnummer: 10987/75

⑬ Inhaber:  
General Electric Company, Schenectady/NY  
(US)

⑫ Anmeldungsdatum: 25.08.1975

⑭ Erfinder:  
Ivar Giaever, Schenectady/NY (US)

⑬ Priorität(en): 03.09.1974 US 503030

⑮ Vertreter:  
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑭ Patent erteilt: 15.02.1980

⑯ Patentschrift  
veröffentlicht: 15.02.1980

⑭ Verfahren zum Nachweisen biologischer Teilchen.

⑮ Eine monomolekulare Schicht von ersten biologischen Teilchen wird an der Oberfläche eines festen, nichtreaktiven Substrat adsorbiert. Das so beschichtete Substrat wird einer Lösung ausgesetzt, in der man zweite biologische Teilchen, spezifisch zu den ersten biologischen Teilchen, vermutet. Als nächstes wird eine poröse, lichtundurchlässige Schicht aus nichtreaktiven dritten Teilchen auf dem beschichteten Substrat gebildet und letzteres einer Spaltmittellösung ausgesetzt, welche die Bindung zwischen den ersten und zweiten biologischen Teilchen spaltet. Eine visuelle Untersuchung der beschichteten Substratoberfläche durch das blosse Auge oder eine Untersuchung durch ein geeignetes Instrument zeigt, ob die Lösung die zweiten biologischen Teilchen enthält, und zwar durch die Feststellung, ob die lichtundurchlässige Schicht vollständig ist oder Bereiche derselben mit den zweiten biologischen Teilchen entfernt wurden, welche Feststellung durch Kontrastwirkung erleichtert wird.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Diagnostisches Verfahren zum Nachweisen der An- oder Abwesenheit ausgewählter biologischer Teilchen in einer Flüssigkeitsprobe, gekennzeichnet durch folgende Stufen:

- Inberührungsbringen der Oberfläche eines Substrats mit ersten biologischen Teilchen, wobei diese biologischen Teilchen spezifisch für die ausgewählten biologischen Teilchen sind und als eine erste Schicht auf der Oberfläche angeordnet werden,
- Inberührungsbringen der beschichteten Oberfläche des Substrats mit der Flüssigkeitsprobe für eine ausgewählte Zeit,
- Aufbringen einer porösen lichtundurchlässigen Schicht aus Teilchen auf der so behandelten Oberfläche, wobei diese Teilchen nicht mit dem Substrat, den ersten biologischen Teilchen, der Probenflüssigkeit und der nachfolgend anzuwendenden Spaltmittellösung reagieren,
- Inberührungsbringen der durch die vorhergehenden Stufen veränderten Oberfläche mit einer Spaltmittellösung, wobei diese Lösung in der Lage ist, selektiv eine zwischen den ersten biologischen Teilchen und den ausgewählten biologischen Teilchen vorhandene Bindung zu zerstören und
- Untersuchen der porösen lichtundurchlässigen Schicht zur Bestimmung, ob diese Schicht unversehrt ist, oder ob ein Teil davon entfernt wurde, wobei das letztere die Anwesenheit ausgewählter biologischer Teilchen in der Flüssigkeitsprobe anzeigen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Untersuchens mit optischen Instrumenten ausgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Inberührungsbringens der Oberfläche des Substrats mit den ersten biologischen Teilchen im Eintauchen des Substrats besteht, um eine monomolekulare Schicht entlang einer ganzen Hauptoberfläche des Substrats zu bilden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Inberührungsbringens der Oberfläche des Substrats mit den ersten biologischen Teilchen im Aufbringen mindestens eines Tropfens einer konzentrierten Lösung der ersten biologischen Teilchen auf einem kleinen Bereich der Hauptoberfläche des Substrats besteht.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Inberührungsbringens der beschichteten Oberfläche des Substrats mit der Flüssigkeitsprobe durch Eintauchen des Substrats ausgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Inberührungsbringens der beschichteten Oberfläche des Substrats mit der Flüssigkeitsprobe durch Aufbringen mindestens eines Tropfens der Flüssigkeitsprobe auf einem kleinen Bereich der beschichteten Oberfläche ausgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Aufbringens der porösen, lichtundurchlässigen Schicht im leichten Aufsprühen eines Ärosols aus Teilchen inerten Materials auf die beschichtete Oberfläche besteht.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Aufbringens der porösen, lichtundurchlässigen Schicht im Aufbringen einer dünnen Schicht aus Metallteilchen besteht.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Aufbringens der porösen, lichtundurchlässigen Schicht im Aufbringen einer dünnen Schicht aus kleinen Glasteilchen auf die Oberfläche besteht.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Aufbringens der porösen, lichtundurchlässigen Schicht im Aufbringen einer dünnen Schicht aus kleinen Teilchen aus Kunststoff auf die Oberfläche besteht.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die poröse lichtundurchlässige Schicht für das bloße Auge erkennbar ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Inberührungsbringens der mit der Spaltmittellösung veränderten Oberfläche durch Aufbringen mindestens eines Tropfens einer schwachen Säure auf einen kleinen Bereich der porösen, lichtundurchlässigen Schicht besteht.

13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe des Inberührungsbringens der mit der Spaltmittellösung veränderten Oberfläche durch Eintauchen des Substrats in eine Lösung einer schwachen Säure ausgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Spaltmittellösung eine Säurelösung mit einem pH-Wert in einem Bereich von 1–5 ist.

15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Spaltmittellösung eine alkalische Lösung mit einem pH-Wert in einem Bereich von 9–13 ist.

16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Spaltmittellösung eine Lösung höherer Salzkonzentration ist.

17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe der Untersuchung durch betrachten mit in durchgehendem Licht ausgeführt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten biologischen Teilchen ein besonderes Antigen sind.

19. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten biologischen Teilchen ein biologisches Substrat sind, das mit einem besonderen Enzym reagiert, welches die ausgewählten biologischen Teilchen darstellen.

20. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe der Untersuchung durch Betrachten mit reflektiertem Licht ausgeführt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es weiter die Stufe des Spülens der Oberfläche des Substrats umfasst, nachdem die monomolekulare Schicht aus ersten biologischen Teilchen daran adsorbiert worden ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass destilliertes Wasser für die Stufe des Spülens benutzt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten biologischen Teilchen ein besonderer Antikörper sind.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die ausgewählten biologischen Teilchen ein Antigen sind, zu welchem der besondere Antikörper spezifisch ist.

25. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die ersten biologischen Teilchen ein besonderes Enzym sind.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die ausgewählten biologischen Teilchen ein besonderes biologisches Substrat sind, das mit dem Enzym reagiert.

27. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die Stufe des Spülens der beschichteten Oberfläche nach Inberührung bringen mit der Flüssigkeitsprobe umfasst.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass destilliertes Wasser zum Spülen nach Inberührungbringen mit der Flüssigkeitsprobe benutzt wird.

29. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass es die Stufe des Trocknens der beschichteten Oberfläche umfasst, nachdem sie mit der Flüssigkeitsprobe in Berührung gebracht und gespült wurde.

Die Erfindung betrifft ein diagnostisches Verfahren zum Nachweisen der An- oder Abwesenheit ausgewählter biologischer Teilchen in einer Flüssigkeitsprobe.

In der DT-OS 2 330 702 ist ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens für den Nach-

weis und die Reinigung von Proteinen und Antikörpern beschrieben und beansprucht. Gegenstand der älteren deutschen Patentanmeldung P 24 33 246.5 ist ein verbessertes Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis und zur Reinigung von Proteinen und Antikörpern.

Weitere Publikationen sind der Artikel von Irving Langmuir et al «Optical Measurement of the Thickness of a Film Adsorbed from a Solution» in Journal of the American Chemical Society, Band 59, Seite 1 406, der Artikel von Alexandre Rothen «Immunologic and Enzymatic Reactions Carried Out at a Solid-Liquid Interface» in der Zeitschrift Physiological Chemistry and Physics Band 5, 1973, Seiten 243–58, der Artikel von Leo Vroman et al «Interactions Among Human Blood Proteins at Interfaces» in Federation Proceedings, Band 30 Nr. 5, Seiten 1 494–1 502, von 1971, der Artikel von Ivar Giaever «Antibody-Antigen-Reaction: A Visual Observation» in the Journal of Immunology, Band 110 Nr. 4, Seiten 1 424–1 426 von 1973 und der Artikel von A.L. Adams et al «Three Simple Ways to Detect Antibody-Antigen-Complex on Flat Surfaces» im Journal of Immunological Methods Band 3, Seiten 227–232 von 1973.

Die immunologischen Reaktionen sind hoch spezifische biophysikalische Reaktionen, bei denen ein erstes immunologisch reaktives biologisches Teilchen (im allgemeinen ein Protein), das als Antigen bekannt ist, sich mit einem zweiten Protein verbindet, das spezifisch zu dem Antigen ist und als Antikörper bekannt ist, wobei sich ein immunologisch komplexiertes Protein bildet. Immunologische Reaktionen, die innerhalb eines biologischen Systems stattfinden, wie einem Tier oder einem Menschen, sind lebenswichtig zum Bekämpfen von Krankheit. In einem biologischen System verursacht der Eintritt eines Fremdproteins, d.h. des Antigens, die Erzeugung der spezifischen Antikörper-Proteine gegenüber dem Antigen durch das biologische System, wobei das Verfahren dieser Erzeugung derzeit noch nicht voll verstanden ist. Einige der wichtigsten Antikörper, die in diagnostischen Reaktionen verwendet werden, stehen jedoch nicht in Beziehung zum Eintritt irgendeines bekannten Fremdmoleküls. Einige Antikörper, wie Anti-A und Anti-B, die bei der Blutgruppenbestimmung benutzt werden, werden natürliche Antikörper genannt, weil sie in menschlichen Seren augenscheinlich ohne das Erfordernis einer vorherigen antigenen Stimulierung gefunden werden. Andere Antikörper scheinen die Fähigkeit zu haben, mit einigen Bestandteilen, die normalerweise im Körper vorhanden sind, zu reagieren. Dies führt zu dem als Autoimmunität oder Autoallergie bekannten pathologischen Zustand. Beispiele solcher Antikörper schließen die antinuklearen Antikörper der allgemeinen Schmetterlingsflechte, die rheumatischen Faktoren der Arthritis deformans und die Antithyroglobulin-Antikörper der chronischen Schilddrüsenentzündung (Hachimotos-Krankheit) ein. Die Antikörper-Proteinmoleküle weisen freie Bindestellen auf, die komplementär zu denen des Antigenmoleküls angeordnet sind, so dass sich Antigen und Antikörper unter Bildung eines immunologisch komplexierten Proteins verbinden können.

