





**Veröffentlicht:**

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

## Beschreibung

Verfahren und Vorrichtung zur Untersuchung von Molekülbindungen

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Untersuchung von Molekülbindungen, bei dem:

- ein Messkopf und ein Adsorptionskörper mit einer Adsorptionsfläche bereitgestellt wird;
- 10 - der Abstand zwischen dem Messkopf, der mit einem Sondenmolekül versehen ist, und dem Adsorptionskörper, an dessen Adsorptionsfläche das Sondenmolekül wenigstens teilweise adsorbiert ist, geändert wird;
- mit Hilfe einer Kraftmessvorrichtung die Kraft gemessen
- 15 wird, die von dem Sondenmolekül zwischen Messkopf und Adsorptionskörper vermittelt wird;
- eine Kraft-Weg-Kurve bestimmt wird, die die Abhängigkeit der gemessenen Kraft von der Änderung des Abstandes zwischen Messkopf und Adsorptionskörper zeigt;
- 20 - durch Auswertung von Kraftplateaus der Kraft-Weg-Kurve eine Desorptionsgröße des Sondenmoleküls an der Adsorptionsfläche im quasistationären Gleichgewicht bestimmt wird.

Die Erfindung betrifft ferner eine Vorrichtung zur Ausführung

25 des Verfahrens.

Ein derartiges Verfahren und eine derartige Vorrichtung sind aus der WO 2008/081044 A1 bekannt. Mit dem bekannten Verfahren wird die Haftung von Einzelmolekülen an einer Substrat-

30 oberfläche untersucht. Zu diesem Zweck werden die Einzelmoleküle an ein Träger-Polymer gebunden. Das auf diese Weise gebildete Sondenmolekül wird an einem Messkopf angebracht, dessen Abstand zur Substratoberfläche variierbar ist. Mithilfe einer Kraftmessvorrichtung wird die Kraft gemessen, die

35 vom Sondenmolekül zwischen Messkopf und Substratoberfläche vermittelt wird. Auf der Grundlage der Messwerte kann eine Kraft-Weg-Kurve bestimmt werden, die die Abhängigkeit der

gemessenen Kraft von der Änderung des Abstandes zwischen Messkopf und Adsorptionskörper zeigt. Die Plateaustufen der Kraftplateaus können mit großer Genauigkeit bestimmt werden. Insofern ist es möglich, die Desorptionskraft des Sondenmoleküls an der Adsorptionsfläche im quasistationären Gleichgewicht zu bestimmen. Da die Desorptionskraft zwischen dem Sondenmolekül und der Substratoberfläche von den Einzelmolekülen vermittelt wird, lässt sich mit dem bekannten Verfahren die Haftung der Einzelmoleküle an der Substratoberfläche untersuchen.

Die Anwesenheit von gelösten im Vergleich zu dem Sondenmolekül kleinen Molekülen wie organischen Verbindungen oder chemischen Prozessrückständen sind oftmals aus gesundheitlichen oder qualitätstechnischen Gründen unerwünscht. Ein Nachweis ist aufgrund der schwachen Reaktivität vieler Substanzen jedoch schwierig. Ferner können Lösemittelzusätze und Kosolute (z.B. Ionen, Liganden, Enzyme, andere kleine Biomoleküle, unter anderem auch kleiner Proteine) die Faltung von Proteinen, die Assemblierung von Polymeren, die Haftung oder das Ablösen eines Makromoleküls von einer Grenzschicht verursachen. Gleichzeitig ist die Wechselwirkung von Kosoluten mit einem Makromolekül beeinflusst von der unmittelbaren Nähe zu einer Grenzfläche. Die Charakterisierung des Bindungsverhaltens kleinerer Moleküle aus Lösung an ein Makromolekül ist aber von großer Bedeutung für viele technische Anwendungen, die in Lösung stattfinden: zum Beispiel die Herstellung molekularer Marker, die medizinische Diagnostik, beispielsweise die Diagnostik von Blutzucker im Falle von Diabetes Mellitus, die Funktionalität von molekularer Sensortechnologien, wie zum Beispiel "Lab on a chip" Anwendungen, und Enzym- oder DNA-basierte Feldeffekttransistoren für die biomedizinische Technik.

Die spezifische Ligandenadsorption an vereinzelten, wohl definierten Bindungsstellen kann durch klassische Methoden wie beispielsweise Fluoreszenz [1, 2] oder radioaktive Mar-

kierung [3] untersucht werden. Dagegen ist für die unspezifische Bindung, wie beispielsweise von Blutzucker, nur eine Methode zur Bestimmung der Anzahl der gebundenen Liganden für ternäre Systeme verfügbar. Derartige ternäre Systeme bestehen aus Makromolekül, Lösemittel und Kosoluten. Eine Strategie zur kompletten Charakterisierung innerhalb des technisch wichtigen Vierkomponentensystems, das zusätzlich noch eine ausgedehnte Oberfläche beinhaltet, existiert bisher noch nicht.

Die Bindungscharakteristik in ternären Systemen kann mittels Kalorimetrie [4], Densiometrie [5] oder Gleichgewichtssedimentation [6] bestimmt werden. Die am häufigsten angewandte Methode ist die Isotherme Titrationskalorimetrie (=ITC).

Diese benötigt jedoch eine gewisse Mindestmenge an Molekülen, um verlässliche Informationen über Änderungen der freien Energie und Bindungskonstanten zu liefern. Dabei steigt die Messgenauigkeit mit der verwendeten Menge an Makromolekülen an. Zusätzlich begrenzen Selbstassemblierung und Aggregation die Anwendbarkeit der ITC auf hydrophile und amphiphile Moleküle [4].

Alternative Messmethoden zur Bestimmung der Molekül-Ligand-Wechselwirkung im thermodynamischen Gleichgewicht in der Nähe einer Oberfläche sind durch ihr räumliches und zeitliches Auflösungsvermögen eingeschränkt. Sehr spezifische Bindungen können, wie bereits erwähnt, durch Fluoreszenz untersucht werden. Dazu ist jedoch eine sehr verdünnte Lösung sowohl von Makromolekülen als auch von Kosoluten notwendig, was häufig eine starke Vereinfachung gegenüber dem technisch relevanten System darstellt. Zusätzlich ist eine chemische Modifikation der Kosolute notwendig. Eine andere gebräuchliche Methode zur Bestimmung von physikalischen Bindungsparametern bedient sich radioaktiver Kontrastmittel. Hier wird die räumliche Auflösung bestimmt durch die Reichweite des Beta-Emitters, die weit oberhalb molekularer Ausdehnungen liegt. Ähnliche Prob-

leme mit dem Auflösungsvermögen sind für die Ellipsometrie, Röntgen- und Neutronenstreuung gegeben,

In ZHANG, H.Y. and MARKO J.F, Maxwell relations for single-  
5 DNA experiments: Monitoring protein binding and double-helix  
torque with force-extension measurements, Physical Review E  
77 (3), 2008 wird die Nutzung von Kraftkurven, die beim  
Überstrecken von doppelsträngiger DNA (= dsDNA) entstehen,  
zur Charakterisierung der Bindung zwischen dsDNA und weiteren  
10 Molekülen theoretisch analysiert. Die gewonnenen Ergebnisse  
setzen die Besonderheiten beim Überstrecken von dsDNAs voraus  
und sind daher für die Untersuchung der Bindung von Einzelmo-  
leküle an beliebige Makromoleküle nicht verwendbar.

15 Ausgehend von diesem Stand der Technik liegt der Erfindung  
daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem  
sich die Bindung von kleinen Einzelmolekülen an beliebige  
Makromoleküle, insbesondere auch einzelsträngigen DNAs,  
untersuchen lässt.

20 Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren und eine Vorrichtung  
mit den Merkmalen der unabhängigen Ansprüche gelöst. In davon  
abhängigen Ansprüchen sind vorteilhafte Ausgestaltungen und  
Weiterbildungen angegeben.

