

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/53	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/55864 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Dezember 1998 (10.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01527 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Juni 1998 (04.06.98) (30) Prioritätsdaten: 197 24 787.3 6. Juni 1997 (06.06.97) DE (71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BIOTEZ BERLIN-BUCH GMBH [DE/DE]; Biochemisch-Technologisches Zentrum, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): STROHNER, Pavel [DE/DE]; Hadlichstrasse 20, D-13187 Berlin (DE). IMMER, Ulrike [DE/DE]; Am Schlagbaum 11, D-61279 Grävenwiesbach (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: SURFACES COATED WITH STREPTAVIDIN/AVIDIN (54) Bezeichnung: STREPTAVIDIN/AVIDIN BESCHICHTETE OBERFLÄCHEN (57) Abstract <p>The invention relates to surfaces coated with streptavidin/avidin used in medical diagnostics and the pharmaceutical industry. The invention seeks to provide a coated solid phase which has high surface binding yields and sufficient stability, even in the presence of detergents, and which can have universal application and facilitates the necessary sensitivity for the determination procedure to be conducted. The inventive surfaces coated with streptavidin/avidin are characterized in that the coating consists of streptavidin and/or avidin, which is bonded on the surface of a solid supporting material by means of a biotinylated adhering agent.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik und die pharmazeutische Industrie. Ziel der Erfindung war, eine beschichtete Festphase zu entwickeln, die hohe Bindungsausbeuten an der Oberfläche liefert sowie genügend Stabilität, auch gegen Detergenzien, aufweist, die universell einsetzbar ist und dabei die notwendige Empfindlichkeit der durchzuführenden Bestimmungsverfahren ermöglicht. Die erfindungsgemäßen Streptavidin/Avidin beschichteten Oberflächen sind dadurch gekennzeichnet, daß die Schicht aus Streptavidin und/oder Avidin besteht, welche über eine biotinylierte Klettsubstanz an der Oberfläche eines festen Trägermaterials gebunden ist.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen

Die Erfindung betrifft Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik und die pharmazeutische Industrie.

Zur Bestimmung immunologisch wirksamer Komponenten nach dem Prinzip des Festphasen-Immunoassay, bei dem ein Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden wird, verwendet man als Festphase heute üblicherweise Reaktionsgefäße in Form von Tubes oder Wells von Mikrotiterplatten, an deren Innenoberflächen der Reaktionspartner gebunden wird, bzw. Außenoberflächen von Kugeln. Das Ziel ist es, diese Oberflächen mit organisch chemischen Substanzen so zu beschichten, daß im nachfolgenden Assay höchste spezifische Bindungen erzielt werden und die unspezifischen Bindungen möglichst niedrig sind.

Zur Bestimmung einer spezifisch bindefähigen immunologischen Substanz, hat sich in den letzten Jahrzehnten der Immunoassay in seinen vielfältigen Formen etabliert. Er gibt die Möglichkeit zur Bestimmung kleinster Substanzmengen in Gegenwart millionenfachen Fremdstoffüberschusses. Grundlage ist die sensitive und spezifische Konkurrenzreaktion einer unmarkierten Substanz P mit einer fixierten Menge an markierter Substanz P* um spezifische Bindungsstellen einer limitierten Menge eines Binders Q. Aus dem Verteilungsmuster des markierten Liganden in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht markiertem Liganden kann die Konzentration des letzteren bestimmt werden. Zur Trennung von umgesetzten und nicht umgesetzten Reaktionspartnern sind verschiedenste Methoden entwickelt worden.

In den letzten Jahren hat die Festphasen-Methode, bei der ein Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden wird, die Hauptbedeutung erlangt. Reaktionspartner, die an die feste Phase chemisch oder physikalisch gebunden werden, können Antikörper, Antigene, Rezeptoren, Zellen, DNA, RNA und vieles andere mehr sein. Diese Reaktionspartner können entweder direkt

oder über eine Vorbeschichtung an die feste Phase adsorbiert werden. Heute werden sie üblicherweise mit einer spezifisch bindefähigen Substanz, dem Biotin, modifiziert, die es ermöglicht, an das beschichtete Trägermaterial zu binden. (Patent DE 36 40 412 A1 u.: Soukup, G.A. et al.: Bioconjugate Chemistry 6, 135/1995)

Als Trägermaterial werden heute üblicherweise Plast-Oberflächen aus Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Polyamid, Polymethacrylat, Polycarbonat, Polyacrylat oder Copolymere von Polystyrol eingesetzt in Form von Innenoberflächen von Tubes oder Wells von Mikrotiterplatten oder Außenoberflächen von Kugeln.

