



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 21 765 T2** 2004.02.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 906 562 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 21 765.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/11328**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 932 372.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/048977**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.06.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **24.12.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.04.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **07.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.02.2004**

(51) Int Cl.7: **G01N 3/04**  
**G01N 33/543**

(30) Unionspriorität:  
**28147 P                      20.06.1996                      US**

(73) Patentinhaber:  
**New York University, New York, N.Y., US**

(74) Vertreter:  
**Meissner, Bolte & Partner GbR, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE**

(72) Erfinder:  
**MOROZOV, Victor N., New York, US; MOROZOVA,  
Tamara Ya, New York, US**

(54) Bezeichnung: **BESTIMMUNG VON LIGAND-WECHSELWIRKUNG MIT EINEM POLYMER MATERIAL**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und einen Apparat zur Bestimmung der Ligandinteraktion mit Makromolekülen wie Proteinen und DNA.

## Hintergrund der Erfindung

[0002] Untersuchungen der Wechselwirkung von Proteinen oder DNA mit kleinen Liganden sind in der biochemischen, pharmakologischen und toxikologischen Forschung allgemein bekannt. Um die Wechselwirkung von Makromolekülen mit ihren spezifischen Liganden in Lösung zu detektieren, kann man entweder bindungsinduzierte Änderungen in physikalischen Eigenschaften der Makromoleküle oder der Liganden (optisch, NMR, usw.) oder irgendeine Trenntechnik (Gleichgewichtsdialyse, Größenausschlusschromatographie, usw.) anwenden. Jeder dieser Ansätze weist ernsthaft Einschränkungen auf. Zum Beispiel ändern sich die optischen Eigenschaften eines Makromoleküls nur dann, falls irgendeine Reportergruppe (fluoreszierend oder absorbierend) zufällig nahe der Bindungsstelle liegt. Auf der anderen Seite, erfordern Trennverfahren die Bestimmung kleiner Konzentrationen von Liganden, was oftmals das synthetische Anbringen von radioaktiven oder homogenen Markern erfordert. Dies macht diese Verfahren teuer, kompliziert und zeitaufwendig. Einige dieser negativen Merkmale sind in letzter Zeit durch die Verwendung der Titrationskalorimetrie vermieden worden. Nichtsdestotrotz kann bei der Untersuchung einer großen Serie von Liganden ein deutlicher Verbrauch an Protein und DNA in Lösung für alle diese Verfahren einen Nachteil darstellen.

[0003] Um dies weiter zu erklären: Assays für Proteinspezifität können auch danach klassifiziert werden, wie sie durchgeführt werden – entweder in Lösung (homogene Assays) oder in heterogenen Systemen, in denen das Protein oder ein spezifischer Ligand immobilisiert ist (heterogene Assays). Die Leistungsmerkmale, Vorteile und Nachteile aller dieser Verfahren werden vorwiegend durch die eingesetzten Detektionstechniken bestimmt.

[0004] Bei homogenen Verfahren wird die Bindung eines Liganden an ein Protein durch ein physikalisches (meist optisches) Verfahren detektiert. Mit wenigen Ausnahmen sind homogene Verfahren nicht universell, da nur eine Bindung, die mit großen konformationellen Änderungen in den Proteinen einhergeht oder eine Bindung an Stellen, die eine in der Nachbarschaft liegende Reportergruppe aufweisen, leicht detektierbar ist. Mikrokolorimetrie und Gleichgewichtsdialyse sind Beispiele für mehr allgemein angewandte homogene Verfahren. Das erstgenannte Verfahren erfordert jedoch relativ große Mengen des Proteins für jeden Assay; da Proteinproben nicht wiederverwendbar sind, ist ein Screenen nach diesem

Verfahren sehr materialaufwendig. Auf der anderen Seite ist die Gleichgewichtsanalyse langsam und erfordert sensitive Verfahren zur Bestimmung der Ligandkonzentrationen, falls kleine Proteinmengen verwendet werden.

[0005] Heterogene Verfahren sind ökonomischer, da sie weniger Protein für jede Probe erfordern und die Proteinprobe wiederverwendet werden kann. Die Bindung in heterogenen Systemen kann entweder direkt durch Änderungen physikalischer Eigenschaften einer Proteinschicht (Masse, optische Eigenschaften, usw.) oder indirekt durch kompetitive Verdrängung eines markierten Liganden durch eine zu untersuchende Substanz detektiert werden. Direkte Verfahren können die Bindung an jede Stelle in einem Protein identifizieren, wohingegen indirekte Verfahren die Bindung an bekannte Stellen detektieren, wobei die Ligandbindung an sekundären Stellen übersehen wird. Dies ist der Grund, warum indirekte heterogene Verfahren für ein, primäres Screenen eines Proteins mit unbekannter Funktion oder Bindungsstelle nicht eingesetzt werden können.

[0006] Heterogene Verfahren stoßen auf schwerwiegende Schwierigkeiten bei der Analyse einer Bindung von kleinen Liganden (Karlsson, R., *Analyt. Biochem.*, 221: 142–151 (1994)). Für direkte Verfahren liegt dies an der Tatsache, dass bei der Bindung kleiner Liganden kleine Änderungen in der Masse und den optischen Eigenschaften der Proteinschicht erfolgen. In indirekten Verfahren ist das Markieren der kleinen Liganden selbst ein Problem, da das Einführen eines Fluorophors oder Enzymmarkers die Spezifität des markierten Liganden verändern kann. Radioaktive Markierung ist frei von diesem Nachteil, wird jedoch als gefährlich und teuer angesehen, da radioaktive Liganden für jedes Protein erhältlich sein müssen.

[0007] WO 94/28372 (Rosemount Inc.) betrifft einen chemischen Sensor zum Aufspüren von mindestens einem, ausgewählt aus organischem Gas, Flüssigkeit und Dampf, umfassend (a) einen ersten Träger mit einer ersten Trägeroberfläche, (b) ein schwellbares Material, das an der ersten Trägeroberfläche befestigt ist, das das Mittel zum Aufspüren des Gases, der Flüssigkeit oder des Dampfes ist, und (c) spannungsempfindliche Elemente. In Gegenwart einer Flüssigkeit, eines Gases oder eines Dampfes schwillt das Material und dehnt sich aus, so dass sich mindestens eine seiner Dimensionen verändert. Solch eine Ausdehnung entwickelt eine Belastung an der Zwischenfläche zwischen einer ersten Trägeroberfläche und dem Material. Das zugsensitive Mittel detektiert eine solche Belastung und erzeugt ein Signal.

[0008] JP 58 182540 (Meisi Denki KK) offenbart einen Apparat zum Messen relativer Feuchtigkeit in einem weiten Bereich auf einem feuchtigkeitsempfindlichen Bestandteil wie Haar. Der Apparat überführt die Änderungen des Sensors (Expansion oder Kontraktion) durch ein Zugelement in ein elektrisches Signal.

[0009] Berry et al. (IMB J. of Research and Development) betrifft ein Biege-Ausleger-Verfahren zur Untersuchung der feuchtigkeitsbedingten Schwellung in einem Polymer für mikroelektronischen Einsatz. Ein solches Polymer besteht aus einem ausgehärteten Epoxy-Glas-Laminat auf einer Rückschicht aus Kupfer. Das beschriebene Biege-Ausleger-Verfahren ist auf die Anwendung für Sorptionsuntersuchungen ausgerichtet.

[0010] EP 0 402 917 (Biocircuits Corporation) betrifft Biosensoren, die elektrisch leitende Polymertensidschichten für die Detektion der Analyten einsetzen. Diese Biosensoren umfassen ein elektrisch inertes Substrat, eine elektrisch leitfähige Tensidschicht und, an die Tensidschicht gebunden, Bestandteile eines spezifischen Bindungspaares zum Binden eines komplementären Bestandteils in einem wässrigen Medium. Die Analyten werden durch Bindung der Bestandteile detektiert, was zu einer Änderung in den elektrischen oder optischen Eigenschaften der Tensidschicht führt.

[0011] WO 9402852 (duPont de Nemours) offenbart ein Verfahren zur Detektion eines Analyten in einer flüssigen Probe, das die akustischen und optischen Eigenschaften eines Polymers nutzt, das mit einem Sensor verbunden ist. Das transduzierende Polymer weist 1 bis 20 Vernetzungen pro Polymermolekül auf, ausgewählt aus amphoterem Co- oder Terpolymer von Acrylsäure, Alkylmethacrylat und N,N-Dimethyl-aminoethylmethacrylat.

[0012] EP 0 121 385 (Cambridge Life Science PLC) betrifft einen konduktimetrischen Sensor für den quantitativen Bioassay eines Analyten, umfassend ein Paar aus beabstandeten Elektroden in elektrischem Kontakt mit dem Sensorbestandteil. Der Sensorbestandteil umfasst eine im wesentlichen nicht-leitfähige Membran, auf der eine Substanz immobilisiert ist, die eine spezifische Affinität mit einem Analyten aufweist. Das Vorliegen des Analyten induziert eine Änderung der Leitfähigkeit entlang der Länge der Membran zwischen den beiden Elektroden.

[0013] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben ein mechanochemisches Verfahren entwickelt, bei dem die mechanischen elastischen Eigenschaften eines Proteinfilms genutzt werden, um die Ligand-Protein-Interaktion zu messen. Das Verfahren wird in zwei Publikationen beschrieben: V. N. Morozov and T. Ya. Morozova (1992) "Mechanical Detection of Interaction of Small Specific Ligands with Proteins and DNA in Cross-Linked Samples", *Analytical Biochem.*, 201: 68–79; und in V. N. Morozov and T. Y. Morozova (1984) "Protein Molecule as a Bioanalytical Device", *FEBS Letters*, 175: 299–302, wobei der Gesamtinhalt von beiden hierin als Referenz einbezogen ist.

[0014] In diesen Artikeln offenbaren die Erfinder ein neues Verfahren zum Nachweis der Wechselwirkung von Makromolekülen mit ihren spezifischen Liganden unter Ausnützen der Fähigkeit von vernetztem Protein und festen und gelförmigen DNA-Proben ihre me-

chanischen Eigenschaften bei Bindung des spezifischen Liganden mit den Makromolekülen zu verändern. Diese mechanochemische Phänomene wurde erstmals in Lysozymkristallen (Morozov et al., *J. Mol. Biol.*, 157: 173–179 (1982), Morozov et al., *Biophysics (Sov.)*, 28: 786–793 (1983)) und in Papainfilmen (Morozov et al., *FEBS Lett.*, 175: 299–302 (1984)) entdeckt. Die Erfinder schlagen vor, dass das Phänomen einen gewissen universellen Charakter aufweist, da es auf zwei allgemein bekannten Tatsachen beruht. Erstens, halten viele kristalline Proteine ihre Fähigkeit zur Bindung spezifischer Liganden aufrecht. Diese Tatsache wird bei der Röntgenanalyse von Proteinligandkomplexen in weitem Umfang genutzt (Rupley in *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, Timasheff and Fasman, Herausgeber, Seiten 291–393, Dekker, New York (1969)). Zweitens, ändert diese Bindung unabhängig von ihrem Charakter bis zu einem gewissen Ausmaß inter- und intramolekulare Interaktionen, die Molekularstruktur und die Packung der Moleküle in der festen Probe.

[0015] Von allen physikalischen Parametern der festen Proteine scheinen die mechanischen diejenigen zu sein, die gegenüber diesen Änderungen am empfindlichsten sind. Eine theoretische Analyse zeigt, dass eine Deformation der Proteilmoleküle um  $10^{-6}$  Å prinzipiell mit mechanischen Verfahren gemessen werden kann. In der Praxis können Änderungen der durchschnittlichen Proteindimensionen von  $10^{-2}$  Å leicht detektiert werden.

[0016] Um Proben für ein mechanochemisches Testen herzustellen, haben die Erfinder ein Verfahren angewendet, das **Fig. 1** gezeigt ist. Eine salzfreie Lösung (10–200 mg/ml Protein) wurde auf eine Glasplatte gegossen und schnell unter reduziertem atmosphärischem Druck von 10–15 mm Hg getrocknet. Der resultierende trockene Proteinfilm (5 bis 10 µm dick) wurde dann in einem Dampf einer 25%igen Glutaraldehyd (GA)-Lösung bei 25–27°C vernetzt. Die Zeit, die zum Erhalten des unlöslichen Films erforderlich war, variierte zwischen 0,5 und 6 h für verschiedene Proteine. Der vernetzte Film wurde mit Wasser gewaschen, um das überschüssige Aldehyd zu entfernen und dann vorsichtig von der Glasplatte abgelöst.

[0017] DNA-Filme wurden durch Dialysieren eines DNA-Präzipitats in Alkohol gegen ein 10 mM NaCl-Lösung hergestellt, um ein Gel mit einer DNA-Konzentration von etwa 100 mg/ml zu ergeben. Das Gel wurde dann über die Glasoberfläche verteilt, wie für Proteinfilme beschrieben getrocknet und durch UV-Strahlung unter einer 30 W-keimtötenden Lampe vernetzt, die für 1,5 h 0,1 m von der Probe entfernt platziert wurde (Sheldon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62: 417–421 (1972)).

[0018] Es wurden Streifen von 300–700 µm Länge und 20–50 µm Breite mit einer Rasierklinge geschnitten, um diese als Proben zu verwenden. Diese Proben wurden dann mechanisch getestet, während sie

in eine Ligandlösung eingetaucht waren. Das mechanische Testen involvierte das Strecken der Streifen in Längsrichtung, das Zulassen ihrer Relaxation unter isometrischen Bedingungen und dann die Messung der Änderungen in der isometrischen Spannung als Reaktion auf das Eintauchen der Probe in die Ligandlösungen.

[0019] Bei ihrem Prototypen-Verfahren haben die Erfinder einen Apparat eingesetzt, der in **Fig. 2** als eine schematische Teilansicht gezeigt ist, die als "Stand der Technik" gekennzeichnet ist. Der Apparat setzt zwei Vorrichtungen ein, um die Probe zu strecken. Eine ist ein Wandler vom bimorphen Typ, der meist verwendet wird, um die Probe periodisch zu strecken, wenn ihr elastisches Modul gemessen wird. Da in der Praxis die Formänderung von Piezomaterialien unter Gleichstromspannung nicht groß genug und nicht stabil genug ist, wird eine andere Vorrichtung verwendet, um eine konstante Belastung anzuwenden und diese während dem Testen genau isometrisch zu halten. Dies erfolgt durch eine rotierende Quarzplatte (**105** in **Fig. 5**; in **Fig. 2** nicht gezeigt). Daher verwendet der Apparat eine rotierende Quarzplatte und ein piezoelektrisches Bimorph, um den hergestellten Streifen statisch bzw. dynamisch zu strecken und einen Wandler mit variabler Kapazität, um statische und dynamische Belastungen in der Probe als Reaktion auf die Formveränderungen und Ligandanwendungen zu messen.

[0020] Mit einer Bettplatte oder Basis **110** ist eine Flusskammer **180**, ein Zugwandler **140**, ein Kraftwandler **160** verbunden. Die Flusskammer **180** schließt, einen Napf **181** ein, der mit Ligandlösung gefüllt ist, die durch die Schwerkraft und Oberflächenspannung in dem Napf gehalten wird. Die Lösung in dem oberen Teil des Napfes **181** wird durch einen Meniskus **M** begrenzt. Die Lösung wird durch das Rohr **182** in den Napf **181** eingefüllt, und von der oberen Begrenzung des Meniskus **M** durch ein Saugrohr **183** abgesaugt. Innerhalb des Meniskus **M** und den Seiten des Napfes **181** befindet sich ein Probenstreifen **S**, der von den Zangenbacken **168** und **148** gehalten wird, die an ihrem jeweiligen Wandler angebracht sind. Die Flusskammer **180** wird auf das Gehäuse der Vorrichtung aufgebracht und ist zur Bewegung nach oben und unten fähig, wodurch ein Eintauchen der Zangenbacken in die Kammer (in der Oben-Position) möglich ist und ein einfacher Zugang zu den Zangenbacken (zum Anbringen der Probe) in der Unten-Position ermöglicht wird. Die Zangenbacken **168** und **148** laufen durch L-förmige Schlitze an gegenüberliegenden Seiten des Napfes **181**, so dass sich die Zangenbacken in einem begrenzten Bereich frei bewegen können, bevor sie die Seiten des Napfes **181** berühren. Der Streifenhalter und die Zangenbacken **168**, **148** werden unten in Bezug auf **Fig. 3** vollständiger beschrieben.

[0021] Noch immer mit Bezug auf **Fig. 2** schließt der Belastungswandler **140** einen rechteckigen Bestandteil ein, der durch eine Befestigungsklammer **146** auf

der Basis **110** angebracht ist. Dieser rechteckige Bestandteil ist ein piezoelektrischer Bimorph, d. h. ein Sandwich aus zwei Schichten eines piezoelektrischen Materials **142** und **143**, die in einem 180°-Winkel zueinander orientiert sind, und zwar so, dass bei Anlegen eines elektrischen Feldes durch den Sandwich **142/143** einer der Schichten sich entlang der Länge des Bestandteils kontrahiert, und die andere Schicht expandiert. Wie in einem Bimetallthermostat verbiegt sich der Bestandteil als Ganzes, wenn sich die eine Schicht expandiert und die andere kontrahiert. Um das benötigte elektrische Feld zum Verbiegen des Sandwichs **142/143** anzulegen, sind beide Seiten des Sandwichbestandteils mit Metall beschichtet. Eine Metallschicht **141** ist auf die untere Seite der Piezoschicht **142** beschichtet und eine Metallschicht **144** ist auf die obere Seite der Piezoschicht **143** beschichtet. Die Drähte **2142** und **2143** verbinden die Metallschichten **142** bzw. **144** mit einer einstellbaren Spannungsquelle (in **Fig. 2** nicht gezeigt). Durch Einstellung der angelegten Spannung können die Zangenbacken **148** in einem kalibrierten Ausmaß bewegt werden.

[0022] **Fig. 3**, auch als "Stand der Technik" markiert, zeigt, wie die Zangenbacken **168** und **148** innerhalb des Napfes **181** verbunden sind. In jeder der Zangenbacken **168**, **148** wird der Streifen **S** durch zangenähnliche Zangenklauen gehalten, die durch Spaltung eines Wolframdrahtes gebildet werden. Die gespaltenen Drähte werden durch einen verschiebbaren Ring **146** auf der Probe **S** befestigt.

[0023] Die Zangenbacke **168** wird fest an einem elastisch aufgehängten Balken **162** befestigt, der auf der Basisplatte **110** durch eine Klammer **166** befestigt ist. Wenn der Streifen **S** in dem Napf **181** durch den Wandler **140** bewegt wird, wird der Balken **162** in einem gewissen Ausmaße gebogen; aufgrund dieser Verbiegung übt der Balken **162** eine Rückstellkraft aus, die eine Funktion seiner Verbiegung ist. Daher kann durch Messung der Verbiegung des Balkens **162** die Kraft oder die Belastung in der Probe **S** gemessen werden. Um die Verbiegung des Balkens zu messen, wird wie folgt ein Kondensator gebildet: die untere Seite des Balkens **162** wird mit einer ersten Schicht eines Metalls **164** beschichtet und ein Block **169**, auf die Basis **110** aufgebracht, wird mit einer zweiten Schicht eines Metalls **161** abgedeckt.

[0024] Die Metallschichten **161** und **164** bilden einen Parallelplattenkondensator, dessen Kapazität mit der Lücke zwischen den Metallschichten **161**, **164** variiert; d. h., mit dem Verbiegen des Balkens **162**, wobei das Verbiegen proportional zur Kraft in dem Streifen **S** ist, innerhalb eines Bruchteils eines Prozentes. Die Metallschichten **161**, **164** werden durch Drähte **2161**, **2164** mit Schaltkreisen verbunden (nicht gezeigt), die die Kapazität der Schichten elektronisch messen (z. B. durch Messen der Frequenz eines LS-resonanten Kreises, der den Balken **162**-Kondensator als C-Wert einschließt und einen entfernten Induktor als L-Wert). Die gemessene Ka-

pazität ist daher ein Maß für die Zugfestigkeit entlang des Streifens S.

[0025] Es ist festzustellen, dass die Verschiebung der Zangenbacke **148** gleich der Summe aus der Verschiebung der Zangenbacke **168** plus der Verlängerung des Streifens S ist.

[0026] Das Prototyp-Verfahren der Erfinder war ein wesentlicher Fortschritt im Fachgebiet und stellte ein neues Verfahren zum Messen der Ligandbindung dar, das das Aufzeichnen neuer Arten von Daten erlaubt. Das Prototyp-Verfahren der Probenherstellung und der verwendete Apparat zum Messen der Kraft/Belastung hatte jedoch verschiedene Nachteile.

[0027] Ein Nachteil lag darin, dass die sehr kleinen und zerbrechlichen Proben, nur 0,3– 0,7 mm in der Länge, in der Handhabung und beim Befestigen für die Belastungs/ Spannungsmessungen Schwierigkeiten bereiteten.

[0028] Die in den **Fig. 2** und **3** gezeigte Klemmbefestigungsanordnung war in der Anwendung im Submillimeter-Maßstab relativ umständlich. Der schlüpfartige Streifen S musste mit großer Sorgfalt gehandhabt werden. Die Vorbereitungsschritte, die das Abkratzen und Schneiden der Streifen involvieren, mussten unter einem Stereoskopen Mikroskop durchgeführt werden und das Platzieren der Streifen S in die Zangenbacken erforderte einen Mikromanipulator. Das Verfahren war sehr zeitaufwendig.

[0029] Der Prototyp-Apparat aus **Fig. 3** umfasst die Probe wahrscheinlich ungleichmäßig: das heißt, es ist relativ wahrscheinlich, dass die Zangenbacken die Probe an einem Punkt entlang ihrer Länge härter fassen als an einem anderen, was zu einer ungleichmäßigen Belastung entlang der Breite der Probe S führt, wenn der weniger festgehaltene Teil herausrutscht. Es ist weiterhin wahrscheinlich, dass sie die Probe an verschiedenen Punkten entlang der Länge umfassen, so dass die effektive Länge der Probe unbestimmbar sein kann oder sogar ungleichmäßig, obwohl die Probe S an allen Punkten entlang der Breite mit gleicher Kraft gefasst wird. Die Zangenbacken können die Probe S sogar zerreißen.

[0030] Die effektive oder gefasste Länge des Streifens S ist eine der Größen, die zur Berechnung der quantitativen Daten verwendet werden, die das erfindungsgemäße Verfahren ergibt. Die quantitativen Ergebnisse könnten daher sehr leicht durch ein ungleichmäßiges Erfassen beeinflusst werden. (Die Theorie des Verfahrens wird unten in der detaillierten Beschreibung der Erfindung beschrieben.)

[0031] Die ungünstigen Wirkungen des ungleichmäßigen Probengreifens könnten durch Hochpräzisionszangenbacken eliminiert werden, aber diese wären sehr teuer und könnten leicht beschädigt werden; falls sie beschädigt würden, wäre der Schaden nicht offensichtlich.

[0032] Ein zusätzlicher Nachteil der mechanischen Anordnung gemäß dem Prototyp liegt darin, dass das Versetzen der beiden Sätze aus Zangenbacken Fluidflussprobleme hervorruft. Die vertikale Insertions-

bewegung der Backen und die horizontalen Testbewegungen erfordern L-förmige Schlitze der Flusskammer und eine Flusskammer mit solchen Schlitzen ist nicht in der Lage, Flüssigkeiten mit niedriger Oberflächenspannung zu handhaben, wie Lösungen in organischen Lösungsmitteln oder Wasserlösungen, die oberflächenaktive Verbindungen enthalten, da diese einfach lecken würden; es können nur Flüssigkeiten verwendet werden, die den Napf **181** nicht "befeuchten" und daher nicht aus den Schlitzen auslaufen.

[0033] Ein anderer Nachteil des in **Fig. 2** gezeigten Apparates besteht darin, dass der kapazitiven Kraftwandler **160** vor Feuchtigkeit, Staub und elektrischen Streufeldern, die seine Ablesewerte beeinflussen können, schlecht geschützt ist.

#### Zusammenfassung der Erfindung

[0034] Demgemäß besteht eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neben anderen, darin, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden, wie sie oben genannt sind.

[0035] Eine besondere Aufgabe der Erfindung besteht in einem mechanochemischen Testen von Probenstreifen ohne die Notwendigkeit für einen Mikromanipulationsapparat oder ein mikroskopische Beobachten, wenn die Streifen in einen Testapparat eingebracht werden.

[0036] Eine andere Aufgabe besteht darin, kontrollierte Bedingungen für das Befestigen des Probenstreifens zu ermöglichen.

[0037] Eine dritte Aufgabe besteht darin, die Befestigung des Probenstreifens einfach und schnell zu gestalten.

[0038] Eine vierte Aufgabe besteht darin, einen mechanochemischen Testapparat mit einer Flusszelle bereitzustellen, der mit Lösungen oberflächenaktiver Verbindungen und Lösungen von Liganden in organischen Lösungsmitteln verwendet werden kann, indem ein Design eingesetzt wird, das nicht auf Oberflächenspannungskräfte der Flüssigkeit in der Flusszelle abhängig ist.

[0039] Eine fünfte Aufgabe besteht darin, einen mechanochemischen Testapparat bereitzustellen, der einen wirksamen Schutz gegen Feuchtigkeit und Staub aufweist und einen stabilen Kraftwandler.

[0040] Eine sechste Aufgabe besteht darin, Verfahren zum Messen der Deformation durch Ligandenbindung eines Proteins oder DNA-Films bereitzustellen, die nicht das Messen der lateralen Elastizitäts- oder der lateralen Zugeigenschaften des Proteins oder DNA-Films einschließen.

[0041] Die Erfindung stellt daher ein Verfahren und einen Apparat zur quantitativen mechanochemischen Messung der Ligandbindung an Protein und DNA zusammen mit anderen Verfahren zur Bestimmung der Ligandbindung durch Messen der Deformation des Proteins oder DNA-Films bereit.

[0042] Insbesondere betrifft das Verfahren daher einen Apparat zum Messen der Wirkung von Chemika-

lien auf einen Probefilm aus polymerem Material, dadurch gekennzeichnet, dass er umfasst:

- ein Paar von Trägerbestandteilen, jeder mit einem Mittel in Form einer Spitze zur Aufnahme von Probe an einem der Enden, um ein Ende des Probenfilms aus polymerem Material mit einer Dicke im Bereich von 1 Micron zu halten, wobei mindestens eines der Mittel in Form einer Spitze zur Aufnahme von Probe ein Ende des Probenfilm aus polymerem Material in einer solchen Art hält, dass das Ende des Probenfilms nicht von einer Zangenbacke gehalten wird;
- Mittel zum Angreifen einer Kraft, angebracht an mindestens einem der Trägerbestandteile, zum Anwenden von Kraft auf den Probenfilm, der von dem Mittel in Form einer Spitze gehalten wird, wenn er verwendet wird; und
- Mittel zum Messen, direkt oder indirekt an dem Probenfilm angebracht, um Änderungen in den Eigenschaften eines Probenfilms zu messen, wenn dieser bei der Verwendung der Einwirkung einer Chemikalie unterworfen wird.

[0043] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Verwendung des oben beschriebenen Apparates zur Messung der Wirkung von Chemikalien auf einen Probenfilm aus polymerem Material.

[0044] Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus Verfahren zur Herstellung eines Probenfilms aus vernetztem Protein oder DNA-Material.

[0045] Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur Detektion der Wechselwirkung eines Liganden mit einem Protein oder einer DNA.

[0046] Der Apparat ist für die quantitative Messung der Wirkung von Chemikalien aus einem Probenstreifen aus polymerem Material in verbesserter Art entworfen. Der Apparat schließt ein Paar aus Trägerbestandteilen ein, wobei jedes ein Mittel in Form einer Spitze zur Aufnahme von Probe an einem Ende aufweist, zum Durchstoßen des oder Adhieren an den Probenstreifen aus polymerem Material. An mindestens einen der Trägerbestandteile ist ein Mittel zum Anwenden von Kraft auf den Probenstreifen angebracht, die bei der Verwendung durch die Spitzen gehalten werden. Ebenfalls direkt oder indirekt an den Probenstreifen angebracht ist ein Bestandteil zum Messen von Änderungen einer chemischen, elektrischen oder mechanischen Eigenschaft des Probenstreifens, wenn dieser bei der Verwendung einer Chemikalie ausgesetzt wird. Die Kraft wird vorzugsweise parallel zur Richtung des Probenstreifens zwischen den Spitzen eingesetzt oder aufrecht erhalten, um den Probenstreifen zu dehnen oder zu kontrahieren. Ein bevorzugtes Mittel zum Messen ist eines, das die Verschiebung einer der Trägerbestandteile in Bezug auf den anderen misst oder die Kraft misst, die erforderlich ist, um die Spitzen bei konstanter Verschiebung zu halten. In einer Ausführungsform schließt der Kraftbestandteil einen Bestandteil zur oszillierenden Variation der der Elongation des Probenstreifens ein.

[0047] In einer bevorzugten Ausführungsform dieses erfindungsgemäßen Apparates schließt der Apparat darüber hinaus ein Gefäß zur Aufnahme der Flüssigkeit ein, wie einen Tank, und der Apparat schließt einen Mechanismus ein, der auslöst, dass die den Probenstreifen haltenden Spitzen den Probenstreifen in die Flüssigkeit eintauchen, der sich in dem Gefäß zur Aufnahme der Flüssigkeit befindet. Auf diese Art kann der Probenstreifen beim Eintauchen in die Flüssigkeit in dem Gefäß getestet werden. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform schließt der Apparat einen Halter ein, um den Probenstreifen in Bezug auf die Spitzen auszurichten. Der Apparat richtet den Probenstreifenhalter in eine vorherbestimmte Position in Relation zu den Trägerbestandteilen aus, so dass das Befestigen des Probenstreifens an den Spitzen erleichtert wird.

[0048] Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur Verwendung dieses Apparates zur quantitativen Messung der Wirkung von Chemikalien auf einen Probenstreifen aus polymerem Material. Gemäß diesem Verfahren wird der Probenstreifen aus polymerem Material an den Spitzen zum Halten der Proben auf dem Paar der Trägerbestandteile befestigt, so dass die Probe zwischen den Spitzen gehalten wird. Der Probenstreifen wird dann in eine Referenzflüssigkeit eingetaucht, und es wird eine Kraft durch den Apparat an den Probenstreifen angelegt. Eine physikalische (chemische, elektrische, optische, magnetische, akustische, mechanische, usw.) Eigenschaft des Probenstreifens wird dann durch den Apparat gemessen. Der Probenstreifen wird dann in eine Flüssigkeit eingetaucht, die die zu testende Chemikalie enthält, und die gleiche physikalische Eigenschaft wird gemessen. Die Wirkung der Chemikalie auf das polymere Material kann durch Detektion einer Änderung in der gemessenen Eigenschaft bestimmt werden.

[0049] Der Probenstreifen aus polymerem Material wird vorzugsweise an den Spitzen befestigt, indem die Probe mit den Spitzen durchstoßen wird oder durch Kleben der Probe an die Spitzen mittels eines Klebers.

[0050] Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise zur quantitativen Messung einer Ligandbindung an ein Protein oder ein Nucleinsäurematerial verwendet. Daher ist der Probenstreifen vorzugsweise ein quervernetztes Protein oder Nucleinsäurematerial und die Chemikalie, deren Effekt gemessen wird, ist der Ligand, der auf seine Fähigkeit zur Bindung an das Protein oder Nucleinsäurematerial zu testen ist.