Die meisten Antigene sind Proteine oder enthalten als wesentlichen Bestandteil Proteine, während alle Antikörper Proteine sind. Proteine sind grosse Moleküle hohen Molekulargewichtes, d.h. sie sind Polymere, die aus Ketten einer variablen Zahl von Aminosäuren bestehen. In den oben genannten Patentanmeldungen ist offenbart, dass ein beliebiges Protein an einem Substrat nur in einer monomolekularen Schicht haften wird, und dass an der Proteinschicht kein anderes beliebiges Protein haften wird. Es wird sich jedoch das hinsichtlich des ersten an jedem Substrat adsorbierten Proteins spezifisch reagierende Protein mit diesem immunologisch verbinden. Gemäß den Lehren der genannten Patentanmeldungen wurde dies zur Schaffung einer medizinisch diagnostischen Vorrichtung

genutzt, in der ein besonders zubereiteter Objektträger eine daran adsorbierte monomolekulare Proteinschicht trug und dieser dazu verwendet wurde, Lösungen auf die Anwesenheit des darin vermuteten spezifisch mit dem adsorbierten Protein reagierenden Proteins zu untersuchen. Ist das spezifisch reagierende Protein in der Lösung vorhanden, dann weist der Objektträger, nachdem man ihn der Lösung ausgesetzt hat, eine bimolekulare Proteinschicht auf. Ist das spezifisch reagierende Protein dagegen in der Lösung nicht vorhanden, dann weist der Objektträger auch nachdem man ihn der Lösung ausgesetzt hat, nur die ursprüngliche monomolekulare Proteinschicht auf. In den Patentanmeldungen sind auch optische, elektrische und chemische Mittel zum Unterscheiden der monomolekularen und bimolekularen Schichten aus biologischen Teilchen beschrieben, und diese Mittel weisen unterschiedliche Empfindlichkeit und Wirtschaftlichkeit auf. Die Untersuchung des proteinbeschichteten Objektträgers mit dem blossem Auge wäre die bevorzugte Art der Bestimmung der Zahl der Schichten aus biologischen Teilchen auf dem Objektträger, da dies sehr einfach ist und diese Art der Untersuchung ist daher in den vorgenannten Patentanmeldungen offenbart.

Der Nachweis von Antikörpern in einem biologischen System ist von medizinisch diagnostischen Wert bei der Bestimmung der Antigene, denen das System ausgesetzt war. Ein Beispiel des diagnostischen Nachweises von Antikörpern ist der Nachweis der Antikörper der Syphilis oder der Gonorrhöe in menschlichem Serum. Umgekehrt ist auch der Nachweis gewisser Antigene in einem biologischen System von medizinisch diagnostischen Wert. Beispiele für den diagnostischen Nachweis von Antigenen sind der Nachweis von HCG-Proteinmolekülen im Urin als Test für die Schwangerschaft und der Nachweis der mit der Hepatitis verbundenen Antigen (HA)-Moleküle im Blut in Aussicht genommener Blutspender.

Um solche diagnostischen Untersuchungen durchzuführen, muss man erst das geeignete Protein für das biologisches miteinander reagierende Proteinpaares gewinnen. Derzeit muss die Quelle für ein Antikörperprotein ein lebendes biologisches System sein.

Im besonderen sind Wirbeltiere dafür bekannt, dass sie die Einführung eines Fremdproteins mit immunologischen Reaktionen beantworten. So werden z.B. viele Antikörper im Bluts serum von Tieren und Menschen gefunden, die man den entsprechenden Antigenen ausgesetzt hatte. Auch Nicht-Wirbeltiere zeigen immunologische Reaktionen, wenn sie auch wahrscheinlich kein spezifisches Gedächtnis haben. Sogar einige Pflanzenproteine verbinden sich mit Antigenen und die dabei gebildeten sogenannten Lectine (im Englischen «lectins» genannt), können von beträchtlichem Nutzen in diagnostischen Reaktionen sein. Einige Antigene können kontrollierbar in Laboratoriumskulturen hergestellt werden. Die meisten Antigene jedoch, wie z.B. die mit der Hepatitis verbundenen Antigene, sind derzeit, wie Antikörper nur aus lebenden biologischen Systemen erhältlich und daher gewinnt man viele Antigene aus natürlichen Quellen, wie menschlichen oder tierischen Geweben.

Es ist in der Immunologie bekannt, dass Antikörpermoleküle als Antigene wirken, wenn man sie in das System eines Wirbeltieres einführt, für das sie Fremdproteine sind. In einem solchen Wirbeltiersystem können demgemäß spezifisch reagierende Antikörper zu einem gegebenen Antikörper gebildet werden.

Obwohl in der vorliegenden Anmeldung die biologischen Teilchen, die miteinander immunologisch reagieren, besondere Berücksichtigung gefunden haben, ist die Erfindung auch für andere Arten biologischer Wechselwirkungen zwischen grossen Molekülen geeignet, die auf nicht-immunologischen Spezifikationen beruhen, wie z.B. die Bindung von Enzymen an ihre biologischen Substrate oder von Hämoglobin an Haptoglobin.

Obwohl die in den oben genannten Patentanmeldungen beschriebenen Substrate (Objekträger) in ihrer Leistungsfähigkeit zufriedenstellend sind, müssen sie im allgemeinen besonders zubereitet werden, d.h. ein aus Glas oder Kunststoff gebildeter Objekträger wird mit einem Metall beschichtet, um den Kontrast zwischen einer monomolekularen und einer bimolekularen Schicht zu verstärken und dies führt zu zusätzlichen Kosten und einer Komplexität der medizinisch diagnostischen Vorrichtung.

Durch die vorliegende Erfindung wird ein Verfahren zum Nachweisen besonderer biologischer Teilchen mit folgenden Stufen geschaffen:

- Inberührungsbringen der Oberfläche eines Substrats mit ersten biologischen Teilchen, wobei diese biologischen Teilchen spezifisch für die ausgewählten biologischen Teilchen sind und als eine erste Schicht auf der Oberfläche angeordnet werden,

- Inberührungsbringen der beschichteten Oberfläche des Substrats mit der Flüssigkeitsprobe für eine ausgewählte Zeit,

- Aufbringen einer porösen lichtundurchlässigen Schicht aus Teilchen auf der so behandelten Oberfläche, wobei diese Teilchen nicht mit dem Substrat, den ersten biologischen Teilchen, der Probenflüssigkeit und der nachfolgend anzuwendenden Spaltmittellösung reagieren,

- Inberührungsbringen der durch die vorhergehenden Stufen veränderten Oberfläche mit einer Spaltmittellösung, wobei diese Lösung in der Lage ist, selektiv eine zwischen den ersten biologischen Teilchen und den ausgewählten biologischen Teilchen vorhandene Bindung zu zerstören und

- Untersuchen der porösen lichtundurchlässigen Schicht zur Bestimmung, ob diese Schicht unversehrt ist, oder ob ein Teil davon entfernt wurde, wobei das letztere die Anwesenheit ausgewählter biologischer Teilchen in der Flüssigkeitsprobe anzeigen.

Nachfolgend wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnung näher erläutert. Im einzelnen zeigen:

Figur 1a eine Draufsicht auf ein Substrat, wie es in der erfundungsgemäßen Vorrichtung zum Nachweisen biologischer Teilchen Verwendung findet,

Figur 1b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum des in Figur 1a abgebildeten Substrates,

Figur 2a eine Draufsicht auf das Substrat, nachdem auf der ganzen oberen Oberfläche eine monomolekulare Schicht aus ersten biologischen Teilchen adsorbiert worden ist,

Figur 2b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum des Substrates und der ersten monomolekularen Schicht, die in Figur 2a abgebildet sind,

Figur 3a eine Draufsicht auf das mit der monomolekularen Schicht bedeckte Substrat, nachdem es einer Lösung ausgesetzt worden ist, die zweite biologische Teilchen enthielt, die spezifisch zu den ersten Teilchen waren, wodurch sich eine zweite monomolekulare Schicht auf der ganzen oberen Oberfläche des Substrates gebildet hat,

Figur 3b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum des Substrates und die beiden monomolekularen Schichten, die in Figur 3a abgebildet sind,

Figur 4a eine Draufsicht auf das beschichtete Substrat der Figur 3a, nachdem eine nicht-reaktive, lichtundurchlässige, poröse dritte Schicht auf der äusseren Oberfläche der zweiten monomolekularen Schicht gebildet worden ist,

Figur 4b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum des mit den drei Schichten bedeckten Substrates, wie es in Figur 4a gebildet ist,

Figur 5a eine Draufsicht auf das in Figur 4a abgebildete beschichtete Substrat, nachdem ein Teil des beschichteten Substrates einer Lösung einer schwachen Säure ausgesetzt worden ist, welche die Bindung zwischen den ersten und zweiten biologischen Teilchen gemäß einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung spaltet,

Figur 5b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 5a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 6a eine Draufsicht auf das mit der nicht-reaktiven, lichtundurchlässigen, porösen Schicht bedeckte Substrat bei Abwesenheit der monomolekularen Schicht der zweiten biologischen Teilchen, nachdem das Substrat der Lösung einer schwachen Säure ausgesetzt worden ist,