25 Bei dem Verfahren werden Sondenmoleküle wiederholt von der  
Adsorptionsfläche des Adsorptionskörpers abgezogen. Dabei  
wird die Aktivität der Einzelmoleküle in einem an die Adsorp-  
tionsfläche des Adsorptionskörpers angrenzenden Bereich  
30 variiert und eine Desorptionsgröße in Abhängigkeit von der  
Aktivität der Einzelmoleküle bestimmt. Indem ferner ein  
Zusammenhang zwischen Desorptionsgröße und Aktivität ermit-  
telt wird, lassen sich Bindungsparameter bestimmen, die die  
Bindung der Einzelmoleküle an das Sondenmolekül im adsorbier-  
35 ten und desorbierten Zustand des Sondenmoleküls beschreiben.  
Auf diese Weise ist es möglich, das Bindungsverhalten kleiner

Moleküle an Makromolekülen im adsorbierten und desorbierten Zustand zu untersuchen.

Es sei angemerkt dass der Begriff der Aktivität in diesem  
5 Zusammenhang als Verallgemeinerung der Konzentration verstanden werden soll und somit auch Konzentrationen einschließt.

Bei einer besonderen Ausführungsform des Verfahrens wird die Desorptionsgröße an wenigstens einer weiteren Adsorptionsfläche  
10 che von wenigstens einem weiteren Adsorptionskörper in Abhängigkeit von der Aktivität der Einzelmoleküle bestimmt. Die Materialbeschaffenheit der verschiedenen Adsorptionsflächen sollte sich dabei unterscheiden. Anhand der zwischen Desorptionsgröße und Aktivität für die verschiedenen Adsorptionsflächen  
15 ermittelten Zusammenhänge können dann Bindungsparameter bestimmt werden, die die Bindung der Einzelmoleküle an das Sondenmolekül im desorbierten Zustand und in den an die verschiedenen Adsorptionsflächen adsorbierten Zuständen des Sondenmoleküls beschreiben. Mit dieser besonderen Ausführungsform  
20 des Verfahrens kann die Genauigkeit, mit der sich die Bindungsparameter bestimmen lassen, erheblich gesteigert werden.

Bei einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens wird die Desorptionsgröße bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit  
25 von der Aktivität der Einzelmoleküle bestimmt. Anhand von zwischen Desorptionsgröße und Aktivität ermittelten Zusammenhängen können dann die Bindungsparameter bestimmt werden, die die Bindung der Einzelmoleküle an das Sondenmolekül  
30 kü in den desorbierten und adsorbierten Zuständen des Sondenmoleküls bei den verschiedenen Temperaturen beschreiben. Durch die zusätzlichen Daten kann die Genauigkeit bei der Bestimmung der Bindungsparameter ebenfalls erhöht werden.

35 Bei einer weiteren Ausführungsform wird bei der Auswertung der Kraftplateaus die Desorptionskraft bestimmt. Indem der Zusammenhang zwischen Desorptionskraft und Aktivität ermit-

telt wird, lassen sich Bindungsparameter bestimmen, die die Bindung der Einzelmoleküle an das Sondenmolekül im adsorbierten und desorbierten Zustand des Sondenmoleküls beschreiben. Auf diese Weise ist es möglich, das Bindungsverhalten kleiner  
5 Moleküle an Polymere im adsorbierten und desorbierten Zustand zu untersuchen.

Die mit dem Verfahren ermittelbaren Bindungsparameter sind insbesondere die Bindungskonstanten für die Bindung der  
10 Einzelmoleküle an das Sondenmolekül im Gleichgewichtszustand und die mittlere Bindungsstellenlänge, die gleich der Länge des Sondenmoleküls geteilt durch die Anzahl der Bindungsstellen ist. Die Bindungskonstanten und die Bindungsstellenlängen können jeweils für den adsorbierten Zustand des Sondenmole-  
15 küls und für den desorbierten Zustand des Sondenmoleküls bestimmt werden.

Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungskonstante und die mittlere Bindungsstellenlänge im desorbierten  
20 Zustand unabhängig von der Beschaffenheit der Adsorptionsfläche ist. Für die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Desorptionskraft und Aktivität können die den desorbierten Zustand des Sondenmoleküls betreffenden Bindungsparameter daher jeweils gleichgesetzt werden.

25 Der Zusammenhang zwischen Desorptionskraft und Aktivität kann durch Anpassen einer Ausgleichsfunktion an Messwerte der Desorptionskraft bestimmt werden, wobei die Messwerte gegen die Änderung der Aktivität aufgetragen sind und die Parameter  
30 der Ausgleichsfunktion die Bindungskonstanten und die mittlere Bindungsstellenlänge für den adsorbierten und desorbierten Zustand des Sondenmoleküls sind. Insbesondere bei Anpassen verschiedener Ausgleichsfunktionen an Messwerte der Desorptionskraft, die bei der Untersuchung von unterschiedlichen  
35 Adsorptionsflächen verwendet worden sind, kann die Genauigkeit bei der Bestimmung der Bindungsparameter wesentlich gesteigert werden.

Bei einer weiteren Ausführungsform wird bei der Auswertung der Kraftplateaus die Desorptionslänge bestimmt. Aus der Abhängigkeit der Desorptionslänge von der Aktivität der  
5 Einzelmoleküle kann dann eine Anzahl der an das Sondenmolekül gebundenen Einzelmoleküle bestimmt werden.

Um die Aktivität der Einzelmoleküle in dem an die Adsorptionsfläche des Adsorptionskörpers angrenzenden Bereich variieren zu können, sind die Einzelmoleküle in einem Lösungsmittel  
10 gelöst. Dabei kann ein gasförmiges oder flüssiges Lösungsmittel verwendet werden.

Weitere Vorteile und Eigenschaften der Erfindung gehen aus der nachfolgenden Beschreibung hervor, in der Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung im Einzelnen erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1 ein Rasterkraftmikroskop oder kurz Kraftmikroskop(= Atomic Force Microscope = AFM);  
20

Figur 2 eine Darstellung des Messkopfs des Kraftmikroskops aus Figur 1 im adsorbierten (A) und desorbierten (B) Zustand eines an den Messkopf angebrachten Sondenmoleküls;  
25

Figur 3 ein Diagramm mit Kraft-Weg-Kurven, die ein Kraftplateau aufweisen;

30 Figur 4 ein Diagramm mit gemessenen Ablöselängen;

Figur 5 ein Diagramm mit gemessenen Haftkräften;

Figur 6 eine Darstellung, die die Wechselwirkung zwischen Sondenmolekül, Einzelmolekülen und Adsorptionsfläche im adsorbierten Zustand veranschaulicht;  
35

Figur 7 eine Darstellung, die die Wechselwirkung zwischen Sondenmolekül und Einzelmolekülen im desorbierten Zustand veranschaulicht;

5 Figur 8 ein Diagramm, das den Zusammenhang zwischen Aktivität und Konzentration für eine Glukoselösung zeigt;

10 Figur 9 ein Diagramm mit gemessenen Haftkräften bei verschiedenen Adsorptionsoberflächen einschließlich der ermittelten Kraftkurven;

15 Figur 10 ein Diagramm mit der Anzahl gebundener Einzelmoleküle pro Sondenmoleküllänge im desorbierten und adsorbierten Zustand für verschiedene Adsorptionsflächen;

20 Figur 11 ein Diagramm, in dem die Desorptionskraft in Abhängigkeit von der Aktivität bei verschiedenen Temperaturen dargestellt ist; und

25 Figur 12 ein Diagramm mit der Anzahl gebundener Einzelmoleküle pro Sondenmoleküllänge im adsorbierten und desorbierten Zustand bei verschiedenen Temperaturen.

30 Figur 1 zeigt ein Rasterkraftmikroskop oder kurz Kraftmikroskop (= Atomic Force Microscope = AFM), das über einen Messkopf 2 verfügt, der an einer Blattfeder 3 angebracht ist. Die Blattfeder 3 ist an einem dem Messkopf 2 gegenüberliegenden Ende fest mit einer Halterung 4 verbunden. Der Messkopf 2 kann mit einem Sondenmolekül 5 versehen sein, bei dem es sich typischerweise um ein Makromolekül, insbesondere um ein Polymer handelt.