[0051] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Detektion der Wechselwirkung des Liganden mit einem Protein und einer DNA durch Messung einer physikalischen Eigenschaft, die durch die Deformation des vernetzten Films aus Protein oder DNA beeinflusst wird, die bei der Ligandenbindung auftritt. Das zu testende Protein und die zu testende DNA wird zunächst vernetzt, um einen festen Probenstreifen

fen des Proteins oder der DNA zu bilden. Dieser Probenstreifen aus vernetztem Protein oder DNA wird mit dem interessierenden Liganden in Kontakt gebracht. Um eine Wechselwirkung zwischen dem Protein oder der DNA und dem Liganden von Interesse zu detektieren, wird eine physikalische Eigenschaft des Probenstreifens gemessen, und zwar vor und nach Kontakt des Streifens mit dem Liganden. Es kann jedes Verfahren zur Messung verwendet werden, bei dem die Deformation der vernetzten Struktur des Probenstreifens detektierbar ist. Falls irgendein Unterschied zwischen den gemessenen Eigenschaften vor und nach dem Inkontaktbringen des Streifens mit dem Liganden detektiert wird, ist dies ein Nachweis für die Interaktion des Liganden mit dem Protein oder der DNA.

[0052] Da die spezifische Ausführungsform dieses Verfahrens die Messung von Änderungen in der lateralen Elastizität eines solchen vernetzten Streifens oder Änderungen in den lateralen Zugeigenschaften involviert, vorhergehend durch die Erfinder der vorliegenden Erfindung publiziert worden ist, werden solche Messverfahren der physikalischen Eigenschaften des Probenstreifens ausdrücklich von dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgeschlossen. Mit dem Begriff "lateral" ist eine Eigenschaft gemeint, die entlang der Achse gemessen wird, die der längsten Dimension (Länge) des Probenfilms entspricht. Es ist festzuhalten, dass die Verfahren, die die Messung der lateralen Elastizität oder der lateralen Zugeigenschaften einsetzen, die von dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgeschlossen sind, nichtsdestotrotz als Teil der vorliegenden Erfindung aufgefasst werden, wenn das Verfahren den neuen erfindungsgemäßen Apparat einsetzt.

[0053] Unter den neuen Verfahren, die zur Detektion der Ligandwechselwirkung mit dem Protein oder DNA verwendet werden können, außer der Messung der lateralen Elastizität oder der lateralen Zugeigenschaften, sind die folgenden eingeschlossen. Der vernetzte Film aus Protein oder DNA kann an eine zweite Schicht adhärirt werden, die nicht von dem Liganden beeinflusst wird, um eine bimorphe Struktur zu bilden. Die zweite Schicht kann aus zug- oder belastungssensitivem Material (z. B. einem piezoelektrischen Material) hergestellt sein, oder sie kann aus dem gleichen Protein oder gleichen DNA wie der Probenstreifen hergestellt sein, auf dem die aktive vernetzte Seite blockiert worden ist. Durch Ligand-induzierte Deformationen des vernetzten Proteins oder der vernetzten DNA verbiegt sich die gesamte Struktur und dieses Verbiegen kann durch jedes geeignete Verfahren gemessen werden, wie z. B. optisch, elektrisch, usw. Eine Art eines modifizierten Bimorphs involviert das Adhärenieren des Probenstreifens auf eine belastungssensitive Oberfläche. Bei Deformation des Probenstreifens wird eine gewisse Veränderung der Beanspruchung oder der Belastung auf der empfindlichen Oberfläche induziert, die verwendet werden kann, um ein elektrisches Signal zu erzeugen, und

zwar auf eine Art und Weise, die der in den bekannten tensorresistiven Sensoren ähnlich ist.

[0054] Ein anderer Weg zur Praktizierung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, Partikel aus leitfähigem Material, wie Kohlepulver, in den Protein- oder DNA-Film einzubeziehen und dann Elektroden auf beiden Seiten des Films zu platzieren. Die Leitfähigkeit des Films wird dann vor und nach dem Einführen des Liganden gemessen. Jede leichte Ligand-induzierte Veränderung in der Probengröße führt zu großen Änderungen der Leitfähigkeit der Probe. Das Schwellen verursacht einen Abfall der Leitfähigkeit, und ein Einlaufen verursacht einen Anstieg. Eine andere Art der Technik besteht darin, Änderungen in der Ligand-induzierten Dicke oder Elastizität in Richtung der Filmdicke zu messen, d. h. Änderungen in der normalen Richtung des Films. Die Änderungen in der Dicke können durch Ellipsometrie oder jedes andere optische Verfahren gemessen werden. Insbesondere bei Messung von normalen Deformationen des Films (d. h. in Richtung der Dicke) ist der Film vorzugsweise ein relativ massiver Körper mit intermolekularen Kontakten zwischen Proteinmolekülen, im Gegensatz zu einer molekularen Monoschicht. Nichtsdestotrotz kann die Größe der Proteinprobe auf einen Mikronmaßstab reduziert werden. Änderungen in der Elastizität und Dicke des Films können auch nach akustischen Verfahren gemessen werden, in denen die Frequenz eines festen Resonators gemessen wird. Unterschiede in der Dicke. können auch durch Elektrodenverfahren gemessen werden. Die Impedanz einer Elektrode ist gegenüber der Dicke eines Halbleiterproteinfilms auf der Elektrode, der Packung der Proteinmoleküle, deren Änderung und Konformation empfindlich. Änderungen in der flektrodenimpedanz können eine Deformation des Films aufgrund der Ligandbindung zeigen. Falls die Proteinschicht mit magnetischen Partikeln bedeckt ist, kann deren Abstand von einem magnetischen Sensor registriert werden, um die Deformation des Films zu verfolgen.

[0055] Die Dicke des Films und die normale Elastizität können direkt unter Verwendung von Indentoren gemessen werden. Die Tiefe der Indention ist eine Funktion der Beadung und der Elastizität des Protein- oder DNA-Films. Eine Mikrovariante des Indentorverfahrens involviert die Verwendung eines Rasterkraftmikroskops. Die Spitze des Rasterkraftmikroskops kann als Indentor verwendet werden. Der Vergleich von Probeteilen, die auf verschiedene Beladung der Spitze erhalten werden, erlaubt die separate Berechnung von Deformation und Elastizitätsparametern.

[0056] Die Geschwindigkeit des Durchtritts von akustischen Wellen durch die vernetzten Proteine oder DNA-Filme kann verwendet werden, um die Deformation zu messen. Dies kann Rayleigh-Wellen auf der Oberfläche eines Piezokristalls einschließen. Die Geschwindigkeit der Transmission von Transversal- oder Longitudinalwellen durch den Probenstreifen kann direkt oder nach einem Resonanzverfahren ge-

messen werden, bei dem die Länge der stehenden Wellen in der Probe aufgezeichnet wird.

[0057] Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht auf die oben diskutierten spezifischen Techniken begrenzt. Jedes Verfahren kann zur Messung einer physikalischen Eigenschaft des Probenstreifens verwendet werden, außer der Lateralelastizität oder den lateralen Spannungseigenschaften, das zur der Detektion der Deformation der vernetzten Struktur des Probenstreifens bei Wechselwirkung mit dem Liganden fähig ist. Zum Beispiel kann der Protein- oder DNA-Film auf den Poren eines Filters oder einer Kapillare aufgebracht sein. Schwellen und Einlaufen des Films durch Ligandwechselwirkung kann die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsdurchflusses durch die Kapillare ändern und dieser Parameter kann zur Sondierung der Schwellung angewendet werden. Es wird erwartet, dass, sobald die vorliegende Erfindung bekannt und verstanden ist, der Fachmann fähig sein wird, andere zu der vorliegenden Beschreibung äquivalente Aspekte aufzugreifen, um die Schritte der vorliegenden Verfahrensansprüche durchzuführen.

[0058] Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus Verfahren zur Bildung des Probenstreifens, die erfindungsgemäß verwendet werden können. Gemäß einem Verfahren werden Streifen aus einem verstärkenden Material auf der Oberfläche gebildet und das zu testende Polymermaterial wird über der Oberfläche gebildet, einschließlich zumindest eines Teils des verstärkenden Streifens, um an den verstärkenden Streifen zu kleben. Das Polymermaterial und die verstärkenden Streifen, die daran angeklebt sind, werden dann von Oberfläche entfernt. Der so hergestellte Probenstreifen wird an den Spitzen des Apparats befestigt, so dass die Spitzen in der Region des verstärkenden Streifens an diesen befestigt werden. Gemäß einem anderen Verfahren wird der Probenstreifen durch Ektrosprayen des Polymermaterials auf eine Oberfläche mit oder ohne Vorliegen des verstärkenden Streifens gebildet.

[0059] Wenn das Polymermaterial ein Protein- oder ein DNA-Material ist, werden die Protein- oder DNA-Moleküle getrocknet, nachdem sie auf die Oberfläche aufgebracht sind und sich im Kontakt mit dem verstärkenden Streifen befinden. Ein Film wird daher auf der Oberfläche gebildet, der mindestens teilweise mit den Streifen des verstärkenden Materials überlappt. Die Proteine oder Nucleinsäuremoleküle des Films werden dann vernetzt, gefolgt vom Entfernen des vernetzten Protein- oder Nucleinsäurematerials und des darunter liegenden verstärkenden Streifens von der Oberfläche. Die Oberfläche des Streifens aus verstärkendem Material ist vorzugsweise so vorbehandelt, dass sie eine Adhärenz des Films an das verstärkende Material ermöglicht. Das verstärkende Material ist vorzugsweise Gelatine.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0060] Die oben genannten Aufgaben und andere

sowie das Wesen und die Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung in Zusammenwirkung mit den Zeichnungen besser deutlich werden, worin:

[0061] **Fig. 1**, markiert als "Stand der Technik", eine schematische Ansicht des Verfahrens zur Herstellung von Streifen nach dem Stand der Technik ist;

[0062] **Fig. 2**, markiert als "Stand der , Technik", eine perspektivische Ansicht des Apparates gemäß dem Stand der Technik ist;

[0063] **Fig. 3**, markiert als "Stand der Technik", eine perspektivische Ansicht der Zangenbacken gemäß dem Stand der Technik ist;

[0064] **Fig. 4** eine perspektivische Ansicht eines erfindungsgemäßen Apparates ist;

[0065] **Fig. 5** eine partielle Schnittansicht ist, die entlang der Linien V-V von **Fig. 4** verläuft;

[0066] **Fig. 6** eine perspektivische Ansicht der Basis ist;

[0067] **Fig. 7** eine perspektivische Ansicht des Halters ist;

[0068] **Fig. 8** Querschnittsansichten der Flusszelle zeigt;

[0069] **Fig. 9A bis 9D** sind schematisch perspektivische Ansichten der Spitzen und, Halter, die ein Verfahren Anbringen der Spitzen an einen Streifen zeigen;

[0070] **Fig. 10A bis 10D** sind schematische Querschnittsansichten, die ein alternatives Verfahren zum Anbringen der Spitzen an einen Streifen zeigen;

[0071] **Fig. 11A bis 11D** sind schematische Querschnittsansichten, die das Verfahren zur Herstellung von Streifen zeigen;

[0072] **Fig. 12** zeigt die Messung von Änderungen in der isometrischen Belastung und im Elastizitätsmodul einer Hexokinaseprobe als Reaktion auf verschiedene Glucosekonzentrationen;

[0073] **Fig. 13** zeigt die Bestimmung der Dissoziationskonstante für Glucose in einem Hexokinaseproteinfilm;

[0074] **Fig. 14** zeigt die Messungen der Änderungen in der isometrischen Belastung einer Concanavalin A-Probe als Reaktion auf verschiedenen Konzentrationen von Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (MP), einer Glucoselösung (Glc) und auf das Entfernen divalenter Kationen aus einer Pufferlösung;

[0075] **Fig. 15** zeigt die Bestimmung der Dissoziationskonstante für Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid in einem Concanavalin A-Proteinfilm;

[0076] **Fig. 16** zeigt das Verfahren zum Testen der Reaktion eines Avidinfilms auf eine Biotinlösung in einer Kontrollprobe und in einer Probe, die gegenüber  $10^{-6}$  M Biotinlösung für 48 h präexponiert war;

[0077] **Fig. 17** zeigt die relativen Änderungen in der isometrischen Spannung und im elastischen Modul von Avidinfilmen als Reaktion auf eine  $4 \times 10^{-4}$  M Biotinlösung, gemessen wie in **Fig. 15** gezeigt. Die Proben wurden gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Biotin für 48 h präexponiert;

[0078] **Fig. 18** ist eine schematische Ansicht der Messvorrichtung;

[0079] **Fig. 19A–19B** zeigt schematisch eine Seitenansicht (**Fig. 19A**) und eine Ansicht von oben (**Fig. 19B**) der Spitzen der Trägerbestandteile, die von unten an den Probenstreifen angebracht sind;

[0080] **Fig. 20A–20B** illustrieren schematisch wellenartige Verfahren zum Messen der Deformation und von Änderungen in der Elastizität anhand der Geschwindigkeit von durchtretenden akustischen Wellen;

[0081] **Fig. 21** zeigt schematisch ein Verfahren zur Messung der Deformation des Probenstreifens durch die elektrische Leitfähigkeit durch den Probenstreifen;

[0082] **Fig. 22A–22C** zeigen schematisch bimorphe Strukturen und Beispiele zur Messung des Verbiegens des Bimorphs aufgrund der Ligand-induzierten Deformation;

[0083] **Fig. 23** zeigt schematisch die Ligand-induzierten Änderungen in einer Belastungssensitiven Struktur, wie durch einen tensorresistiven Sensor gemessen;

[0084] **Fig. 24** zeigt schematisch ein magnetisches Verfahren zur Messung der Ligand- induzierten Änderungen in der Filmdicke;

[0085] **Fig. 25** zeigt schematisch das Indentorverfahren zur direkten Messung der Ligand-induzierten Änderungen in der Filmdicke und Elastizität;

[0086] **Fig. 26** zeigt schematisch ein Verfahren, bei dem die Deformation des Proteinfilms in einem Flusskanal die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsdurchflusses durch den Kanal modulieren kann;

[0087] **Fig. 27A–27D** zeigen schematisch eine chipartige Struktur einer mechanochemischen Testvorrichtung, in die ein Probenfilm, ein Probenhalter und ein Kraftwandler in einer kompakten Einheit kombiniert sind (**Fig. 27A**), der abmontierbar ist und ein Einwegartikel sein kann. **Fig. 27B–27D** zeigen schematisch mögliche Strukturen für Kraft- oder Deformationssensoren. Bei einem Tunnelstromsensor wird die Verbiegung eines elastischen Auslegers durch Änderungen im Tunnelstrom zwischen dem Ausleger und einem Kontaktpunkt gemessen (**Fig. 27B**). Die Lichtreflexion oder Interferenz, die durch die Verbiegung des Cantilevers induziert wird, wie in **Fig. 27C** gezeigt, oder Änderungen im Widerstand einer leitfähigen Schicht auf der Oberfläche des Auslegers werden in **Fig. 27D** gezeigt und können ebenso als Kraftsensoren verwendet werden;

[0088] **Fig. 28A** und **28B** zeigt schematisch ein Verfahren zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit des Probenfilms;

[0089] **Fig. 29** zeigt die Ligand-induzierte Änderung im Widerstand eines Lysozymfilms aus Hühnereiklar, hergestellt aus triclinen Lysozymkristallen. Nach unten gerichtete Pfeile zeigen die Zeitpunkte, zu denen eine 2,5-Dinitrophenyllösung in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt wurde. Nach oben weisende Pfeile zeigen die Zeitpunkte, zu denen eine

Waschlösung zugesetzt wurde, die 0,1 M NaCl, pH 4,6, enthält;

[0090] **Fig. 30** zeigt die Änderungen im Widerstand eines amorphen Kabeljau-Parvalbumin-Films in Reaktion auf die Bindung von Calciumionen. Die Messungen wurde in 1 mM Ca-EDTA-Puffer, pH 6,0, 0,1 M NaCl, durchgeführt;

[0091] **Fig. 31** zeigt schematisch den elektrostatischen Linseneffekt bei der Elektrospray-Aufbringung von geladenen Partikeln durch eine Öffnung in einem dielektrischen Schirm;

[0092] **Fig. 32** ist ein Schema eines Verfahrens zur Herstellung und Ablösung eines Probenfilms;

[0093] **Fig. 33A** und **33B** zeigen durch Elektrospray hergestellte Filme aus Concanavalin A (**Fig. 33A**) und Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (**Fig. 33B**). Proteinfilme wurden durch eine einzelne rechteckige Öffnung (0,8 × 0,2 mm) in einer Maske auf einen leitfähigen Polymer-Unterschichtfilm, abgelagert auf einer Al-Elektrode, aufgebracht; und

[0094] **Fig. 34A** und **34B** zeigen die poröse Struktur des durch Elektrospray aufgetragenen Films aus humanen Hämoglobin (das Bild der Filmoberfläche wurde durch Rasterkraftmikroskopie nach trockener Aufbringung in **Fig. 34A** hergestellt) und Änderungen in der Filmstruktur als Resultat des "Backens" des Films (das Bild in **Fig. 34B** zeigt die Struktur des gleichen Films nach Exposition gegenüber einer feuchten Atmosphäre).

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0095] In seiner bevorzugten Ausführungsform betrifft das erfindungsgemäße Verfahren die Herstellung von Streifen aus vernetztem Material aus DNA oder Proteinlösungen, wobei die Streifen mechanisch zum Testen durch Belastung/Spannung oder mechanische Komplianz geeignet sind, und wobei die Streifen mechanische Verstärkungen an ihren Enden beinhalten. Die Verstärkung, die sich über die Breite jedes Streifens erstreckt, ermöglicht eine einfache Handhabung des Streifens und verhindert ein ungleichmäßiges Dehnen entlang verschiedener Ausdehnungsteile in Längsrichtung des Streifens.

[0096] Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung des Streifens besteht darin, die Kunststoffverstärkungsstreifen in einer Abfolge mit regelmäßigen Abständen über eine Glasoberfläche zu legen, die Oberfläche einer Protein- oder DNA-Lösung anzufeuchten, die Lösung zu trocknen und das Protein oder die DNA zu vernetzen und dann die Verstärkung der Länge nach zu schneiden. Nach diesem Verfahren wird jeden einzelnen Probenstreifen an einem Ende von einer Hälfte eines Verstärkungsstreifens begrenzt.

[0097] Ein anderes bevorzugtes Verfahren zur Herstellung des Streifens besteht darin, Protein oder DNA durch Elektrospray auf eine Oberfläche aufzubringen, auf der verstärkende Streifen aufgebracht

sein können.

[0098] Ein bevorzugter Apparat zur Verwendung mit den gemäß dem Verfahren hergestellten Streifen weist ein Paar von nach unten weisenden Trägerbestandteilen mit Spitzen zum Halten der Probe an der untersten Stelle ihrer Ausdehnung auf. Ein Trägerelement wird an einem Kraftumwandler befestigt und andere an einem Bewegungs- oder Verschiebungswandler. Die Spitzen des Trägerbestandteils dehnen sich nach unten in ein Durchlauf oder einen Napf aus, der die Lösung enthält, so dass jede Flüssigkeit verwendet werden kann. Die Trägerbestandteile werden auf einem vertikal bewegbaren Wandlergehäuse des Apparates gehalten, das auf Präzisionsschienen nach oben und unten wandert, die an einem Basisteil befestigt sind. Alternativ kann der Wandler fest sein und der Napf beweglich. Die Trägerbestandteile können in den Napf abgesenkt oder angehoben werden, indem der Bediener das Wandlergehäuse nach oben und unten bewegt. Ein Probenhalter wird vorzugsweise verwendet, um die Proben in dem Apparat zu befestigen. Der Probenhalter ist eine Spannvorrichtung, die Präzisionsoberflächen zum präzisen Befestigen des Halters in Relation zur Basis einschließt. Da sowohl der Probenhalter als auch das Wandlergehäuse in Relation zur Basis präzise gehalten werden, können die Spitzen der Trägerbestandteile wiederholt auf die beiden gleichen Punkte einer Probe abgesenkt werden, die im Probenhalter gehalten wird, und zwar mit einer Genauigkeit von wenigen Mikron, sogar wenn der Probenhalter zwischen den Absenkern und dem Wandlergehäuse entfernt wird.

[0099] Das bevorzugte Verfahren zur Verwendung des Apparates zieht das Platzieren des Probenhalters auf der Basis und das Absenken des Wandlergehäuses, solange bis die Trägerbestandteile mit dem Halter in Kontakt treten, wobei sich Markierungen ergeben, in Betracht. Der Probenstreifen kann dann in einfacher Weise über die Markierungen in einer Position platziert werden, in der die Spitzen des Trägerbestandteils mit diesen in der korrekten Platzierung in Kontakt treten. Dann wird das Wandlergehäuse erneut abgesenkt, bis die Spitzen mit dem Streifen in Kontakt treten, der über den Markierungen über dem Probenhalter positioniert ist, und diesen greifen. Das Greifen kann nach verschiedenen Verfahren erfolgen, einschließlich einer Penetration des Streifens durch die scharfen Enden der Spitze, einem Ansaugen des Probenstreifens auf das Ende von Kapillaren (Spitzen), die im Inneren einen verminderten Druck aufweisen, und ein Binden der Streifen an die Spitzen durch Kleben; bei den letztgenannten Verfahren weisen die Spitzen vorzugsweise abgeflachte Enden auf, um eine Saug- oder Klebefläche bereitzustellen.

[0100] Als Alternative können die Spitzen der Trägerbestandteile (**500**) an den (die) Probenstreifen von unten her geklebt werden, wie dies in **Fig. 19A** und **19B** gezeigt ist.

[0101] Vorzugsweise werden die Streifen durch die Verstärkung penetriert, so dass die durch die Spitzen

ausgeübten Kräfte durch die Verstärkung verteilt werden. Falls ein Klebstoff verwendet wird, sind die Spitzen wiederum vorzugsweise nahe an oder auf der Verstärkung.

[0102] Nachdem der Probenstreifen fest zwischen den beiden Trägerbestandteilen fixiert ist, wird das Wandlergehäuse angehoben, der Probenhalter entfernt und der Probenstreifen wird in den Napf abgesenkt und in die Referenzlösung eingetaucht (Pufferlösung oder irgendeine andere als Kontrolle bezeichnete, d. h. eine, die im Vergleich zur Testlösung ähnlich ist, mit der Ausnahme des Vorliegens des zu analysierenden Liganden oder des (der) Liganden, dessen (deren) Vorliegen vermutet wird. In dieser Referenzlösung wird der Streifen durch den Wandler mit konstanter Zugkraft (Wegmeßwandler) auf eine festgelegte Länge gestreckt und man erlaubt dann sein Relaxieren, bis eine konstante isometrische Spannung erreicht ist. Nach der Relaxation wird die Referenzlösung in der Flusskammer gegen die Testlösung ausgetauscht, die eine oder mehrere chemische Substanzen enthält, die auf ihre Fähigkeit getestet werden, das Protein, aus dem der Streifen hergestellt ist, zu binden. Änderungen der isometrischen Spannung und/oder im elastischen Modul zeigen eine Bindung.

[0103] Im Gegensatz zu üblichen Verfahren des Testens mechanischer Eigenschaften von Metallen und anderen Materialien (in denen die Probe angebracht wird, der Sensor aktiviert wird, die Messungen durchgeführt werden, usw.), besteht das Testen der Proteinfilm im Grundsatz in der Detektion von Änderungen der mechanischen Parameter des Proteinfilms, wenn die den Film umgebende Lösung von einer Referenzlösung zu einer Lösung, die einen oder mehrere Liganden enthält, gewechselt wird. Das gesamte Verfahren wird unter Anlegen des Kraftsensors durchgeführt. Ein einzelner Wegmesswandler streckt die Probe auf eine festgelegte Länge und variiert als zweites dann die Länge im zeitlichen Verlauf sinusförmig um einen kleinen Betrag, um die Komplianz zu testen.

[0104] Als Alternative können auch zwei Längen-Wandler vorgesehen werden. Ein Bewegungswandler, der eine oszillatorische Deformation der Proben ermöglicht, der für eine bestimmte Zeitdauer angeschaltet wird, während ein anderer Wandler, der eine statische Deformation ermöglicht, während des Testverfahrens nicht aktiv ist. Der statische Wandler wird verwendet, um die Probe für das Testen vorzubereiten, z. B. um sie zu strecken.

[0105] Die erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung des erfindungsgemäßen mechanochemischen Apparates arbeiten am besten, wenn die folgenden Elemente angebracht sind, insbesondere wenn der Probenbestandteil ein Protein oder eine DNA ist:

1. Die in der zu testenden Probe befindlichen Moleküle sind vernetzt oder in physikalischem Kontakt.
2. Die Probe ist größer als Makromoleküle in zumin-

dest einer Dimension.

3. Mindestens eine Dimension der Probe ist grob in der Größenordnung von 1  $\mu\text{m}$ . Wenn eine Dimension klein ist (dünn), wird die Probe als Film bezeichnet. Wenn zwei oder alle drei Dimensionen klein sind, wird die Probe als Faser bzw. Körnchen bezeichnet.
4. Die Vorrichtung hält die Probe an mindestens einem Punkt.
5. Die Proben sind in der Vorrichtung austauschbar, entweder alleine oder mit einem Halter.
6. Die Vorrichtung schließt Mittel zum Verändern der Zusammensetzung eines Gases oder einer Flüssigkeit ein, die die Probe umgeben.

[0106] Die Elemente **1** und **2** unterscheiden zusammen die vorliegende Technologie von anderen Technologien, die immobilisierte Proteine einsetzen. Zum Beispiel werden in BIA-Core-Vorrichtungen (Pharmacia) Proteine auf einer Goldoberfläche immobilisiert, aber sie binden niemals aneinander.

[0107] Die Unterscheidung zwischen einem Kraftsensor und einem Sensor für Deformation oder Verschiebung besteht darin, dass ein Kraftsensor eine Komplianz aufweist, die wesentlich kleiner ist als die der Probe, während ein Verschiebungssensor eine wesentlich größere Komplianz aufweist als die Probe. Das Gleiche gilt für Wandler. Wandler und/oder Sensoren sind Mittel zum Setzen und/oder Messen einer Kraft und Mittel zum Setzen und/oder Messen einer Verschiebung; die gleiche Vorrichtung kann zum Setzen oder Fixieren und darüber hinaus auch zum Messen verwendet werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann jeder Kraftsensor (Wandler) und jeder Deformationssensor (Wandler) verwendet werden.

[0108] Die Erfindung sieht eine dynamische Messung der Beanspruchung bei fixierter Belastung und darüber hinaus auch eine dynamische Messung der Belastung bei fixierter Beanspruchung in Betracht. Im Gegensatz zu den Verfahren aus dem Stand der Technik kann bei der Erfindung auch die Kraft konstant gehalten und die Beanspruchung gemessen werden. Das heißt, die Probe wird unter einer fixierten Belastung oder Kraft  $F$  gehalten, und man erlaubt eine Variation der Beanspruchung. Zunächst relaxiert die Probe, dann kann die Kraft oszillieren und die resultierende Elongation gemessen werden. Ein Apparat kann für beide Arten der Messung verwendet werden.

[0109] Es ist festzuhalten, dass der erfindungsgemäße Apparat vorzugsweise den Probenstreifen vor dem Testen streckt. Dafür gibt es zwei Gründe: einer besteht darin, dass der Test sensitiver ist, wenn der Streifen gestreckt ist; der andere besteht darin, dass die Belastungs-Beanspruchungsrelation gestört wird, wenn die Beanspruchung oder Elongation des Streifens unter Null sinkt: er verbiegt sich und verhält sich nicht mehr gemäß dem Hook'schen Gesetz oder auch nur eine Annäherung an dieses (es sei denn, der Streifen ist sehr dick oder sehr kurz, wobei jede

dieser Eigenschaften die Empfindlichkeit des Tests vermindert oder zerstört). Sobald der Streifen unter keiner Spannung mehr steht, ist es unmöglich, Messungen der Federkonstante durchzuführen.

[0110] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt der Wegmesswandler ein Mittel zum Strecken dar.

[0111] Es ist ebenfalls festzuhalten, dass die vorliegende Erfindung eine Messung der Elastizität – ein Verhältnis zwischen der Kraft und der Länge – verwendet, um die Bindung an den Probenstreifen zu bestimmen. Die vorliegende Erfindung misst nicht notwendigerweise irgendeine Dimension des Probenstreifens; tatsächlich ist es so, dass in der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Streifenlänge konstant gehalten wird oder gemäß einem vorherbestimmten Muster leicht variiert wird: sie ist eine unabhängige Variable. Die abhängige oder gemessene Variable ist die Kraft.

[0112] In einer alternativen Messart gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Elastizität ebenfalls gemessen, während der Streifen unter Verwendung der beiden gleichen Quantitäten gestreckt wird, aber die Deformation oder Verschiebung ist die gemessene Größe, während die Kraft vorherbestimmt ist. Auch in dieser alternativen Ausführungsform ermöglicht die gemessene Größe, die Dimension, nicht eine direkte Messung der Ligandenbindung; nur das Verhältnis von Dimension und Kraft ergibt das Endergebnis.

[0113] Das Kraftmittel zum Anlegen der Kraft an den Streifen kann eine Feder und/oder einen aktiven Wandler/Sensor umfassen. Falls ein Ende des Streifens an eine solche Feder angebracht wird, ist die Verschiebung des Endes der Feder proportional zur Reckkraft, und diese Verschiebung kann mit einem geeigneten Sensor gemessen werden.

[0114] Während verschiedene Wandler als spezifische Ausführungsformen des Mittels zum Anlegen der Kraft an den Probenstreifen offenbart sind, sollte es klar sein, dass jedes Mittel zum Anlegen einer Kraft verwendet werden kann, um eine Kraft an den Probenstreifen anzulegen, der durch die Spitzen des Apparates gehalten wird. Sobald eine Kraft angelegt wird, indem z. B. der Streifen gestreckt wird oder der Streifen zumindest in einer voll ausgedehnten und nicht gebogenen Position gehalten wird, können andere Aktionen mit dem Streifen durchgeführt werden, um andere Merkmale des Streifens zu messen, und dies führt zu einer quantitativen Messung der Wirkung von Chemikalien auf den Streifen. So kann z. B. elektrische Energie oder akustische Energie auf den Streifen einwirken. In ähnlicher Weise können die Messmittel nicht nur die Elastizität, sondern auch die chemischen, mechanischen oder elektrischen Eigenschaften messen, in Abhängigkeit von der Aktion, die mit dem Streifen durchgeführt wird. So kann die Art, in der ein elektrisches Signal oder eine akustische Welle durch die Probe durchtreten, gemessen werden, bevor und nachdem dieses einer Chemikalie

ausgesetzt wird. Zum Beispiel können Änderungen in der Geschwindigkeit von durch den Film hindurchtretenden akustischen Wellen eingesetzt werden, um auf eine Ligandbindung zu testen, indem die Deformation und Änderungen in der Elastizität des Films gemessen werden (**Fig. 20A–D**). Diese Wellenlängenverfahren zum Messen der Deformation und der Änderungen in der Elastizität können Liganden-induzierte Änderungen in der Masse und Elastizität der Probenstreifen, z. B. einen Proteinfilm, auf der Oberfläche eines Piezokristalls (**502**) (**Fig. 20A**) messen, die durch Variation der Geschwindigkeit von Rayleigh-Wellen registriert werden, die von einem Wellengenerator (**504**) erzeugt werden und können durch einen Wellensensor (**506**) gemessen werden. Die Geschwindigkeit der Transmission von Transversal- (**Fig. 20B**) und Longitudinal- (**Fig. 20C**)-Wellen durch den Probenstreifen kann ausgenutzt werden, um auf Ligandbindung zu testen, und sie kann direkt oder nach einem Resonanzverfahren gemessen werden, in dem die Länge der stehenden Wellen in der Probe aufgezeichnet wird (**Fig. 20B**).