Figur 6b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 6a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 7a eine Draufsicht auf das Substrat gemäß einer zweiten und bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, bei der die monomolekulare Schicht der ersten biologischen Teilchen nur an einem Teil der Substratoberfläche adsorbiert ist,

Figur 7b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 7a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 8a eine Draufsicht auf das mit der monomolekularen Schicht bedeckte Substrat der Figur 7a, nachdem dieses der Lösung mit den zweiten biologischen Teilchen ausgesetzt worden ist, um die zweite monomolekulare Schicht zu bilden,

Figur 8b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 8a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 9a eine Draufsicht auf das beschichtete Substrat der Figur 8a, nachdem die nicht-reaktive, lichtundurchlässige, poröse dritte Schicht auf der gesamten Oberfläche des Substrates gebildet worden ist,

Figur 9b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 9 abgebildeten Vorrichtung,

Figur 10a eine Draufsicht auf das beschichtete Substrat der Figur 9a, nachdem dieses der Lösung einer schwachen Säure ausgesetzt worden ist, gemäß der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung,

Figur 10b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Fig. 10a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 11a eine Draufsicht auf das beschichtete Substrat der Figur 10a bei Abwesenheit der monomolekularen Schicht aus zweiten biologischen Teilchen und nachdem das Substrat der Lösung einer schwachen Säure ausgesetzt worden ist,

Figur 11b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 11a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 12a eine Draufsicht auf das Substrat, nachdem es der Lösung der zweiten biologischen Teilchen ausgesetzt worden ist, um gemäß einer dritten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die zweite monomolekulare Schicht zu bilden,

Figur 12b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 12a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 13a eine Draufsicht auf das beschichtete Substrat der Figur 12a, nachdem die nicht-reaktive, lichtundurchlässige, poröse dritte Schicht gebildet worden ist,

Figur 13b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 13a abgebildeten Vorrichtung,

Figur 14a eine Draufsicht auf das beschichtete Substrat der Figur 13a, nachdem man es der Lösung einer schwachen Säure ausgesetzt hatte, und

Figur 14b eine Seitenansicht im Schnitt durch das Zentrum der in Figur 14a abgebildeten Vorrichtung.

In den Figuren 1a und 1b sind eine Draufsicht bzw. eine Seitenansicht eines typischen Substrates 10 gezeigt, die in dem erfundungsgemäßen Verfahren zum Nachweisen einer immuno-  
logischen oder anderen spezifischen Reaktion und damit von spezifischen biologischen Teilchen benutzt werden kann. Ein Hauptvorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass das Substrat 10 aus irgendeinem festen Material hergestellt sein kann, das für praktische Zwecke mit den biologischen Teilchen, die zusammen mit dem Substrat verwendet werden, und einer lichtundurchlässigen dritten Schicht, die noch näher beschrieben wird, nicht reagiert. Die Oberfläche des Substrates 10 muss undurchdringlich sein, und darf für die Lösungen der biologi-

schen Teilchen und das lichtundurchlässige Material kein Absorptionsmittel sein, muss jedoch die Adsorption einer monomolekularen Schicht der ersten biologischen Teilchen darauf gestatten. Das Substrat 10 kann also aus irgendeinem geeigneten Material hergestellt sein, wie Glas, Kunststoff oder einem Metall, wobei Glas und Kunststoff wirtschaftliche Vorteile haben. Die Gestalt und die Dicke des Substrates 10 sind also ohne Bedeutung und der Zweckmässigkeit halber kann ein quadratisches Substrat mit einer Dicke in der Größenordnung von einem 1/4 mm benutzt werden. Obwohl es bevorzugt ist, dass die obere Oberfläche des Substrates im wesentlichen flach ist, ist dies nicht unbedingt erforderlich und diese Oberfläche kann daher auch etwas nicht-planar sein. Das Substrat 10 kann als typisches Beispiel in der Form eines Glasobjektträgers vorliegen, wie einem üblichen Mikroskop-Deckglas von 25 mm<sup>2</sup> Fläche und einem 1/4 mm Dicke, wobei der Glas-Objektträger wegen seiner geringen Kosten und leichten Erhältlichkeit im Handel eine geeignete Ausführungsform ist. Die Grösse des Substrates 10 wird in erster Linie durch die besondere medizinisch diagnostische Anwendung bestimmt, für die das Substrat verwendet werden soll. Im Falle nur eines einzigen Testes ist daher das Substrat 10 kleiner, nämlich in der Größenordnung der oben genannten 25 mm<sup>2</sup>, während für die Verwendung für eine Vielzahl von Proben, die gleichzeitig oder nacheinander analysiert werden sollen, die Grösse des Substrates 10 ausreichend gross sein muss, damit die Vielzahl der zu testenden Proben Platz findet. Die einzigen Erfordernisse, welche das Substrat 10 erfüllen muss, sind, dass es eine feste Oberfläche für die sie in dem jeweiligen diagnostischen Test benutzten biologischen Teilchen aufweist, wobei die feste Oberfläche relativ frei sein muss von Fehlern, so dass sie ausreichend glatt ist, obwohl sie nicht vollkommen planar sein muss, und schliesslich darf das Substrat nicht mit den biologischen Teilchen oder dem Material in der lichtundurchlässigen Schicht reagieren. Eine spezielle Herstellung der Substratoberfläche ist nicht erforderlich, d.h. dass ein Objektträger für ein Mikroskop als Substrat verwendet werden kann, nachdem man ihn gereinigt hat.

Wird für das Substrat ein separates Säuberungsverfahren benutzt, dann muss es gründlich gespült werden, um sicherzustellen, dass unerwünschte Ablagerungen des Reinigungsmittels, welche die Adsorption der ersten Monoschicht biologischer Teilchen auf dem Substrat verhindern oder beeinträchtigen können, nicht an der Substratoberfläche haften bleiben.

Nach Auswahl des Substrates 10 lässt man eine monomolekulare Schicht 11 aus ersten immunologisch reaktiven biologischen Teilchen an der oberen festen Oberfläche des Substrates 10 adsorbieren. Wenn auch in der vorliegenden Anmeldung der Einfachheit halber die Betonung auf biologischen Teilchen liegt, deren einfachster Fall das Antigen/Antikörper-Paar ist, so ist die vorliegende Erfindung jedoch gleichermassen brauchbar für biologische Teilchen, die in andere Arten biologischer Wechselwirkung treten als der immunologischen Reaktion, wobei das einzige Kriterium ist, dass die Teilchen spezifisch zueinander sind. Das Haften der ersten biologischen Teilchen kann durch Aufbringen ein oder mehrerer Tropfen einer ersten Lösung der ersten biologischen Teilchen auf die obere Oberfläche des Substrates unter Verwendung eines geeigneten Tropfers oder anderer Mittel bewerkstelligt werden. Das Substrat 10 kann aber auch kurzzeitig in die Lösung der ersten biologischen Teilchen eingetaucht werden. Die ersten biologischen Teilchen werden auf der Grundlage ausgewählt, dass sie spezifisch zu besonderen zweiten biologischen Teilchen sind, welche die zweite Schicht auf der Substratoberfläche bilden werden, wenn sie in einer zweiten Lösung oder Probe vorhanden sind, die getestet werden soll. Die ersten biologischen Teilchen können in Lavoratoriumskulturen hergestellt werden, oder man kann sie aus höheren lebenden biologischen Systemen wie oben beschrieben erhalten und sie sind im allgemeinen im Handel in einer relativ hochge-

reinigten Form erhältlich und wenn sie nicht gereinigt erhältlich sind, können sie chemisch gereinigt werden. Die Lösung der ersten biologischen Teilchen kann eine Salzlösung in Wasser oder einer anderen Flüssigkeit sein, die geeignet ist für die ersten biologischen Teilchen und das Substratmaterial und mit beiden nicht reagiert. Eine ausführlichere Beschreibung der Herstellung der ersten (und zweiten) monomolekularen Schichten aus den biologischen Teilchen ist in den oben genannten Patentanmeldungen enthalten, auf die hiermit Bezug genommen wird. Die für die Bildung der ersten monomolekularen Schicht 11 auf dem Substrat 10 erforderliche Zeit, im allgemeinen bis zu einer Stunde, ist umgekehrt proportional der Konzentration der ersten biologischen Teilchen in der ersten Lösung. Die erste monomolekulare Schicht 11 bedeckt in der ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, wie sie in den Figuren 2a und 2b abgebildet ist, im wesentlichen die gesamte obere Oberfläche des Substrates 10. Das Substrat 10 wird daher so klein gehalten, wie dies praktisch möglich ist, um die Menge des für das Verfahren erforderlichen biologischen Materials möglichst gering zu halten. Es wird empfohlen, die mit der monomolekularen Schicht bedeckte Oberfläche des Substrates 10 mit Leitungs- oder destilliertem Wasser zu spülen, um überschüssige erste biologische Teilchen und möglicherweise andere in der ersten Lösung vorhandene Teilchen zu entfernen, die sich auf der monomolekularen Schicht angesammelt haben könnten. Soll das beschichtete Substrat danach vertrieben oder gelagert werden, dann wird es getrocknet, vorzugsweise, indem man Luft bei Zimmertemperatur über das Substrat bläst, um das Trocknen zu beschleunigen. Soll das Substrat sofort benutzt werden, besteht keine Notwendigkeit für ein Trocknen nach dem Spülen. Die erste monomolekulare Schicht 11 ist im allgemeinen für das blosse Auge nicht sichtbar, da die Dicke einer solchen monomolekularen Schicht im Bereich von 20 bis 100 Å liegt, je nach der Grösse der diese Schicht bildenden besonderen biologischen Teilchen.