35

Das Kraftmikroskop 1 verfügt ferner über einen Adsorptionskörper 6, der eine dem Messkopf 2 und dem Sondenmolekül 5

zugewandte Adsorptionsfläche 7 aufweist. Der Adsorptionskörper 6 befindet sich in einem Behälter 8, der mit einem Lösungsmittel 9 gefüllt ist. Der Behälter 8 ist auf einem Probenhalter 10 angeordnet, der so verfahren werden kann,  
5 dass der Abstand zwischen dem Messkopf 2 und der Adsorptionsfläche 7 variiert wird.

Es sei angemerkt, dass das Lösungsmittel grundsätzlich sowohl gasförmig als auch flüssig sein kann.

10 Das Kraftmikroskop 1 ist ferner mit einem Laser 11 ausgestattet, der einen Lichtstrahl 12 auf eine vom Adsorptionskörper 6 abgewandten Rückseite 13 der Blattfeder 3 sendet. Der Lichtstrahl 12 wird von dort zu einem Photodetektor 14 mit  
15 einer sektorierten Photodiode gelenkt. Das vom Photodetektor 14 gelieferte Messsignal wird mithilfe einer Auswerteeinheit 15 ausgewertet, bei der es sich beispielsweise um einen handelsüblichen Rechner handeln kann. Die Auswerteeinheit 15 wird auch dazu verwendet, den Probenhalter 10 zu steuern.

20 Mit dem Kraftmikroskop 1 lässt sich die Desorptionskraft messen, mit der das Sondenmolekül 5 an der Adsorptionsfläche 7 gehalten wird. Zu diesem Zweck wird der Probenhalter 8 derart betätigt, dass sich der Abstand zwischen dem Messkopf  
25 2 und der Adsorptionsfläche 7 vergrößert. Da das Sondenmolekül 5 an der Adsorptionsfläche 7 haftet, wird der Messkopf 2 etwas in Richtung auf die Adsorptionsfläche 7 hin bewegt, was zu einer Auslenkung des Lichtstrahls 12 führt. Diese Auslenkung kann mithilfe des Detektors 14 erfasst werden. Da die  
30 Federkonstante der Blattfeder 3 bekannt ist, kann auf die Desorptionskraft geschlossen werden.

In Figur 2 ist die Blattfeder 3 des Kraftmikroskops 1 über der Adsorptionsfläche 7 dargestellt. Der Messkopf 2 ist  
35 jeweils mit dem Sondenmolekül 5 versehen, das im adsorbierten Zustand (A) und im desorbierten Zustand (B) gezeigt ist.

Figur 3 zeigt ein Diagramm mit einer Überlagerung von Kraft-Weg-Kurven 16, die Kraftplateaus 17 und eine Plateaustufe 18 aufweist. Die Kraft-Weg-Kurven wurden bei einem nachfolgend noch im Einzelnen beschriebenen Experiment aufgenommen, bei dem ein Poly(allylamin)-Molekül (PAAm) als Sondenmolekül 5 und eine oxidierte Diamantoberfläche als Adsorptionsoberfläche 7 verwendet wurde. Figur 3 zeigt die Überlagerung von 20 typischen Kraft-Weg-Kurven 16, die mit ein und demselben PAAm-Molekül unter Gleichgewichtsbedingungen aufgenommen wurden, wie die geschwindigkeitsunabhängigen Kraftplateaus 17 belegen.

Durch Anpassen von Ausgleichsgeraden 19 an die Kraftplateaus 17 kann eine Desorptionskraft  $F_{des}$  bestimmt werden, die gleich der Kraft ist, die benötigt wird, um das Sondenmolekül 5 unter Einhaltung eines quasistationären Gleichgewichtszustand von der Adsorptionsfläche 7 abzuziehen. Von Interesse ist ferner auch eine Desorptionslänge  $L$ , die gleich der Länge des an der Adsorptionsfläche 7 adsorbierten Abschnitts des Sondenmoleküls 5 ist. Das Produkt von Desorptionslänge  $L$  und Desorptionskraft  $F_{des}$ , das einer Fläche 20 entspricht, ist gleich der freien Desorptionsenergie.

In Figur 4 und 5 sind typische Messwertverteilungen für die Desorptionslänge  $L$  und die Desorptionskraft  $F_{des}$  dargestellt. Die Messwertverteilungen der Desorptionslänge  $L$  und Desorptionskraft  $F_{des}$  umfassen die Ergebnisse von 100 Annäherungs- und Separationszyklen der Blattfeder 3 bei der Untersuchung des Adsorptionsverhalten eines PAAm-Moleküls in Glukoselösung auf einer oxidierten Diamantoberfläche .

Im Folgenden werden einige thermodynamischen Relationen abgeleitet, mit deren Hilfe sich aus den in den Figuren 3 bis 5 gezeigten Messergebnissen diverse Bindungsparameter bestimmen lassen.

In Figur 6 ist das vollständig an die Adsorptionsfläche 7 adsorbierte Sondenmolekül 5 in der Anwesenheit von Einzelmolekülen 21 dargestellt, die in dem Lösungsmittel 9 gelöst sind. Die Einzelmoleküle 21 lagern sich an Bindungsstellen 22 des adsorbierten Sondenmoleküls 5 an und lösen sich wieder von den Bindungsstellen 22. Der Anlagerungsvorgang wird durch die Geschwindigkeitskonstante  $K_a^{\text{on}}$  und der Ablösevorgang durch die Geschwindigkeitskonstante  $K_a^{\text{off}}$  beschrieben.

Figur 7 zeigt das Sondenmolekül 5 in einem weiteren Zustand, in dem das Sondenmolekül 5 von der Adsorptionsfläche 7 desorbiert ist. Die Einzelmoleküle 21 lagern sich an den Bindungsstellen 22 des desorbierten Sondenmoleküls 5 an und lösen sich wieder von den Bindungsstellen 22. Der Anlagerungsvorgang wird durch die Geschwindigkeitskonstante  $K_d^{\text{on}}$  und der Ablösevorgang durch die Geschwindigkeitskonstante  $K_d^{\text{off}}$  beschrieben.

Die Anlagerungsgeschwindigkeit  $d\theta_{a/d}/dt$  im adsorbierten und desorbierten Zustand des Sondenmoleküls ist proportional zur Konzentration  $c$  der Einzelmoleküle 21 und der Anzahl der freien Bindungsstellen 22 ( $N = N_{\text{ges}} \times [1 - \theta]$ ) entlang dem Sondenmolekül 5.

$$\frac{d\theta_{a/d}}{dt} = K_{a/d}^{\text{on}} \cdot c \cdot N_{\text{ges}} \cdot (1 - \theta_{a/d}) \quad (1)$$

Die Ablösegeschwindigkeit  $d\theta_{a/d}/dt$  ist proportional zum Anteil der besetzten Bindungsstellen ( $N_{\text{ges}} \times \theta_{a/d}$ ):

$$\frac{d\theta_{a/d}}{dt} = -K_{a/d}^{\text{off}} \cdot N_{\text{ges}} \cdot \theta_{a/d} \quad (2)$$

Das dynamische Gleichgewicht ist dann erreicht, wenn die Geschwindigkeit der Anlagerung neuer Einzelmoleküle 21 gleich der Geschwindigkeit der Ablösung bereits angelagerter Einzelmoleküle 21 ist. Durch Gleichsetzen der Anlagerungs- und Ablösegeschwindigkeiten und Auflösen nach  $\theta$  erhält man mit

der Geschwindigkeitskonstante ( $K_{a/d} = K_{a/d}^{\text{on}}/K_{a/d}^{\text{off}}$ ) jeweils die Langmuirsche Isotherme:

$$\theta_{a/d} = \left( \frac{K_{a/d} \cdot c}{1 + K_{a/d} \cdot c} \right) \quad (3)$$

5

Der Belegungsgrad  $\theta$  nimmt somit mit steigender Konzentration  $c$  der Einzelmoleküle 21 zu. Diese Relation gilt nur für ideale Mischungen. Bei nicht-idealen Mischungen ist die Konzentration  $c$  durch die Aktivität  $a$  der Einzelmoleküle 21 zu ersetzen. Für die Aktivität  $a$  und die Konzentration  $c$  gilt der Zusammenhang:

10

$$a = \gamma \cdot c \quad (4)$$

15 wobei  $\gamma$  der Aktivitätskoeffizient ist. Es gilt:

$$a = \exp(\mu / kT) \quad (5)$$

dabei ist  $k$  die Boltzmannkonstante und  $T$  die Temperatur. Der Effekt der auf das Sondenmolekül wirkenden Desorptionskraft ist bislang noch nicht berücksichtigt worden. Das Verhalten des von Sondenmolekül 5 und angelagerten Einzelmolekülen 21 gebildeten Systems kann nun mithilfe eines thermodynamischen Potentials ähnlich dem großkanonischen Potential für offene Systeme beschrieben werden. Dieses Potential ergibt sich aus der Zustandsumme  $Z$  des Systems. Für das Differential dieses Potentials gilt:

20

25

$$d(kT \ln Z)_{a/d} = L dF_{\text{des}} + N_{a/d} d\mu + \tau_{a/d} dL \quad (6)$$

30

wobei  $L$  die Desorptionslänge des Sondenmoleküls 5,  $F_{\text{des}}$  die auf das Sondenmolekül 5 einwirkende Desorptionskraft,  $N$  die Zahl der besetzten Bindungsstellen 22 entlang dem Sondenmolekül 5,  $\mu$  das chemische Potential der Einzelmoleküle 21 und  $\tau$  eine Linien-  
35 eine Linien-  
spannung der Einzelmoleküle 21 entlang dem Sonden-

molekül 5 ist, die gleich der freien Energie pro Längeneinheit ist. Im Gleichgewichtszustand folgt aus Gleichung (6):

$$-\left. \frac{\partial \tau_{a/d}}{\partial \mu} \right|_{P_{des}} = \frac{N_{a/d}}{L} = \frac{\theta_{a/d}}{d_{a/d}} \quad (7)$$

5

wobei d der Abstand zwischen den insgesamt vorhandenen Bindungsstellen entlang dem Sondenmolekül 5 ist. Der Abstand d wird nachfolgend auch als Bindungsstellenlänge d bezeichnet.

10 Durch Kombination der Gleichung (7) mit Gleichung (3) erhält man für die Änderung der Linienspannung  $\tau$  bei Änderung der Aktivität der Einzelmoleküle 21 den Zusammenhang:

$$\tau_{a/d} = -\frac{kT}{d_{a/d}} \ln(1 + aK_{a/d}) \quad (8)$$

15

Bei der Desorption des Sondenmoleküls 5 von der Adsorptionsfläche 7 sind die an der Adsorptionsfläche 7 adsorbierten Abschnitte des Sondenmoleküls 5 und die desorbierten Abschnitte jeweils im thermischen Gleichgewicht. Das Gleichgewicht an dem Abschnitt des Sondenmoleküls 5, der an der Adsorptionsfläche 7 adsorbiert ist, ist durch die Bindungskonstante  $K_a$  und die Bindungsstellenlänge  $d_a$  beschrieben. Der Zustand des Abschnitts des Sondenmoleküls 5, der von der Adsorptionsfläche 7 desorbiert ist, ist dagegen durch eine Bindungskonstante  $K_d$  und eine Bindungsstellenlänge  $d_d$  bestimmt. Die Änderung der Linienspannung  $\Delta\tau$  zwischen adsorbiertem und desorbiertem Zustand des Sondenmoleküls 5 ist daher gleich:

30

$$\Delta\tau = \frac{kT}{d_a} \ln(1 + aK_a) - \frac{kT}{d_d} \ln(1 + aK_d) \quad (9)$$

Dieser Unterschied der Linienspannung  $\tau$  trägt hauptsächlich dazu bei, dass die Desorptionskraft von der Aktivität der Einzelmoleküle 21 abhängt:

$$F(a) = F(a = 0) + \Delta\tau \quad (10)$$

Es sei angemerkt, dass anhand der errechneten Bindungskonstanten K auch die Bindungsenergie einer einzelnen Bindungsstelle berechnet werden kann:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (11)$$

Das im Folgenden anhand eines konkreten Experiments näher beschriebene Verfahren ermöglicht den Nachweis von kleinen, in Lösung befindlichen Einzelmolekülen 21 und die Charakterisierung deren Bindung an das als Sondenmolekül 5 verwendete Makromolekül oder Polymer sowohl im gelösten als auch im oberflächenadsorbierten Zustand. Der Einfluss der gelösten Einzelmoleküle 21 auf die Wechselwirkung zwischen Sondenmolekül 5 und Adsorptionsfläche 7 aufgrund des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der Einzelmoleküle 21 an das Sondenmolekül 5 kann dazu verwendet werden, die Anwesenheit der Einzelmoleküle 21 in dem Lösungsmittel 23 nachzuweisen.

Durch die Übersetzung von Bindungsgleichgewichten in messbare Desorptionskräfte lassen sich ferner Bindungsparameter wie die Bindungskonstanten K, Bindungsstellenlängen d, Bindungsenergien sowie die Anzahl der gebundenen Einzelmoleküle 21 pro Länge ermitteln. Diese Bindungsparameter werden dabei nicht nur für den in Lösung befindlichen Zustand des Sondenmoleküls 5 bestimmt, sondern auch für den Fall, dass das Sondenmolekül 5 an der Adsorptionsfläche 7 anhaftet.

Das Verfahren wurde am Beispiel von Poly(allylamin) getestet, das sich in Kontakt mit chirurgischen Edelstahl 316L oder mit oxidiertem Diamant befindet. Durch Auswertung der erhaltenen Kraft-Weg-Kurven 16 und der Anwendung der in den Gleichungen (1) bis (9) enthaltenen grundlegenden thermodynamischen Relationen kann dabei auf die oben genannten Bindungsparameter geschlossen werden.

Als Sondenmolekül 5 wird ein einzelnes Poly(allylamin)-Molekül (PAAm) verwendet, das an die Spitze des Messkopfs 2 der Blattfeder 3 (AFM Cantilever) kovalent angebunden ist.

5 Die kovalente Anbindung gewährleistet die notwendige Langzeitstabilität [7] um mit ein und demselben Sondenmolekül 5 für den Zeitraum von mehreren Stunden auf unterschiedlichen Adsorptionsflächen 7 in Zuckerlösungen unterschiedlicher Konzentration die Desorptionskräfte zu messen. Bei den Einzel-

10 zelmolekülen 21 handelt es sich insbesondere um Glukosemoleküle. Die Konzentration wurde in diesem Fall zwischen 0 und 1 M variiert. Die Spitze mit dem Sondenmolekül 5 wurde für eine Sekunde in Kontakt mit der Adsorptionsfläche 7 gebracht, um darauf zu adsorbieren. Die darauffolgende Desorption des

15 Sondenmoleküls 5 mit einer Geschwindigkeit von 1  $\mu\text{m/s}$  wurde unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt, wie aus den Kraftplateaus 17 ersichtlich war [8].

Das Sondenmolekül 5 aus Figur 6 und 7 ist somit ein PAAm-

20 Molekül, das in Figur 6 adsorbiert auf der Adsorptionsfläche 7 und in Figur 7 gestreckt in Lösung dargestellt ist. Die Einzel-moleküle 21 werden ferner von D-Glukosemolekülen gebildet. Die Bindungskonstanten  $K_a = K_a^{\text{on}}/K_a^{\text{off}}$  für die Anlagerung der Glukosemoleküle an das PAAm-Molekül 5 im adsorbierten

25 Zustand auf der Adsorptionsfläche 7 und die Bindungskonstanten  $K_d = K_d^{\text{on}}/K_d^{\text{off}}$  für das PAAm-Molekül in Lösung sowie die Anzahl der im jeweiligen Zustand gebundenen Glukosemoleküle können nun anhand der Desorptionskraft als Funktion der Glukoseaktivität bestimmt werden.

30 Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass eine präzise Bestimmung der Bindungsparameter durch die Gibbs Adsorptionsisotherme in nicht-idealen Lösungen die Messung der Kraft als Funktion der Glukoseaktivität anstelle der Glukosekonzentration voraussetzt. In den hier beschriebenen Experimenten

35 wurden deshalb die Werte für den Stoffmengenanteil  $x$  für

Glukose in Aktivitäten  $a$  gemäß  $a = \gamma x$  umgerechnet und dabei der Aktivitätskoeffizient aus [9] und [10] benutzt.