[0115] Es können im Stand der Technik bekannte Phasen, Impuls- und Resonanzverfahren, eingesetzt werden, um die Geschwindigkeit des Voranschreitens der Welle in allen diesen Strukturmethoden vom Wellentyp zu messen. Ein Wellengenerator **504** und ein Wellensensor **506** zum Messen der Geschwindigkeit des Fortschreitens der Wellen in dem Probenstreifen S sind in den **Fig. 20B** und **20C** gezeigt. In **Fig. 20C** werden Piezokristalle **502** mit den Probenstreifen an beiden Enden verbunden, während in **Fig. 20D** ein Piezokristall **502** lediglich an einem Ende des Probenstreifens S positioniert wird, um die stehenden Wellen **508** zu messen, und das andere Ende des Probenstreifens S wird an einer steifen Wand **510** befestigt.

[0116] Ein anderes Beispiel, gezeigt in **Fig. 21**, involviert den Einschluss von leitfähigen Partikeln **514**, wie z. B. Kohlepulver, in das polymere Material des zu testenden Probenstreifens. Die Leitfähigkeit durch den Probenstreifen S wird zwischen den Elektroden **512** gemessen, wobei leichte Ligand-induzierte Variationen der Probengröße (z. B. durch Schwellen), wie im unteren Teil von **Fig. 21** gezeigt, zu großen Änderungen in der Leitfähigkeit der Probe führen, da der Kontakt zwischen den leitfähigen Partikeln verloren geht. Dies ist der einfachste Proteinsensor, da lediglich ein Mittel zum Messen der Leitfähigkeit der Probe zwischen den Elektroden benötigt wird. In einer Ausführungsform können die Spitzen des erfindungsgemäßen Apparates als Elektroden verwendet werden.

[0117] Ein weiteres Beispiel ist eine bimorphe Struktur (**Fig. 22A**), die aus zwei Schichten besteht, von denen eine eine Probenstreifenschicht S ist und die andere eine Schicht **516**, die aus einem Material hergestellt werden kann, das durch den Liganden nicht beeinflusst wird, einem Zug- oder Belastungs-sensitiven Material (z. B. einem piezoelektrischen Material), oder in dem gleichen vernetzten Protein oder der

gleichen vernetzten DNA, in denen die Fähigkeit zur Bindung des Liganden durch Modifikation blockiert ist. Durch Exposition gegenüber einer Ligandlösung verbiegt sich ein solcher Bimorph aufgrund der Deformation der Probenstreifenschicht S. In **Fig. 22A** verursacht das Schrumpfen der Probenstreifenschicht S ein Biegen der bimorphen Struktur und das Biegen der bimorphen Struktur kann nach einem geeigneten Verfahren gemessen werden, d. h. optisch, elektrisch usw., wobei der Vorteil in der Einfachheit und einem differenzierten Ansprechen liegt. Die **Fig. 22B** und **22C** zeigen, dass die Deformation der bimorphen Struktur B optisch durch eine Lichtquelle **518** und einen positionssensitiven Lichtdetektor **520** (**Fig. 22B**) detektiert werden kann und durch einen Entfernungssensor **522** (**Fig. 22C**). Die Ligand-induzierten Änderungen in der Beanspruchung (der Belastung) einer Beanspruchungs-sensitiven Struktur wie einem modifizierten Bimorph, in dem ein Probenstreifen S auf eine Beanspruchungs-sensitive Oberfläche **524** gelegt ist (**Fig. 23**), kann ebenfalls ein elektrisches Signal in einem Sensor **526** erzeugen, in einer Art, die gegenüber bekannten Sensor-resistiven Sensoren bekannt ist. Die Probenzubereitung eines solchen modifizierten Bimorphs ist einfach und der Massenerstellung zugänglich.

[0118] Wenn die Probe als Film auf einem Träger abgelagert wird, können die Ligand-induzierten Änderungen in der Filmdicke und/oder Steifigkeit gemessen werden durch: (1) Ellipsometrie oder andere interferometrische optische Verfahren, in denen ein Anschwellen/Schrumpfen zu Änderungen sowohl der Dicke als auch des Brechungsindex der Schicht führen; (2) akustische Verfahren, in denen Änderungen in der Resonanzfrequenz eines festen Resonators wie einem Quarzkristall aufgrund von Änderungen der Filmdicke und Elastizität bei der Deformation des Films (z. B. durch Schwellen) gemessen werden; (3) Elektrodenimpedanzverfahren, in denen der Probenfilm auf einer leitfähigen Oberfläche abgelagert wird und Änderungen in der Impedanz einer solchen Elektrode, die die Folge von Änderungen in der effektiven dielektrischen Konstante aufgrund der Schwellung des Films sind, Änderungen in der Konzentration von Gegenionen bei der Bindung von geladenen Liganden, Änderungen in der Ionenleitfähigkeit des Probenfilms usw. verwendet werden können, um ein Schwellen des Films bei Ligandbildung zu detektieren; (4) magnetische Verfahren (**Fig. 24**), in denen die Probenfilmschicht S auf eine Folienschicht **528** abgelagert wird, die mit magnetischen Partikeln **530** bedeckt ist und die die Deformation der Filmdicke bei Ligandbildung messen, indem der Abstand der magnetischen Partikel **530** vom magnetischen Kopf **532** bestimmt wird; und (5) ein Eindringverfahren, wie in **Fig. 25** gezeigt, bei dem die Filmdicke und Steifigkeit direkt durch eine Indentorspitze **534** gemessen werden, wie der Spitze eines Rasterkraftmikroskops, während es von einer Position über dem Substrat **536** zu einer Position über den Probenfilm S wandert,

wobei die Tiefe des Eindringens eine Funktion der Beladung und Elastizität des Probenfilms ist. Ein Messen der Filmdicke unter verschiedenen Kräften  $F$ , die durch die in Eindringerspitze während des Eindringverfahrens angreifen, erlaubt die Bestimmung der Elastizität des Films. Je größer die Komplianz des Filmes ist, desto stärker wird der Film unter der Eindringerspitze deformiert und um so kleiner ist die gemessene Filmdicke. Das Eindringverfahren bietet den Vorteil, dass die Simultandetektion mit verschiedenen Proben erreicht werden kann, was zu einem Screenen mit hohem Probendurchsatz führt. Alle diese Verfahren, die die Messung der normalen Deformation (im Gegensatz zu der lateralen Messungen gemäß dem Stand der Technik) involvieren, haben den Vorteil, dass sie die Reduktion der Größe der Protein- oder DNA-Probe bis zu einem Mikronmaßstab ermöglichen, obwohl diese vorzugsweise dicker als eine Monoschicht ist.

[0119] In einem weiteren Verfahren, wie in **Fig. 26** gezeigt, kann die Deformation des Probenfilms  $S$  bei Ligandbildung als Funktion des Flüssigkeitsdurchflusses durch einen Kanal gemessen werden, d. h. durch eine Kapillare, durch Poren in einem Filter usw. Die Deformation (das Schwellen oder die Schrumpfung) des Probenfilms  $S$ , der auf den Kanalwänden **540** abgelagert ist, als Ansprechen auf den Liganden, moduliert die Flussrate einer Flüssigkeit oder eines Gases durch den bzw. die Kanäle, und dieser Flussgeschwindigkeitsparameter kann verwendet werden, um auf eine Deformation des Probenfilms zu testen.

[0120] Die **Fig. 28A** und **28B** zeigen eine Querschnittsansicht bzw. eine Draufsicht eines Verfahrens zur Detektion einer Deformation eines Probenfilms bei Wechselwirkung mit einem , Liganden durch Messung der Änderung der elektrischen Leitfähigkeit eines Probenfilms **1010**. Der Probenfilm **1010** ist an das Ende einer Elektrode geklebt und steht in Kontakt mit einem Draht **1011**, z. B. einen Platindraht, der von einem Isolator **1012** umgeben ist. Ein Leiter **700** wird mit dem Draht durch einen Lötspunkt verbunden. Die Ecke des Proteinfilms wird mit einer Schicht eines isolierenden Klebstoffes abgedeckt, um einen Stromabfluss zu verhindern, wenn der Probenfilm in die Lösung eingetaucht wird, wie z. B. eine Ligand-enthaltende Lösung, um den Stromkreis zum messen der elektrischen Leitfähigkeit durch den Probenfilm zu schließen.

[0121] Ein Kraftwandler, ein Kraftsensor und ein Probenfilm (z. B. Protein) können in einer einzelnen Einheit kombiniert werden, wie schematisch in **Fig. 27A** gezeigt, in der ein Vorteil darin besteht, dass eine solche integrierte Einheit einfach ausgetauscht werden kann und sogar als Einwegeinheit eingesetzt werden kann. **Fig. 27A** ist ein ablösbarer Chip **700** aus einer austauschbaren Kombination eines Probenfilms **702**, einem Kraftwandler **704** (Kraftsensor) und einem Mittel zur Induktion einer Filmdeformation **706** zusammengesetzt, wobei dieses Mittel ein bewegliches Teil ist. Der ablösbarer Chip **700** wird in die

Messeinheit **708** eingebracht, die ein Mittel **710** zum Bewegen des beweglichen Teils **706** aufweist.

[0122] Die Filmdeformation wird durch Verschieben des beweglichen Teils **706** in Relation zur Basis **712** durchgeführt.

[0123] Ein Typ eines Kraftsensors, der in dem in **Fig. 27A** gezeigten ablösbaren Chip **700** verwendet wird, ist in **Fig. 27B** gezeigt. In diesem Sensor werden Änderungen im Tunnelstrom genutzt, um die Deformation eines elastischen Auslegers **714** unter der angreifenden Kraft zu messen, der an dem Probenfilm **702** angebracht ist. Das Tunneln ist ein Prozess des Elektronentransportes durch eine schmale Lücke (etwa 0,1 bis 2 nm) zwischen einer Elektrode **716** mit dem Isolator **715** und einer zweiten Elektrode, die auch den Ausleger **714** darstellt, wobei der Tunnelstrom hochgradig abhängig von der Lücke ist, und sein Wert benutzt wird, um die Kraft aufgrund der Deformation einer kalibrierten Feder (des Auslegers) zu messen.

[0124] Eine andere Art eines Kraftwandlers für einen ablösbaren mechanochemischen Chip misst die Biegung des Auslegers **714**, indem Änderungen in der Intensität oder Richtung von reflektiertem Licht mittels eines Lichtdetektors detektiert werden, wie z. B. unter Verwendung von optischen Fasern **716** (**Fig. 27C**). Die **Fig. 27D** zeigt einen weiteren Typ eines Kraftwandlers, in dem beide Seiten des Auslegers mit einer Deformations-sensitiven Beschichtung abgedeckt sind, wie einem Tensoresistor **718**, und Änderungen in dem Erzeugen der Leitfähigkeit als Ansprechen auf ein Verbiegen des Auslegers zum Messen der Kraft verwendet werden.

[0125] Ebenfalls innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung sind verschiedene Befestigungen der Proben an die Vorrichtung, zusätzlich zu einem Kleben und Feststecken. Zum Beispiel kann ein Heißkleber (Thermokleber) verwendet werden, der aus einem Material hergestellt ist, das sich bei relativ niedrigen Temperaturen verfestigt. Oder die Proben könnten unter Verwendung einer magnetischen Flüssigkeit befestigt werden, die sich in einem magnetischen Feld verfestigt (magnetischer Kleber). Eine weitere Alternative besteht in der Verwendung des atmosphärischen Drucks zum Befestigen der Probe am Ende von Kapillarröhrchen unter Ansaugen.

[0126] Die folgende detaillierte Beschreibung beschreibt zunächst den Apparat, der zum Testen der Erfindung verwendet wird, dann beschreibt sie die Herstellung der Proben (Streifen aus Protein- oder DNA-Material), als Nächstes werden dann die Testverfahren beschrieben (unter Verwendung des Apparates zum Messen von Änderungen in den mechanischen Eigenschaften der Probenstreifen als Ergebnis ihres Eintauchens in eine ligandhaltige Lösung), und schließlich werden die Ergebnisse der Erfindung diskutiert.

[0127] Die Erfindung wird als Überblick in **Fig. 4** gezeigt. Diese schließt eine Base **200** ein, die relativ zum Wandlergehäuse **100** auf einer vertikalen Schie-

ne **300** beweglich ist.

[0128] Alternativ kann das Gehäuse **100** beweglich sein. Ein Probenhalter **400** kann auf die Base über einem Gefäß **210** zur Flüssigkeitsaufnahme angebracht sein.

[0129] Der Probenhalter **400** schließt einen Griff **415** zum Bewegen des Halters **400** in die Vertiefung **240** auf der Basis **200** und aus dieser heraus ein. Die Vertiefung **240** ist so dimensioniert, dass sie den Halter **400** fest, aber nicht zu eng aufnimmt. Der Halter sollte wiederholt eine fixierte Position in Relation zur Basis **200** einnehmen, auch wenn er entfernt wird und in die Vertiefung **240** wieder eingesetzt wird. Wenn der Halter **400** in die Vertiefung **240** eingesetzt wird, zwingen die Feder **241** und **242** den Halter **400** nach unten und nach rechts, wie in **Fig. 4** gezeigt wird, wodurch ein lockeres Sitzen verhindert wird. (**Fig. 6** zeigt eine alternative Ausführungsform der Rückhaltefeder **242**.) Aufgründessen nimmt der Halter **400** jedesmal, wenn er in die Vertiefung **240** eingesetzt wird, die exakt gleiche Position ein, und zwar mit einer Genauigkeit von einigen Mikron. Eine solche Präzision kann durch konventionelle Aufspanntechniken erreicht werden. Es kann auch jede andere konventionelle Aufspannvorrichtung anstelle der beschriebenen verwendet werden, um den Halter **400** präzise und wiederholt in die Vertiefung **240** einzusetzen.

[0130] Das Probenträgerkissen **408** wird vorzugsweise auf die obere Oberfläche des Halters **400** adhäriert.

[0131] Die **Fig. 4** und **5** zeigen das Wandlergehäuse **100**, das in seiner Funktion zu der Vorrichtung gemäß dem Stand der Technik in **Fig. 2** analog ist. Am unteren Teil des Wandlergehäuses **100** stehen Trägerbestandteile **148** und **168**, die in den

[0132] **Fig. 4** und **5** vielleicht besser als Arme beschrieben werden können, in Richtung auf einen Probenraum vor, der in der Basis **200** definiert ist. Der Probenraum schließt einen Teil der Vertiefung **240** und darüber hinaus ein Flüssigkeits-enthaltendes Gefäß **210** ein, das direkt darunter lokalisiert ist. Die Arme **148** und **168** können in den Napf **210** hinein bewegt werden, um die Probe zu testen.

[0133] Das Wandlergehäuse **100** (oder die Basis **200**) ist vertikal entlang einer Schiene beweglich, die vorzugsweise eine Präzisionsschiene von optischer Qualität ist. Das Wandlergehäuse **100** wird durch eine Feder **310** nach oben bewegt, die jedes Spiel gegen eine rotierbare exzentrische Nocke **312** aufnimmt. Wenn die Nocke **312** durch den Griff **314** bewegt wird, wird das Wandlergehäuse nach oben und unten bewegt, und die Spitzen der Arme **148**, **168** können auf den Probenhalter herunter bewegt werden oder in den Napf **210**. Als Alternative kann ein automatischer Mechanismus zum Anheben und Absenken des Gehäuses **100** vorgesehen werden der Positionssensoren und Computer-kontrollierte Servomechanismen einschließen kann.

[0134] Das Nach-Unten-Bewegen des Gehäuses

**100** wird durch die Finger **111** und **112** begrenzt, die sich vom unteren Teil des Gehäuses **100** ausgehend erstrecken Wenn das Gehäuse **100** vollständig abgesenkt ist, befinden sich die unteren Finger **111** in den Öffnungen **211**, das Gehäuse wird dadurch gestoppt, dass die Finger **111** auf den Boden der Öffnungen **211** auftreffen. Wenn sich der Halter **400** in der Vertiefung **240** befindet, treten die Finger **111** durch die angepassten Öffnungen **411** in dem Halter durch. Die Finger **111** können jedoch nicht auf den Boden auftreffen, wenn der Halter **400** sich in dieser Position befindet, da der kürzere Finger **112** gegen eine Stopplatte **412** auf den Probenhalter **400** stößt. Daher kann das Gehäuse **100** so weit angehoben werden, dass die Finger **111**, **112** die Vertiefung **240** verlassen und es dem Probenhalter **400** erlauben, eingebracht zu werden; und sie dann in eine fixierte Zwischenposition gebracht werden, wenn der Halter **400** in Position ist; oder in die unterste Position bewegt werden, wenn der Halter **400** aus der Vertiefung **240** entfernt ist. Die Zwischenposition dient dazu, die Spitzen der Arme **148**, **168** auf eine Probe zu platzieren, und die unterste Position dient dazu, die Probe zu testen, während sie sich innerhalb des Gefäßes zur Aufnahme von Flüssigkeit **210** befindet.

[0135] Die Finger **111** und die Öffnungen **211** können als Einspannelemente dienen, um andere Einspannelemente zu ersetzen oder zu unterstützen, um den Halter **400** präzise in der Vertiefung **240** zu platzieren. Dies erfolgt, wenn der Halter **400** durch die Federn **241**, **242** gegen die Finger **111** gehalten werden kann. Die Finger **111** haben den Vorteil, dass sie mit dem Gehäuse **100** verbunden sind, so dass in Bezug auf die Arme **148**, **168** präzisiert lokalisiert sind, als irgendein Teil der Basis **200**. Die Basis **200** bewegt sich in Relation zu dem Gehäuse **100** um einen Abstand, der dem Spielraum in der Schiene **300** entspricht.

[0136] Das Gefäß zur Flüssigkeitsaufnahme (oder die Flusszelle) **210** ist in **Fig. 8** gezeigt, wie es aus der Basis **200** entfernt ist. Ein Einlaufrohr **211** auf der rechten Seite der **Fig. 8** injiziert die Lösung in den Napf. Das Rohr **219** mit einem höheren Niveau entfernt überflüssige Lösung. Die innere Oberfläche des Napfes ist vorzugsweise hydrophob. Der Napf **210** kann aus einer Mittelplatte **216** und zwei Endplatten **214**, wie gezeigt, konstruiert sein. Er kann auch in irgendeiner anderen Art und Weise gebildet sein, z. B. durch Spritzguss oder Fräsen aus einem soliden Block. Es wird vorzugsweise aus transparentem oder transluzentem Material hergestellt. Wie in **Fig. 4** und **6** gezeigt, kann das Gefäß zur Aufnahme von Flüssigkeit **210** von unten durch ein optisches System beleuchtet sein, das in die Basis **200** eingesetzt ist, einschließlich einer Vergrößerungslinse oder konvexen Linse **290**. Die Linse **290** kann auf verschiedene externe Lichtquellen einstellbar sein (nicht gezeigt).

[0137] Die Basis **200** kann interne Kanäle und externe Verbindungen **250** aufweisen, um Flüssigkeiten durch die Basis hindurchzuleiten, um die Basis **200**

sowie das Gefäß zur Flüssigkeitsaufnahme bei einer konstanten Temperatur zu halten.

[0138] Die **Fig. 5** ist ein Querschnitt, der den Teil des Wandlergehäuses **100** zeigt, einschließlich des Wandlers und auch des Gefäßes zur Aufnahme der Flüssigkeit **210**. Die Arme **148**, **168** halten einen Streifen **S** in der Lösungsflüssigkeit **L**. Wie in **Fig. 2** erstrecken sich die Arme **148**, **168**, ausgehend von den jeweiligen Wandlern.

[0139] Ein Verschiebungswandler **140** schließt ein Element ein, vorzugsweise einen piezoelektrischen Quarz-Bimorph, der sich als Ansprechen auf eine elektrische Spannung verbiegt. Der Wandler **140** ist auf einer Platte **105** angebracht, die zur dimensionalen Stabilität vorzugsweise aus Quarz hergestellt ist und die einstellbar ist, um eine Bewegung der Spitze des Armes **148** nach links und rechts, wie in **Fig. 5** gezeigt, zu ermöglichen. Die Platte **105** ist um eine Drehangel **195** (vorzugsweise die Spitze eines Quarzprismas) herum scharnierartig beweglich, die auf der Innenseite der Platte **106** befestigt ist. Die Platte **105** ist um den Zapfen **195** durch eine mit einem Gewinde versehene Welle **191** rotierbar, die in eine Gewindeöffnung oder einen Anschluss **192** in einer zweiten Quarzplatte **106** eingreift und die ebenso am Gehäuse **100** angebracht ist. Durch Drehen des Knopfes **196** auf der Welle **191** wird der Arm **148** auf- und abbewegt.

[0140] Der Kraftwandler **160** schließt einen elastischen Bestandteil **162**, vorzugsweise aus Quarz, ein, der mit einer Metallschicht **164** beschichtet ist, die mit einem Draht **2164** verbunden ist. Eine anliegende Metallschicht **161**, anliegend und parallel zu der Schicht **164**, bildet einen Kondensator, dessen Kapazität sich mit dem Abstand zwischen den beiden Schichten **161**, **164** ändert, der sich wiederum mit der Kraft ändert, die auf die Spitze des Arms **168** ausgeübt wird, wobei diese Kraft den elastischen Bestandteil **162** bewegt. Die Metallschichten **161**, **164** bestehen vorzugsweise aus Gold, um Korrosion zu vermeiden.

[0141] Der kapazitive Kraftwandler kann durch irgendeinen anderen vergleichbaren (in Bezug auf den Kraftbereich, die Präzision, die Stabilität) ersetzt werden, der dann den bevorzugten Wandler darstellt. Jede andere Art eines Wandlers, der auf irgendeinem anderen physikalischen Mechanismus beruht, kann in der Vorrichtung als Alternative zum kapazitiven Wandler eingesetzt werden, unter der Voraussetzung, dass er die oben genannten Bedingungen erfüllt.

[0142] Um elektrische Streufelder um die Wandler herum zu vermeiden, sind alle internen Teile mit Metallfilm beschichtet, vorzugsweise aus Silber, um einen Faraday'schen Käfig zu bilden. Eine zusätzliche Abschirmungsbox **107** umgibt den Kraftwandler **160**, der gegenüber Feuchtigkeit empfindlich ist. Die Schicht **164** kann geerdet sein, um im Vergleich zu der metallischen Auskleidung der Platten das gleiche Potential aufzuweisen. Das Gehäuse **100** ist vor-

zugsweise ebenfalls aus Metall, um eine zusätzliche Isolation vor Feldern zu ermöglichen. Bei guter Abschirmung kann die elektronische Schalttechnik **199** (**Fig. 4**), die mit den Wandlern verbunden ist, auch in dem Gehäuse **100** angebracht werden. Die Drähte **2161** und **2164** werden mit der Schalttechnik **199** verbunden.

[0143] Wenn die Schalttechnik innerhalb des Gehäuses **100** angebracht ist, stellt das Gehäuse **100** eine vollständige Messeinheit dar, die mit Anzeigevorrichtungen, wie Computern und ähnlichen, verbunden werden kann, um ihre Funktion zu unterstützen. Die Erfindung schließt auch eine Messeinheit ein, die lediglich Wandler beinhaltet und die gesamte Elektronik an einem anderen Ort platziert.

[0144] Feuchtigkeit sowie elektrische Streufelder können die Kapazität beeinflussen, so dass trockene saubere Luft in die Box **107** eingeführt wird. Der Draht **2164** umfasst vorzugsweise entlang eines Teiles seiner Länge eine metallische Ummantelung, die zum Einblasen von Luft verwendet wird.

[0145] Die bevorzugte Quarzkonstruktion ist hilfreich bei der Vermeidung von Fehlern aufgrund von Änderungen in den Abmessungen der mechanischen Elemente (Quarz weist einen sehr niedrigen Temperaturexpansionskoeffizienten auf).

[0146] Je steifer die Bestandteile **162** sind, um so geringer sind die Änderungen im Abstand zwischen den Goldschichten **161**, **164** und desto geringer sind die Änderungen in der Kapazität und dementsprechend muss der Wandler um so genauer sein. Vorzugsweise ist der elastische Bestandteil **162** des Kraftwandlers **160** steif, so dass sich bei Streckung des Probenstreifens zwischen den Armen **148**, **168** der Arm **168** lediglich um einen sehr geringen Betrag bewegt; falls die Bewegung des Armes **168** wesentlich kleiner ist, als die Streckung des Probenstreifens, muss keine Korrektur für die Verschiebung des Bestandteiles **162** vorgenommen werden.

[0147] Eine alternative Konstruktion besteht darin, den elastischen Arm **162** und den Bimorph in einem einzelnen Element zu kombinieren, unter Verwendung einer Metallschicht auf dem elastischen Bestandteil, sowohl als Element des Kondensators als auch als Element des Bimorphs; in dieser Konstruktion ist nur ein Arm beweglich und der andere Arm ist an das Gehäuse **100** fixiert. Eine solche Konstruktion ermöglicht die einfache Kalibrierung der Bewegung des elastischen Bestandteils unter Kraft.

[0148] **Fig. 18** zeigt die Messeinheit des Gehäuses **100**, angebracht auf Federn **1000** und gedämpft durch einen Stoßdämpfer **1001**. Vorzugsweise liegen drei Schichten der Federvibrationsisolierung vor. Es können alle geeigneten Stoßdämpfer, wie z. B. Wirbel-Effekt magnetische Stoßdämpfer, verwendet werden. Ein Schild **1002** kann zum Zwecke der thermischen, elektromagnetischen oder einer anderen Art von Abschirmung verwendet werden. Ein Pumpsystem **1003** für die Ligand- und Pufferlösungen kann fakultativ Teil der Erfindung sein, sowie auch ein iso-

thermisches System **720**. Die Wandler **140**, **160** und/oder alle elektronischen Elemente im Gehäuse **100** können mit einem Computersystem **130** gekoppelt werden.

[0149] Die **Fig. 9A–9D** zeigen in Kombination mit **Fig. 4** ein Verfahren zum Aufbringen eines Probenstreifens **S** auf die Arme **148**, **168**.

[0150] In **Fig. 9A** ist die Position des Trägerkissens **408** gezeigt, das auf der oberen Oberfläche des Probenhalters **400** aufgebracht ist, nachdem der Probenhalter **400** in die Vertiefung **240** eingebracht worden ist (siehe **Fig. 4**). Das Probenträgerkissen **408** ist vorzugsweise aus einem relativ weichen Material, wie z. B. geschäumter Kunststoff (z. B. Styropor) und wird mit einem Material **410**, wie z. B. Aluminiumfolie, abgedeckt, das leicht durchdrungen werden kann und auf dem Eindrücke leicht gesehen werden können.

[0151] Die scharfen Spitzen der Arme **148**, **168** werden auf die Folie abgesenkt, indem der Griff **314** eingesetzt wird, bis der Finger **112** gegen die Stopplatte **412** stößt (siehe **Fig. 4**); in dieser mittleren Position des Gehäuses **100** ritzen die Spitzen gerade das Material **410**, was Eindringmarkierungen zurücklässt (stellvertretend durch die Kreise **409** gezeigt).

[0152] Das Gehäuse wird dann angehoben und der Halter **400** wird aus der Vertiefung **240** entnommen. Wie in **Fig. 9B** gezeigt, wird ein Probenstreifen **S** dann auf das Trägerkissen **408** in eine Position abgesenkt, in der der Streifen **S** die beiden Einstiche **409** abdeckt.

[0153] Die **Fig. 9C** zeigt, wie die Spitzen auf den Probenstreifen abgesenkt werden, nachdem der Halter **400** in die Vertiefung **240** eingesetzt wurde (**Fig. 4**). Die scharfen Spitzen penetrieren den Streifen **S**.

[0154] In **Fig. 9D** ist das Gehäuse **100** dann wieder angehoben worden. Der Probenstreifen **S**, nunmehr auf den Armen **148**, **168** aufgespießt, wird von dem Trägerkissen **408** und dem Halter **400** entfernt. Der Streifen ist nun bereit, in den Napf **210** zum Zwecke des mechanochemischen Tests in Lösung herabgesenkt zu werden.

[0155] Die **Fig. 10A–10D** zeigen eine alternative Befestigung des Probenstreifens, die für weiche Probenstreifen bevorzugt ist, die nicht festgesteckt werden können (wie in den **Fig. 9A–9D**). In der **Fig. 10A** werden die Spitzen auf einen Bogen oder eine Platte **P** aus Kunststoff abgesenkt, weit genug, dass sie gerade so die Platte **P** penetrieren. Mikrotröpfchen **E** eines Polymers, wie eines Epoxys, werden an jeder Spitze platziert und man lässt sie aushärten. Die Platte **P** ist aus einem geeigneten Material wie Teflon, das nicht an Epoxy oder ein anderes Harz adhärert; dies erlaubt ein Entfernen der Platte **P** wie in **Fig. 10B**. Die Spitzen treten leicht hervor, wie in der Zeichnung zu sehen ist; dies ermöglicht ein Herabsenken der Spitzen auf das Trägerkissen **408** zum Erzeugen von Einstichmarkierungen. Ein Kleber wie Cyanoacrylat (z. B. Loctite) wird dann auf jede Ein-

stichmarkierung aufgebracht, wie in **Fig. 10C** gezeigt, und dann werden die Spitzen schnell abgesenkt und dann angehoben, wobei sie aufgrund der kurzen Kompressionszeit angefeuchtet werden, aber nicht an das Cyanoacrylat adhäreren. Schließlich wird die Probe **S**, wie in **Fig. 10D** zu sehen, über die Einstichmarkierungen platziert; wie oben in Bezug auf **Fig. 9** beschrieben. Wenn die Spitzen auf den Probenstreifen **S** herabgesenkt werden und für mehrere Sekunden gehalten werden, adhärert der Streifen an die Epoxytröpfchen **E** durch den Kleber **C**, was eine großflächige Adhärenz ermöglicht.

[0156] Um eine Beschädigung von Proteinproben durch die Befestigung zu verhindern, muss der Probenstreifen während des Verfahrens feucht gehalten werden. Dies kann entweder dadurch erfolgen, dass schnelle Handhabung unter Verwendung von Wasser oder Pufferlösung erfolgt oder durch Zugabe von 10% Zucker- oder Glycerinlösungen zu dem Zwischenhalter mit der Proteinprobe. Bei Verwendung des Klebverfahrens muss man die Probe für 5 bis 10 min stehen lassen, um die Polymerisation des Cyanoacrylats zu ermöglichen. Bevor die Probe von der Oberfläche des Zwischenhalters abgelöst wird, sollte ein Wassertröpfchen oben auf die Probe aufgebracht werden, um eine einfache Ablösung des Probenstreifens von der Oberfläche des Zwischenhalters zu ermöglichen.

[0157] Die **Fig. 11A–11D** zeigen das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung verstärkter Streifen **S**. In den Querschnittsansichten von **Fig. 11** werden die Verstärkungsstreifen **P** über eine Basis **B** aus Glas, Kunststoff oder einem anderen Material mit glatter Oberfläche ausgelegt. Die Streifen **P** und die Basis **B** werden dann in einer Lösung befeuchtet, die das Protein oder die DNA enthält. Wie in den Verfahren nach dem Stand der Technik, die in **Fig. 1** gezeigt sind, wird die Lösung einer Vakuumtrocknung, einer Vernetzung und möglicherweise einem Waschen unterzogen. Nach diesen anfänglichen Schritten werden die Verstärkungsstreifen **P** mit einem Film aus Protein- oder DNA-Material für die Streifen **S**, wie in **Fig. 11D** gezeigt, abgedeckt. Ein Messer **K** wird dann verwendet, um jeden Verstärkungsstreifen der Länge nach zu spalten, wie in **Fig. 11C** gezeigt, wobei zwei Streifen **P<sub>2</sub>** aus dem einen Streifen **P** gebildet werden. Danach können die Streifen in der Querrichtung auf eine Länge gekürzt werden (nicht gezeigt), falls dies notwendig ist. Schließlich werden die fertiggestellten Streifen **S** mit dem Messer **K** abgelöst, wie in **Fig. 11D** gezeigt.