Das mit der ersten monomolekularen Schicht bedeckte Substrat wird dann einer zweiten Lösung ausgesetzt, in der man die zweiten immunologisch reaktiven biologischen Teilchen vermutet, die spezifisch zu den ersten biologischen Teilchen sind, um in einem direkten Test solche zweiten biologische Teilchen zu ermitteln. Dies wird allgemeinen durch Eintauchen des mit der ersten monomolekularen Schicht bedeckten Substrates in die zweite Lösung für eine Zeit gemacht, die wiederum umgekehrt proportional zu der Konzentration der zweiten biologischen Teilchen in der zweiten Lösung ist. Da die Konzentration der zweiten Teilchen in der zweiten Lösung im allgemeinen sehr viel geringer ist, als die Konzentration der ersten Teilchen in der ersten Lösung, erfordert das Eintauchen im allgemeinen sehr viel mehr Zeit, als für die Bildung der monomolekularen Schicht 12 aus den ersten biologischen Teilchen erforderlich war und das zweite Eintauchen kann bis zu 24 Stunden dauern. Bei Anwesenheit der zweiten biologischen Teilchen in der zweiten Lösung bildet sich eine zweite im wesentlichen vollständige monomolekulare Schicht 12 auf dem Substrat als Ergebnis der immunologischen Reaktion der zweiten biologischen Teilchen mit den ersten biologischen Teilchen und das Ergebnis dieser Verbindung ist in den Figuren 3a und 3b abgebildet. Nachdem das Substrat ausreichend der zweiten Lösung ausgesetzt worden ist, wird das beschichtete Substrat daraus entfernt und mit einer geeigneten Lösung gespült, die in vielen Fällen Leitungswasser, destilliertes Wasser oder eine Salzlösung davon sein kann, je nachdem in welcher Lösung die zweiten biologischen Teilchen enthalten waren. Dieses Spülen wird auch hier wiederum dazu durchgeführt, ein überschüssiges Ansammeln der zweiten biologischen Teilchen auf dem Substrat zu vermeiden und eine nicht-spezifische Adsorption möglichst gering zu halten, da die zweite Lösung häufig eine grosse Zahl anderer biologischer Teilchen enthält, wie z.B. einer Probe menschlichen Serums. Das

beschichtete Substrat wird dann wie oben beschrieben getrocknet, wenn die folgende Stufe die der Bildung einer lichtundurchlässigen porösen nicht-reaktiven Schicht auf dem Substrat ein Besprühen erfordert, andernfalls ist das Trocknen nicht notwendig. Sind in der zweiten Lösung keine zweiten biologischen Teilchen vorhanden, dann bildet sich auch keine zweite monomolekulare Schicht auf dem Substrat.

Als nächstes wird eine Schicht 13 aus dritten Teilchen auf der gesamten beschichteten Oberfläche des Substrates als dritte und äusserste Schicht gebildet, wie in den Figuren 4a und 4b abgebildet, wobei diese dritten Teilchen nicht reagieren mit dem Substrat 10 und den die monomolekularen Schichten 11 und 12 bildenden biologischen Teilchen. Enthielt die zweite Lösung keine zweiten biologischen Teilchen, dann bildet die Schicht 13 die zweite Schicht auf dem Substrat 10, wie in den Figuren 6a und 6b abgebildet. Die nicht-reaktive Schicht 13 muss ausreichend porös sein, so dass beim nachfolgenden Aussetzen des beschichteten Substrates gegenüber einer Spaltmittellösung das Spaltmittel, wie nachfolgend näher beschrieben wird, durch die Schicht 13 hindurchsickern kann. Da das beschichtete Substrat der Spaltmittellösung ausgesetzt wird, darf das Material der Schicht 13 auch nicht mit dem Spaltmittel reagieren. Und schliesslich muss die poröse nicht-reaktive Schicht 13 lichtundurchlässig sein, so dass sie mit dem blosen Auge erkennbar ist, während die monomolekulare Schichten 11 und 12 normalerweise nicht sichtbar sind. Die Lichtundurchlässigkeit wird erhalten, indem man die Schicht 13 wesentlich dicker sein lässt, als die monomolekularen Schichten 11 und 12 und die Lichtundurchlässigkeit wird auch durch die Art des für die Bildung dieser Schicht verwendeten Materials bedingt. Die lichtundurchlässige Schicht 13 kann praktisch aus jedem Material gebildet werden, das in Form diskreter kleiner Teilchen existiert oder das eine poröse zusammenhängende Schicht bildet und das an der Schicht biologischer Teilchen und im Falle der zweiten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung an der Oberfläche des Substrates 10 haftet, und das die vorgenannten Eigenschaften aufweist, mit den ersten und zweiten biologischen Teilchen, dem Substrat und der Spaltmittellösung nicht zu reagieren. Die Schicht 13 kann aus Metallteilchen gebildet werden, mit Nickel oder Gold und in einem solchen Falle wird die Schicht 13 durch Eintauchen des beschichteten Substrates in eine gerührte dritte Lösung gebildet, die eine relativ hohe Konzentration solcher nicht-reaktiver Teilchen enthält, um eine Schicht aus den Teilchen zu bilden, die miteinander in Berührung stehen oder in geringem Abstand zueinander angeordnet sind. Es können zur Herstellung der Schicht 13 auch Glas- oder Kunststoffteilchen in einer geeigneten gerührten Lösung verwendet werden. Die Lösung, in der Metall-, Glas-oder Kunststoffteilchen vorhanden sind, kann einfach Wasser sein. Für den Fall, dass das beschichtete Substrat in eine Lösung der kleinen Teilchen eingetaucht wird, besteht keine Notwendigkeit das beschichtete Substrat zu trocknen, nachdem das mit der monomolekularen Schicht 12 beschichtete Substrat gespült worden ist, da die die Teilchen enthaltende Lösung das beschichtete Substrat befeuchten wird. Die Grösse der im allgemeinen kugelförmigen Teilchen, seien sie aus Metall, Glas oder Kunststoff, kann in einem weiten Bereich liegen, wie Durchmessern von 0,1 bis 100 µm, da die Funktion der Schicht 13 lediglich die ist, für die danach zu benutzende Spaltmittellösung eine poröse Schicht zu bilden sowie lichtundurchlässig zu sein, so dass die Schicht 13 für das blosse Auge sichtbar ist, wenn man sie im reflektierten Licht betrachtet oder im durchgehenden Licht, wenn das Substrat lichtdurchlässig ist.

Ein anderes Verfahren zum Herstellen der Schicht 13 auf dem Substrat ist durch die Verwendung eines üblichen Ärosolsprays gegeben, wobei das Sprühgerät mit praktisch jedem Material gefüllt werden kann, das mit dem Substrat, den biolo-

gischen Teilchen und dem Spaltmittel nicht reagiert, porös ist und eine licht-undurchlässige Schicht bildet. Das beschichtete Substrat sollte vor dem Besprühen trocken sein, um ein wirksameres Haften der Schicht 13 an der Schicht 12 (oder 11) zu gestatten. Das Ärosol ist eine Suspension feiner fester oder flüssiger Teilchen in einem Gas, so dass die Schicht 13 aus Fest- oder Flüssigkeits-Teilchen zusammengesetzt sein kann. Als typisches Beispiel kann ein leichtes Besprühen der getrockneten beschichteten Oberfläche des Substrates mit MS-122 FLUOR-CARBON erfolgen, das ein Entformungsmittel auf Basis eines Trockenschmiermittels der Miller-Stephenson Chemical Company ist und das aus einer Ärosolzubereitung eines niedermolekularen synthetischen polymeren Harzwachses besteht und das an der äusseren Oberfläche der Schicht aus biologischen Teilchen haftet und ein weisses Aussehen aufweist. Als anderes Beispiel aus der grossen Zahl sprühbarer Materialien, die zur Herstellung der Schicht 13 verwendet werden können, hat sich eine dünne Schicht aus SURE, einem Produkt der Proctor and Gamble Company, eines desodorierenden Mittels, als brauchbar erwiesen. Es ist also praktisch jedes sprühbare Material, das an der äusseren Schicht aus biologischen Teilchen haftet, und mit diesen biologischen Teilchen und dem nachfolgend angewendeten Spaltmittel nicht reagiert, porös und lichtundurchlässig ist für die Zwecke der Bildung der Schicht 13 geeignet. Die Dicke der aufgesprühten Schicht 13 ist beträchtlich grösser als die Dicke der monomolekularen Schichten 11 und 12 und sie liegt typischerweise im Bereich von 1 bis 10 µm, doch kann sie insgesamt in einem Bereich von 0,1 bis 100 µm, liegen. Die Bereiche für die Größen der diskreten Teilchen oder die Dicken der aufgesprühten Schicht können für die verschiedenen Materialien unterschiedlich sein, wegen der unterschiedlichen Porosität und Lichtundurchlässigkeit.