In Figur 8 ist der Zusammenhang zwischen Glukosekonzentration und Glukoseaktivität aufgetragen. Aus Figur 8 ist ersichtlich, dass für durchschnittliche Konzentrationen schwach miteinander wechselwirkender Glukosemoleküle die Eigenschaften der Lösung denen einer idealen Lösung ähnlich sind. Insbesondere bei einer Konzentration mit einem Mol-Anteil unterhalb von 0,05 kann der Zusammenhang zwischen Konzentration und Aktivität durch eine linear ansteigende Kurve angenähert werden. In diesem Bereich ist der Aktivitätskoeffizient konstant und nahe 1. Deshalb ergibt sich nur ein kleiner Fehler, wenn man Konzentrationen statt Aktivitäten verwendet. Allerdings kann es Systeme geben, die die Benutzung von Aktivitäten für eine genaue Bestimmung der Bindungsparameter unumgänglich machen.

In Figur 9 sind die Messwerte für die Desorptionskraft von PAAm bei verschiedenen Glukosekonzentrationen auf Edelstahl (offene Dreiecke) und auf oxidiertem Diamant (gefüllte Dreiecke) bei 31 °C aufgetragen. Die Desorptionskraft auf oxidiertem Diamant steigt mit der Glukosekonzentration an, während die Werte auf Edelstahl einen nicht-monotonen Verlauf zeigen. Die mit durchgezogenen Linien dargestellten Kraftkurven 24 und 25 stellen das Ergebnis einer gemeinsamen Ausgleichsrechnung dar. Die Kraftkurven 24 und 25 sind die graphische Darstellung der in Gleichung (9) wiedergegebenen Funktion  $\Delta\tau$  mit den für die jeweilige Adsorptionsfläche  $A$  bestimmten Bindungsparameter  $K_{a/d}$  und  $d_{a/d}$ , die unter der Annahme ermittelt wurden, dass die Werte  $K_d$  und  $d_d$  für den desorbierten Zustand jeweils gleich sind.

Von Bedeutung ist, dass die Ausgleichsrechnung an beiden Datensätze, die mit unterschiedlichen Materialien erhalten wurden, durchgeführt wird. Dadurch kann die Genauigkeit des Verfahrens erheblich gesteigert werden. Die erhaltenen Werte

für die Bindungsparameter, namentlich die Länge einer Glukosebindestelle  $d$  und die zugehörige Gleichgewichtskonstante  $K$ , sind daher für die beiden Zustände äußerst zuverlässig.

- 5 In Figur 10 sind die Anzahl der besetzten Bindungsstellen 22 pro Längeneinheit dargestellt. Eine Kurve 26 gibt die Anzahl angelagerter Glukosemoleküle im desorbierten Zustand wieder, eine weitere Kurve 27 die Anzahl angelagerter Glukosemoleküle bei Adsorption an die Diamantoberfläche und eine dritte Kurve  
10 28 die Anzahl angelagerter Glukosemoleküle bei Adsorption an die Stahloberfläche. Die Kurven 26 bis 28 ergeben sich gemäß Gleichung (7) aus der Ableitung der für die jeweiligen Zustände durch die Ausgleichsrechnung ermittelten Kraftkurven.
- 15 Für Konzentrationen ab etwa 0,2 M übersteigt die Anzahl angelagerter Glukosemoleküle am PAAm-Molekül nahe der Stahloberfläche (Kurve 28) diejenige in Lösung (Kurve 26). Dies hat den nicht-monotonen Verlauf der Kraftkurve 25 zur Folge.
- 20 Mit dem hier beschriebenen Verfahren können auch die kleinen Unterschiede detektiert werden, die durch Variation der Temperatur hervorgerufen werden.

Figur 11 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Glukosebindung  
25 an das adsorbierte und gelöste PAAm-Molekül. Figur 11 zeigt insbesondere die Messwerte für die Desorptionskraft von PAAm auf oxidiertem Diamant in Glukoselösungen unterschiedlicher Konzentration bei 31 °C (offene Dreiecke) und 46 °C (gefüllte Dreiecke). Die Kraftkurven 29 und 30 sind das Ergebnis von  
30 Ausgleichsrechnungen, mit denen die Funktionen gemäß Gleichung (9) an die aufgetragenen Messwerte angepasst wurden.

Figur 12 zeigt wiederum die Anzahl der gebundenen Glukosemoleküle in Abhängigkeit von der Aktivität. Kurve 31 betrifft  
35 den desorbierten Zustand bei 46 °C, Kurve 32 den adsorbierten Zustand bei 46 °C, Kurve 33 den desorbierten Zustand bei 31 °C und Kurve 34 den adsorbierten Zustand bei 31 °C.

Die Kraftkurven 29 und 30 können zur Erhöhung der Genauigkeit auch zusammen mit den Kraftkurven 24 und 25 in einer gemeinsamen Ausgleichsrechnung bestimmt werden.

5

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Ausgleichsrechnung eingetragen. Ein Blick auf Tabelle 1 zeigt, dass für das Diamantsubstrat die Bindungskonstante  $K_a$  für den adsorbierten Zustand etwa 8% größer ist als die Bindungskonstante  $K_d$  für  
10 den desorbierten Zustand bei 31 °C und sogar um ca. 20% größer bei 46 °C. Folglich sind mehr Glukosemoleküle an das PAAm-Molekül in seinem oberflächenhaftenden Zustand gebunden. Die zusätzlich gebunden Glukosemoleküle lösen sich beim Desorbieren des PAAm-Polymers ab, was zu dem gemessenen  
15 Anstieg der Desorptionskraft führt. Auch der Abstand zwischen zwei benachbarten Bindungsstellen erhöht sich beim Übergang vom adsorbierten zum desorbierten Zustand.

Für die Edelstahloberfläche kann der Verlauf der Kraftkurve  
20 25 durch die Überlagerung unterschiedlicher Glukosebindungsaffinitäten erklärt werden. Bis zu einer Konzentration von ca. 0,2 M, entsprechend einer Aktivität  $a$  von ungefähr  $5 \times 10^{-3}$ , bindet mehr Glukose an den gelösten Zustand im Vergleich zu dem an der Oberfläche adsorbierten Zustand des  
25 PAAm-Moleküls. Folglich steigt die Anzahl der gebundenen Glukosemoleküle bei erzwungener Desorption des PAAm-Moleküls durch das zusätzliche Binden von Glukosemolekülen aus der umgebenden Glukoselösung. Bei höheren Konzentrationen bindet  
jedoch mehr Glukose an das an der Oberfläche adsorbierte  
30 PAAm-Molekül im Vergleich zu seinem gestreckten Zustand in Lösung. Folglich müssen Glukosemoleküle in Lösung gehen und das PAAm-Molekül verliert gebundene Glukosemoleküle, während das PAAm-Molekül von der Metalloberfläche abgezogen wird. Dies ist höchst wahrscheinlich durch die unterschiedliche  
35 Affinität von Glukose zu dem Substratmaterial selbst verursacht. Bei kleinen Konzentrationen wird der Zucker von der Metalloberfläche abgewiesen und zeigt eine reduzierte Tendenz

an das PAAm-Molekül zu binden, wenn sich das PAAm-Molekül an der Oberfläche befindet. Mit steigender Glukosemenge an der Adsorptionsschicht 7, steigt auch die Zahl an adsorbierter Glukose, bis sich eine dichte Schicht aus Glukosemolekülen auf der Adsorptionsschicht 7 gebildet hat. Nun ist das Bindungsverhalten ähnlich dem auf der oxidierten Diamantoberfläche.

Anstelle der Desorptionskraft kann auch die Änderung der Desorptionslänge  $L$  als Funktion der Konzentration oder Aktivität der Einzelmoleküle 21 gemessen werden. Aufgrund der Anlagerung oder des Ablösens von Einzelmolekülen 21 an das Sondenmolekül 5 kommt es zu Änderungen in der Desorptionslänge. Durch deren Messung als Funktion der Aktivität oder der Konzentration kann die genaue Zahl der gebundenen Moleküle bestimmt werden, sofern die Längenänderung pro Einzelmoleküle bekannt ist.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, dass Merkmale und Eigenschaften, die im Zusammenhang mit einem bestimmten Ausführungsbeispiel beschrieben worden sind, auch mit einem anderen Ausführungsbeispiel kombiniert werden können, außer wenn dies aus Gründen der Kompatibilität ausgeschlossen ist.