[0158] Ein bevorzugtes Material für die Verstärkungsstreifen **P** ist gebackene Gelatine. Die Streifen werden auf der Basis **B** gebildet, vorzugsweise durch Fotolithografie. Es wird eine Gelatine verwendet, die durch Zugabe von Ammoniumdichromat fotosensitiv gemacht worden ist. Nach Auflösen der nicht-exponierten Gelatine werden die verbleibenden Streifen in einem Ofen bei 180°C für 2 h gebacken. Die Oberfläche der Substratbasis **B** wurde schließlich für 20 s ei-

ner Plasmaentladung bei vermindertem Luftdruck unterworfen, um eine starke Adhäsion der Proteinschicht an die Verstärkungsstreifen P zu gewährleisten.

[0159] Die vorliegende Erfindung schließt nicht nur Probenstreifen ein, die durch Trocknen einer Lösung entstanden sind, sondern auch Proben, die nach anderen Verfahren zu Formen geformt worden sind, bei denen es sich nicht um flache Bänder oder Streifen handelt. Die Erfindung schließt auch sandwichartige Proben ein, die Oberflächenschichten aufweisen, die ein Protein oder eine andere auf Ligandbindung zu testende Substanz aufweisen oder enthalten und eine interne Schicht aus einer anderen Substanz, die nicht der Ligandlösung ausgesetzt wird.

[0160] Ein anderes bevorzugtes Verfahren zur Herstellung eines Probenstreifens (Film) zur Verwendung einer Bestimmung der Ligandbindung an Protein oder Nucleinsäuremoleküle ist ein Elektrospray (ES)-Verfahren, in dem eine elektrostatische Atomisierung einer Flüssigkeit oder einer Lösung verwendet wird, um geladene Mikrotröpfchen oder geladene Ionen zur Ablagerung auf einer Oberfläche zu erhalten. Die Lösung oder Flüssigkeit der abzulagernden Substanz wird in eine Kapillare gebracht und das Anlegen einer hohen Spannung resultiert in einer Instabilität der Flüssigkeit oder Lösung, die dann in kleine geladene Tröpfchen eines Durchmessers von typischerweise 0,5 bis 2 Mikron dispergiert wird.

[0161] Die elektrostatische Abstoßung führt zu einer schnellen Bewegung dieser geladenen Mikrotröpfchen aus der Kapillarspitze und zu ihrem Wandern zur Substratoberfläche, wobei die Mikrotröpfchen verdampfen, falls der Lösungsmitteldampfdruck niedrig genug ist, und sie erreichen ein Raleigh-Limit der elektrostatischen Stabilität. Anschließend unterliegen die Mikrotröpfchen einer Serie von Zerfällen, die ihre Größe auf 10 bis 20 nm reduziert und das elektrostatische Feld auf ein Niveau erhöht, in dem das Verdampfen der ionisierten solvatierten Moleküle möglich wird. Bei einem weiteren Wandern durch ein trockenes Gas verlieren diese solvatierten ionisierten Moleküle die Lösungsmittel. Mit schnellem Vorschreiten des Verdampfens kann der gesamte gelöste Inhalt der Mikrotröpfchen in kleine Nanocluster konzentriert werden.

[0162] Techniken des Elektrosprays biologisch aktiver Materialien, wobei einige davon auf die vorliegende Erfindung anwendbar sind, sind im Detail von den Erfindern der vorliegenden Anmeldung in der vorläufigen US-Anmeldung mit dem Titel "Method of Electro spraying Solutions of Substances for Mass Fabrication of Chips and Libraries", eingereicht am 20. Juni 1997, diskutiert, deren gesamter Inhalt hierin als Referenz einbezogen ist.

[0163] Ein Elektrosprayen, das in einer feuchten Atmosphäre stattfindet oder bei dem die Quelle des Elektrosprays in kurzer Distanz von der Substrat-(Ziel-)Oberfläche zur Ablagerung ist, kann es den Mikrotröpfchen erlauben, die Substratoberfläche

ohne Zerfall oder Produktion von Ionen zu erreichen. Diese Vorgehensweise wird als feuchtes Elektrosprayen (WES) bezeichnet. Die Ablagerung von geladenen Molekülen oder Clustern findet in einem trockenen Elektrospray-Vorgehen (DES) statt, wobei die Bedingungen trockener Luft oder langer Distanz zwischen der Elektrosprayquelle und der Substratoberfläche eingesetzt wird.

[0164] Demgemäß erlaubt dieses Elektrosprayphänomen die Ablagerung von Substanzen in verschiedenen Formen von geladenen Mikrotröpfchen, solvatisiert oder als trockene ionisierte Moleküle oder Nanocluster. Die Form der Ablagerung kann dadurch reguliert werden, dass der Wanderungsweg der geladenen Spezies verändert wird, und zwar durch Kontrolle des Dampfdruckes in der Atmosphäre und durch geeignete Auswahl des Lösungsmittels und der Lösungskonzentration.

[0165] Eine der frühesten Anwendungen des Elektrosprays erfolgte in der Produktion von dünnen Quellen für radioaktive Messungen. Diese früheste Anwendung und andere Anwendungen des Elektrosprays wie z. B. das Sprayen von Farbe, das Sprayen von Pestiziden und die Verwendung als Ionenquelle für die Massenspektroskopie biologischer Moleküle werden von Michelson, D., *Electrostatic Atomization*, IOP Publishing, New York, NY, 1990 einer Übersicht unterzogen. Das Elektrosprayen biologischer Moleküle wurde zur Anwendung in der Massenspektroskopie entwickelt, um die strukturellen Merkmale nicht kovalenter Wechselwirkungen zu charakterisieren.

[0166] Das Verfahren zur Herstellung eines Probenfilms gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet eine Maske mit einem nicht runden Loch, das zwischen eine Elektrosprayquelle und Oberfläche des Substrates, auf die ein Film abgelagert werden soll, platziert ist. Daher können die geladenen Mikrotröpfchen, Cluster oder Ionen durch eine Öffnung oder eine Reihe von Öffnungen in einer Maske auf eine Substratoberfläche gleitet werden.

[0167] Wenn die Elektrosprayablagerung durch eine dünne leitfähige Maske unter dem gleichen Potential erfolgt, wie das Substrat und in enger Nachbarschaft zu diesem, folgen die Ablagerungen exakt der Form der Öffnung in der Maske, wobei die Probenbiomoleküle gleichmäßig über die Ablagerung verteilt werden. Ein Großteil der Biomoleküle in der Probe werden jedoch auf der Maske selbst abgelagert und gehen dadurch verloren, wodurch diese Konfiguration des elektrostatischen Feldes für das Elektrosprayen relativ ineffektiv und zeitaufwendig ist.

[0168] Es wurde darüber hinaus gefunden, dass, wenn man die Maske unter ein Potential des gleichen Vorzeichens im Vergleich zu Elektrosprayquelle und den Mikrotröpfchen setzt, die bevorzugte Ablagerung des elektrospraysen Materials auf das Substrat sehr effizient ist, da die geladene Maske das Elektrospraymaterial abstößt und ihre Flugbahn so verän-

dert, dass sie durch die Öffnungen in der Maske (dem Schirm) durchtreten. Dieser elektrostatische Linseneffekt wurde bei einem geladenen Plastik- oder Metallschirm unter Bedingungen von Umgebungsdruck bzw. einem beliebigen Gas unter normalem Druck gefunden und dies ist in **Fig. 31** gezeigt, und er basiert auf der Ablenkung der Flugbahnen der geladenen Partikel in einem inhomogenen elektrischen Feld in der Nähe der Öffnung. Wie in **Fig. 31** gezeigt destabilisiert eine Elektrode **850** mit einer positiven Ladung, eingebracht in eine Kapillare **852**, eine Lösung von Biomolekülen **854**, die von der Spitze der Kapillare als Saum **856** einem Elektrosprayen unterzogen werden, wobei die Flugbahnen der Partikel (wie durch Pfeile gekennzeichnet) auf das Substrat **858** abgelenkt werden und durch eine Öffnung **860** in dem geladenen Schirm **862** fokussiert werden, der als Maske dient, um einen Punkt (Film) **864** abzulagern. Ein inhomogenes elektrisches Feld, das durch die Öffnung bzw. die Öffnungen hindurchtritt, zwingt die geladenen Partikel zu Bewegung entlang der Isopotenziallinien, was es dem Material dann ermöglicht, als Flecken abgelagert zu werden, deren Größe kleiner ist als die Öffnung in der Maske.

[0169] Es ist bemerkenswert, dass die Arbeitsweise dieser elektrostatischen Linse im Vergleich zu der in Elektronenmikroskopen unterschiedlich ist, da die inerten Kräfte, die die Flugbahnen in elektrostatischen Linsen unter Vakuum bestimmen, in Luft unter Normalbedingungen, in denen die viskosen Kräfte dominieren, vernachlässigbar sind. Dieser elektrostatische Linseneffekt weist den Vorteil auf, dass die Größe der Ablagerung wesentlich kleiner ist als die Öffnung in der Maske. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das elektrosprayte Material mit nahezu 100% Effizienz abgelagert wird, da der Schirm nur einen kleinen Teil der geladenen Moleküle absorbiert.

[0170] Die bei der Elektrosprayablagerung verwendete Maske eines groben Films weist eine Öffnung auf und ist zwischen die Quelle des Elektrosprays (Kapillare) und dem Ziel positioniert. Die Maske kann ein Schirm sein, der vorzugsweise aus einem nicht gleitfähigen Material hergestellt ist, wobei der konzentrierte elektrostatische Linseneffekt automatisch erzielt wird, wenn die ersten geladenen Moleküle des Elektrosprays auf der Oberfläche des Schirms absorbiert werden, wodurch jede weitere Absorption geladener Moleküle elektrostatisch geblockt wird. Der nicht leitfähige Schirm mit einer Schicht aus absorbierten geladenen Molekülen dient dann zur Ablenkung aller geladenen Moleküle des Elektrosprays in die Öffnung des Schirms zur Ablagerung auf einem Substrat.

[0171] Leitfähige Schirme wie metallische Schirme können ebenfalls als Maske verwendet werden. Jedoch sollte das Potential des leitfähigen Schirms, der gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung eines Probenfilms verwendet wird, so angepasst sein, dass es zwischen dem Potential der Elektrode in der Kapillare und dem Potential auf dem Substrat liegt, um die geladenen Moleküle in die Öffnung

zu dirigieren.

[0172] Es wurde darüber hinaus gefunden, dass eine Elektrofokussierung mit einer einzelnen Öffnung (d. h. einer rechteckigen oder nicht-runden Öffnung, die zur Herstellung eines Streifens von Probenfilmen verwendet wird) nicht beobachtet wird, wenn die Elektrosprayquelle nicht direkt über der Öffnung positioniert ist und das Substrat und die Maske zusammen um die Normalachse rotieren, die durch das Zentrum der Öffnung der Maske verläuft. Die Größe und Form der Ablagerung entspricht unter diesen Bedingungen der Größe und Form der Öffnung.

[0173] Das Ausmaß der Elektrofokussierung wird durch die Distanz zwischen der Kapillarspitze und dem Schirm, der Dicke des Schirms usw. bestimmt. Im Allgemeinen gilt, je dicker der Schirm oder je weiter voneinander entfernt der Schirm und die Kapillare sind, desto stärker ist das Ausmaß der Elektrofokussierung.

[0174] Jede relative Bewegung der Kapillare und des Substrates, die mit der Bedingung kompatibel sind, dass eine gleiche Zeit über jeder Fläche der Ablagerung auf dem Substrat verbracht wird, würde eine gleichmäßige Ablagerung ermöglichen und eine solche kann vom Fachmann bestimmt werden. Für die Ablagerung auf einem nicht-runden Film wie einem rechteckigen oder gestreckten ellipsoiden Streifen und einer Ablagerung einheitlicher Dicke ist die Kapillare vorzugsweise stationär und nicht direkt über der nicht-runden Öffnung in einer Maske positioniert, während die Maske und das Substrat/der Träger rotieren. Auf diese Art umgehen die rotierende Maske und das rotierende Substrat/der rotierende Träger den elektrostatischen Fokussierungseffekt der Öffnung, indem es dem geladenen Artikel möglich ist, sich der Öffnung von der Seite zu nähern. In der Regel wird ein Abhaltering mit einem Potential des gleichen Vorzeichens im, Vergleich zu den geladenen Mikrotröpfchen, die die Kapillarspitze verlassen, unter die Kapillarspitze positioniert, um die Zone der Elektrosprayentladung zu umgeben, und zwar mit einer Ladung, die die geladenen Mikrotröpfchen abstößt und eine Streuung während des Elektrosprays verhindert.

[0175] Damit Biomoleküle wie Proteine und DNA ihre strukturellen und funktionellen Eigenschaften aufrecht erhalten, wenn sie als Film auf ein Substrat/einen Träger elektrosprayt werden, wird die Stärke des elektrischen Felds an der Kapillarspitze der Elektrosprayquelle so gewählt, dass sie zum Hervorrufen des Elektrosprays hinreichend ist, aber nicht so hoch, dass es zu einer Koronaentladung kommen würde, die die funktionellen Eigenschaften von Biomolekülen zerstört. Die Stärke des elektrischen Feldes an der Kapillarspitze kann durch Aufrechterhalten eines konstanten Stroms oder einer konstanten Spannung bei der Entladung der Lösung in der Kapillare gesteuert werden. Die Mindestspannung oder der Mindeststrom wird empirisch bestimmt. Es wurde gefunden, dass die Mindestspan-

nung, die ein wirksames Elektrosprayen ermöglicht, vom Radius der Kapillare, der Leitfähigkeit der Lösung, der Flussgeschwindigkeit und dem Abstand zwischen der Kapillare und dem Substrat abhängt. Bei einem apillardurchmesser von etwa 20–30 Micron und einem Abstand der Kapillare zu dem Substrat von ca. 15–20 mm wird eine Proteinlösung sehr wirksam bei 2–4 kV mit einer Flussgeschwindigkeit von 50–200 nl/min elektrosprayt. Oberhalb von 6 kV ist es wahrscheinlich, dass die Eigenschaften der biologischen Moleküle während des Elektrosprayverfahrens zerstört werden. Die Luft kann durch Freon oder ein anderes koronaunterdrückendes Gas ersetzt werden, um ein Verhindern einer Koronaentladung zu unterstützen. Die Wirkungen einer Koronaentladung können auch dadurch inhibiert werden, dass das Elektrosprayen durch eine Air-Jet-Atomisierung unterstützt wird, durch die Tröpfchen von Mikrongröße bei deutlich geringeren Spannungen erhalten werden können, als die, die für das Elektrosprayen alleine notwendig sind. Das Jet- unterstützte Elektrosprayen beschleunigt auch die Ablagerung des Materials, da eine stabile Dispersion bei wesentliche höheren Flussgeschwindigkeiten erzielt werden kann, als beim Elektrosprayen alleine.

[0176] Die Substrate oder Träger, auf die die geladenen Partikel abgelagert werden, weisen vorzugsweise eine hohe Leitfähigkeit auf. Es können jedoch auch andere Materialien mit niedriger Bulk-Leitfähigkeit (Halbleiter) oder solche mit einer niedrigen Oberflächenleitfähigkeit als Substrate verwendet werden. Beispiele für solche Materialien schließen hydrophile Kunststoffe, PVDF (z. B. IMMOBILON-P) und Nitrozellulosemembranfilter, sowie Glimmer und Glas. Glimmer ist nicht leitfähig, wenn er trocken ist, aber er weist eine Oberflächenleitfähigkeit auf, wenn er feucht ist oder sich in einer feuchten Atmosphäre befindet.

[0177] In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung eines Probenfilms wird eine Elektrosprayablagerung auf eine nicht leitfähige Oberfläche wie eine Glimmeroberfläche durch periodische Aufladung einer nicht leitfähigen Oberfläche mit einem Strom aus Gegenionen aus einer Koronaentladung durchgeführt. Der Strom aus Gegenionen wird mit einer Anordnung aus Mikroelektroden in einer abgeschirmten Kammer erzeugt. Ein solches Wiederaufladen gibt den Vorteil, dass aufeinanderfolgende Schichtengeladener Moleküle auf das Substrat aufgebracht werden können, indem wiederholte Zyklen von Sprayen und Wiederaufladen erfolgen; anderenfalls würde das Ansammeln von geladenen Molekülen auf dem Substrat eine weitere Ablagerung verhindern. Bei dem Beispiel der Glimmeroberfläche wird ein Glimmerblatt auf eine rotierende Kunststoffscheibe aufgebracht und in periodischer Weise während des periodischen Durchtretens unterhalb einer Anordnung von Mikroelektroden bei der Rotation erneut geladen. Sowohl positive als auch negative Spannungen kann an die Kapillare in Bezug auf den

Glimmer angelegt werden. Um die Oberflächenleitfähigkeit des Glimmers zu reduzieren, kann die Glimmeroberfläche während der Ablagerung trocken gehalten werden, indem sie mit einer Infrarotquelle oder mit einem Strom aus trockener warmer Luft erhitzt wird. Die Ablagerung kann z. B. in offener Luft oder in einer Kammer mit einer gesteuerten Atmosphäre erfolgen.

[0178] In einer bevorzugten Ausführungsform zur Herstellung des Probenfilms zur Verwendung in dem erfindungsgemäßen Apparat und dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine Zwischenschicht zwischen das Substrat und die Probe eingebracht werden, um die Ablösung des abgelagerten Materials als Probenfilm von dem Substrat oder Träger zu erleichtern, d. h. zum Transfer zu einer Messvorrichtung, die einen solchen Probenfilm einsetzt. Eine solche Zwischenschicht muss geringfügig leitfähig sein und sie muss nach dem Vernetzen der elektrosprayabgelagerten Biomoleküle leicht entfernbar sein. Beispiele für Materialien, die als Zwischenschicht verwendet werden können, schließen ein: (1) Eine wasserlösliche Polymerschicht wie ein Polyacrylamid oder ein Polyethylenglykol, das langsam schwellt und sich in Gegenwart von Wasser und/oder unter anderen Bedingungen, d. h. pH-Wert, auflöst; (2) eine Schicht aus einem im Handel erhältlichen Polymer mit Disulfidbindungen, die aufgebrochen werden können (durch chemische Reduktion) wenn dieses in Kontakt mit einer Mercaptoethanol-Lösung tritt, wodurch ein Auflösen des Polymers erfolgt; (3) eine Schicht aus hochdispersiertem Kohlenstoff mit niedriger Adhärenz an die abgelagerten Biomoleküle; und (4) eine Schicht aus leitfähigen Kohlenstoffpolymerkompositen mit niedrigem Schmelzpunkt.

[0179] **Fig. 32** illustriert schematisch eine Ausführungsform eines Verfahrens zur Herstellung eines Probenfilms auf einer Zwischenschicht und dessen Entfernen von dieser. Eine Halbleiterunterschicht **880** als Zwischenschicht wird zunächst über ein leitfähiges Substrat **882** abgelagert, indem mit einer Kapillare **848** oder nach irgend einem anderen der bekannten Verfahren elektrosprayt wird und der Probenfilm **886** des erwünschten Biomoleküls bzw. der erwünschten Biomoleküle durch eine Öffnung **888** in einer Maske **890** durch Elektrospray abgelagert wird. Der Probenfilm kann an den Spitzen **892** des Apparates gemäß der vorliegenden Erfindung **894** befestigt werden und von dem Substrat abgelöst werden, indem die halbleitfähige Unterschicht mit einem Lösungsmittel **896** aufgelöst wird und der Probenfilm **886** dann in eine Lösung **898** in einer Flusszelle **900** eingetaucht wird. Alternativ kann die Probe einfach von dem Substrat als abgelöster Film abgehoben werden.

[0180] Eine bevorzugte Zwischenschicht zum Ablösen des Probenfilms ist eine Unterschicht aus Alginsäure, die unlöslich ist für Lösungen mit einem sauren pH-Wert, aber die in einer Lösung mit einem alkalischen pH-Wert leicht gelöst wird. Für den Fach-

mann ist klar, dass die Verwendung einer Zwischenschicht (Unterschicht) zur Erleichterung der Ablösung des Probenfilms nicht auf einen Probenfilm beschränkt ist, der durch Elektrospray abgelagert wurde. Eine solche Zwischenschicht ist genauso verwendbar, um die Ablösung eines Probenfilms zu vereinfachen, der als Lösung auf eine Zwischenschicht aufgebracht wurde.

[0181] Bei Verwendung eines Proteins als Beispiel für ein Biomolekül zur Ablagerung durch Elektrospray hängt die Struktur des Proteinfilms und die funktionalen Eigenschaften der Proteinmoleküle in dem Film vom Flugweg des Elektrosprays und der Feuchtigkeit und Temperatur ab, unter denen die Proteinmoleküle dem Elektrospray unterzogen werden. Bei kurzen Distanzen, z. B. etwa 15 mm zwischen Kapillare und Substrat oder wenn das Elektrosprayen in einer feuchten Atmosphäre stattfindet, können die geladenen Mikrotröpfchen von dem Elektrospray die Oberfläche ohne Zersetzung oder Produktion von Ionen in dem feuchten Elektrospray-Verfahren erreichen. Die Proteinfilme, die nach der Verdampfung der abgelagerten Mikrotröpfchen auf dem Substrat erhalten werden, haben viel mit den Proteinfilmen gemeinsam, die konventionellerweise durch Aufbringen einer Proteinlösung direkt auf das Substrat und Trockenlassen des Proteins erhalten werden. Es wurden keine nennenswerten Unterschiede im mechanochemischen Ansprechen auf Liganden, wie z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ , Glucose und NADH zwischen Filmen von  $\alpha$ -Lactalbumin, Hefehexokinase bzw. Pferdeleberalkoholdehydrogenase festgestellt, die durch feuchte Elektrosprayablagerung auf einer Glasoberfläche, die mit einer leitfähigen  $\text{SnO}_2$ -Schicht bedeckt war, hergestellt wurden und Filmen der gleichen Enzyme, die nach dem konventionellen Verfahren hergestellt waren.

[0182] Die Elektrosprayablagerung von Biomolekülen kann als Mittel eingesetzt werden, um einen Probenfilm nicht nur zu erhalten, sondern auch um Mikromengen verdünnter Biomoleküllösungen zu konzentrieren. Oberhalb von etwa 70–80% Feuchtigkeit werden die Mikrotröpfchen durch Elektrospray abgelagert und die Wirkung der Konzentration ist unter Umständen nicht signifikant. Bei niedrigeren Feuchtigkeitsgraden kann eine Konzentration der Biomoleküle in Mikrotröpfchenform auftreten und die Bedingungen können für das Elektrosprayen eingestellt werden, d. h. längere Distanzen, trockene Bedingungen, in denen Nanocluster und Ionen von Biomolekülen auf das Substrat abgelagert werden. Beim trocknen Elektrosprayen werden Biomoleküle nur dann als Einzelmoleküle abgelagert, falls die Konzentration in Lösung unter einem kritischen Schwellenwert von etwa  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  mg/ml liegt. Bei höheren Konzentrationen erfolgt die Ablagerung durch trockenes Elektrospray aus Proteinen und anderen Biomolekülen hauptsächlich in Form von Nanoclustern.

[0183] Neben dem schnelleren Trocknen, das bei trocknen Elektrosprayen erzielt wird und das zum Schutz der Proteine vor Schaden beiträgt, kann die

Zugabe von protektiven Reagenzien wie Kohlenhydraten, z. B. Glycerin, Saccharose, Trehalose usw. ebenfalls dazu dienen, einen Schutz vor Beschädigung und/oder Reaktivierung beim Trocknen zu bieten. Wenn unter milden Bedingungen niedriger Spannung, niedriger Stromstärke und kontrollierter Feuchtigkeit elektrosprayt wird, hat das Vorliegen von Saccharose die Aktivität eines alkalischen Phosphatase (AP) Enzyms geschützt, im Vergleich zu einem AP, das aus der gleichen Lösung, die auch für das Elektrosprayen verwendet wird, direkt auf dem gleichen Substrat getrocknet wurde. Die spezifische Aktivität des AP-Enzyms, das durch Elektrospray unter milden Bedingungen abgelagert wurde, war der der anfänglichen Enzymlösung ähnlich. Für Proteine mit freien SH-Gruppen, die für ihre funktionellen Eigenschaften essentiell sind, wie z. B. Hexokinase, hat das Vorliegen von  $\beta$ -Mercaptoethanol, einem Reduktionsmittel, das vor Oxidation der SH-(Sulfhydryl-)Gruppen in der Elektrospraylösung schützt, zu einem merklichen Anstieg des mechanochemischen Ansprechens des durch Elektrospray abgelagerten Proteinfilms geführt.

[0184] Zusätzlich zum Schutz von Biomolekülen gegenüber Schaden während des Trocknens bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Probenherstellung können protektive Reagenzien wie Kohlenhydrate und Polyole, wie z. B. Glycerin, Saccharose, Trehalose usw. auch dazu dienen, die Packungsdichte der Biomoleküle, insbesondere bei Proteinen, in dem abgelagerten Probenfilm zu vermindern. Diese protektiven Reagenzadditive sind wasserlöslich und nicht flüchtig. Nachdem die Biomoleküle in einem trockenen Zustand vernetzt sind, können die wasserlöslichen und nicht flüchtigen Additive ausgewaschen werden und dadurch zusätzliche Öffnungen und Kanäle in der Probe erzeugt werden, was die Packungsdichte in dem vernetzten Probenfilm vermindert und die Durchdringbarkeit des Probenfilms für Liganden erhöht.

[0185] Eine andere Art der Verminderung der Packungsdichte und des Erhöehens der Durchdringbarkeit eines Biomolekülprobenfilms besteht darin, ein trockenes Elektrospray mit hohen Konzentrationen an Biomolekülen in Lösung zu verwenden, was zur Ablagerung von Biomolekülen in Form von Nanoclustern führt. Die Größe der abgelagerten Nanocluster hängt in hohem Maße von den Konzentrationen des Biomoleküls und gelöster Stoffe ab. Die anfängliche Diffusion in solchen Filmen, die aus elektrosprayabgelagerten Nanoclustern zusammengesetzt sind, wäre wesentlich schneller, da die großen Zwischenkornkanäle leicht für Liganden durchdringbar sind und nur die Diffusion innerhalb eines Körnchens auf das Niveau eines homogenen Films abgesenkt wird.

[0186] Während es zu erwarten ist, dass große Liganden die Probenfilme mit niedriger Packungsdichte wie oben beschrieben ebenfalls durchdringen können, wird durch Reduktion der Dicke der abgelagerten Biomolekülfilmschicht auf eine Dicke von, etwa

einer Monoschicht auf einer Substratoberfläche jede diffusionskontrollierte Begrenzung in dem Probenfilm vermieden. Die Moleküle in der Monoschicht sind sowohl mit der Substratoberfläche als auch untereinander vernetzt. Das Substrat für einen abgelagerten Monoschichtfilm ist vorzugsweise ein Material, d.h. ein Gel, das die Flexibilität des Monoschichtfilms nicht beeinträchtigt. Andere geeignete Materialien sind dem Fachmann aufgrund seines Fachwissens bekannt.

[0187] Dem Fachmann sind etliche Mittel zur Vernetzung von Biomolekülen untereinander bekannt (Hermanson et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, New York, 1991). Für DNA-Moleküle kann eine UV-Bestrahlung angewendet werden. Für Proteinmoleküle ist Glutaraldehyd bevorzugt, da dieses Vorteile in Bezug auf die Erhaltung einer funktionalen Aktivität der vernetzten Proteine aufweist. Glutaraldehyd greift freie Aminogruppen an, die den Proteinmolekülen in großer Anzahl vorliegen und deren Modifikation offensichtlich die funktionalen Eigenschaften von Proteinen nicht negativ beeinflusst, wenn die Aminogruppen nicht direkt in die aktive Stelle einbezogen sind. Während die Aminogruppen in den aktiven Stellen vor einer Reaktion mit Glutaraldehyd durch die Schritte einer reversiblen Maleilation bei basischem pH-Wert, Vernetzung unter basischem pH-Wert und Entlocken durch Lagerung bei leicht saurem pH-Wert (pH 5–6) geschützt werden können, wurde im Labor der Erfinder der vorliegenden Erfindung gefunden, dass eine Ligandenbindung, wie bestimmt durch Affinität-Assays, die mit dem Film durchgeführt werden, immer noch nachweisbar war, selbst wenn die Aminogruppen in den Proteinen mit Aminogruppen in ihren aktiven Stellen ungeschützt gelassen wurden, d. h. bei Ribonuclease, monoclonalen Antikörpern usw. Es ist jedoch nützlich, die Aminogruppen zu schützen, wenn das Protein entweder sehr viele freie Aminogruppen hat oder Aminogruppen in einer Bindungsstelle, um somit ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen.

[0188] Vor dem Vernetzen der abgelagerten Biomoleküle, insbesondere bei Proteinen, kann der Film der Biomoleküle entweder einer feuchten Atmosphäre oder einer Lösung ausgesetzt werden, d. h. einer Glycerinlösung, die eine begrenzte Mobilität oder Flüssigkeit der Biomoleküle in dem Probenfilm erlaubt, aber durch die nicht eine Solubilisierung in Lösung erfolgt. Die Wirkung einer erhöhten Flüssigkeit ermöglicht es den Proteinmolekülen im Film, in Relation zu anderen Proteinmolekülen in dem Film zu wandern, um somit einen Film zu ergeben, der keine sichtbare Inhomogenität aufweist. Dieses Phänomen kann verglichen werden mit großen runden Felsbrocken, die willkürlich auf eine Oberfläche ausgeschüttet werden, was zu einer inhomogenen Topographie führt. Falls man es den großen Felsbrocken erlaubt, sich in Relation zueinander zu bewegen, indem man eine gewisse Art von Störung einführt, dann wandern

die großen Felsbrocken vorzugsweise so, dass sich eine stärker uniforme Topographie ergibt. Ein homogener Proteinfilm erzielt seine Festigkeit jedoch auf Kosten einer möglicherweise reduzierten Durchdringbarkeit für den Liganden.

[0189] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Probenfilmen kann eingesetzt werden, um die sensitiven Elemente von Biosensoren mit sehr kleinen Mengen an Proteinen (0,1–1 Mikrogramm) herzustellen. Dies ist besonders wichtig, wenn es auf mechanochemische Verfahren zum Testen der Biospezifität von Proteinmolekülen durch Änderung in den Eigenschaften eines Proteinfilms eingesetzt wird, da Mikrogrammmengen von Proteinen normalerweise durch die üblichen Proteinaufreinigerungsverfahren im analytischen Maßstab wie beispielsweise Elektrophorese leicht erhalten werden können. Das Verfahren kann auch eingesetzt werden, um Proteinfilme für andere Arten von Biosensoren herzustellen, z. B. Enzymelektroden, MOS-FET-Chemosensoren, Biosensoren, die auf Änderung in der Masse oder der optischen Eigenschaften des Proteinfilms beruhen usw. Ein Beispiel für die Herstellung eines solchen Probenfilms wird in **Fig. 32** gezeigt, indem eine Elektrosprayablagerung eingesetzt wird, um einen einzelnen Probenfilm aus immobilisiertem Protein für ein mechanochemisches Testen auf Proteinbioaffinität zu erhalten. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Herstellung von Proteinproben aus Mikrogrammmengen von Protein, die in wenigen Mikrolitern Wasser gelöst sind. Um ein leichtes Ablösen der Probe zu ermöglichen, wird eine Unterschicht, wie in **Fig. 32** gezeigt, zunächst auf ein leitfähiges Substrat abgelagert.