Nachdem die nicht-reaktive, poröse, lichtundurchlässige Schicht auf im wesentlichen der gesamten äusseren beschichteten Oberfläche des Substrates 10 gebildet worden ist, wird ein Teil der mit der Schicht 13 bedekten Oberfläche des Substrates 10 einer Spaltmittellösung ausgesetzt, wie einer Lösung einer schwachen Säure, einer alkalischen Lösung oder einer Lösung hoher Salzkonzentration, wobei in der ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein oder mehrere Tropfen der Spaltmittellösung im allgemeinen auf den zentralen Bereich der beschichteten Substratoberfläche aufgebracht werden. Da die lichtundurchlässige Schicht 13 mit dem Spaltmittel nicht reagiert, diesem gegenüber aber porös ist, sickert die Spaltmittellösung durch die Schicht 13 in dem Bereich, indem sie aufgebracht wurde und das Spaltmittel spaltet bei Anwesenheit der monomolekularen Schicht 12 aus den zweiten biologischen Teilchen die Bindung zwischen den ersten und den zweiten biologischen Teilchen in diesem Bereich, so dass ein entsprechender Teil der monomolekularen Schicht 12 zusammen mit dem entsprechenden Teil dem der daran haftenden Schicht 13 entfernt wird, wie in den Figuren 5a und 5b abgebildet, wobei nur die monomolekulare Schicht 11 aus den ersten biologischen Teilchen auf dem Substrat 10 in dem Bereich verbleibt, in dem die Spaltmittellösung aufgebracht worden ist. Da die Schicht 13 licht-undurchlässig ist und daher mit dem blosen Auge klar sichtbar, gibt es einen deutlichen Kontrast bei Betrachtung im reflektierten oder (falls Substrat lichtdurchlässig ist) durchgehenden Lichte zwischen den Teilen des beschichteten Substrates, in denen die Schicht 13 verblieben ist und dem zentralen Bereich, in dem die Schicht 13 aufgrund der Spaltung der Bindung zwischen den ersten und zweiten biologischen Teilchen entfernt worden ist. Dieser klar erkennbare Kontrast zwischen den genannten Teilen des beschichteten Substrates zeigt daher die Anwesenheit der zweiten biologischen Teilchen in der Lösung, in der man sie vermutet hatte und dieser Kontrast zeigt auch die immunologische Reaktion zwischen den ersten und zweiten biologischen

Teilchen. Hatte die zweite Lösung die zweiten biologischen Teilchen nicht enthalten, dann bewirkt die Anwendung der Spaltmittellösung im Bereich 14, wie in Figur 6a gezeigt, keine Veränderung an der beschichteten Oberfläche des Substrates, weil es keine zu spaltende Bindung zwischen biologischen Teilchen gibt und die lichtundurchlässige Schicht 13 daher vollständig bleibt. Ist das Spaltmittel eine Säurelösung, dann wird im allgemeinen eine schwache Säure verwendet, d.h. eine die stark genug ist, die Bindung zwischen den Schichten aus ersten und zweiten biologischen Teilchen zu spalten, aber wiederum nicht so stark, um die Bindung zwischen der ersten Schicht 11 aus biologischen Teilchen und der festen Oberfläche des Substrates, an dem sie adsorbiert ist, zu spalten oder in anderer Weise zu beeinflussen. Für die oben beschriebenen Zwecke ist eine 0,1 normale Zitronensäurelösung geeignet. Der Konzentrationsbereich der Zitronensäure, um die gewünschten Ergebnisse zu erhalten, liegt zwischen 0,1 und 1,0 normal. Andere geeignete schwache Säuren, die für diesen Zweck eingesetzt werden können, sind 0,1 normale Maleinsäure und 0,1 normale Ameisensäure. Es können auch stärkere Säuren, wie Chlorwasserstoff-säure und Schwefelsäure, benutzt werden, dann jedoch in sehr viel geringerer Konzentration, z.B. etwa 0,01 normal. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung benutzbare Lösung einer schwachen Säure kann allgemein so beschrieben werden, dass sie jede Säurelösung ist, welche das Substrat oder die dritte Schicht nicht angreift, einen pH-Wert im Bereich von 2–5 hat, obwohl auch ein pH-Wert von 1,0 sich als geeignet erwiesen hat, bei Verwendung von 0,1 normaler Chlorwasserstoffsäure. Es können auch alkalische Lösungen und Lösungen mit höherer Salzkonzentration als Spaltmittel verwendet werden. Die für diesen Zweck verwendbare alkalische Lösung hat einen pH im Bereich von 9–13 und im speziellen Fall ist eine 0,2 normale Natriumhydroxid-Lösung zur Spaltung der Bindung zwischen Eialbumin und seinem Antigen benutzt worden. Verschiedene Salzlösungen, wie NaCl und NaJ sind als Spaltmittel bekannt. So spaltet eine 1,71 molare NaCl-Lösung pneumoccales Polysaccharid und seinen Antikörper. Der Vergleich zwischen den Figuren 5a und 6a ebenso wie zwischen den Figuren 5b und 6b zeigt die Fälle, in denen die zweiten biologischen Teilchen in der zweiten Lösung vorhanden bzw. nicht vorhanden waren.

Eine zweite und bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist in den Figuren 7a bis 11b veranschaulicht und soll im folgenden beschrieben werden. Der Hauptunterschied zwischen eer eben beschriebenen Ausführungsform und dieser zweiten Ausführungsform ebenso wie der dritten Ausführungsform, die unter Bezug auf die Figuren 12a bis 14b beschrieben werden wird, ist der, dass das ganze beschichtete Substrat in der zweiten und dritten Ausführungsform der Spaltmittellösung ausgesetzt wird und dass nicht nur ein geringer Bereich davon mit dem Spaltmittel in Berührung gebracht wird.

Bei der zweiten Ausführungsform wird, soweit in den Figuren 7a und 7b veranschaulicht nach der Auswahl des Substrates 10 ein einzelner (oder mehrere) Tropfen der ersten Lösung, welche die ersten biologischen Teilchen enthält, auf die obere Hauptoberfläche des Substrates 10 aufgebracht und dies führt zur Bildung einer monomolekularen Schicht 11 mit dem Muster des aufgebrachten Tropfens durch Adsorption der Teilchen an der Oberfläche des Substrates. Der Tropfen aus der ersten Teilchenlösung wird vorzugsweise der Bequemlichkeit halber etwa in der Mitte des Substrates aufgebracht. Da nur ein einzelner Tropfen der ersten Lösung benutzt werden muss und in Abhängigkeit von der Feuchtigkeit in dem Raum, kann das Substrat in einer Feuchtigkeitskammer gelagert werden, um eine zu rasche Verdampfung des Lösungsmittels zu vermeiden, das die ersten biologischen Teilchen enthält, obwohl diese Lage-  
65 rung in einer Feuchtigkeitskammer nicht immer erforderlich ist. Ein Vorteil dieser zweiten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es, dass ein geringerer Bereich der monomoleku-

laren Schicht 11, verglichen zu der das ganze Substrat bedekkenden Schicht der ersten Ausführungsform zu einer Einsparung an biologischem Material führt. Nach Adsorbieren der monomolekularen Schicht 11 am Substrat 10 kann, wie im Fall der ersten Ausführungsform, die beschichtete Oberfläche des Substrates gespült werden.

Das mit der monomolekularen Schicht bedeckte Substrat der Figuren 7a und 7b wird als nächstes in die Lösung eingetaucht, in der man die zweiten biologischen Teilchen vermutet und wenn solche Teilchen in der zweiten Lösung vorhanden sind, dann reagieren diese immunologisch mit den ersten biologischen Teilchen in der monomolekularen Schicht 11 unter Bildung einer monomolekularen Schicht 12 aus den zweiten biologischen Teilchen, deren Muster die gleiche Gestalt hat wie die Schicht 11, wie in den Figuren 8a und 8b dargestellt und ausserdem bildet sich eine monomolekulare Schicht 12a an den verbleibenden freien Oberflächen des Substrates 10 durch nicht-spezifisches Haften anderer Teilchen in der zweiten Lösung. Die Eintauchzeit für das beschichtete Substrat in die zweite Lösung ist, wie bei der ersten Ausführungsform, umgekehrt proportional der Konzentration der zweiten biologischen Teilchen in der zweiten Lösung. Das Muster der monomolekularen Schichten 11 und 12 ist, wie dargestellt, im allgemeinen ein runder Fleck. Nach Herausnahme des beschichteten Substrates aus der zweiten Lösung wird dieses vorzugsweise nochmals gespült und kann dann getrocknet werden, je nach der Art der Aufbringung der nachfolgenden lichtundurchlässigen Schicht, wie dies bereits bei der ersten Ausführungsform beschrieben wurde.

Als nächstes wird auf der beschichteten Oberfläche des Substrates 10 in der gleichen Weise wie bei der ersten Ausführungsform der Erfindung, die nicht-reaktive, poröse lichtundurchlässige Schicht gebildet, indem man das Material dieser Schicht auf die gesamte obere Oberfläche des Substrates 10 aufbringt, so dass es in Berührung gelangt mit den Schichten 12 und 12a aus biologischen Teilchen, wie in den Figuren 9a und 9b veranschaulicht. Nachdem die Schicht 13 auf dem Substrat entweder durch Aufsprühen des geeigneten Ärosols auf die beschichtete Oberfläche des Substrates oder durch Eintauchen des beschichteten Substrates in eine Lösung gebildet worden ist, wobei die Lösung kleine Teilchen aus dem besonderen Material enthält, welches die Schicht 13 bildet, wird das gesamte beschichtete Substrat kurzzeitig in die Spaltmittellösung eingetaucht, um die Bindung zwischen den Schichten aus ersten und zweiten biologischen Teilchen zu spalten, wenn die zweite Schicht 12 tatsächlich auf dem Substrat vorhanden ist. Da die biologischen Teilchen nur in Form eines kleinen Bereiches auf dem Substrat 10 vorhanden sind, hat das beschichtete Substrat nach der Entfernung aus der Spaltmittellösung das in den Figuren 10a und 10b abgebildete Aussehen unter der Annahme, dass die zweite Lösung, von der man annahm, dass sie die zweiten biologischen Teilchen enthielt, diese tatsächlich enthalten hatte. Das beschichtete Substrat erscheint daher für das blosse Auge in Figur 10a genauso wie in Figur 5a, da die obere Oberfläche des Substrates 10 mit einer lichtundurchlässigen Schicht 13 bedeckt ist, und dadurch ein deutlicher Kontrast gegenüber dem Bereich 11 sichtbar ist, in dem der Teil der lichtundurchlässigen Schicht 13 zusammen mit der gesamten Schicht 12 aus zweiten biologischen Teilchen (im Falle der zweiten Ausführungsform) durch die Spaltmittellösung entfernt worden ist. Wie im Falle der Figuren 6a und 6b der ersten Ausführungsform weist das beschichtete Substrat nach der Herausnahme aus der Spaltmittellösung eine vollständige Schicht 13 aus lichtundurchlässigem Material auf dem Substrat 10 auf, wie in den Figuren 11a und 11b wiedergegeben, wenn die zweite Lösung die zweiten biologischen Teilchen nicht enthalten hatte.