Schließlich wird noch darauf hingewiesen, dass in den Ansprüchen und in der Beschreibung der Singular den Plural einschließt, außer wenn sich aus dem Zusammenhang etwas anderes ergibt. Insbesondere wenn der unbestimmte Artikel verwendet wird, ist sowohl der Singular als auch der Plural gemeint.

Tabelle 1:

Bindungsparameter von D-Glukose an PAAm auf Edelstahl 316L  
 5 und oxidiertem Diamant bei unterschiedlicher Temperatur.

|                                  | Edelstahl 316L | O-Diamant | O-Diamant |
|----------------------------------|----------------|-----------|-----------|
| Temperatur                       | 31 °C          | 31 °C     | 46 °C     |
| $K_d$                            | 1300           | 1300      | 1400      |
| $d_d[\text{\AA}]$                | 2.40           | 2.40      | 2.68      |
| $\Delta G_d[\text{kJ mol}^{-1}]$ | 18.13          | 18.13     | 18.32     |
| $K_a$                            | 114            | 1404      | 1789      |
| $d_a[\text{\AA}]$                | 0.99           | 2.15      | 2.55      |
| $\Delta G_a[\text{kJ mol}^{-1}]$ | 11.98          | 18.33     | 18.94     |

## Literatur:

- [1] M. Gavutis, S. Lata, J. Piehler, Nature Protocols 2006, 1, 2091
- 5 [2] S. D'Auria, A. Ausili, A. Marabotti, A. Varriale, V. Scognamiglio, M. Staiano, E. Bertoli, M. Rossi, F. Tanfani, Journal of Biochemistry 2006, 139, 213.
- [3] M. S. Yang, H. C. M. Yau, H. L. Chan, Langmuir 1998, 14, 6121.
- 10 [4] A. Velazquez-Campoy, E. Freire, Nature Protocols 2006, 1, 186.
- [5] S. N. Timasheff, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002, 99, 9721.
- 15 [6] C. Ebel, H. Eisenberg, R. Ghirlando, Biophysical Journal 2000, 78, 385.
- [7] M. Geisler, T. Pirzer, C. Ackerschott, S. Lud, J. Garrido, T. Scheibel, T. Hugel, Langmuir 2008, 24, 1350.
- 20 [8] M. Geisler, T. Hugel, Advanced Materials 2010, 22, 398-402.
- [9] Y. F. Hu, Z. C. Wang, Journal of Chemical Thermodynamics 1997, 29, 879.
- 25 [10] K. Miyajima, M. Sawada, M. Nakagaki, Bulletin of the Chemical Society of Japan 1983, 56, 1620.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung von Molekülbindungen, bei dem:

- 5     - ein Messkopf (2) und ein Adsorptionskörper (6) mit einer Adsorptionsfläche (7) bereitgestellt wird;
- der Abstand zwischen dem Messkopf (2), der mit einem Sondenmolekül (5) versehen ist, und dem Adsorptionskörper (4), an dessen Adsorptionsfläche (7) das Sondenmolekül (5)
- 10    wenigstens teilweise adsorbiert ist, geändert wird;
- mit Hilfe einer Kraftmessvorrichtung (11-14) die Kraft gemessen wird, die von dem Sondenmolekül (5) zwischen Messkopf (2) und Adsorptionskörper (6) vermittelt wird;
- eine Kraft-Weg-Kurve (16) bestimmt wird, die die Abhängig-
- 15    keit der gemessenen Kraft von der Änderung des Abstandes zwischen Messkopf (2) und Adsorptionskörper (6) zeigt;
- durch Auswertung von Kraftplateaus (17) der Kraft-Weg-Kurve (16) eine Desorptionsgröße ( $F_{des}$ , L) des Sondenmoleküls (5) an der Adsorptionsfläche (7) im quasistationären Gleich-
- 20    gewicht bestimmt wird,
- d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,   d a s s
- eine Aktivität von Einzelmolekülen (21) in einem an die Adsorptionsfläche (7) des Adsorptionskörpers (6) angrenzenden Bereich variiert wird,
- 25    - die Desorptionsgröße ( $F_{des}$ , L) in Abhängigkeit von der Aktivität der Einzelmoleküle (21) bestimmt wird und dass
- anhand eines zwischen Desorptionsgröße ( $F_{des}$ , L) und Aktivität ermittelten Zusammenhangs (24, 25, 29, 30) Bindungsparameter bestimmt werden, die die Bindung der Einzelmoleküle
- 30    (21) an das Sondenmolekül (5) im adsorbierten und desorbier-
- ten Zustand des Sondenmoleküls (5) beschreiben.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

- d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,   d a s s
- 35    die Desorptionsgröße ( $F_{des}$ , L) an wenigstens einer weiteren Adsorptionsfläche (7) von wenigstens einem weiteren Adsorptionskörper (6) in Abhängigkeit von der Aktivität der Einzelmo-

leküle (21) bestimmt wird und dass anhand von zwischen Desorptionsgröße ( $F_{\text{des}}$ , L) und Aktivität ermittelten Zusammenhängen (24, 25) die Bindungsparameter bestimmt werden, die die Bindung der Einzelmoleküle (21) an das Sondenmolekül (5) im desorbierten Zustand und in den an die verschiedenen Adsorptionsflächen (7) adsorbierten Zuständen des Sondenmoleküls (5) beschreiben.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet, dass die Desorptionsgröße ( $F_{\text{des}}$ , L) bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Aktivität der Einzelmoleküle (21) bestimmt wird und dass anhand von zwischen Desorptionsgröße ( $F_{\text{des}}$ , L) und Aktivität ermittelten Zusammenhängen (24, 25) die Bindungsparameter bestimmt werden, die die Bindung der Einzelmoleküle (21) an das Sondenmolekül (5) in den desorbierten und adsorbierten Zuständen des Sondenmoleküls (5) bei den verschiedenen Temperaturen beschreiben.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet, dass bei der Auswertung der Kraftplateaus (17) die Desorptionskraft ( $F_{\text{des}}$ ) bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4,

dadurch gekennzeichnet, dass als zu ermittelnden Bindungsparameter die Bindungskonstanten ( $K_s$ ,  $K_b$ ) für die Bindung der Einzelmoleküle (21) an das Sondenmolekül (5) im Gleichgewichtszustand und die mittlere Bindungsstellenlänge ( $d_s$ ,  $d_b$ ) bestimmt werden, wobei die Bindungskonstanten ( $K_s$ ,  $K_b$ ) und die Bindungsstellenlänge ( $d_s$ ,  $d_b$ ) jeweils für den an der jeweiligen Adsorptionsfläche (7) adsorbierten und den von der jeweiligen Adsorptionfläche (7) desorbierten Zustand des Sondenmoleküls (5) bestimmt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5,

dadurch gekennzeichnet, dass

für die Ermittlung der Bindungsparameter ( $K_b$ ,  $d_b$ ) diejenigen Bindungsparameter, die dem von den Adsorptionsflächen (7) desorbierten Zustand des Sondenmoleküls (5) zugeordnet sind, gleich gesetzt werden.

5

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6  
dadurch gekennzeichnet, dass  
aus der Bindungskonstante eine Bindungsenergie ( $\Delta G$ ) pro  
Einzelmolekül (21) bestimmt wird.

10

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Bindungsparameter durch Anpassen einer Ausgleichsfunktion  
(24, 25) an Messwerte der Desorptionskraft ( $F_{des}$ ) bestimmt  
werden, wobei die Messwerte gegen die Änderung der Aktivität  
aufgetragen sind und die Parameter der Ausgleichsfunktion die  
Bindungskonstanten ( $K_s$ ,  $K_b$ ) und die mittlere Bindungsstellen-  
länge ( $d_s$ ,  $d_b$ ) für den adsorbierten und desorbierten Zustand  
des Sondenmoleküls (5) sind.

20

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3  
dadurch gekennzeichnet, dass  
bei der Auswertung der Kraftplateaus (17) die Desorptionslän-  
ge ( $L$ ) bestimmt wird und aus der Abhängigkeit der Desorpti-  
onslänge ( $L$ ) von der Aktivität der Einzelmoleküle (21) eine  
Anzahl der an das Sondenmolekül (5) gebundener Einzelmoleküle  
(21) bestimmt wird.