[0190] Verfahren zur direkten Detektion einer Bindung unter Verwendung des abgelagerten Probenfilms schließen Plasmaresonanz (d. h. elliptische Reflektanzmikroskopie, die im Handel erhältlich ist) und Rastersondenmikroskopie ein (ein Kraftmikroskop kann verwendet werden, um die Bindung von Liganden an einer Anordnung von Probenfilmen großer Proteinmoleküle auf einer Substratoberfläche nachzuweisen, wohingegen die Tunnelmikroskopie eingesetzt werden kann, um die Bindung von DNA-Sonden an komplementäre Oligonukleotide nachzuweisen, die in Matrizes auf einer Substratoberfläche vorliegen).

[0191] Mit erneutem Bezug auf die **Fig. 4** und **5**: Bei einem Probenstreifen **S**, der zwischen den Spitzen der Arme **148**, **168** befestigt ist, und mit der Referenzlösung **L**, die in das Gefäß zur Aufnahme von Flüssigkeit **210** fließt, kann das mechanochemische Testen der Probe **S** beginnen. Das Testen selbst besteht aus zwei Phasen. In der ersten (präparativen) Phase wird der Streifen gestreckt, bis eine maximale Federkonstante des Streifens erhalten wird und dann lässt man ihn unter isometrischen Bedingungen relaxieren, bis ein konstantes Niveau der isometrischen Spannung erreicht ist. Mit isometrischen Bedingungen ist hier gemeint, dass eine fixierte Distanz zwischen den

Spitzen der Arme **148** und **146** gehalten wird. In der zweiten Phase wird der relaxierte Streifen in Kontakt mit der Ligandlösung gebracht und die ligandinduzierten Änderungen der isometrischen Spannung und der Federkonstante werden gemessen.

[0192] In der ersten Phase wird der Streifen durch eine fixierte Beanspruchung gestreckt

[0193]

$$\varepsilon_0 = (L - L_0)/L_0$$

wobei  $L_0$  die Länge des Streifens in der Referenzlösung ohne Anlegen einer Zugspannung ist und  $L$  die Länge des Streifens in der gleichen Lösung unter einer Belastung  $F$  ist.

[0194] Gemäß dem Hook'schen Gesetz muss man zum Erzeugen der Beanspruchung die Belastung

$$\sigma = F/bh = \varepsilon_0 E$$

anlegen, wobei  $E$  das Elastizitätsmodul des Proteinmaterials ist und  $b$  und  $h$  die Breite und Dicke der Probe sind. Daher gilt

$$F = \sigma bh = bh\varepsilon_0 E = bhE(L - L_0)/L_0$$

[0195] Theoretisch sollte die Kraft proportional mit  $(L - L_0)$  ansteigen, in der Praxis gilt die genannten Beziehung jedoch zum Beginn des Streckens nicht und auch nicht, wenn der Streifen vollständig gestreckt ist und wenn er zu einer großen Ausdehnung hin gestreckt ist, bei der eine Zerstörung des Streifens auftreten kann. Um eine maximale Empfindlichkeit zu erzielen, sollte die höchste  $F$  eingesetzt werden, die nicht zu einer Beschädigung der Probe führt. Es wurde gefunden, dass die zweckmäßigste Art, diese Belastung zu finden, darin besteht, die Federkonstante des Streifens während des Streckens zu messen. Die Federkonstante ist im nicht ausgestreckten Streifen klein und sie sinkt drastisch, wenn die Beschädigung des Streifens bei großen Ausdehnungen beginnt. Eine maximale Federkonstante tritt zwischen diesen beiden Extremen auf.

[0196] Die Federkonstante wird durch Anwendung kleiner Deformationen des Streifens mit einer Amplitude  $\Delta L$  gemessen, die wesentlich kleiner ist als  $(L - L_0)$ . Diese Deformationen verursachen Spannungsszillationen mit einer Amplitude von  $\Delta F$ . Die Federkonstante des Streifens wird definiert als

$$\kappa = \Delta F/\Delta L$$

[0197] Der Kehrwert der Federkonstante ist als die Komplianz der Probe definiert.

[0198] Um ein gutes Maß für die Federkonstante der Probe zu erhalten, muss die Komplianz der Probe sehr viel größer sein als die Summe der Komplianzen des Kraftwandlers und des Blockes der Probendeformation.

[0199] Das Elastizitätsmodul ist mit der Federkonstanten über die Formel verbunden

$$E = \kappa L_0/bh$$

[0200] In der Testphase werden ligandeninduzierte Änderungen in  $F$  und  $\kappa$  nach dem Austausch der Referenzlösung gegen die ligandenthaltende Lösung in der Flusszelle gemessen. Diese Parameter werden selbst zur Detektion der Bindung eingesetzt. Sie erlauben jedoch auch eine Abschätzung praktisch wichtiger Parameter: Die ligandinduzierte Beanspruchung  $\varepsilon_\lambda = (L - L_1)/L_0$ , wobei  $L_1$  die Länge der Probe in der Ligandlösung ohne Angreifen einer Kraft ist. Diese kann auch durch die Formel berechnet werden  $\varepsilon_\lambda = -\varepsilon_0((\Delta F/F) - (\Delta\kappa/?))$  wobei  $\Delta\kappa$  die gemessene Änderung der Federkonstante ist.

[0201] Die Komplianz wird typischerweise bei niedrigen Frequenzen von 0,1–0,15 Hz gemessen, weit unter den Resonanzfrequenzen der Arme **148** oder **168**.

[0202] Die Elektronik **199** in **Fig. 4** schließt all die verschiedenen konventionellen Stromkreise und Vorrichtungen ein, die zur Verwendung des erfindungsgemäßen Wandlers beim Testen der Probenstreifen  $S$  adaptiert sind. Beispiele für solche Vorrichtungen sind Netzteile; Spannungsregler, Frequenzgeneratoren, Analysatoren und Stromrichter; Verstärker; Computer; Rekorder; Wechselstrom/Gleichstrom- oder Gleichstrom-/Wechselstrom-Wandler; Gleichstrom- und Wechselstrom-Voltmeter und Amperemeter; Displayinstrumente vom Oszillatortyp und verwandte Vorrichtungen. Diese Liste ist nur beispielhaft und die Erfindung kann andere Arten von Elektronik einschließen.

[0203] Klimatisierungsgeräte und Geräte zum Leiten von Luft über die Wandler, Heiz/Kühleinheiten, Pumpen, chemische Vorrichtungen und eine Vorrichtung zur Isolierung vor Vibration werden auch als Teile der Erfindung in Betracht gezogen.

[0204] Die im vorliegenden Beispiel beschriebenen Tests sind von zwei Arten. In der ersten wurde die Probe um einen vorherbestimmten Betrag beansprucht, z. B. 1,5–4% und die Zugkraft  $F$  würde als abhängige Größe gemessen. In der zweiten Art war das Elastizitätsmodul gemäß der dynamischen Definition die gemessene Größe. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben gefunden, dass beide Größen sehr nützlich sind, um die Bindung von Liganden an Protein oder DNA zu detektieren. Der Fachmann kennt andere Tests, die unter Verwendung des erfindungsgemäßen Apparats durchgeführt werden können.

[0205] Der erfindungsgemäße Apparat kann, vorzugsweise mit dem beschriebenen Zubehör, sofort verwendet werden, um eine beliebige Untersuchung der Wechselwirkung kleiner Liganden mit Protein- oder DNA-Molekülen durchzuführen. Mögliche Anwendungen schließen die folgenden ein:

1. Es ist bekannt, dass bestimmte Extrakte eine Verbindung enthalten, die in Bezug auf ein bekanntes Zielprotein aktiv sind. Ein einfacher Weg, um die aktive Komponente schnell zu finden und zu isolieren besteht darin, die Vorrichtung, mit der aus diesem Protein hergestellte Probe, an den Ausgang eines HPLC oder eines anderen Chromatographen zu platzieren, wenn der Extrakt durch dieses durchgeleitet wird.

2. Die vorliegende Erfindung kann eingesetzt werden, um ein massives primäres Screenen von Verbindungen auf ihre Wechselwirkungen mit wichtigen Proteinen (oder DNA) Molekülen bei der Suche nach potentiellen Arzneimitteln durchzuführen.

3. Die vorliegende Erfindung kann bei der primären Analyse der biologischen Gefährlichkeit neu synthetisierter Verbindungen eingesetzt werden. Es können Proben aus Schlüsselenzymen und anderen Proteinen als mögliche Ziele dieser Verbindungen getestet werden. Zum Beispiel besteht bei allen Verbindungen, die Acetylcholinesterase mit hoher Affinität binden, der Verdacht, dass sie mögliche Giftstoffe darstellen.

4. Die Erfindung kann auch bei der biochemischen Analyse der metabolischen Kontrolle in lebenden Zellen eingesetzt werden. Allosterische Effektoren von metabolischen Schlüsselenzymen können entdeckt werden, indem alle möglichen metabolischen Zwischenprodukte auf Proben aufgebracht werden, die aus einer kleinen Anzahl von Schlüsselenzymen hergestellt sind.

5. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann auch als Chemosensor eingesetzt werden, um die Konzentration einer bestimmten Verbindung in flüssigen Proben zu messen. Dies hat im Vergleich mit anderen Biosensoren den Vorteil, dass die gleiche Messeinheit bei jeder spezifischen Aktivität, die durch die jeweiligen Proben festgelegt wird, verwendet werden kann. Die sensitiven Elemente für die Sensoren können auf Nachfrage hergestellt und separat den Anwendern geliefert werden.

6. Die Vorrichtung kann auch bei Untersuchungen von Muskeln und anderen biologischen Geweben eingesetzt werden, in denen die mechanischen Eigenschaften wie die Kontraktilität in hohem Maße mit ihrer biologischen Funktion verbunden sind.

7. Die Erfindung kann zur Analyse von bestimmten Komponenten in Wasser eingesetzt werden. Dies kann durch ein Monitoring erfolgen, bei dem Messungen in bestimmten Intervallen durchgeführt werden, oder es können ablösbare Proben gegenüber Wasser für eine bestimmte Zeitdauer ausgesetzt werden und dann auf ihre verbleibende Kapazität zum Ansprechen auf den Liganden getestet und mit Kontrollproben verglichen werden. Somit kann der Bindungsprozess und das Ablesen des Ergebnisses zeitlich und räumlich getrennt sein.

8. Es ist auch eine Analyse der Luftverschmutzung mittels der Vorrichtung möglich sowie eine direkte Analyse der Extrakte in organischen Lösungsmitteln.

[0206] Anstatt des Eintauchens der Probe in eine Lösung zum Zwecke des erfindungsgemäßen Testens kann die Probe zwischen zwei Spitzen des erfindungsgemäßen Apparats in eine zu testende Gasatmosphäre platziert werden. Somit können auch Liganden oder Chemikalien in Dampf oder Gasform durch die vorliegende Erfindung getestet werden.

[0207] Während das bevorzugte erfindungsgemäße Probenmaterial ein Film aus Protein oder Nukleinsäurematerial ist, kann die vorliegende Erfindung auch eingesetzt werden, um die Wirkungen von Chemikalien auf andere polymere Materialien zu testen. Zum Beispiel ist von einigen Polymeren bekannt, dass sie mechanisch auf das Vorliegen bestimmter Chemikalien in der Atmosphäre oder in Lösungen durch Schwellen reagieren (z. B. bei Lösungsmitteldämpfen) oder durch eine Reduktion der Elastizität oder der Reißfestigkeit (ein klassisches Beispiel ist die Schwächung eines Gummistreifens in Gegenwart von Spuren von Ozon in der Luft). In ähnlicher Weise kann der Apparat eingesetzt werden, um mikroskopische Polymerproben auf ihre Stabilität bei verschiedenen Umweltbedingungen, auf ihre Fähigkeit zur Absorption von Substanzen usw. zu testen. Alle diese möglichen Verwendungen werden auch als innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung liegend aufgefasst.

[0208] Nachdem die Erfindung nun im Allgemeinen beschrieben worden ist, wird diese durch Verweis auf die folgenden Beispiele noch besser verstanden, die spezifische Tests beschreiben, die unter Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren und unter Verwendung des erfindungsgemäßen Apparats durchgeführt wurden, und die als Verdeutlichung dienen. Diese Beispiele sollen die vorliegende Erfindung nicht eingrenzen.

#### Beispiel 1

[0209] Es wurde ein Film von Hefehexokinase (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) hergestellt. Die Herstellung war die in Morozov und Morozova, Anal. Biochem. 201: 68–79 (1992) und FEBS Lett. 175: 299–302 (1987) beschriebene, außer dass Saccharose der Proteinlösung in einer Menge von 30%, bezogen auf das Trockengewicht, zugesetzt wurde, um ein Reißen des Probenstreifens S zu verhindern. Ein Streifen der Maße 800 µm × 100 µm wurde geschnitten und auf die Arme **148**, **168** aufgebracht und um 2,8% gedehnt, wobei der Maximalwert der Elastizität erreicht wurde, und dann ließ man ihn für 20 Minuten relaxieren. Nach der Relaxation der Probe in Referenz-Puffer wurden Glucoselösungen in dem gleichen Puffer in den Napf zur Flüssigkeitsaufnahme **210** eingefüllt. Änderungen in der Elastizität und der isometrischen Spannung der Probe wurden zu den Zeitpunkten gemessen, die durch Pfeile angezeichnet sind und Änderungen in der Spannung und im Modul, die das Resultat eines solchen Austausches der Lösungen waren, wurden gemessen. Die Ergeb-

nisse sind in **Fig. 12** gezeigt. Der eingesetzte Puffer ist 10 mM HEPES, pH = 7,5, 0,1 NaCl.

[0210] Die Liganden wurden zu den Zeitpunkten zugesetzt, die durch die Pfeile in den **Fig. 12, 14** und **16** angezeigt sind.

[0211] Dieser Graph zeigt, dass die Variation der Glucosekonzentration große aber reversible Änderungen in der isometrischen Spannung und der Komplianz der Hexokinaseproben hervorrief; die Reversibilität wird dadurch gezeigt, dass die Graphen nach Einführen von Pufferlösung auf ihr ursprüngliches Niveau zurückkehren. Die horizontalen Anhebungen des stationären Zustandes zeigen die Spannung im Probenstreifen. Die Oszillationen zeigen die Komplianzmessung, bei der die Beanspruchung und die resultierende Belastung in sinusartiger Art variiert werden. Die Amplitude der Oszillation ist ein Maß für die Komplianz. Dieses Beispiel illustriert, dass die bekannte spezifische Wechselwirkung von Hexokinase mit seinem Substrat Glucose unter Anwendung der vorliegenden Erfindung in wenigen Minuten detektiert werden kann.

[0212] **Fig. 13** ist ein Graph der inversen Spannungsänderungen gegen inverse Glucosekonzentrationen, wobei ein lineares Verhältnis gezeigt wird.

[0213] Wie in **Fig. 12** gezeigt, ändert sich die Amplitude der Spannung als Reaktion auf Glucoselösungen in Abhängigkeit von deren Konzentrationen. Dies ermöglicht ein Abschätzen der Bindungskonstante, um die Affinität von Glucose an Hexokinase zu charakterisieren. Ein Beispiel für eine solche Abschätzung ist in **Fig. 13** gezeigt. Hier wird ein Graph der inversen Spannungsänderungen gegen inverse Glucosekonzentrationen (Lineweaver-Burk Auftragung, s. L. Stryer, Biochemistry, W. H., Freeman and Company, New York, 1988, S. 189–190) gezeigt, der ein lineares Verhältnis aufweist. Dies zeigt, dass die Glucose-Hexokinase-Wechselwirkung durch das bekannte Langmuir-Isotherm beschrieben wird und durch die Dissoziationskonstante des Glucosehexokinasedimers unter ähnlichen Bedingungen (Mayes et al., Eur. J. Biochem. 133: 127 (1983)).

## Beispiel 2

[0214] Ein Streifen aus Konkanavalin A (Sigma, St. Louis, MO) wurde hergestellt wie in Beispiel 1 für Hexokinase beschrieben, auf die Arme **148, 146** aufgebracht und um 1,2% in Puffer 1 (10 mM HEPES-Puffer, pH = 7,5 enthalten 0,1 M NaCl und jeweils 0,1 mM  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$ ) gestreckt. Nach der Relaxation wurde die Lösung mit 0,25, mM, 1,25 mM, 5 mM und 10 mM Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (MP) im gleichen Puffer **1** in das Gefäß zur Aufnahme der Flüssigkeit **210** eingefüllt und zwar zu Zeitpunkten, die in **Fig. 14** durch Pfeile gekennzeichnet sind. Man sieht, dass die Zugabe jeder anderen Lösung zu einer progressiven Reduktion der isometrischen Spannung in dem Konkanavalin A-Streifen führt. Eine Lineweaver-Burk-Auftragung dieser Spannungsänderungen

ähnlich zu dem in Beispiel 1 für Hexokinase vorgenommenen (**Fig. 13**) ermöglicht die Bestimmung der Dissoziationskonstante von MP. Dieser Auftragung für Konkanavalin ist in **Fig. 15** gezeigt und ergibt einen  $K_d = 0,3$  mM. Dieser Wert liegt nahe an der Dissoziationskonstante  $K_d = 0,14$  mM, die für die Bindung in Lösung gezeigt wurde (Schwartz et al., J. Biol. Chem., 268: 7668 (1993)). Dieses Beispiel zeigt, dass die Dissoziationskonstante des Liganden mit dem Protein in etwa 10 min. erhalten werden kann.

[0215] Zurückkehrend zu **Fig. 14** ist zu sehen, dass die MP-induzierte Abnahme der Spannung vollständig reversibel ist, die Einführung von Puffer **1** in das Gefäß zur Flüssigkeitsaufnahme **210** führt zu einem Anstieg der Spannung um  $\Delta F_1$ , der entsprechenden Abnahme bei Zugabe von MP gleich ist. Ein Austausch von Puffer **1** gegen Puffer **2**, enthaltend alle Komponenten von Puffer **1** außer  $MnCl_2$  und  $CaCl_2$ , resultiert in einer merklichen Abnahme der Spannung. Daher ermöglicht der mechanochemische Effekt eine einfache Detektion der bekannten Fähigkeit von Konkanavalin zur Bindung von divalenten Kationen (siehe den Übersichtsartikel von G. N. Reeke et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 234: 369 (1974)). Ein weiterer Beweis dafür ist aus der Wirkung der Zugabe von 1 mM EDTA zu Puffer **2** ersichtlich. Diese Substanz, die zur starken Bindung aller polyvalenten Metallkationen fähig ist, entfernt alle Spuren von solchen Kationen, die stets in den Pufferlösungen vorliegen (in Konzentration von etwa  $10^{-6}$  M) und die Dissoziation dieser Kationen von dem Protein reduziert die Spannung noch weiter. Der EDTA-Effekt beruht nicht auf der direkten Bindung von EDTA-Molekülen an Proteinen, da eine weitere Zugabe von EDTA-freiem Puffer **2** in das Gefäß zur Flüssigkeitsaufnahme **210** die Spannung nicht beeinflusst.

[0216] Das Einführen von 10 mM MP, gelöst in Puffer **2**, in den Napf **210** führt zu einer reversiblen Abnahme der Spannung um  $\Delta F_2$ , ähnlich der Wirkung  $\Delta F_1$  in Puffer **1**. Dies zeigt, dass die entfernten divalenten Kationen für die MP-Bindung nicht notwendig waren. Im Vergleich zu MP ist von Glucose bekannt, dass sie eine wesentlich höhere Fähigkeit zur Bindung von Konkanavalin A hat (Lucy L. S. und Golfstein I. J. Biochem. Biophys. Acta, 165: 398 (1968)) und dies ist anhand der sehr kleinen Spannungsänderungen als Ansprechen auf das Einführen von 5 mM Glucoselösung (Glc) in den Napf **210** einfach zu sehen.

[0217] Dieses Beispiel illustriert die Potenz der vorliegenden Erfindung bei dem Auffinden der Fähigkeit von Proteinen, mit verschiedenen Liganden in Wechselwirkung zu treten. In weniger als einer Stunde wurde unter Verwendung einer einzelnen Probe, die lediglich ein Mikrogramm Protein enthielt, und unter Anwendung des Verfahrens der Bindungsdetektion die Wechselwirkung von Konkanavalin mit vier verschiedenen Substanzen charakterisiert.

## Beispiel 3

[0218] Dieses Beispiel illustriert einen „Dosimeter“-Arbeitsmodus, der aufgrund der schnellen und reproduzierbaren Methode der Probenaufbringung in die erfindungsgemäße Vorrichtung möglich wird.

[0219] In diesem Beispiel wurden Avidinstreifen aus im Handel erhältlichen Protein (Sigma, St. Louis, MO) wie in Beispiel 1 für Hexakinase beschrieben, hergestellt. Die Streifen wurden in Lösungen aus verschiedenen Konzentrationen von Biotin, angesetzt in 10 mM HEPES-Puffer, pH = 7,5, 0,1 M NaCl, eingebracht. Die Lösungen mit den Streifen wurden für 48 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die Streifen an die Arme **146**, **148** angebracht, gestreckt und man ließ sie in dem gleichen Puffer ohne Biotin relaxieren, wie dies in **Fig. 16** gezeigt ist. Nach Abschluss der Relaxation wurden  $4 \times 10^{-4}$  molare Lösungen von Biotin, hergestellt im gleichen Puffer, in das Gefäß zur Flüssigkeitsaufnahme **210** eingefüllt und Messungen der isometrischen Spannung  $\Delta F$  und des Moduls wurden gemessen. Die **Fig. 17** zeigt die Ergebnisse solcher Messungen mit Avidinproben, die gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Biotin präexponiert worden waren. Es ist zu sehen, dass (i) alle Messungen mit jeder Proteinprobe in 10–15 min. durchgeführt werden können und (ii) die Änderungen sowohl im Modulus als auch der Spannung eingesetzt werden können, um die „Dosis“ des Liganden schnell zu charakterisieren, die durch die Proteinprobe erhalten wird, vorausgesetzt, dass der Ligand stark und irreversibel gebunden wird.

## Beispiel 4

[0220] Es wurden Proteinfilme durch Elektro spray zur Verwendung in einem chemischen Verfahren hergestellt. Eine 2 mg/ml Konkanavalin A (Sigma, St. Louis, MO) Lösung, enthaltend 0,5 mg/ml Glycerin, wurde durch eine rechteckige einzelne Öffnung auf eine Al-Elektrode elektro sprayt, die mit einer polymeren leitfähigen Unterschicht von etwa 2–5 Mikron Dicke bedeckt war. Die Unterschicht wurde durch Trocknen einer dünnen Schicht einer wässrigen Lösung aus einer Mischung von drei Verbindungen (Polyethylenglycol-8000, Poly(anethosulfonsäure-Na-Salz und Triton X-100), jeweils 3%, hergestellt. Die Proteinlösung wurde aus einer Kapillarspitze elektro sprayt, die 20 mm über dem Substrat platziert war mit einer positiven Spannung von 4,0 kV an der Kapillare und einem Stromfluss von 33 nA. Die Ablagerung wurde in trockener Luft für 10 Min. durchgeführt. Nach Elektro sprayablagerung wurde die Probe für 15 min. in einem Dampf von 25% Glutaraldehyd (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) bei 25°C vernetzt. Bei Aufbringung eines Tröpfchens aus Wasser auf die Substratoberfläche wurde die Probe innerhalb von 5 Sekunden vom Substrat aufgeschwemmt. Zur Herstellung einer Mikrofotografie

der Probe, wie in **Fig. 33A** gezeigt, wurde die Probe durch Behandlung mit einer Lösung von Coomassibrillant Blau R (Sigma, St. Louis, MO) gefärbt.

[0221] Ein Film aus Pferdeleberalkoholdehydrogenase (LADH, Sigma, St. Louis, MO), wie in **Fig. 33B** gezeigt, wurde auf einer Al-Elektrode hergestellt, die mit einer Unterschicht bedeckt war, die aus 95% des Natriumsalzes der Algininsäure (Sigma, St. Louis, MO) und 5% Triton X-100-Detergenz bestand. Die LADH-Lösung, enthaltend 5 mg/ml Protein und 0,15 mg/ml Saccharose wurde in trockener Luft bei +4,3 kV und 30–40 nA von einer Kapillare elektro sprayt, die etwa 15 mm über dem Substrat platziert war. Der abgelagerte Film wurde für 8 min mit Dampf aus 25% Glutaraldehyd bei 28°C vernetzt.

[0222] Dieses Beispiel zeigt, dass kleine Proteinproben einheitlicher Dicke, was für das Testen der Proteine durch ein mechanochemisches Verfahren wichtig ist, durch Elektro sprayablagerung hergestellt werden können.

## Beispiel 5

[0223] Die Ablagerung von Protein aus konzentrierten Proteinlösungen in trockener Atmosphäre führt zur Bildung einer porösen Struktur. **Fig. 34A** zeigt eine Abbildung durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) eines humanen Hämoglobinfilms, der auf einer polierten Goldelektrode abgelagert ist. Das Protein wurde aus einer wässrigen Lösung elektro sprayt, die 0,6 mg/ml humanes Hämoglobin enthielt, wobei keine anderen Additive zugesetzt wurden. Die Ablagerung wurde in trockener Luft bei +5,3 kV von einer Kapillare durchgeführt, die in einem Abstand von etwa 20 mm über dem Substrat platziert war, wobei ein Stromfluss von 12 nA und eine Lösungsflussrate von 100 nl/min erfolgte. Die in **Fig. 34A** gezeigte Abbildung zeigt das Vorliegen von Proteinclustern mit Größen von etwa 300 nm. Das Aussetzen gegenüber feuchter Luft (100% relative Luftfeuchtigkeit bei Raumtemperatur von 20 min) führte zum Verschwinden der großen Cluster und zur Bildung einer flachen Oberfläche mit engen „Kanälen“, die als schwarze Struktur in der in **Fig. 34B** gezeigten Abbildung sichtbar sind. Dieses Beispiel erläutert die Herstellung poröser Materialien durch Elektro sprayablagerungen aus Substanzen, die homogene dichte Filme bilden, wenn sie aus einer Lösung getrocknet werden. Es verdeutlicht darüber hinaus ein Mittel zur Regulation der Porosität des durch Elektro spray hergestellten Films, indem in einer feuchten Atmosphäre „gebakken“ wird, wodurch die relative Verschiebung von Proteinmolekülen innerhalb des Clusters möglich wird.

[0224] Alle hierin zitierten Referenzen, einschließlich der Journalartikel und der Zusammenfassungen, der publizierten oder korrespondierenden US oder ausländischen Patentanmeldungen, der erteilten US oder ausländischen Patente und alle anderen Referenzen werden vollständig hierin als Referenzen ein-

bezogen, einschließlich aller Daten, Tabellen, Figuren und des Textes, der in den zitierten Referenzen vorliegt. Zusätzlich wird der gesamte Inhalt der Referenzen, die innerhalb der hierin zitierten Referenzen zitiert werden, ebenfalls vollständig als Referenz einbezogen.

[0225] Eine Bezugnahme auf bekannte Verfahrensschritte, konventionelle Verfahrensschritte, bekannte Verfahren oder konventionelle Verfahren ist in keinerlei Hinsicht als Eingeständnis zu verstehen, dass irgend ein Aspekt, eine Beschreibung oder eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung im relevanten Stand der Technik offenbart, gelehrt oder nahegelegt ist.

[0226] Die vorhergehende Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen offenbart das allgemeine Wesen der Erfindung vollständig und andere können; indem sie das gegenwärtige Fachwissen nutzen, diese für verschiedene Anwendungen wie spezifische Ausführungsformen ohne übermäßiges Experimentieren und ohne Abweichung von dem allgemeinen Konzept einfach modifizieren oder adaptieren und daher sind solche Adaptionen und Modifikationen so zu verstehen, dass sie innerhalb der Bedeutung und dem Bereich der Äquivalente der offenbarten Ausführungsformen liegen. Die Mittel und Materialien zum Durchführen der verschiedenen offenbarten Funktionen können eine Vielzahl von alternativen Formen annehmen, ohne dass von der Erfindung abgewichen wird. Es ist klar, dass die hierin verwendete Sprachregelung, und Terminologie zum Zwecke einer Beschreibung eingesetzt wird und nicht eingrenzend ist.

### Patentansprüche

1. Apparat (894) zum Messen der Wirkung von Chemikalien auf einen Probenfilm (702, 886, 1010) aus polymerem Material, **dadurch gekennzeichnet**, dass er umfasst:

ein Paar von Trägerbestandteilen (500, 148, 168), jeder mit einem Mittel (892) in Form einer Spitze zur Aufnahme von Probe an einem der Enden, um ein Ende des Probenfilms aus polymerem Material mit einer Dicke im Bereich von einem Mikron zu halten, wobei mindestens eines der Mittel in Form einer Spitze zur Aufnahme von Probe ein Ende des Probenfilms aus polymerem Material in einer solchen Art hält, dass das Ende des Probenfilms nicht von einer Zangenbacke gehalten wird;

Mittel zum Angreifen einer Kraft, angebracht an mindestens einem der Trägerbestandteile, zum Anwenden von Kraft auf den Probenfilm, der von dem Mittel in Form einer Spitze gehalten wird, wenn er verwendet wird; und Mittel zum Messen, direkt oder indirekt an den Probenfilm angebracht, um Änderungen in den Eigenschaften des Probenfilms zu messen, wenn dieser bei der Verwendung der Einwirkung einer Chemikalie unterworfen wird.

2. Apparat (894) gemäß Anspruch 1, wobei das Mittel im Sinne einer Spitze (892) eine Probe-haltende Spitze umfasst, die zum Durchdringen des Probenfilms (702, 886, 1010) aus polymerem Material fähig ist.

3. Apparat (894) gemäß Anspruch 1, wobei das Mittel im Sinne einer Spitze (892) eine Probe-haltende Spitze umfasst, die fähig ist, an den Probenfilm (702, 886, 1010) aus polymerem Material unter Verwendung eines Klebers angeklebt zu werden.

4. Apparat (894) gemäß Anspruch 1, wobei die Kraftmittel Mittel zum Anwenden oder Aufrechterhalten einer Kraft umfassen, die parallel zur Richtung des Probenfilms (702, 886, 1010) zwischen den Mitteln in Form einer Spitze (892) verlaufen, so dass der Probenfilm verlängert oder kontrahiert wird.

5. Apparat (894) gemäß Anspruch 4, wobei die Kraftmittel darüber hinaus Mittel für eine oszillierende Veränderung der Elongation des Probenfilms (702, 886, 1010) einschließen.

6. Apparat (894) gemäß Anspruch 1, wobei die Messmittel Mittel zum Messen der Verschiebung von einem der Trägerbestandteile in Bezug auf den anderen umfassen.

7. Apparat (894) gemäß Anspruch 1, wobei die Messmittel Mittel zum Messen der Kraft umfassen, die erforderlich ist, um die Mittel im Sinne einer Spitze (892) in einer konstanten Ausrichtung zu halten.

8. Apparat (894) gemäß Anspruch 1, der darüber hinaus ein Gefäß zur Aufnahme von Flüssigkeit einschließt, um Mittel zur Aufnahme einer Flüssigkeit und zum Eintauchen bereitzustellen, um bei Verwendung das Eintauchen des Probenfilms durch die Mittel in Form einer Spitze (892) die den Probenfilm (702, 886, 1010) halten, in die in dem Gefäß zur Flüssigkeitsaufnahme vorliegende Flüssigkeit zu verursachen, wobei der Probenfilm einem Test unterzogen werden kann, während er in die Flüssigkeit in dem Gefäß eingetaucht ist.