In den Figuren 12a bis 14b ist das Aussehen des beschichteten Substrates in den verschiedenen Stufen einer dritten Aus-

führungsform der vorliegenden Erfindung dargestellt. Bei dieser dritten Ausführungsform wird das Substrat 10 zuerst in eine erste Lösung eingetaucht, welche die ersten biologischen Teilchen enthält, so dass danach die gesamte obere Oberfläche des Substrates 10 eine monomolekulare Schicht 11 aus ersten immunologisch reaktiven biologischen Teilchen adsorbiert aufweist, wie dies auch in den Figuren 2a und 2b der ersten Ausführungsform abgebildet ist, und danach wird das beschichtete Substrat gespült. Im Unterschied zur ersten Ausführungsform wird dann jedoch nur ein geringer Teil des beschichteten Substrates der zweiten Lösung ausgesetzt, von der man annimmt, dass sie die zweiten biologischen Teilchen enthält. Die kann dadurch bewirkt werden, dass man einen einzelnen oder mehrere Tropfen der zweiten Lösung etwa in der Mitte des beschichteten Substrates aufbringt. Da die zweite Lösung im allgemeinen eine verdünnte Lösung der zweiten biologischen Teilchen ist, kann das beschichtete Substrat, wie im Falle der zweiten Ausführungsform, während der Bildung der Schicht aus zweiten biologischen Teilchen, wobei die zweiten biologischen Teilchen immunologisch sich mit den ersten biologischen Teilchen verbinden, in einer Feuchtigkeitskammer gelagert werden.

Nachdem sich die kleine im allgemeinen kreisförmige Schicht 12 aus den zweiten biologischen Teilchen auf dem Substrat gebildet hat, wird das Substrat aus der Feuchtigkeitskammer herausgenommen, gespült und kann dann je nach der Art der Aufbringung der nachfolgenden lichtundurchlässigen Schicht getrocknet werden. Das beschichtete Substrat hat nach Bildung der nicht-reaktiven porösen lichtundurchlässigen Schicht 13, das in den Figuren 13a und 13b dargestellte Aussehen.

Nach Bildung der Schicht 13 auf dem Substrat wird das beschichtete Substrat kurzzeitig in die Spaltmittellösung eingetaucht, so dass bei dem Vorhandensein der Schicht 12 aus zweiten biologischen Teilchen auf dem Substrat, die Bindung zwischen den ersten und zweiten biologischen Teilchen durch das Spaltmittel aufgespalten wird und die Schicht 12 aus zweiten biologischen Teilchen zusammen mit der darüber liegenden Schicht 13 von dem Substrat entfernt wird. Das beschichtete Substrat hat dann das in den Figuren 14a und 14b wiedergegebene Aussehen, worin die gesamte obere Oberfläche des Substrates mit der lichtundurchlässigen Schicht 13 bedeckt ist, mit Ausnahme des kleinen im allgemeinen kreisförmigen Bereiches, der etwa in der Mitte der Substratoberfläche angeordnet ist, wo nur noch die erste monomolekulare Schicht 11 aus den ersten biologischen Teilchen vorhanden ist. Wie im Falle der Ausführungsform der Figuren 5a und 5b und 10a, 10b, ist der Kontrast zwischen dem Teil der Substratoberfläche, in dem die Bindung aus ersten und zweiten biologischen Teilchen gespalten worden ist und dem restlichen Teil der Substratoberfläche leicht erkennbar. Wenn die zweite Lösung die zweiten biologischen Teilchen nicht enthalten hatte, dann hat das beschichtete Substrat das gleiche Aussehen wie in den Figuren 6a und 6b abgebildet, d.h. die gesamte obere Oberfläche des Substrates 10 bleibt mit der nicht-reaktiven, porösen, lichtundurchlässigen Schicht 13 bedeckt.

Die obigen Beschreibungen der drei Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle auf einen direkten Nachweis der zweiten biologischen Teilchen als Ergebnis der an der Substratoberfläche stattfindenden immunologischen Reaktion. Das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens unter Verwendung der nicht-reaktiven, porösen, lichtundurchlässigen Schicht 13 können aber auch in einem indirekten oder Inhibitionstest für den Nachweis der besonderen immunologisch reaktiven biologischen Teilchen benutzt werden, da es der allgemeine Zweck der vorliegenden Erfindung ist, zwischen einer monomolekularen Schicht aus ersten biologischen Teilchen und einer bimolekularen Schicht aus ersten und zweiten biologischen Teilchen zu

unterscheiden. Das Prinzip des Inhibitionstests besteht darin, dass Antigenteilchen, wenn sie in ausreichender Menge vorhanden sind, freie Antikörper in einer Lösung neutralisieren werden. Diese Reaktion verhindert es, dass Antikörper beobachtbare Komplexe bilden, z.B. eine bimolekulare Schicht, wenn das Substrat mit einer monomolekularen Antigenschicht darauf der Lösung ausgesetzt ist.

In den obigen drei Ausführungsformen eines direkten Nachweises des Vorhandenseins der zweiten biologischen Teilchen in der zweiten Lösung sind die ersten biologischen Teilchen, die an der Oberfläche des Substrates 10 haften, im allgemeinen ein besonderes Antigen, während die zweiten biologischen Teilchen im allgemeinen der Antikörper sind, der spezifisch ist gegenüber dem besonderen Antigen. Die ersten biologischen Teilchen müssen jedoch nicht das Antigen sein, sondern sie können auch die Antikörerteilchen sein, so dass die zweiten biologischen Teilchen dann die Antigenteilchen wären, gegenüber denen der Antikörper spezifisch ist.

Der Inhibitionstest wird folgendermassen ausgeführt: Eine monomolekulare Schicht aus ersten biologischen Teilchen, von denen hier angenommen werden soll, dass sie Antigenteilchen seien, wird, wie bei dem oben beschriebenen direkten Test, an dem Substrat 10 adsorbiert und dies entweder auf der gesamten oberen Oberfläche des Substrates 10 oder nur an einem kleinen, im allgemeinen kreisförmigen Teil davon. Die zweite Lösung wird zubereitet, indem man eine zu testende Probe zu einer Lösung des spezifischen Antikörpers in einem Glasfläschchen oder einem anderen geeigneten Behälter hinzugibt. Das Glasfläschchen wird dann für eine ausreichende Zeit gelagert, damit sich der Antikörper mit dem Antigen in der Testprobe komplexiert kann, falls Antigen in der Testprobe vorhanden ist. Vorzugsweise wird das Glasfläschchen bewegt, um die Komplexierungsgeschwindigkeit zu erhöhen. Schliesslich wird das mit der monomolekularen Antigenschicht bedeckte Substrat in die zweite Lösung eingetaucht und nach einer geeigneten Zeitdauer, die wiederum bis zu 24 Stunden ausmachen kann, wird das Substrat herausgenommen und kann gespült und getrocknet werden, und dann wird die nicht-reaktive, poröse, lichtundurchlässige Schicht 13 darauf gebildet und danach wird das beschichtete Substrat der Spaltmittellösung ausgesetzt, wie oben beschrieben. Die Ergebnisse des Inhibitionstests sind dem des direkten Tests entgegengesetzt, d.h. bei Anwesenheit des Antigens in der untersuchten Probe ist kein Kontrast in der lichtundurchlässigen Schicht 13 vorhanden, d.h. es bildet sich dann keine zweite monomolekulare (Antikörper) Schicht auf dem Substrat, während die Entfernung eines Teiles der lichtundurchlässigen Schicht des Teiles 13 unter Bildung eines deutlichen Kontrastes, der für das blosse Auge leicht erkennbar ist, die Abwesenheit von Antigen in der Testprobe anzeigen. In gleicher Weise wird der Inhibitionstest für den Nachweis eines spezifischen Antikörpers ähnlich dem Inhibitionstest für das Antigen ausgeführt, wobei jeweils Antigen anstelle von Antikörper eingesetzt wird und Antikörper anstelle von Antigen.

In der vorstehenden Beschreibung der vorliegenden Erfindung ist die Rede gewesen von ersten und zweiten immunologisch reaktiven biologischen Teilchen, wobei das zweite biologische Teilchen spezifisch zu dem ersten ist. Diese Bezeichnungen sind absichtlich gewählt und die mit Hilfe der vorliegenden Erfindung verwendbaren und nachweisbaren immunologisch reaktiven biologischen Antigenteilchen schliessen Hormone, Viren, Bakterien, Enzyme und andere Teilchen ein, die leicht gezüchtet oder in anderer Weise isoliert und gesammelt werden können oder die in menschlichem Serum oder einer anderen untersuchten Lösung vorhanden sein können. Die vorliegende Erfindung ist brauchbar für jedes Paar biologischer Teilchen, das miteinander reagiert bzw. sich miteinander kombiniert. Neben dem immunologisch reaktiven Paar Antigen-Antikörper schliesst die vorliegende Erfindung auch andere Formen biolo-

gischer Wechselwirkungen zwischen grossen Molekülen ein, die auf nicht-immunologischen Besonderheiten beruhen, wie z.B. dem Verbinden von Enzymen mit ihren biologischen Substraten oder von Hämoglobin mit Haptoglobin.

Eine wichtige Anwendung der vorliegenden Erfindung ist der Fall, bei dem die gestestete Lösung nur eine sehr geringe Konzentration der darin vermuteten biologischen Teilchen aufweist. In einem solchen Falle bleibt das gemäss der vorliegenden Erfindung mit einer monomolekularen Schicht bedeckte Substrat in der zweiten (Test) Lösung für eine ausreichende Zeit eingetaucht, so dass die zweiten (in geringer Konzentration vorhandenen) biologischen Teilchen eine monomolekulare Schicht bilden können, die nicht so viele Moleküle erfordert, besonders wenn die zweite Ausführungsform der vorliegenden Erfindung (vgl. besonders die Figuren 8a und 8b) benutzt wird.