25

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Einzelmoleküle (21) in einem Lösungsmittel (9) gelöst  
werden.

30

11. Verfahren nach Anspruch 10  
dadurch gekennzeichnet, dass  
ein gasförmiges oder flüssiges Lösungsmittel (9) verwendet  
wird.

35

12. Vorrichtung zur Untersuchung von Molekülbindungen mit:

- einem Adsorptionskörper (6), der mit einer Adsorptionsfläche (7) versehen ist,
- 5    - einem Messkopf (2), dessen Abstand von der Adsorptionsfläche (7) veränderbar ist,
- einer Kraftmessvorrichtung (11-14), mit der eine zwischen Messkopf (2) und Adsorptionsfläche (7) wirkende Kraft messbar ist, und mit
- 10    - einer an die Kraftmessvorrichtung (11-14) angeschlossene Auswerteeinheit (15),

d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t ,   d a s s

die Auswerteeinheit (15) zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 eingerichtet ist.

1/5

FIG 1

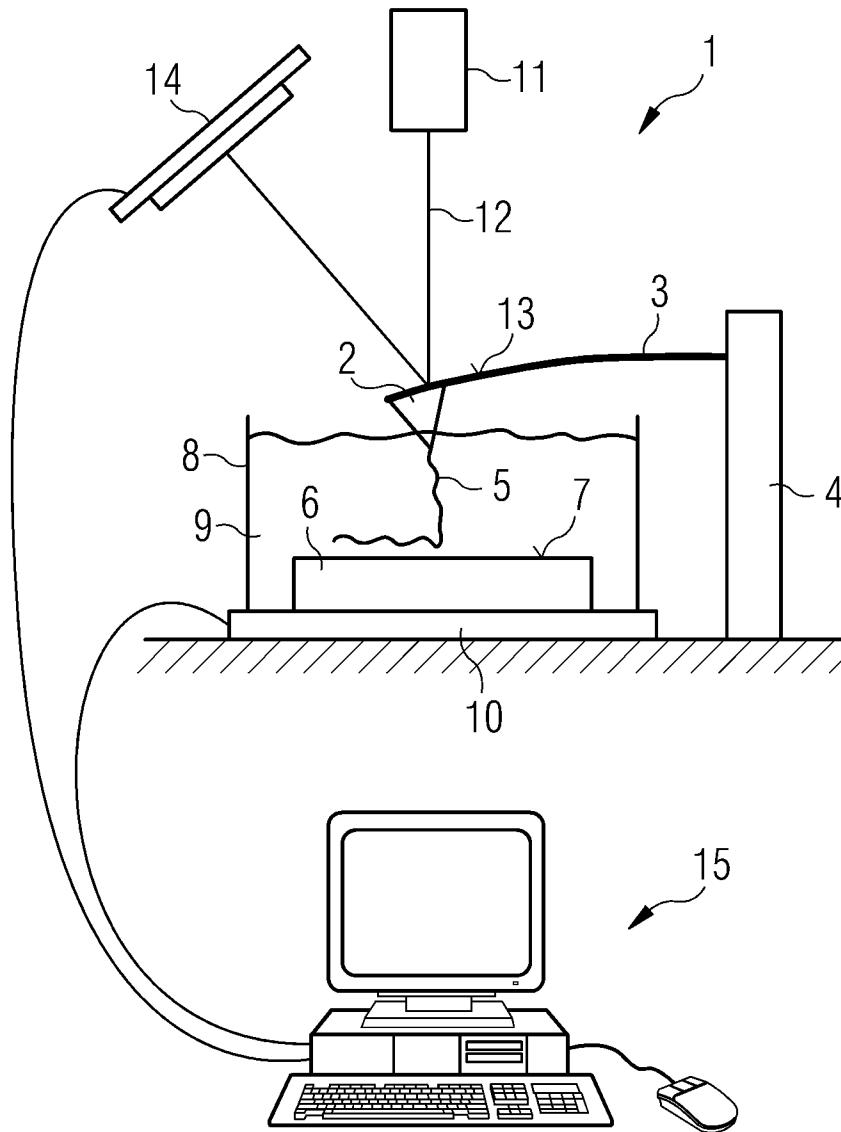




FIG 6

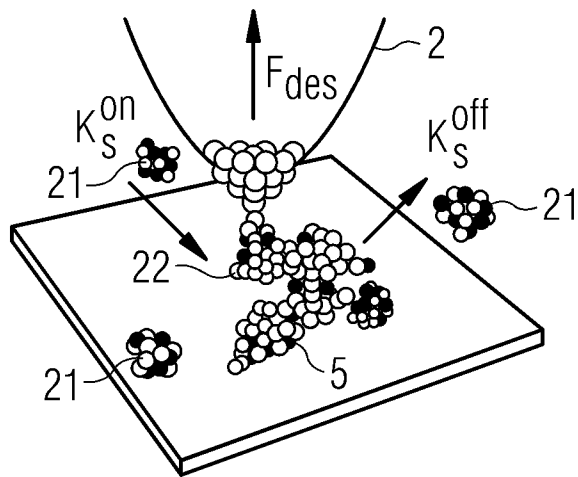


FIG 7

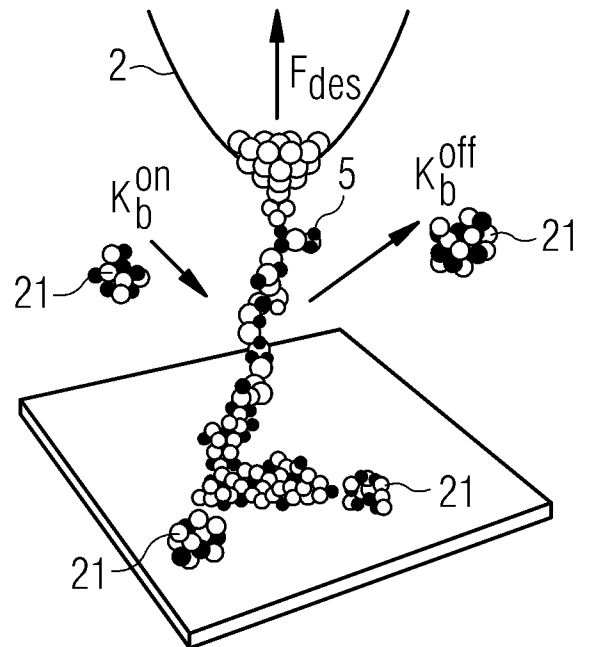
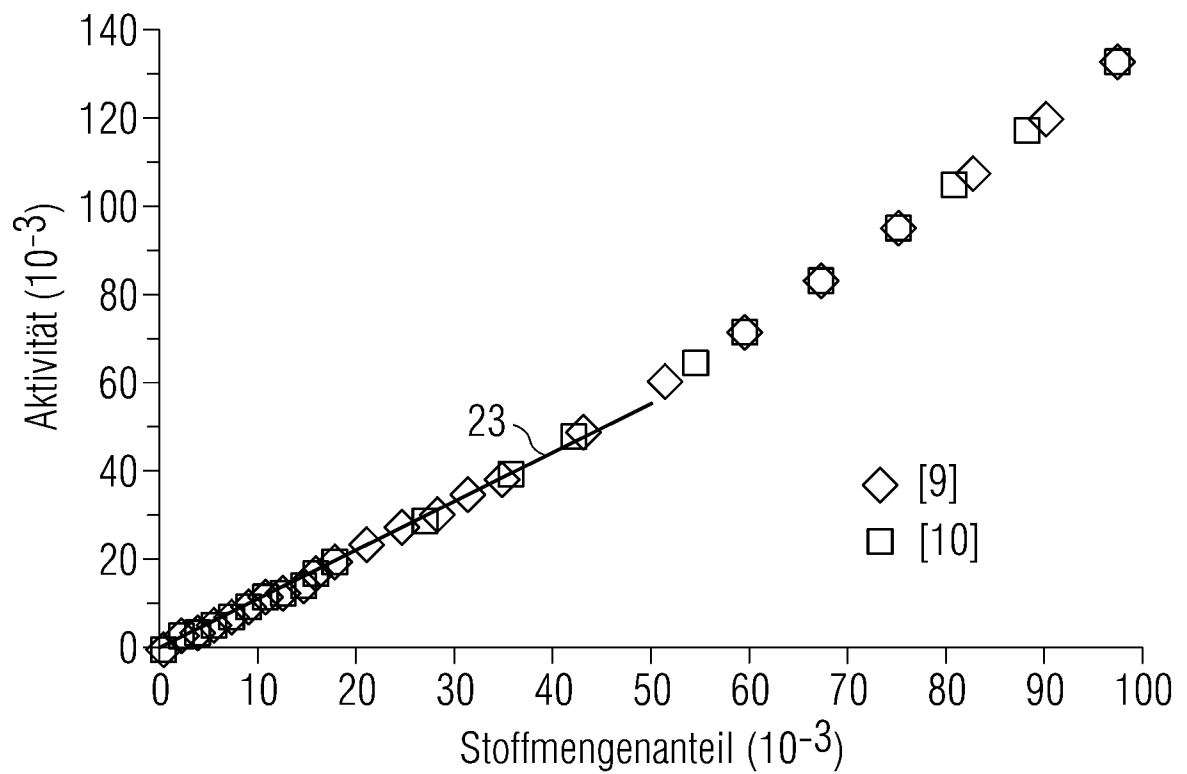