9. Apparat (894) gemäß Anspruch 1, der darüber hinaus einen Probenfilmhalter zum Präsentieren des Probenfilms (702, 886, 1010) für die Mittel in Form einer Spitze (892) der Trägerbestandteile einschließt und Mittel zum Ausrichten, um den Probenfilmhalter in eine vorherbestimmte Position relativ zu den Trägerbestandteilen auszurichten.

10. Verfahren zum Verwenden des Apparates (894) nach Anspruch 1 zur Messung der Wirkung von Chemikalien auf einen Probenfilm (702, 886, 1010) aus Polymermaterial, dadurch gekennzeichnet, dass es umfasst:

Befestigen eines Probenfilms aus polymerem Materi-

al an den Mitteln in Form einer Spitze (**892**) zum Halten der Probe des Paars an Trägermitteln (**500, 148, 168**), so dass der Probenfilm zwischen den Spitzen (**892**) gehalten wird;

Eintauchen des Probenfilms in einer Referenzflüssigkeit;

Anwenden von Kraft auf den Probenfilm durch Kraftmittel;

Messen einer physikalischen Eigenschaft des Probenfilms durch den Einsatz von Mitteln zum Messen; Eintauchen des Probenfilms in eine Flüssigkeit, die die zu testende Chemikalie enthält; und erneutes Messen der gleichen physikalischen Eigenschaft des Probenfilms, die in besagtem Messschritt gemessen wurde, durch Einsetzen von Messmitteln; wobei die Wirkung der Chemikalie auf das polymere Material durch Detektieren einer Änderung in der gemessenen Eigenschaft bestimmt werden kann.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei die Mittel in Form einer Spitze (**892**) zum Halten der Probe eine Spitze zum Halten der Probe umfassen, die zum Durchdringen des Probenfilms (**702, 886, 1010**) aus polymerem Material fähig ist, und der Fixierungsschritt das Durchdringen der Probe mit den Spitzen umfasst.

12. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei die Mittel in Form einer Spitze (**892**) zum Probenhalten eine Spitze zum Probenhalten umfassen, die fähig ist, an den Probenfilm (**702, 886, 1010**) aus polymerem Material durch Einsatz eines Klebers geklebt zu werden, und dieser Fixierungsschritt das Kleben der Probe an die Spitzen durch Einsatz eines Klebers umfasst.

13. Verfahren gemäß Anspruch 10 zum Messen der Ligandenbindung an ein Protein- oder Nucleinsäure-Material, wobei das polymere Material ein quervernetztes Protein oder ein Nucleinsäure-Material umfasst und die Chemikalie der Ligand ist, der auf seine Fähigkeit zur Bindung des Proteins oder des Nucleinsäure-Materials getestet werden soll.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dass darüber hinaus vor dem Fixierungsschritt die Schritte der Herstellung des Probenfilms (**702, 886, 1010**) beinhaltet, umfassend:

die Bildung von Streifen aus einem Verstärkungsmaterial auf einer Oberfläche;

das Anwenden einer Lösung der zu testenden Protein- oder Nucleinsäuremoleküle auf die Oberfläche und in Kontakt mit den darauf befindlichen verstärkenden Streifen;

Trocknen der Protein- oder Nucleinsäuremoleküle zur Bildung eines Films auf der Oberfläche und zumindest teilweises Überlappen der Streifen des verstärkenden Materials;

Vernetzen des Proteins oder der Nucleinsäuremoleküle auf dem Film; und

Entfernen des vernetzten Protein- oder Nucleinsäure-Materials und der unterlegten Verstärkungstreifen von der Oberfläche,

wobei der Fixierungsschritt das Fixieren des Streifens mit vernetztem Protein- oder DNA-Material und der untergelegten Verstärkungstreifen mit den Mitteln in Form einer Spitze (**892**) auf solche Weise umfasst, dass die Mittel in Form einer Spitze in der Region der Verstärkungstreifen daran fixiert werden.

15. Verfahren gemäß Anspruch 10, das darüber hinaus vor dem Fixierungsschritt die Schritte der Herstellung des Probenfilms (**702, 886, 1010**) einschließt, umfassend:

das Bilden von Streifen aus Verstärkungsmaterial auf einer Oberfläche;

das Bilden von zu testendem polymerem Material über der Oberfläche, einschließlich mindestens eines Teils der Verstärkungstreifen, so dass diese an die verstärkenden Streifen geklebt werden; und

das Entfernen des polymeren Materials und der daran adherierten verstärkenden Streifen von der Oberfläche, wobei der Fixierungsschritt das Fixieren des polymeren Materials an die Mittel in Form einer Spitze (**892**) umfasst, so dass die Mittel in Form einer Spitze daran im Bereich der Verstärkungstreifen fixiert werden.

16. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei (a) der Schritt des Anlegens einer Kraft auf den Probenfilm (**702, 886, 1010**) einschließt:

das Strecken des Probenfilms zwischen den Trägerbestandteilen; und

das Entspannenlassen des Probenfilms durch Aufrechterhalten eines fixierten Abstandes zwischen den Mitteln im Sinne einer Spitze, bis eine konstante isometrische Spannung der Probe erreicht ist;

(b) wobei die Schritte zur Messung und zur erneuten Messung das Messen der konstanten isometrischen Spannung und/oder einer Federkonstante des Probenfilms umfassen; und

wobei die Änderung in der gemessenen Eigenschaft Änderungen in mindestens eine der Eigenschaften einschließt, ausgewählt aus der isometrischen Spannung und der Federkonstante.

17. Verfahren zur Herstellung eines Probenfilms (**702, 886, 1010**) aus vernetztem Protein oder DNA-Material zur Verwendung in dem Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Schritte umfasst:

die Bildung von Streifen eines Verstärkungsmaterials auf einer Oberfläche;

das Aufbringen einer Lösung aus Protein oder Nucleinsäuremolekülen auf die Oberfläche und in Kontakt mit den Verstärkungstreifen darauf;

das Trocknen der Protein- oder Nucleinsäuremoleküle zur Bildung eines Films auf der Oberfläche und das zumindest teilweise Überlappen der Streifen aus Verstärkungsmaterial;

das vernetzen der Proteine- oder Nucleinsäuremoleküle auf dem Film (**702, 886, 1010**); und das Entfernen des vernetzten Protein- oder Nucleinsäure-Materials und der darunterliegenden Verstärkungstreifen von der Oberfläche.

18. Verfahren gemäß Anspruch 15, das darüber hinaus den Schritt der Vorbehandlung der Oberfläche des Streifens aus Verstärkungsmaterial umfasst, um Adhärenz der Protein- oder Nucleinsäuremoleküle an den Film (**702, 886, 1010**) zu erzeugen.

19. Verfahren gemäß Anspruch 17, das darüber hinaus den Schritt der Vorbehandlung der Oberfläche der Streifen aus Verstärkungsmaterial umfasst, um Adhärenz der Protein- oder Nucleinsäuremoleküle an den Film (**702, 886, 1010**) zu erzeugen.

20. Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei das verstärkende Material Gelatine ist.

21. Verfahren gemäß Anspruch 17, wobei das verstärkende Material Gelatine ist.

22. Verfahren zur Herstellung eines Probenfilms (**702, 886, 1010**) von vernetztem Protein- oder DNA-Material zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

Elektrosprayen einer Lösung aus Protein- oder Nucleinsäuremolekülen auf eine Oberfläche, um einen Film zu bilden;

Vernetzen der Protein- oder Nucleinsäuremoleküle in dem Film; und

Entfernen des Films aus vernetzten Protein- oder Nucleinsäuremolekülen als Probenfilm.

23. Verfahren zur Detektion der Wechselwirkung eines Liganden mit einem Protein oder DNA, dadurch gekennzeichnet, dass es umfasst:

Vernetzen des Proteins oder der DNA, das oder die zu testen sind, um einen festen Probenbestandteil des Proteins oder der DNA in Form eines Films (**702, 886, 1010**) in einer Dicke im Bereich von 1 Mikron zu bilden;

das in Kontakt Bringen des Probenbestandteils aus vernetztem Protein oder vernetzter DNA mit dem Liganden, wobei die Wechselwirkung des Liganden die Deformation der vernetzten Struktur des Probenbestandteils aus Protein oder DNA verursacht;

das Messen einer charakteristischen physikalischen Eigenschaft des Probenbestandteils, die nicht die laterale Elastizität oder die lateralen Reißigenschaften sind, vor und nach dem Schritt des in Kontakt Bringens des Probenbestandteils mit dem Liganden, in einer Art, in der jede Deformation der vernetzten Struktur des Probenbestandteils durch eine Änderung in einer charakteristischen physikalischen Eigenschaft vor und nach dem in Kontakt Bringen mit dem Liganden gemessen wird; und

Detektieren jeder Differenz zwischen den gemessenen Eigenschaften vor und nach dem in Kontakt Bringen mit dem Liganden, wobei die Existenz einer solchen Differenz ein Nachweis der Wechselwirkung des Liganden mit dem Protein oder der DNA ist.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei der Messschritt eine elektrische Eigenschaft des Probenbestandteils misst. Verfahren gemäß Anspruch 24, wobei die charakteristische physikalische Eigenschaft des Probenbestandteils, die zur Detektion der Wechselwirkung mit einem Liganden verwendet wird, die Innenleitfähigkeit ist.

25. Apparat (**894**) gemäß Anspruch 1, wobei die Messmittel direkt mit dem Probenfilm (**702, 886, 1010**) verbunden sind, um Änderungen in den mechanischen Eigenschaften des Probenfilms bei Kontrolle mit einer Chemikalie zu messen, und wobei die Trägermittel und die Messmittel in einem integrierten Chip (**700**) konstruiert sind.

26. Apparat (**894**) gemäß Anspruch 26, wobei der Probenfilm (**702, 886, 1010**) aus polymerem Material ein Probenfilm aus vernetztem Protein oder vernetzter DNA ist.

Es folgen 28 Blatt Zeichnungen

*FIG. 1*  
Stand der Technik

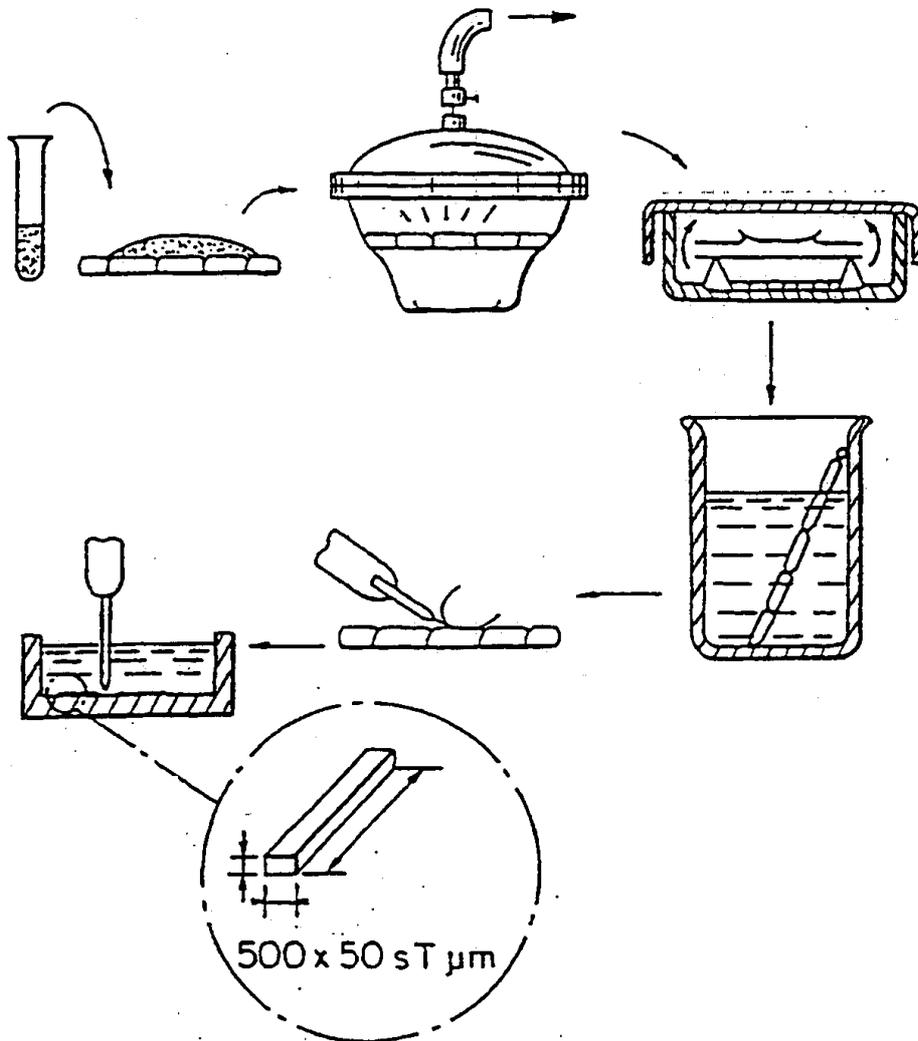




FIG. 4

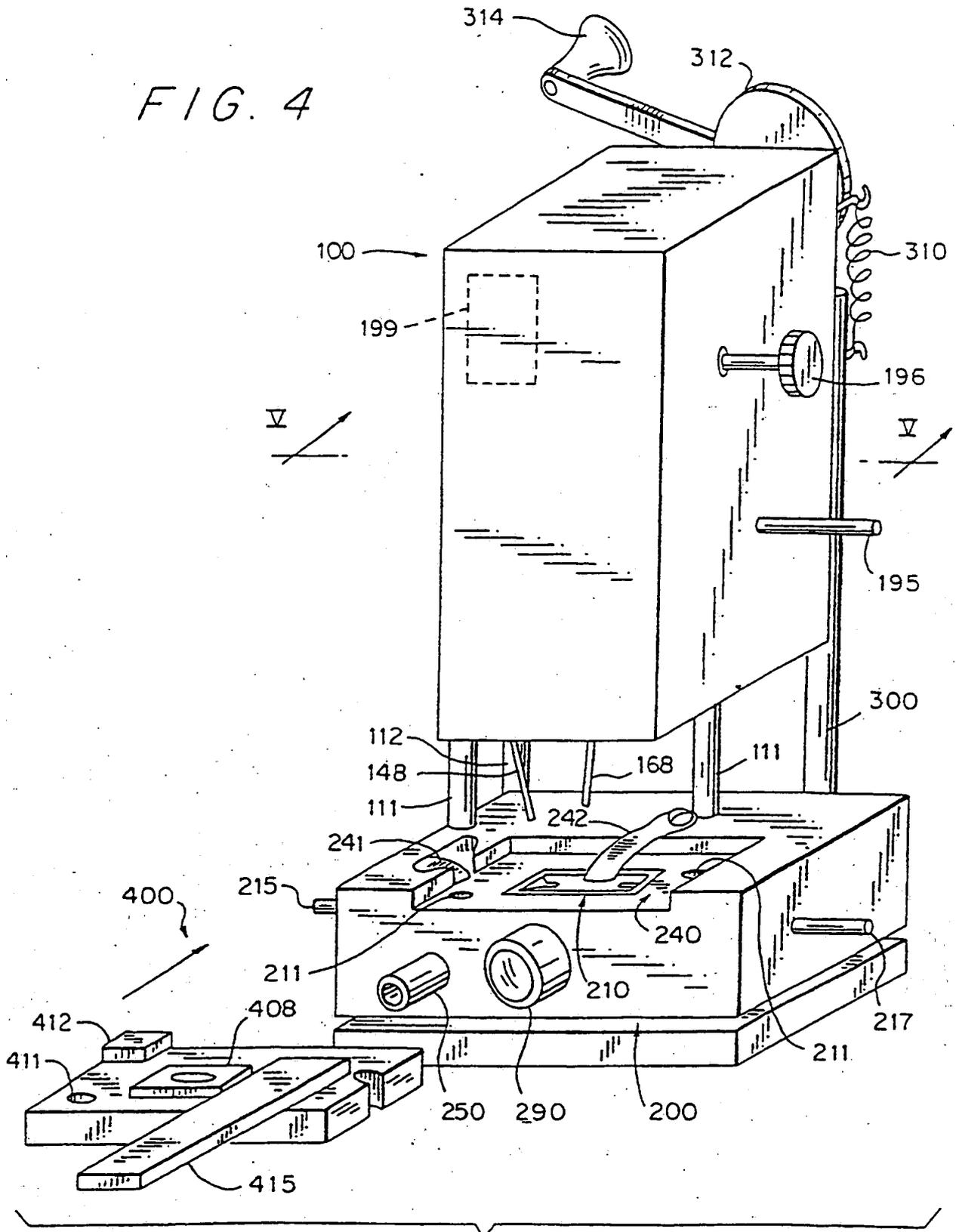
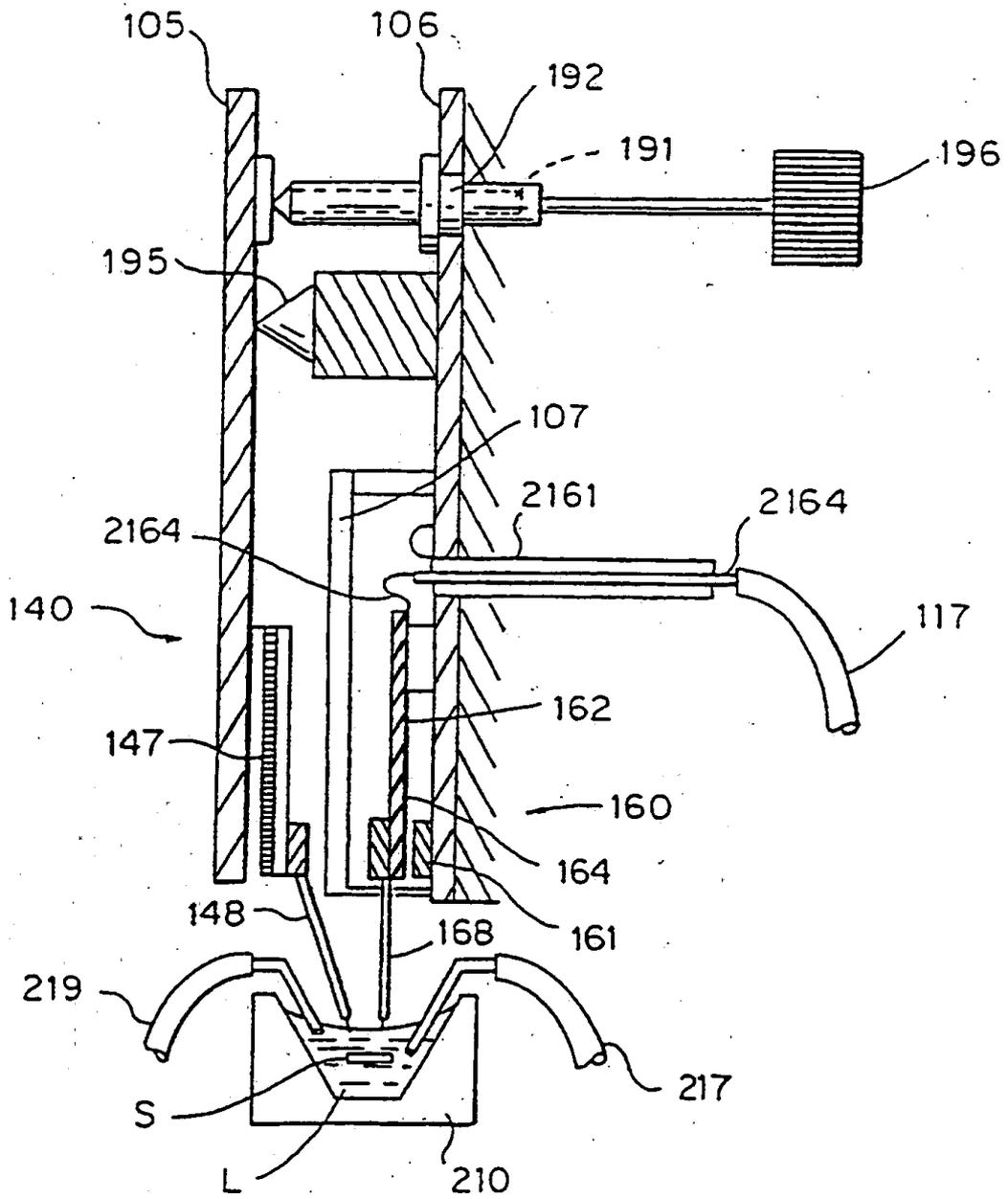


FIG. 5



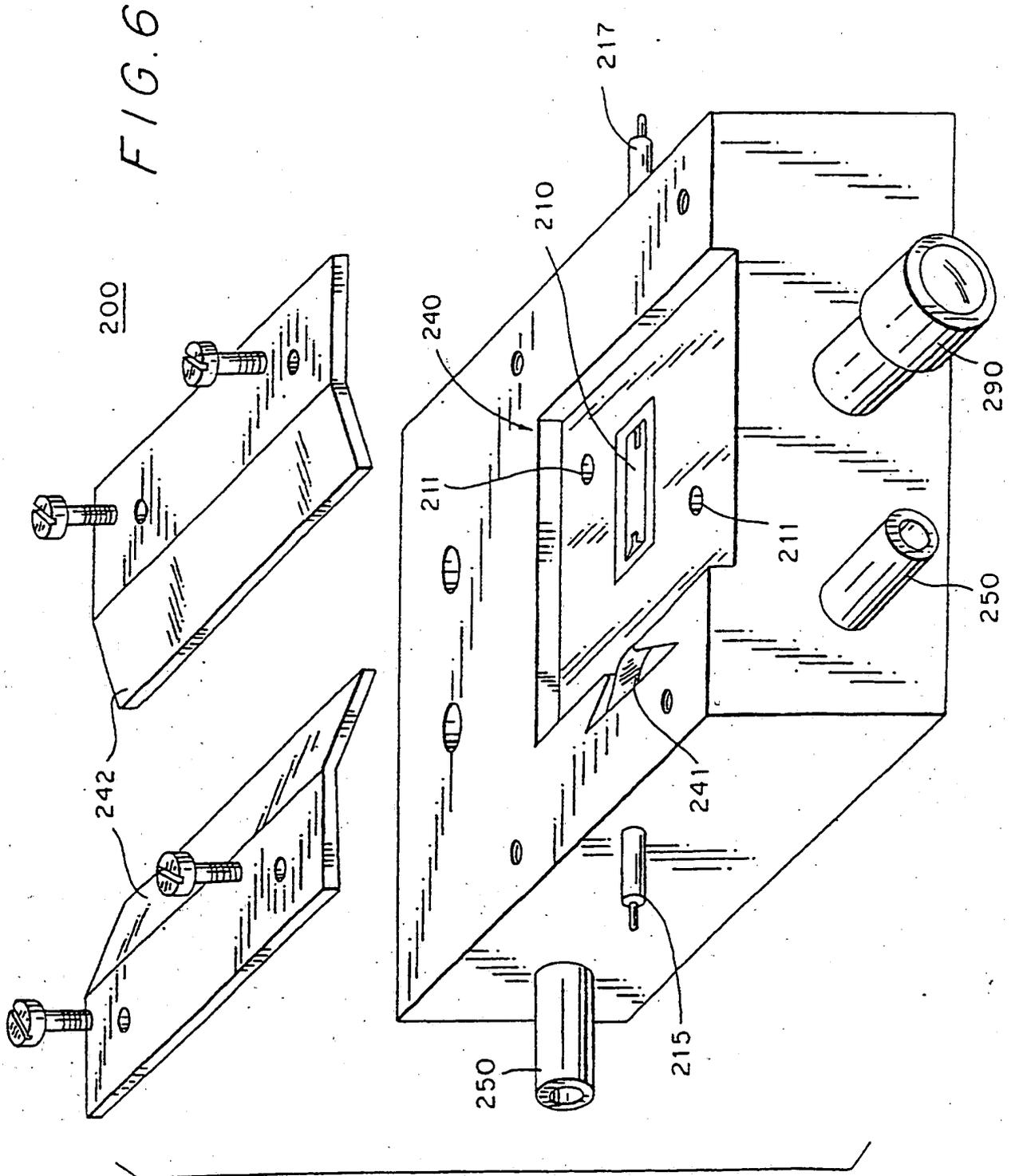


FIG. 7

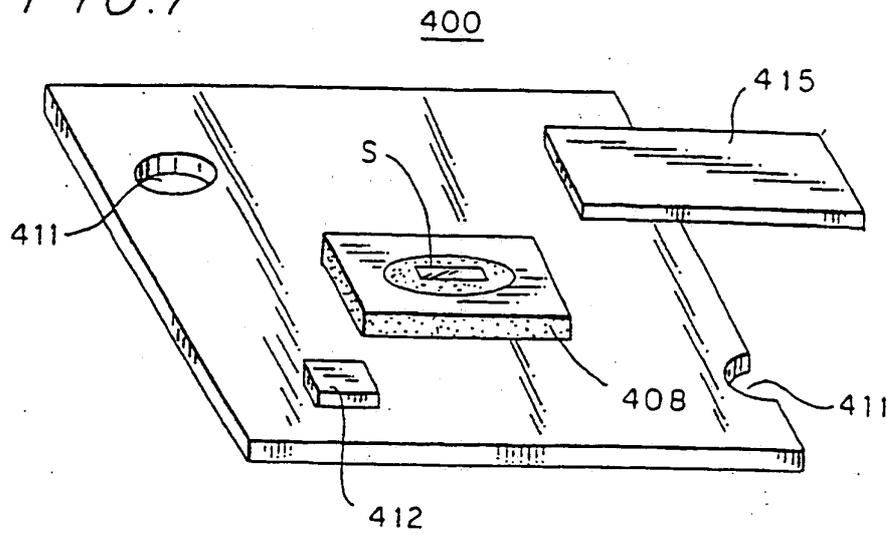
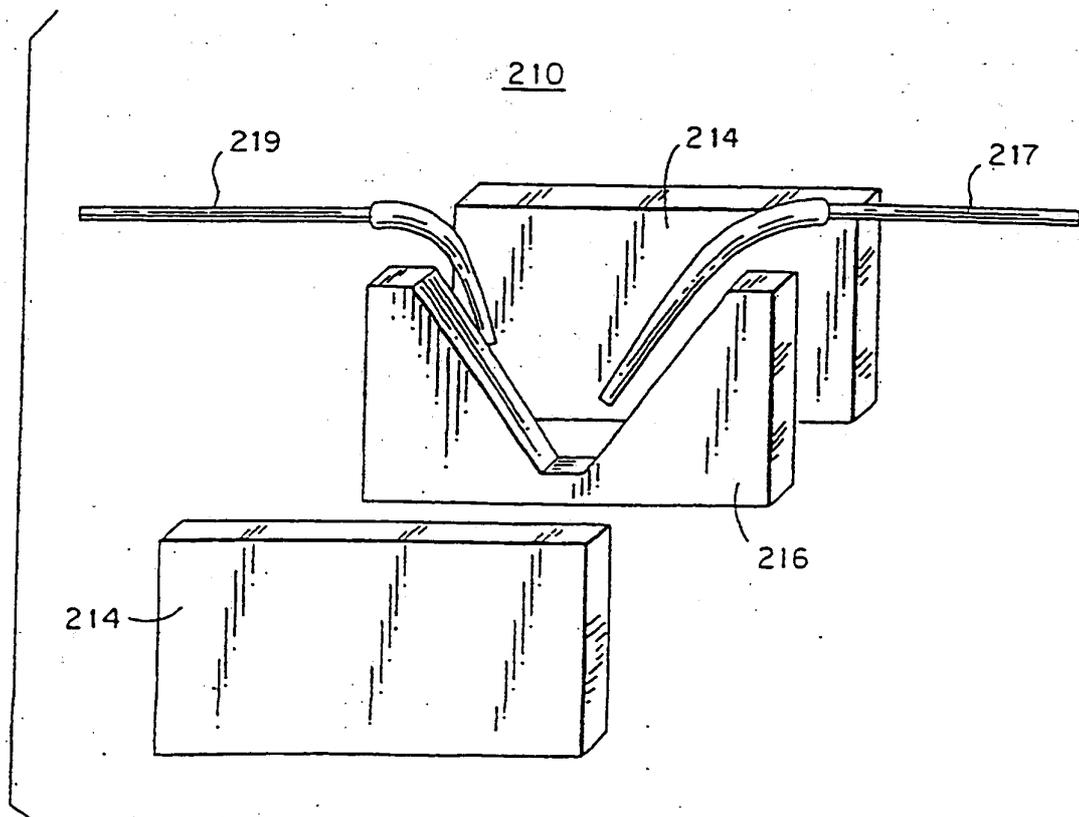