Die zweite Lösung, die in der vorliegenden Erfindung benutzt wird, ist im allgemeinen eine Probe menschlichen Serums, obwohl es auch eine andere Art Lösung sein kann, die für die besonderen untersuchten biologischen Teilchen geeignet ist. In dem direkten Test, in dem ein Antikörper nachgewiesen soll, wie im Falle der Syphilis oder Gonorrhöe, wird der Antikörper in dem menschlichen Serum eines Patienten nachgewiesen, von dem man weiß oder annimmt, dass er diese besondere Krankheit hat. Beim Inhibitionstest, bei dem man ein Antigen nachzuweisen versucht, wie das mit der Hepatitis verbundene Antigen HAA, kann der Antikörper in einer Ziege, einem Kaninchen oder in einem anderen geeigneten Tier entwickelt werden und die richtige Menge dieses Tierserums wird mit dem menschlichen Serum eines Patienten vermischt, das auf Hepatitis untersucht werden soll.

Es werden im folgenden einige Beispiele für die vorliegende Erfindung beschrieben, die verschiedene Antigen/Antikörper-Paare und geeignetes nicht-reaktives Material für die poröse lichtundurchlässige Schicht 13 zeigen. In jedem dieser Beispiele ist das Substrat 10 aus einem festen Material gemacht, das nicht mit den biologischen Teilchen und mit dem die lichtundurchlässige Schicht 13 bildenden Material reagiert, wobei ein kleiner Objektträger aus Glas oder Kunststoff mit 25 mm<sup>2</sup> Grösse und einem 1/4 mm Dicke für die Zwecke der vorliegenden Erfindung brauchbar ist. In einigen der Beispiele wird die Stufe des Aussetzens der oberen Oberfläche des Substrates gegenüber einer ersten Lösung, welche die ersten immunologisch reaktiven biologischen Teilchen enthält, um eine monomolekulare Schicht darauf zu adsorbieren, als Aufbringen eines Tropfens der ersten Lösung im Zentrum der oberen Oberfläche des Substrates beschrieben, wie für die zweite Ausführungsform im Zusammenhang mit den Figuren 7a und 7b, um erste biologische Teilchen zu sparen. Es sollte jedoch klar sein, dass auf der gesamten oberen Oberfläche des Substrates die erste monomolekulare Schicht adsorbiert sein kann (Beispiel 1) wie dies unter Bezugnahme auf die erste und dritte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beschrieben ist, indem man das ganze Substrat in die erste Lösung eintaucht und diese Art des Herangehens könnte brauchbar sein in Fällen, in denen Tropfen verschiedener Lösungen, von denen man vermutet, dass sie die zweiten biologischen Teilchen enthalten, im Abstand voneinander auf dem mit der monomolekularen Schicht bedeckten Substrat aufbringt, um mehrere Versuche nahezu gleichzeitig durchzuführen. Alle Stufen der verschiedenen Beispiele können bei Zimmertemperatur ausgeführt werden, d.h. in einem Temperaturbereich von etwa 18 bis 24°C, der für die vorliegende Erfindung nicht kritisch ist. Schliesslich sollte klar sein, dass die für die Beschreibung des verwendeten Substrates benutzte Bezeichnung «nicht-reaktiv» mit den biologischen Teilchen von der lichtundurchlässigen Schicht auf seine chemische und biologische Inertheit zu einem Ausmass bezogen ist, dass das Substrat die biologischen Teilchen oder die lichtundurchlässige Schicht nicht angreift oder zerstört. Das Substrat ist dagegen

reakтив zu dem Ausmass, als es die Fähigkeit hat, die ersten biologischen Teilchen daran als monomolekulare Schicht zu adsorbieren. In gleicher Weise ist das lichtundurchlässige Material 13 nicht-reaktiv mit den biologischen Teilchen (und dem Substrat), doch hat das Material die Fähigkeit an der Schicht aus zweiten biologischen Teilchen (oder der Schicht aus ersten biologischen Teilchen im Falle der Abwesenheit der zweiten Schicht) zu haften oder sich damit zu verbinden.

Es folgen die Beispiele zur näheren Erläuterung der Erfindung, die jedoch nicht als den Umfang einschränkend missverstanden werden sollen.

### Beispiel 1

#### 15 Direkter Rinderserum-Albumintest

Die Quelle für das Antigen ist Pentex-Rinderalbumin, Crystal, 10%ige Lösung, ein Produkt der Miles Laboratories. Eine 1%-ige Lösung des im folgenden als BSA-Antigen bezeichneten Rinderserum-Albumin-Antigens in physiologischer Kochsalzlösung (0,154 normal) wurde zubereitet und übliche Mikroskop-Deckgläser darin eingetaucht und etwa 1 Minute darin belassen. Nach dem Herausnehmen der mit einer monomolekularen BSA-Antigenschicht bedeckten Objektträger aus der Lösung wurden diese mit destilliertem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. Die Quelle für die Antikörper ist auch eine handelsübliche Zubereitung der Miles Laboratories, nämlich Pentex-Kaninchen-Antibovin-Albuminserum. Eine Reihe von Verdünnungen von 1:1 bis 1:10 000 des Antiserums in physiologischer Kochsalzlösung, die sich jeweils um den Faktor 5 voneinander unterschieden, wurden zubereitet und es wurden Tropfen von 1/20 ml dieser Verdünnungen auf die mit BSA-Antigen bedeckten Objektträger aufgebracht und für 2 Minuten darauf belassen. Dann wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. Zu diesem Zeitpunkt können die bimolekularen Antigen/Antikörper-Schichten auf den Glasobjektträger-Oberflächen vorhanden sein, ohne dass sie mit dem blossen Auge sichtbar sind. Die mit den vorgenannten Schichten bedeckten Objektträger wurden dann leicht eingesprüht (jede für etwa 2 bis 3 Sekunden), um eine dünne Schicht aus einem synthetischen polymeren Harzwachs (dem oben beschriebenen MS-122 Produkt) als lichtundurchlässigen Film zu schaffen der an den Antigen/Antikörper-Schichten haftet und den Objektträgern ein weissliches Aussehen gibt. Schliesslich wurden die Objektträger in eine Zitronensäurelösung mit einem pH-Wert von 2,0 für eine Minute eingetaucht und dann wieder herausgenommen. Die Säurelösung spaltet die Bindungen zwischen BSA-Antigen und Antikörpern. Werden die Antikörper durch das Spalten der Bindung entfernt, dann werden dadurch auch einige der Fluorcarbon-Teilchen entfernt. Eine klare Stelle auf dem Objektträger, der die Entfernung im wesentlichen aller Fluorcarbon-Teilchen von einer solchen Stelle anzeigen, ist ein Zeichen für die Entfernung einer vollständigen Schicht der BSA-Antikörper, während eine partiell klare Stelle zeigt, dass sich nur eine unvollständige Antikörperschicht gebildet hatte. Keine Veränderung im Aussehen der weissen Beschichtung auf dem Objektträger zeigt, dass sich keine Antikörperschicht gebildet hatte und das daher die jeweilige Antiserumverdünnung (oder eine Lösung, von der man annahm, dass sie BSA-Antikörper enthielt) die Antikörper nicht in ausreichender Menge zum Nachweis enthielt. Durch dieses Verfahren können BSA-Antikörper in Verdünnungen nachgewiesen werden bis zu 1 bis 1 000 von dem Kaninchen-Antirinderalbuminserum, was einer Konzentration der Antikörper von etwa 10<sup>-6</sup> g/ml Serum entspricht. Diese Empfindlichkeit kann durch Verlängern der zweiminütigen Verweilzeit verbessert werden, durch Röhren der Antiserumlösung oder durch Verwenden eines grösseren Serumvolumens. Die Verwendung der verschiedenen Verdünnungen des Antiserums führt so zu

einem Endpunkt in einem Titrationstest und gestattet die quantitative Bestimmung der Antikörperkonzentration. Durch Ausführung eines Inhibitionstestes kann auch die Titration des Antigens erfolgen.

### *Beispiel 2*

#### *Direkter Toxoplasma-Test*

Als Antigen wurde ein Derivat des gereinigten Toxoplasmas verwendet. Die Quelle des Antigens war ein peritonealer Extrakt einer ausgewachsenen Maus, die drei Tage vor der Tötung mit einem verdünnten Impfstoff (unter Verwendung von 100 ml steriler Salzlösung) von *Toxoplasma gondii*, einem Protozoenparasiten geimpft worden war. Der Extrakt wurde dann für etwa 20 Minuten mit Schallenergie behandelt und die Zubereitung danach durch Zentrifugieren geklärt, wobei die überstehende Flüssigkeit als einzelnes Tröpfchen von etwa 6 mm Durchmesser auf die Oberfläche eines Glas-Objektträgers aufgebracht wurde. Der Objektträger wurde dann etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtigkeitskammer, einer feuchte Schwämme enthaltenden Hülle, inkubiert. Nach der Herausnahme des mit der Toxoplasma-Antigenschicht bedeckten Objektträgers aus der Feuchtigkeitskammer wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und trocken geblasen. Dann ordnete man den Objektträger in einer engen Vertiefung in einem Plastiktrog an und füllte die Vertiefung mit einer 0,154 normalen physiologischen Kochsalzlösung, die in einer 1:10 Verdünnung den Antikörper zum Toxoplasma enthielt. Der von einer Ziege gewonnene Antikörper ist eine handelsübliche Zubereitung der Canalaco Diagnostics aus Rockville, Maryland. Der Objektträger wurde in der Antikörperlösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur in der bewegten Lösung inkubiert. Der Objektträger wurde dann aus der Lösung herausgenommen, mit destilliertem Wasser gewaschen und trocken geblasen. Die zu diesem Zeitpunkt auf der Objektträgeroberfläche vorhandenen Antigen/Antikörper-Schichten sind mit dem blossem Auge nicht sichtbar. Der beschichtete Objektträger wurde dann für etwa 2 oder 3 Sekunden zur Schaffung einer dünnen Schicht aus synthetischem polymeren Harzwachs, dem oben beschriebenen MS-122 Produkt, leicht besprüht, das als lichtundurchlässiger Film vorlag. Schliesslich wurde der beschichtete Objektträger in eine Säurelösung, 0,2 molarer Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 3,6, eingetaucht. Diese Lösung durchdringt den lichtundurchlässigen Film und spaltet die Antigen/Antikörper-Bindung. Im Bereich der gespaltenen Antigen/Antikörper-Bindung ist der lichtundurchlässige Wachsfilm von dem Objektträger entfernt und es erscheint ein Loch in dem lichtundurchlässigen Film, der mit dem blossem Auge leicht erkennbar ist.