FIG 8



4/5

FIG 9

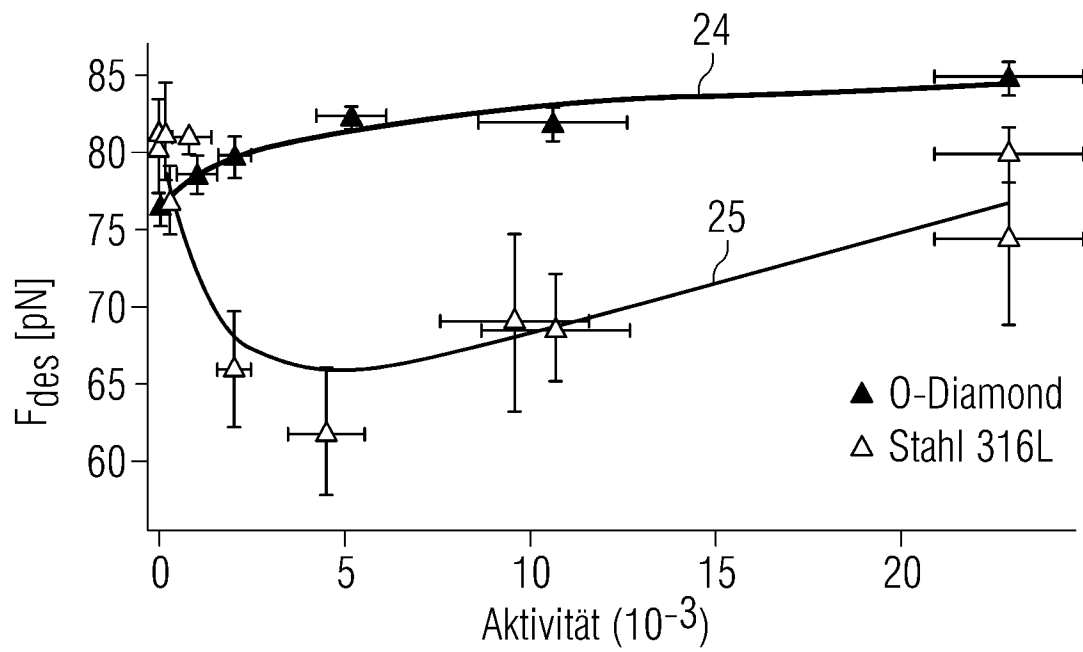
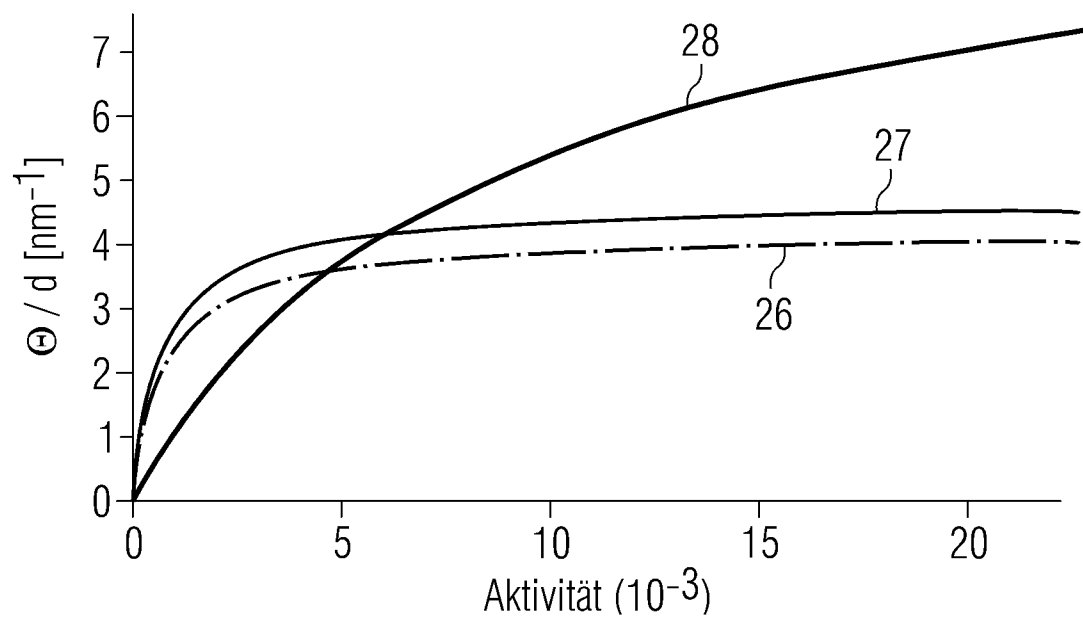


FIG 10



5/5

FIG 11

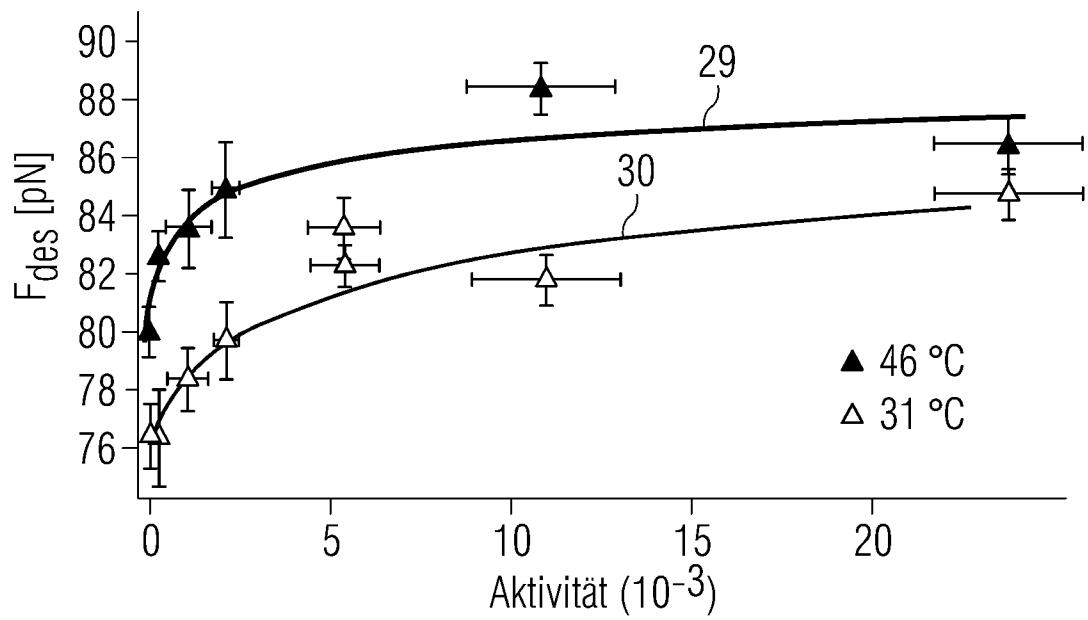


FIG 12