FIG. 8



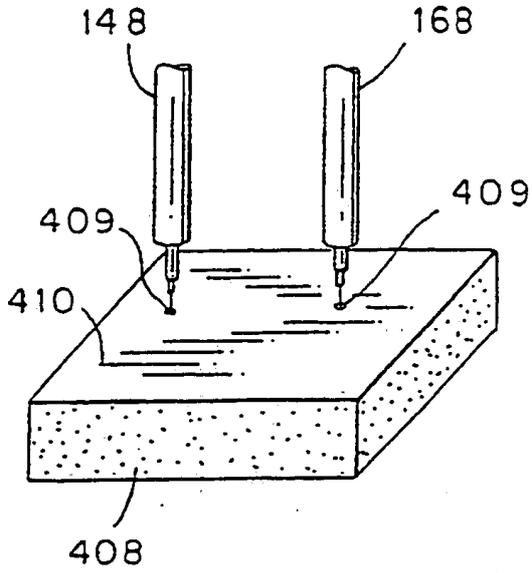


FIG. 9A

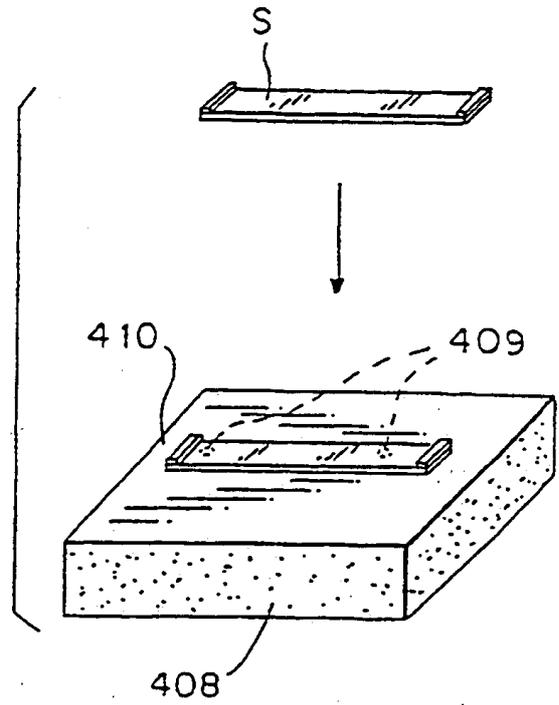


FIG. 9B

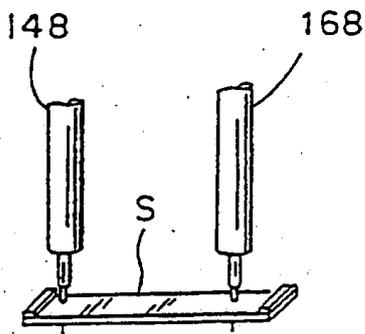


FIG. 9D

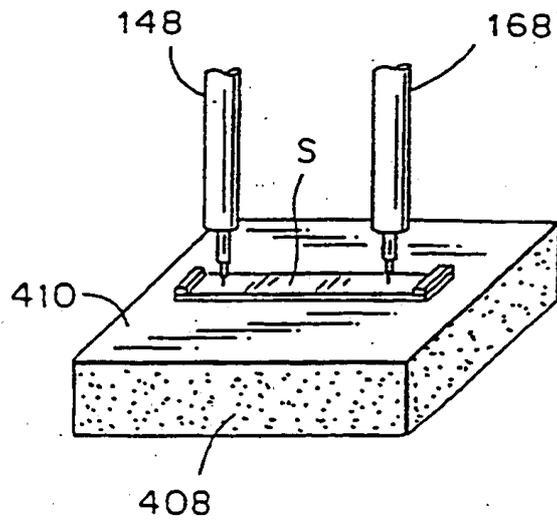


FIG. 9C

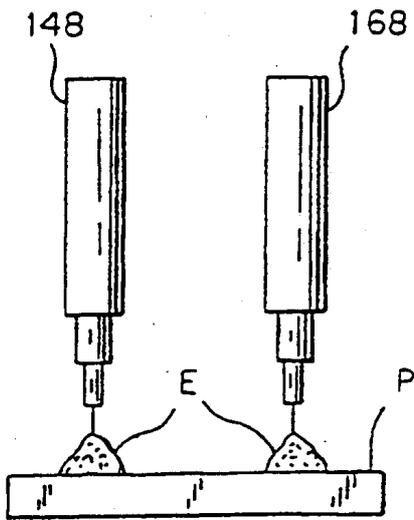


FIG. 10A

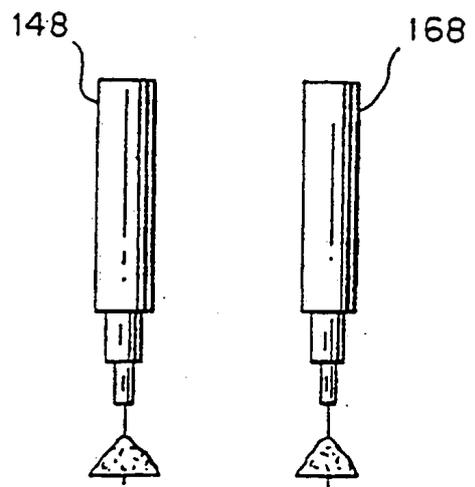


FIG. 10B

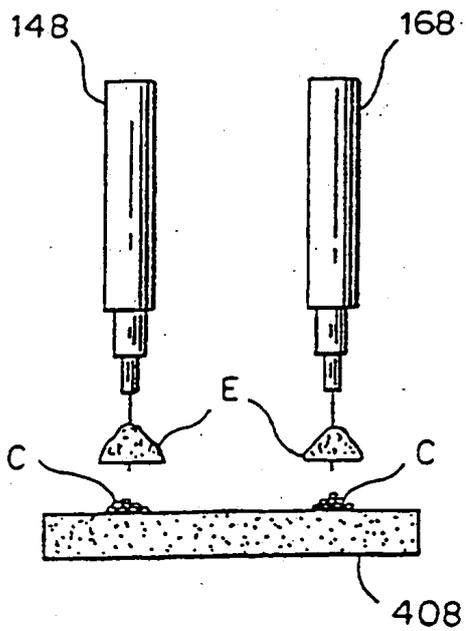


FIG. 10C

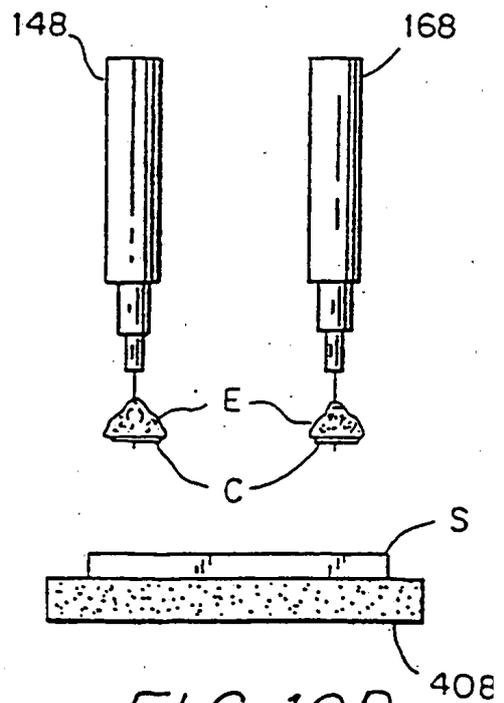


FIG. 10D

FIG. 11A

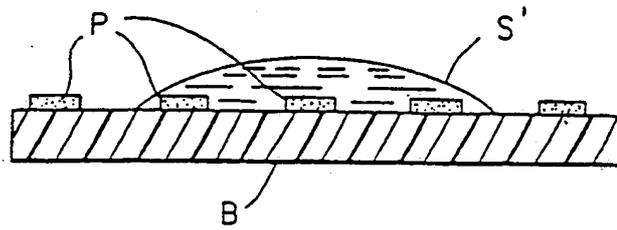


FIG. 11B

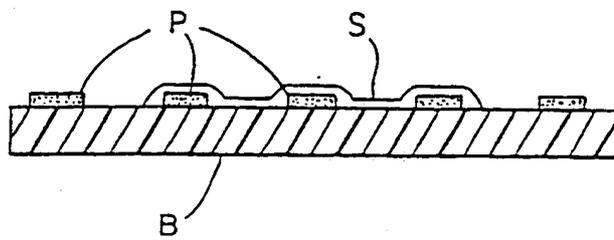


FIG. 11C

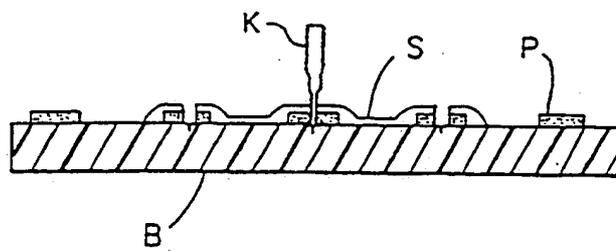


FIG. 11D

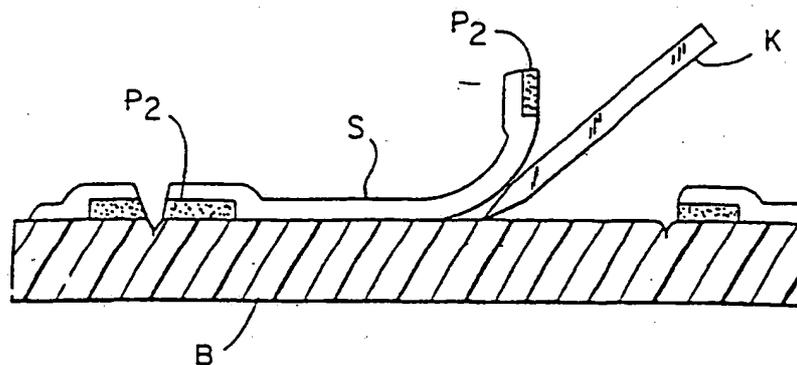
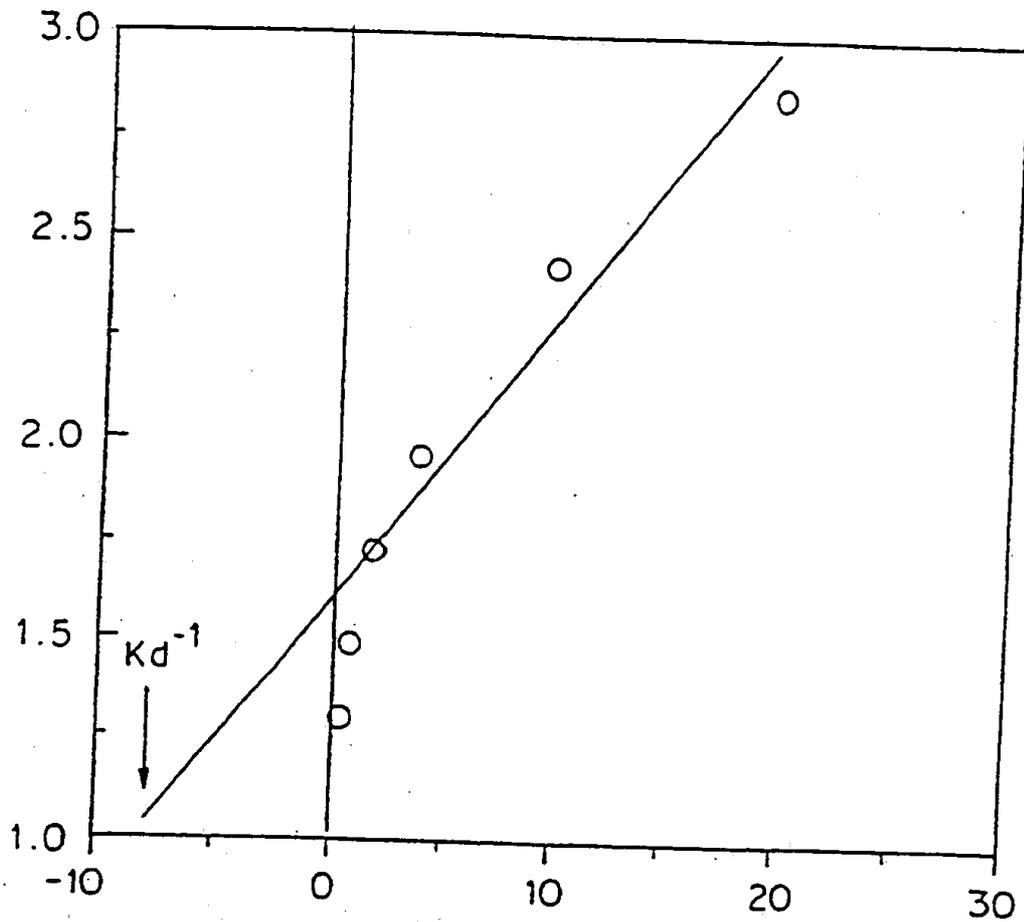




FIG. 13

KEHRWERT DER SPANNUNGSÄNDERUNGEN, WILLKÜRLICHE EINHEITEN



KEHRWERT DER GLUCOSE-KONZENTRATION  $\cdot M^{-1} \times 100$



FIG. 15

KEHRWERT DER SPANNUNGSÄNDERUNGEN, RELATIVE EINHEITEN

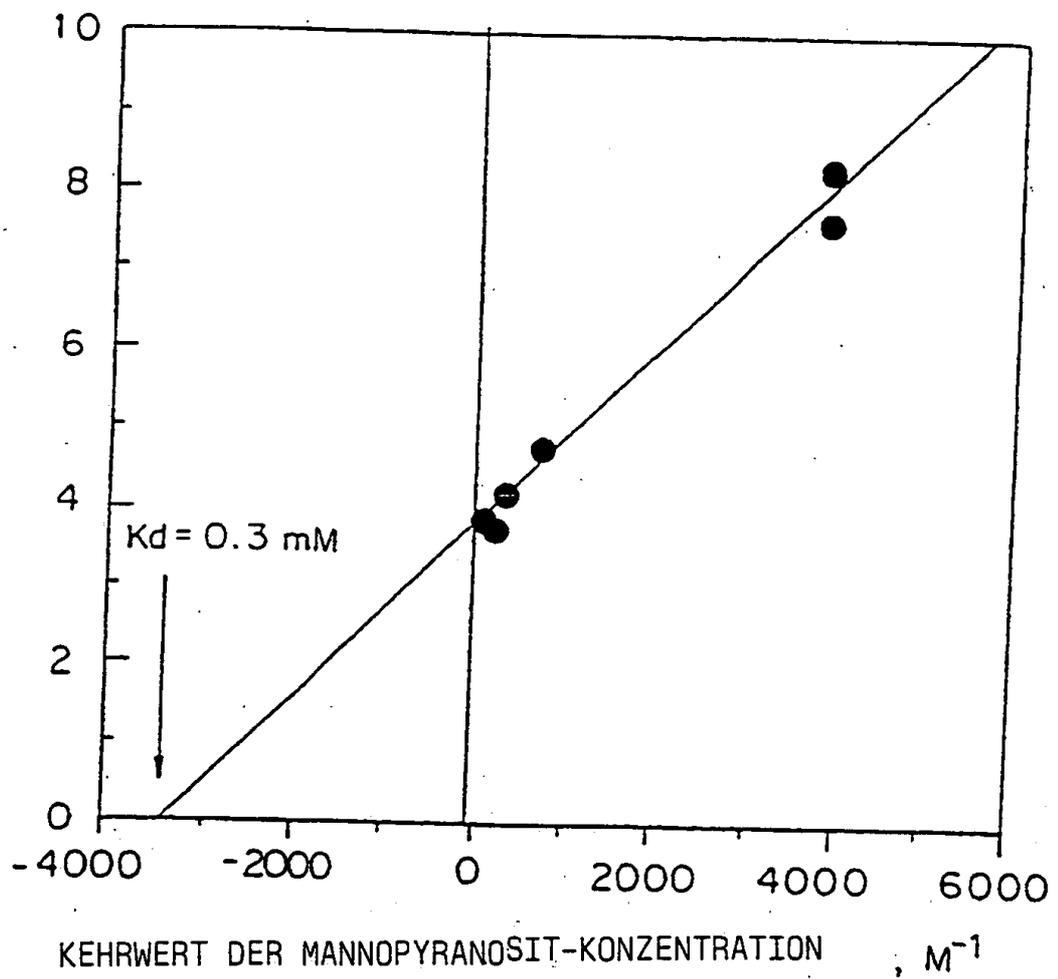


FIG. 16

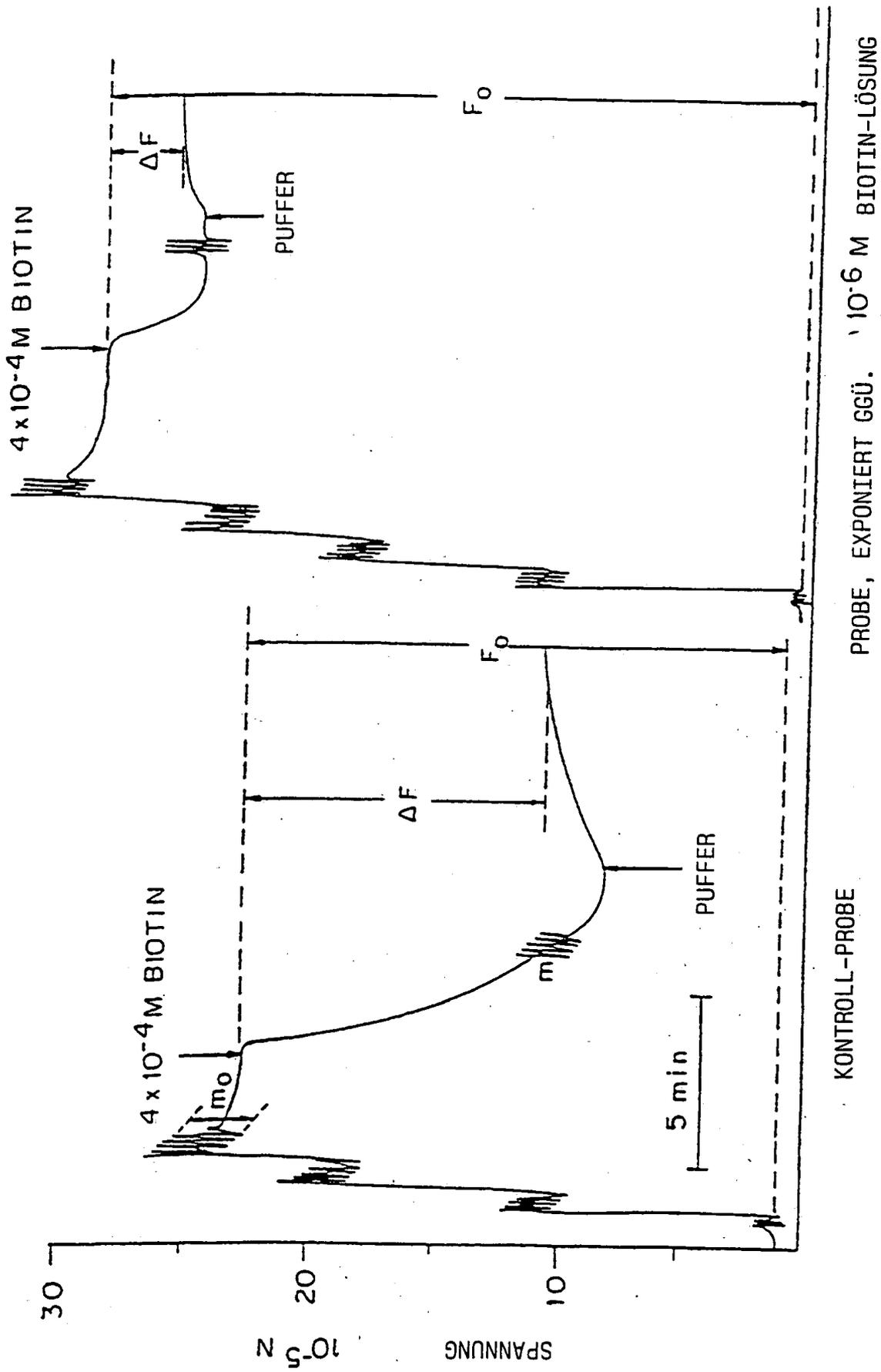
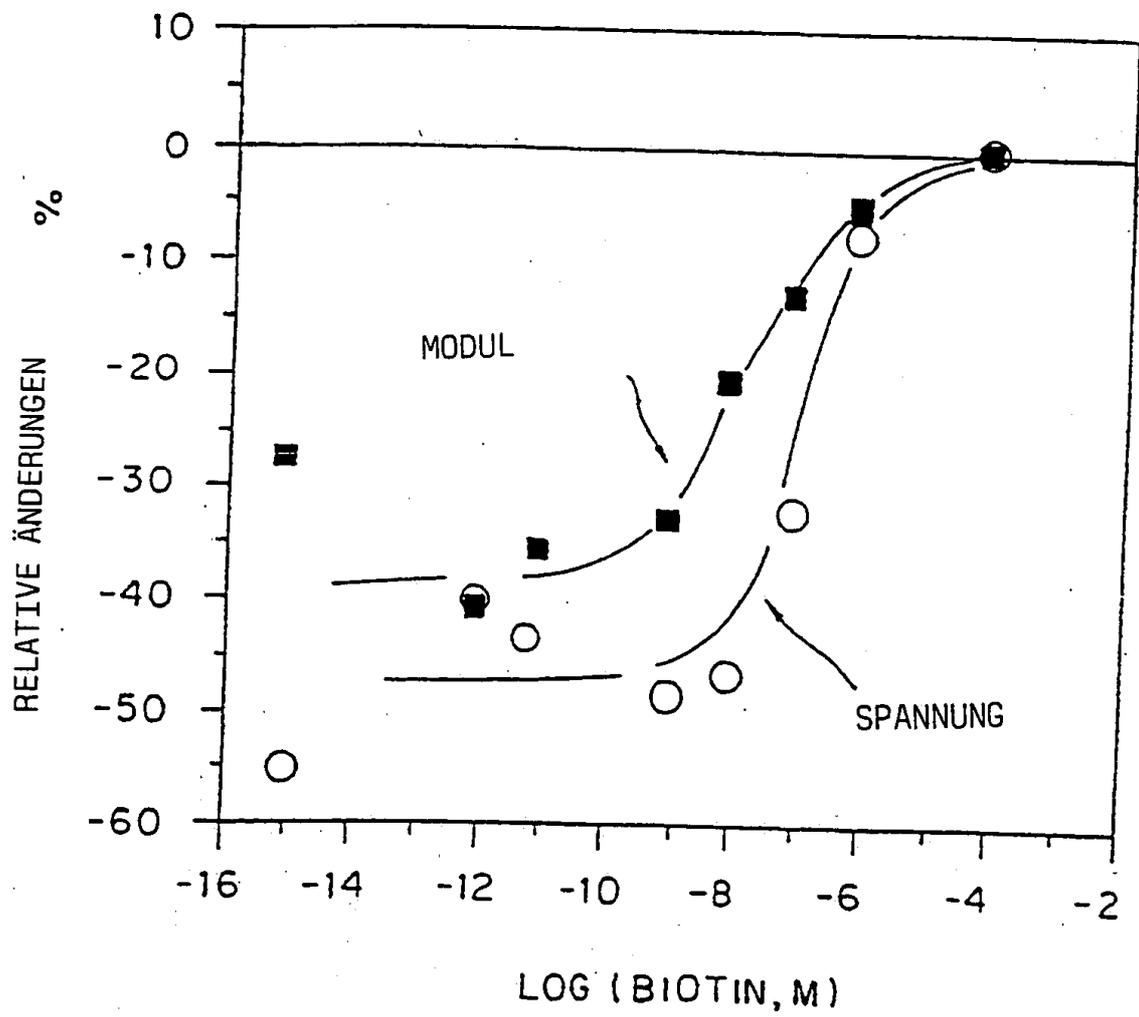


FIG. 17



16 / 28

FIG. 18

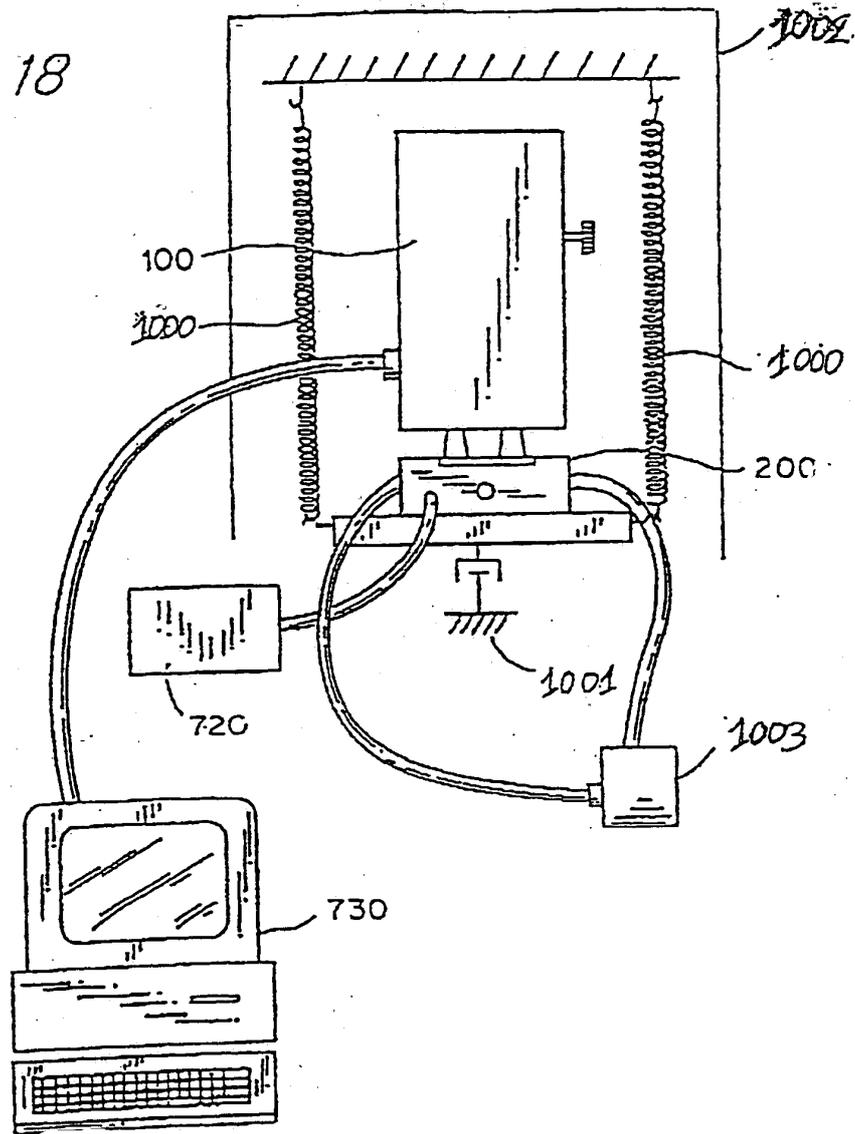


FIG. 19A

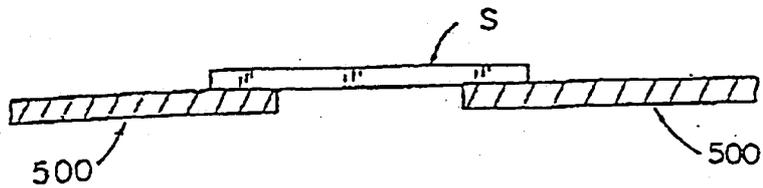


FIG. 19B

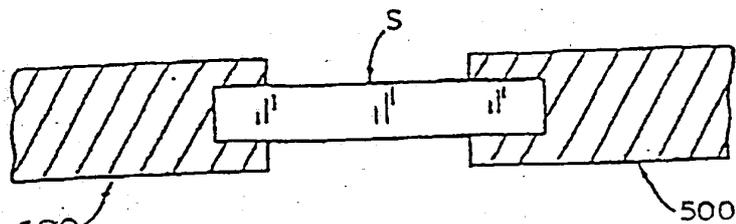


FIG. 20A

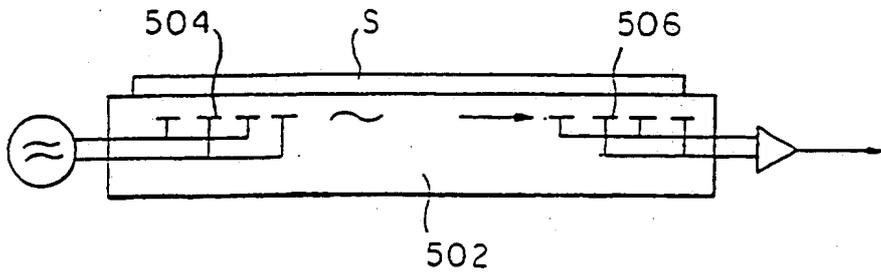


FIG. 20B

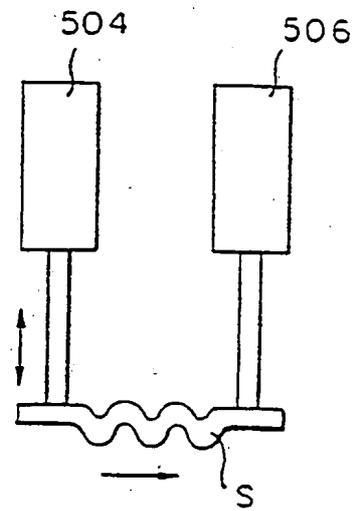


FIG. 20C

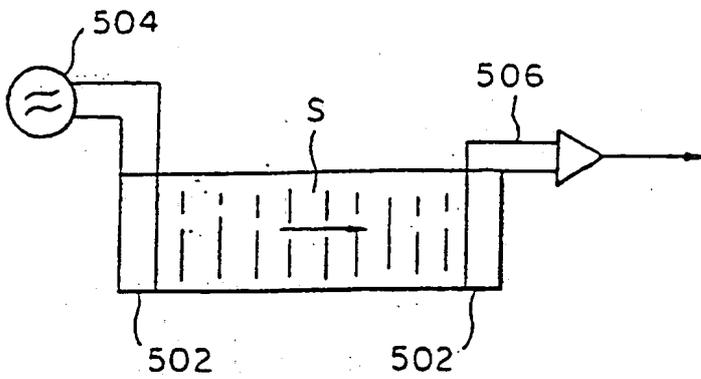


FIG. 20D

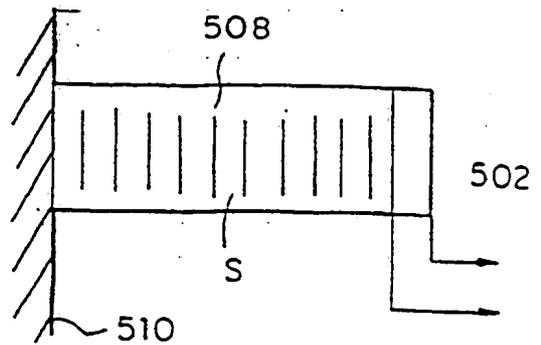
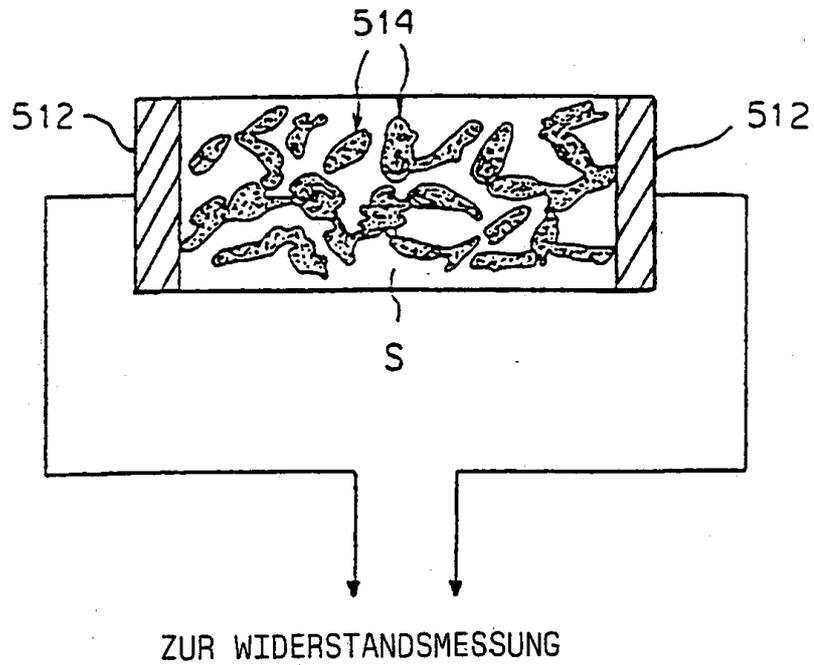