#### *Test zur Überprüfung von Beispiel 2*

Um zu überprüfen bzw. bestätigen, dass das beobachtete Loch der Anwesenheit einer Schicht aus dem Toxoplasma-Antikörper zuzuschreiben ist, wurde das Beispiel 2 wiederholt, dabei jedoch anstelle der Antikörperlösung ein Serum ohne einen solchen Antikörper verwendet. Nach Behandlung mit der Säurelösung war kein sichtbares Loch in dem lichtundurchlässigen Film entstanden.

Bei einem zweiten Überprüfungstest wurde eine 0,154 molare Natriumchloridlösung anstelle der antikörperlösung verwendet. Eine solche Lösung ist isoton zum Blutplasma, enthält jedoch keine Antikörper zum *Toxoplasma*. Auch hierbei war nach der Säurebehandlung kein Loch in der lichtundurchlässigen Schicht entstanden.

### *Beispiel 3*

#### *Versuch mit menschlichem korionischem Gonadothrophin*

Der Test wurde wie in Beispiel 2 ausgeführt, wobei die Antigenlösung 2 mg menschliches korionisches Gonadothrophin pro ml destilliertem Wassers enthielt und der Antikörper zu diesem korionischen Gonadothrophin (im Englischen «chorionic gonadothrophin» genannt) war unverdünnt und wurde von einem Kaninchen gewonnen.

10

### *Beispiel 4*

#### *Test mit der lichtundurchlässigen Schicht*

Führte man den obigen Test mit einem anderen Material als dem synthetischen polymeren Harzwachs aus, so führte dies bei 15 Anwesenheit der zweiten Monoschicht ebenfalls zu einem mit dem blossem Auge leicht erkennbaren Loch in der lichtundurchlässigen Schicht. Dieses Material war eine Lösung von Polystyrol mit dem Molekulargewicht 33 000 in Aceton. Zuerst wurde ein Wassertropfen auf das mit der bimolekularen Schicht 20 bedeckte Substrat aufgebracht und dann ein Tropfen der Polystyrollösung in Aceton auf den Wassertropfen. Durch Vermischen der beiden Tropfen entstand ein weisser Niederschlag, der die lichtundurchlässige Schicht bildete.

25

### *Beispiel 5*

#### *Substrat-Test*

Der obige Test wurde auf Substraten ausgeführt, wie einer Laboratoriumsschale aus Kunststoff, einem dünnen Goldfilm auf einem Glasobjektträger und einem Siliziumdioxidfilm auf einer Siliziumscheibe und ergab jeweils in gleichem Masse zufriedenstellende Ergebnisse, wie auf dem Glasobjektträger-Substrat.

Aus der vorstehenden Beschreibung ergibt sich, dass durch 35 die vorliegende Erfindung ein verbessertes Verfahren zum Nachweisen biologischer Reaktionen geschaffen werden, wobei die an einer festen Oberfläche stattfindenden Reaktionen nachgewiesen werden und das verwendete Substrat praktisch jedes feste Material sein kann, das nicht mit den biologischen Teilchen und der nicht-reaktiven porösen lichtundurchlässigen Schicht, die als äusserste Schicht auf dem Substrat benutzt wird, reagiert. Wegen seiner Lichtundurchlässigkeit ist die äussere Schicht deutlich mit dem blossem Auge erkennbar und das Spalten der Bindung zwischen dem ersten und zweiten biologischen Teilchen auf der Substratoberfläche ist leicht erkennbar 45 wegen der damit verbundenen Entfernung eines Teiles einer solchen lichtundurchlässigen Schicht am Schluss des Testverfahrens.

50 Es ist klar, dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung und insbesondere innerhalb der drei Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens Abänderungen und Variationen möglich sind. So kann im Falle des biologischen Paars das aus grossen Molekülen, wie einem Enzym und seinem biologischen Substrat besteht, dem Molekül mit dem es reagiert, wie ein Protein oder Zucker, jedes dieser Moleküle die erste Schicht bilden und das jeweils andere die zweite Schicht. Die lichtundurchlässige Schicht kann auch als dünner Metallfilm gebildet werden, der auf das mit den biologischen Teilchen bedeckte 55 Substrat durch Elektroplattieren oder Bedampfen aufgebracht ist anstelle der Verwendung der Metallteilchen in Lösung, wie oben beschrieben. Ein Vorteil dieser Art Schicht ist es, dass der Metallfilm, der aus Silber bestehen kann, beträchtlich dünner sein kann, als die in Lösung benutzten Teilchen, wobei ein wenige Ångström dicker Film deutlich erkennbar ist. Schliesslich ist auch die Endstufe des erfindungsgemässen Verfahrens, d.h. die Stufe der Untersuchung des mit der lichtundurchlässigen Schicht bedeckten Substrates, nachdem man es dem Spalt-

mittel ausgesetzt hat, nicht auf eine visuelle Beobachtung mit dem blosen Auge beschränkt. Bei einer kommerziellen Anwendung der vorliegenden Erfindung, insbesondere für Testuntersuchungen im grossen Umfange, würden optische

Instrumente häufig verwendet werden, wobei ein Densitometer bzw. Schwärzungsmesser ein typisches Instrument zur Messung der durch das beschichtete (transparente) Substrat hindurchgehenden Lichtmenge wäre.

Fig. 1a

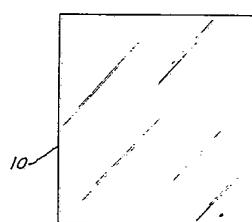


Fig. 1b

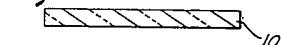


Fig. 3a

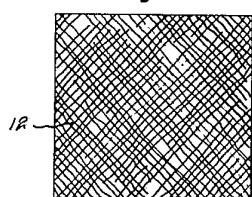


Fig. 3b



Fig. 5a

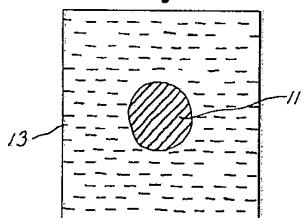


Fig. 5b



Fig. 2a



Fig. 2b

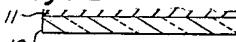


Fig. 4a

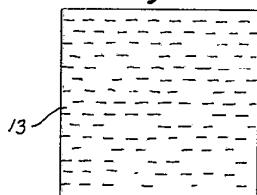


Fig. 4b



Fig. 6a

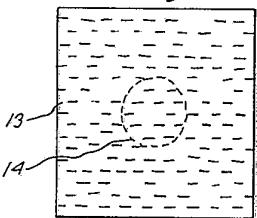


Fig. 6b



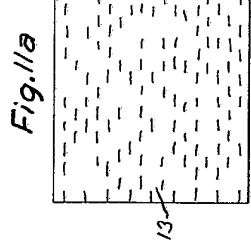
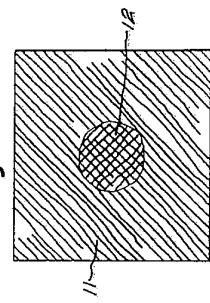


Fig. 12a

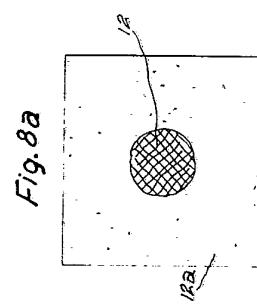


Fig. 8a

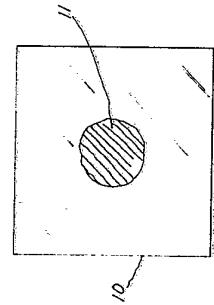


Fig. 7a

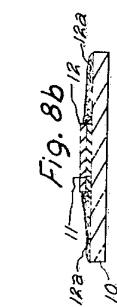


Fig. 8b

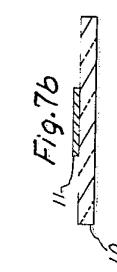


Fig. 7b



Fig. 11b

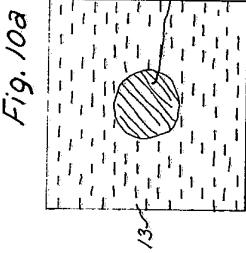


Fig. 10a

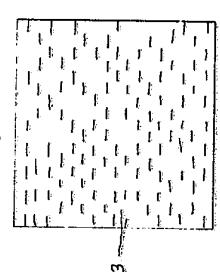


Fig. 9a

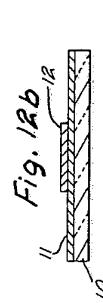


Fig. 12b

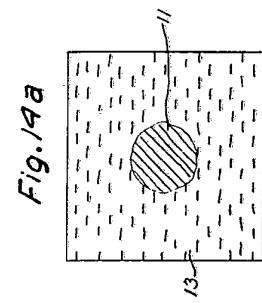


Fig. 14a

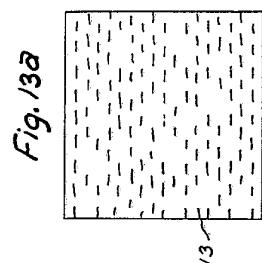


Fig. 13a

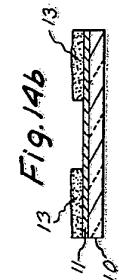


Fig. 14b



Fig. 13b

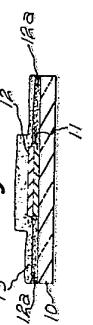


Fig. 9b