FIG. 21



LIGANDENBINDUNG

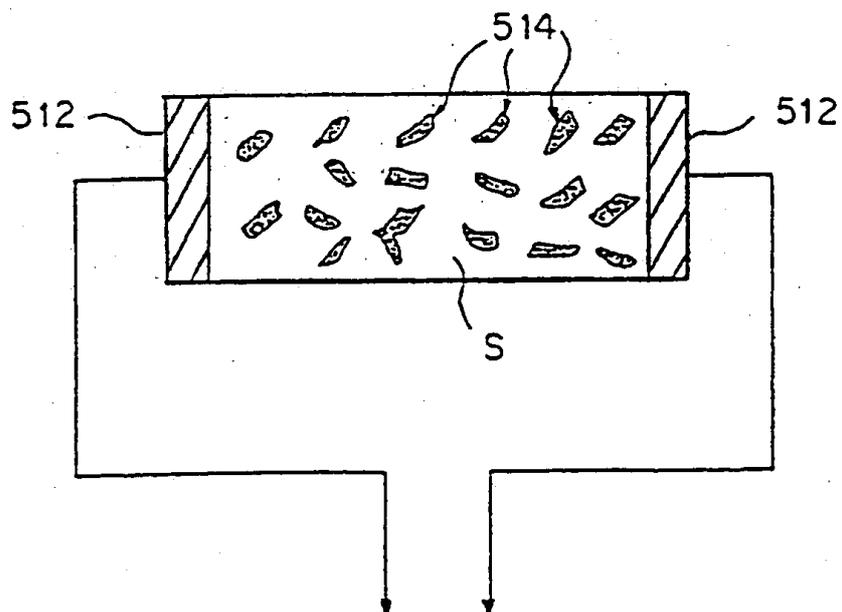


FIG. 22A

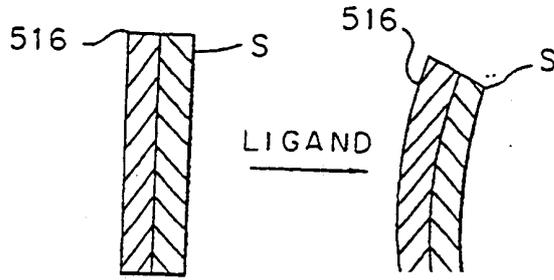


FIG. 22B

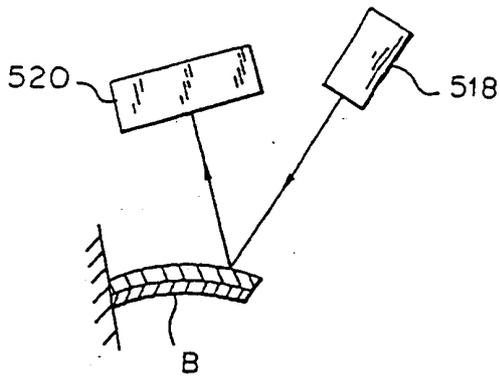


FIG. 22C

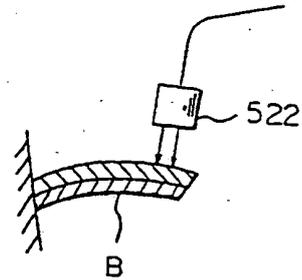


FIG. 23

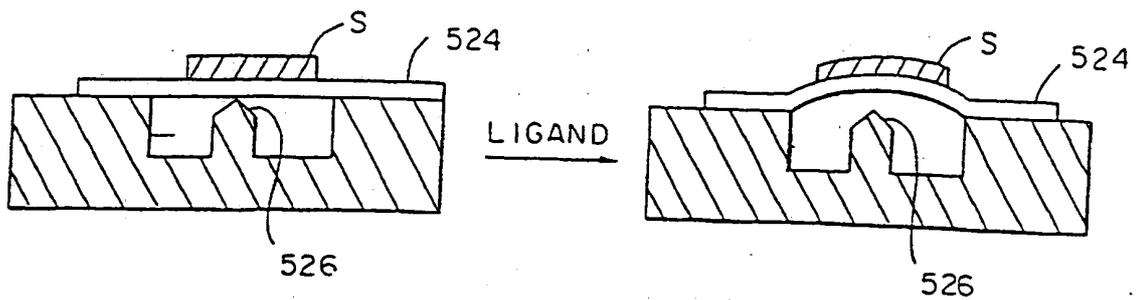


FIG. 24

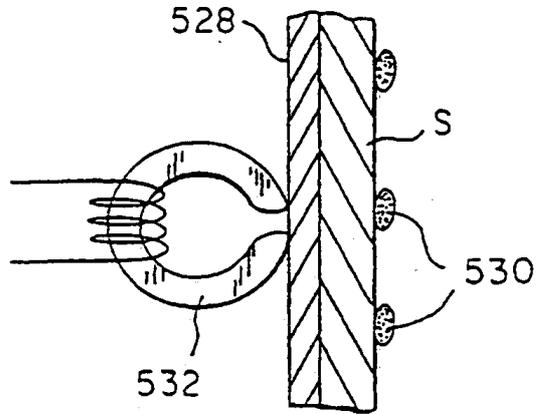


FIG. 25

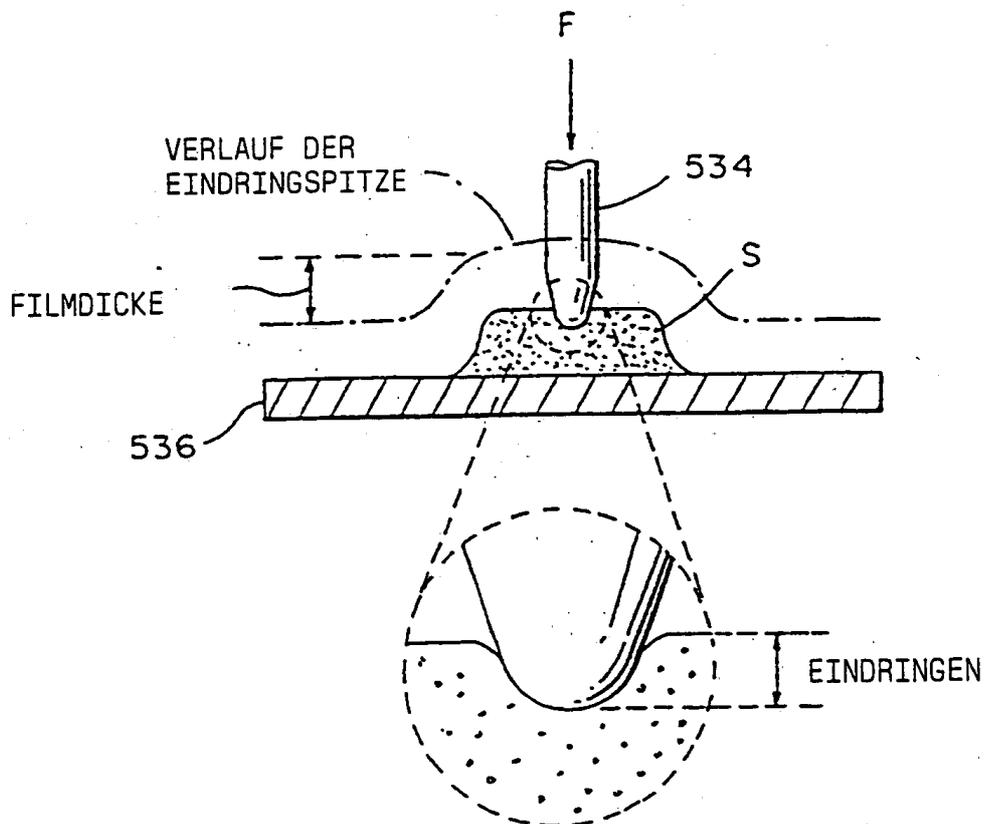
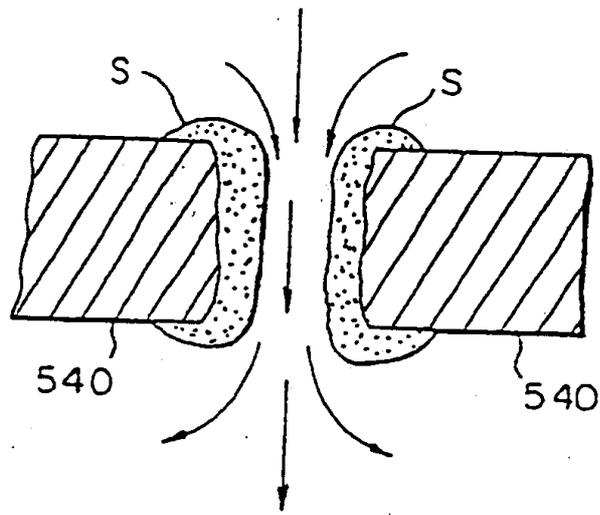


FIG. 26

FLÜSSIGKEITS-(GAS)  
FLUSS



LIGANDENBINDUNG

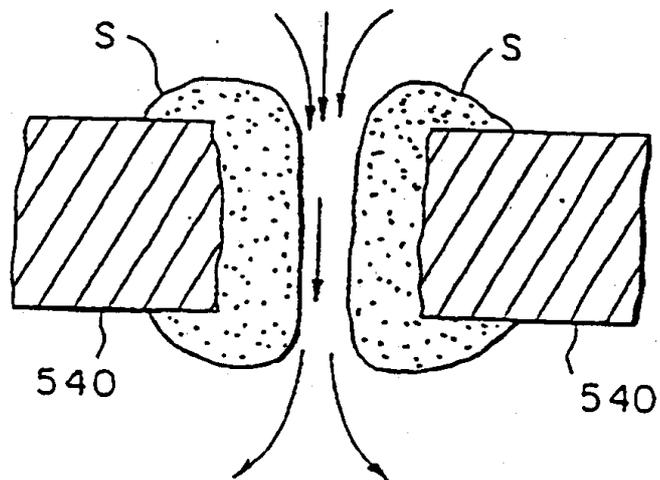


FIG. 27A

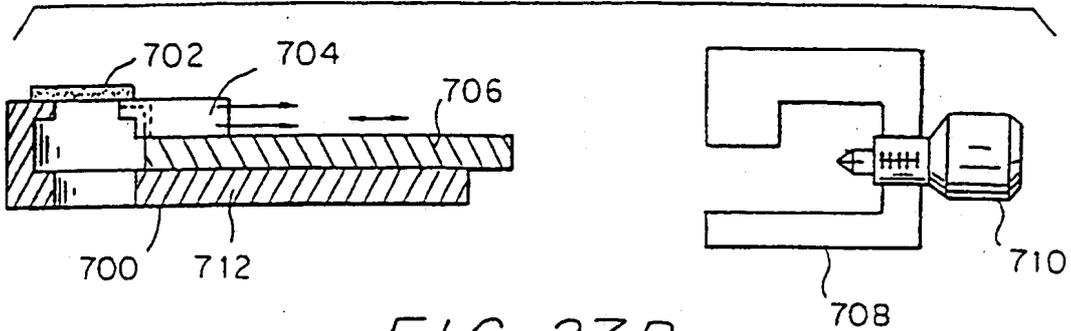


FIG. 27B

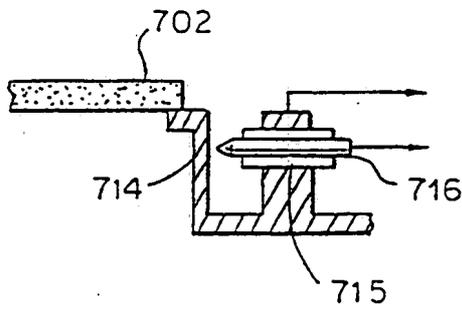


FIG. 27C

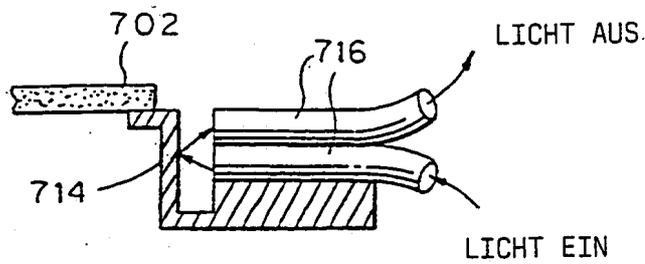


FIG. 27D

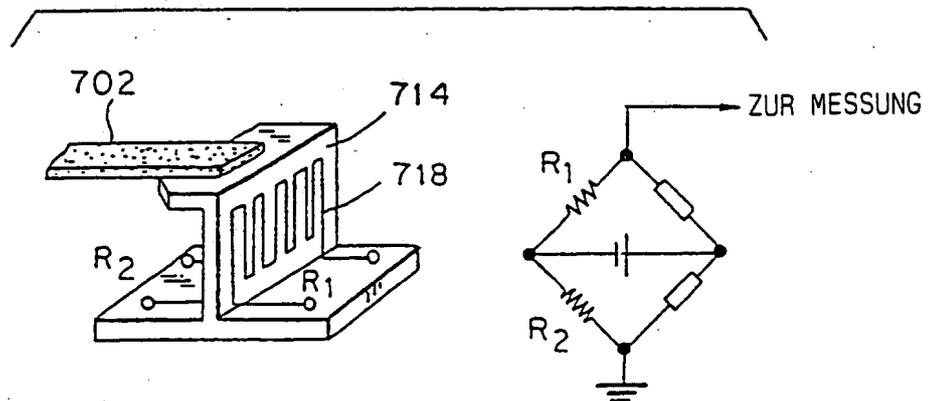


FIG. 28A

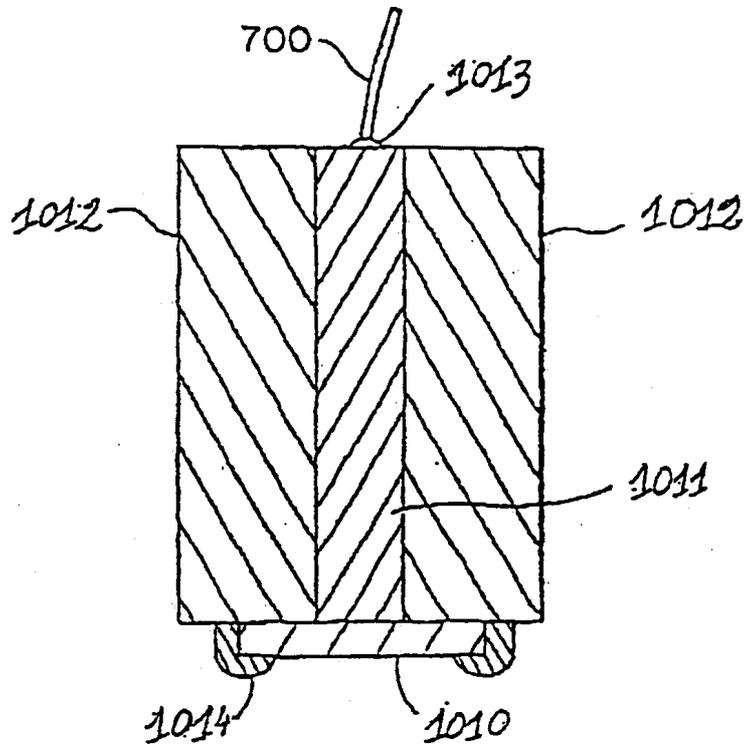


FIG. 28B

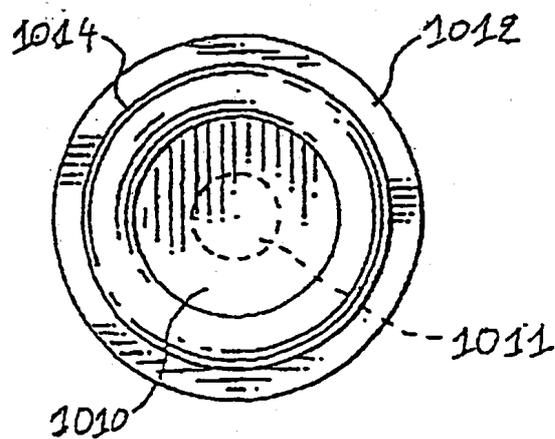


FIG. 29

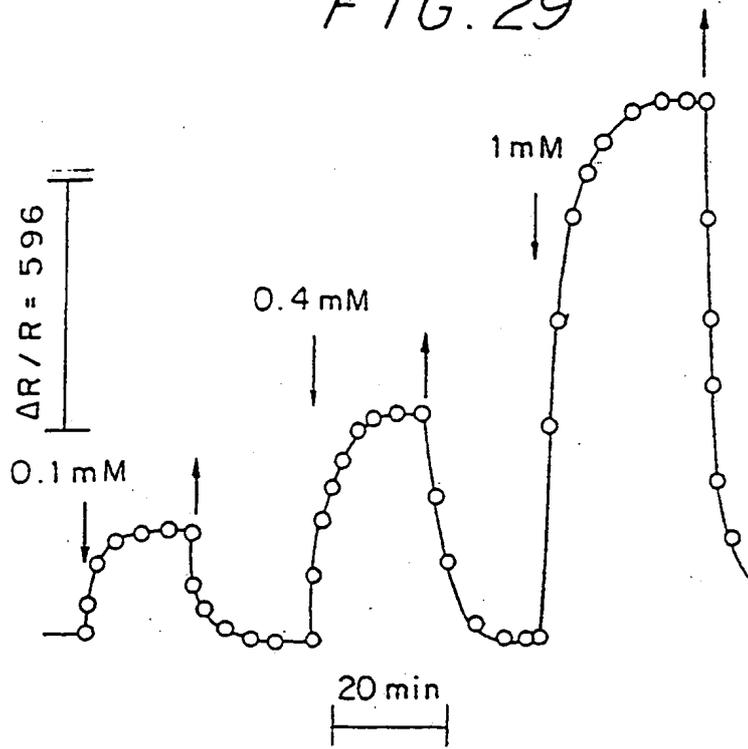


FIG. 30

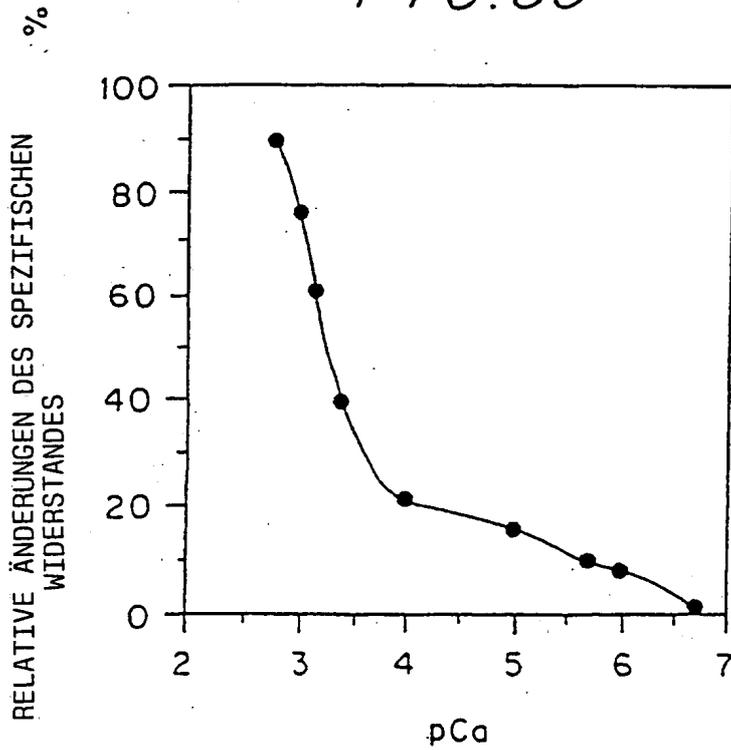


FIG. 31

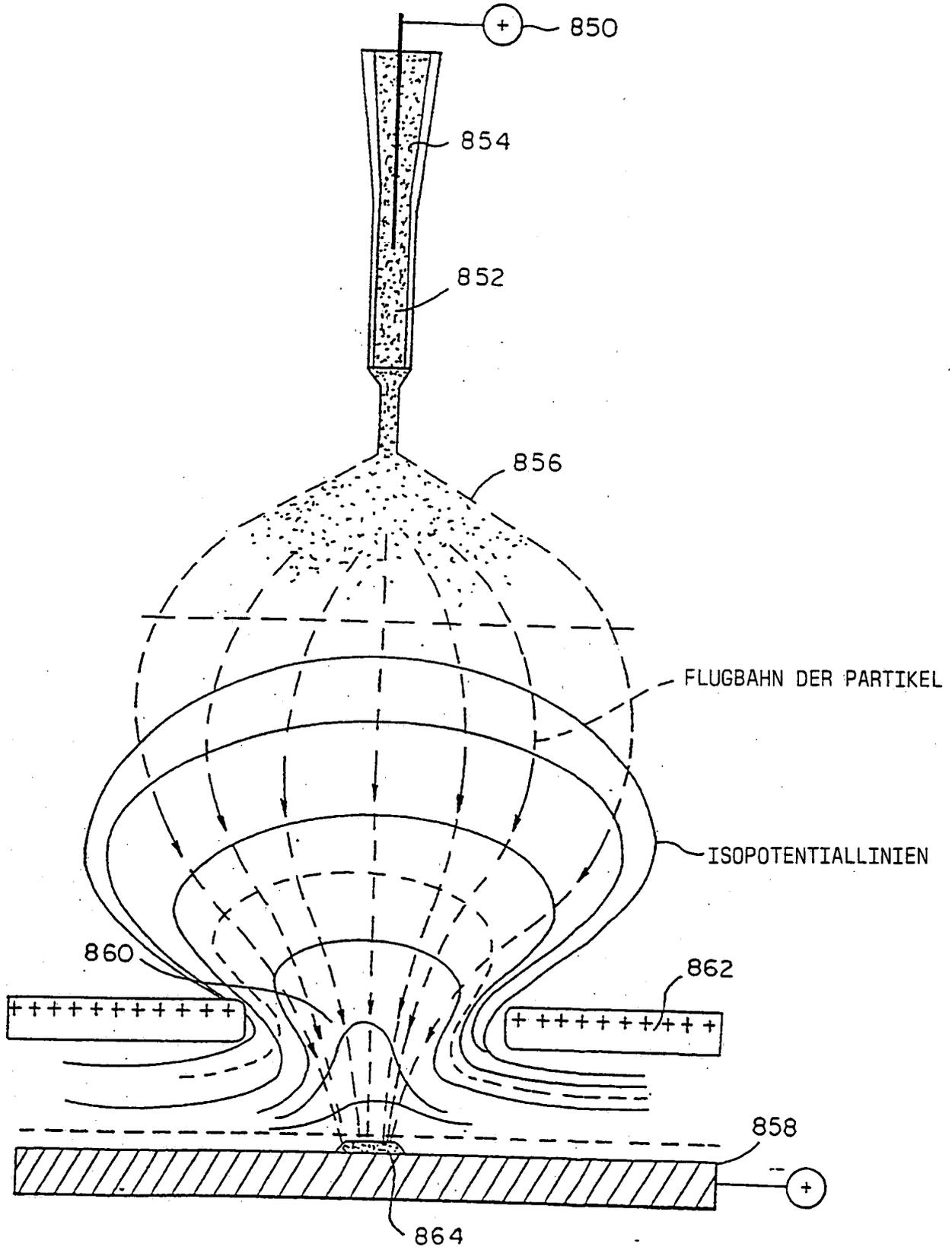
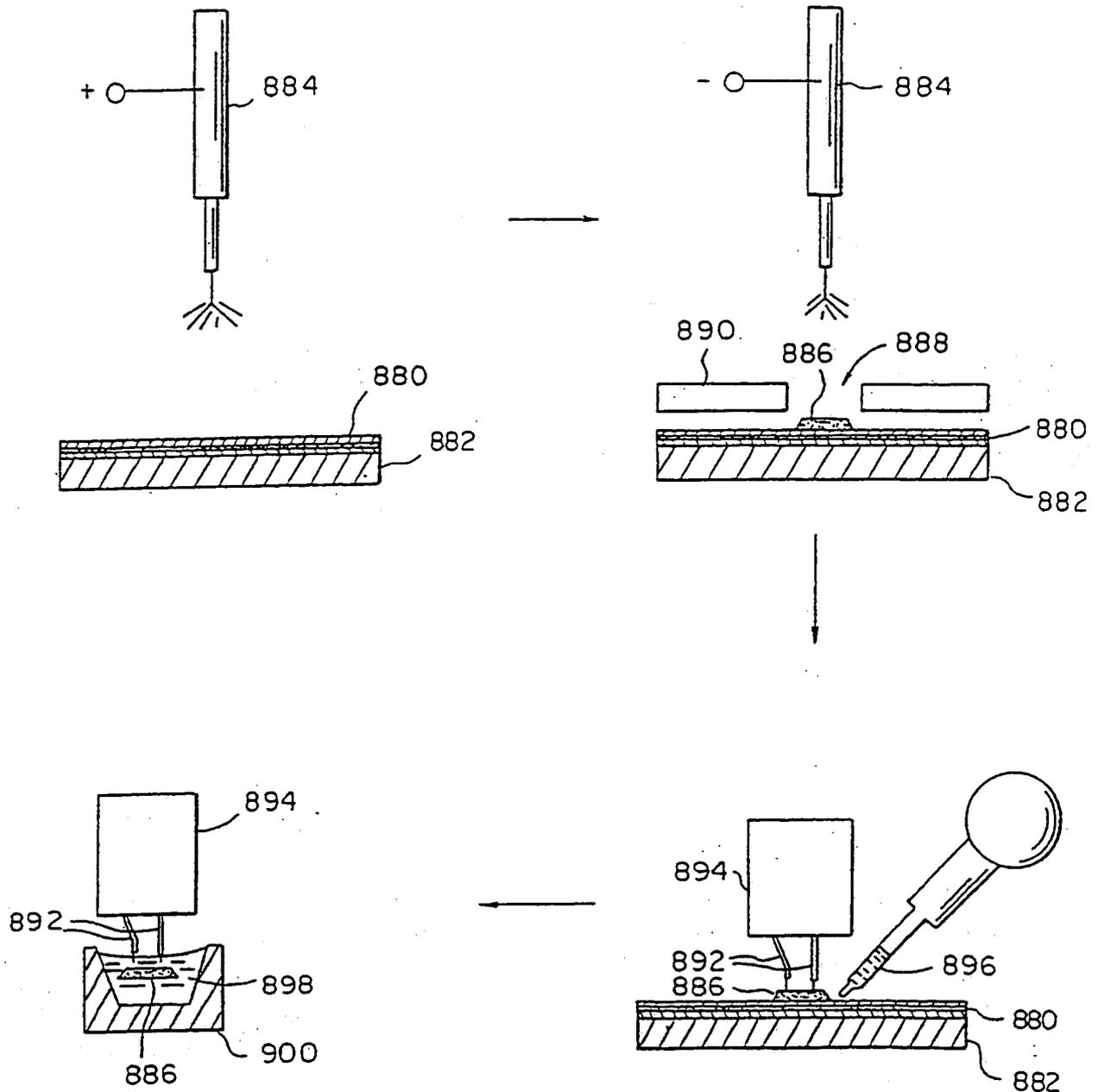
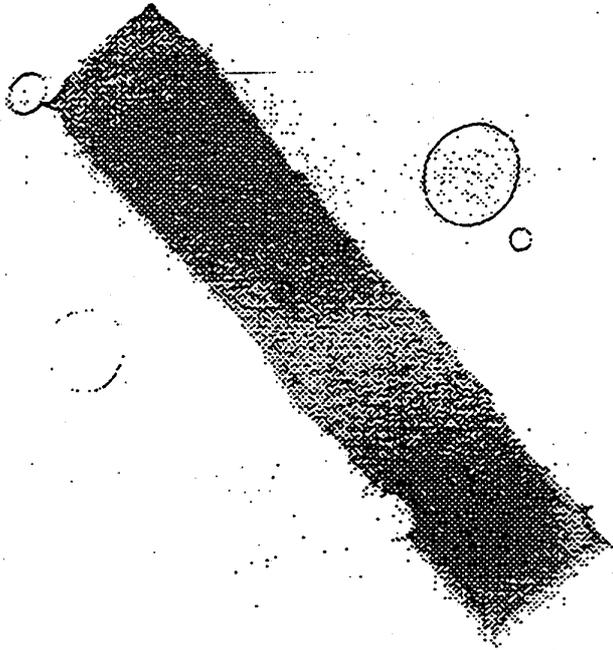


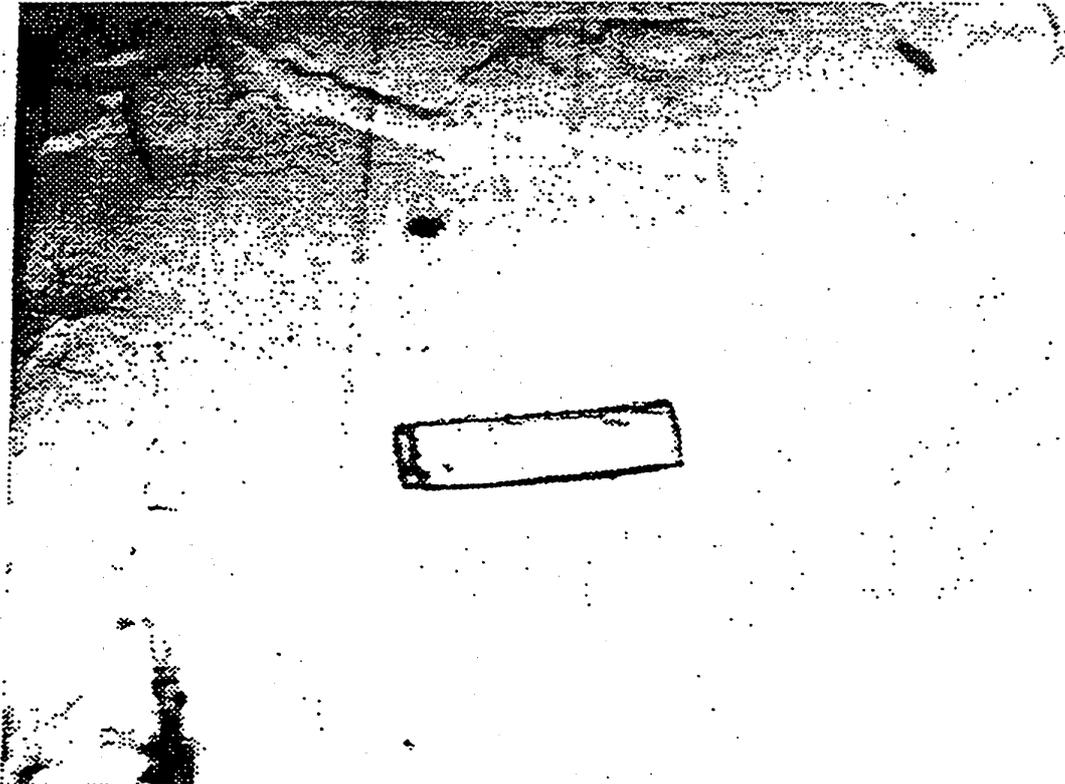
FIG. 32



*FIG. 33A*



*FIG. 33B*



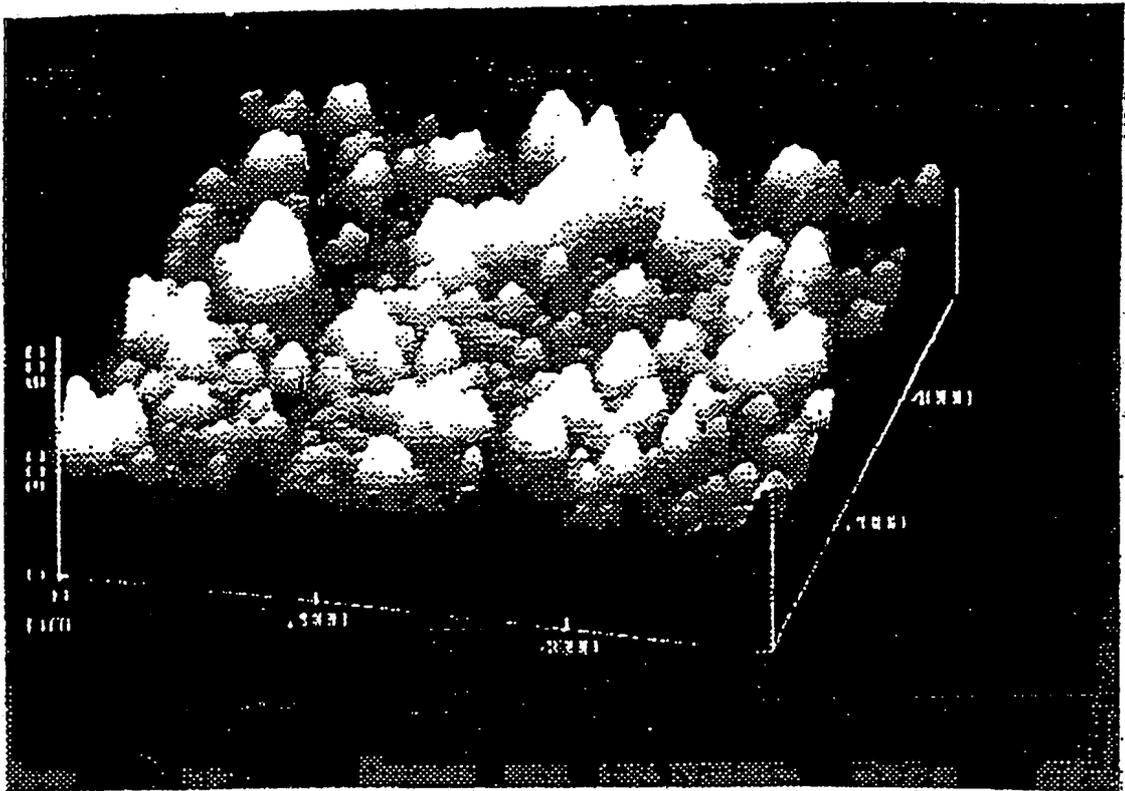


FIG. 34B