Verschiedene Modifikationen dieser Oberflächen sind bekannt. Dabei muß die Bindung der spezifisch bindenden Substanz so erfolgen, daß die Anbindung des mit Biotin modifizierten Reaktionspartners stabil, unbeeinflußt und ausreichend ist für alle im Laufe des Bestimmungsverfahrens notwendigen Manipulationen. Der modifizierte, spezifisch bindende Reaktionspartner darf dabei seine Fähigkeit zur Bindung nicht verlieren. Die meisten Beschichtungen von festen Phasen beruhen heute auf adsorptiven Bindungen.

Zur Sicherung der Stabilität und optimalen Beschichtung wurden die adsorptive Bindung vermittelnde Klettsubstanzen vorgeschlagen. Dabei ist zu beachten, daß der spezifisch bindende Reaktionspartner in seiner Bindefähigkeit nicht beeinträchtigt wird (Patent DE 38 06 431).

Die bisher bekannten Nachweisverfahren haben folgende Nachteile

- die adsorptive Beladung mit Reaktionspartnern hat ein oft zu geringe Beladung zur Folge,

- zu geringe Aufnahmekapazität der beschichteten Oberflächen für die Bindung der nachfolgenden biotinylierten Reaktionspartner,

- oftmals auftretende hohe unspezifische Bindung,

- Instabilität gegenüber aggressiven Stoffen wie Detergenzien, starken Basen oder Säuren.

Davon ausgehend war es das Ziel der Erfindung, eine beschichtete Festphase zu entwickeln, die hohe Bindungsausbeuten an der Oberfläche liefert sowie genügend Stabilität, auch gegen Detergenzien, aufweist, die universell einsetzbar ist und dabei die notwendige Empfindlichkeit der durchzuführenden Bestimmungsverfahren ermöglicht.

Das Ziel der Erfindung wird gemäß Patentanspruch 1 und 17 erreicht, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Das Trägermaterial wird in einem ersten Schritt mit einer hydrophoben Klettsubstanz adsorptiv beladen, die ihrerseits modifiziert ist mit einem spezifischen Bindepartner für eine weitere, spezifisch bindende Substanz. Die Klettsubstanz kann ein Polypeptid, ein Protein, ein Kohlehydrat oder Glykoprotein sein. Sie kann unvernetzt, vernetzt oder derivatisiert eingesetzt werden. Bevorzugt werden zur Hydrophobisierung und/oder Vernetzung Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 000 bis 900 000 benutzt. Besonders bevorzugt sind RSA, Lipase oder Immunglobuline wie Immunglobulin-gamma. Die Klettsubstanz muß hydrophober als das Trägermaterial sein.

Erfindungsgemäß ist die Klettsubstanz mit einem Bindepartner modifiziert, dem Biotin. Dies wird erfindungsgemäß ausgenutzt, eine stabile Bindung mit einer weiteren spezifisch bindefähigen Substanz, dem Streptavidin und/oder Avidin herzustellen, was zu einer stabilen beschichteten festen Phase neuer Qualität führt. Streptavidin und/oder Avidin besitzen mehrere Bindungsstellen für Biotin und können so nachfolgend mit Biotin-modifizierten Reaktionspartnern eines Bestimmungsverfahrens binden. Dabei wird die starke Biotin-Streptavidin- und/oder Avidin-Bindung auf der einen Seite und die Tatsache, daß Streptavidin bzw. Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzen, auf der anderen Seite ausgenutzt. Überraschenderweise

haben die beschichteten Oberflächen die Eigenschaft, daß, obwohl durch die Bindung an biotinylierte Klettsubstanz Bindungsstellen vom Streptavidin und/ oder Avidin verbraucht wurden, die verbleibenden freien Bindungsstellen für Biotin um so affiner mit dem nachfolgend zu bindenden, mit Biotin modifizierten Reaktionspartner reagieren. Dies führt zu einer äußerst stabilen und hochsensiblen Festphase, wodurch die auf dieser Festphase entwickelten Bestimmungsverfahren wesentlich sensitiver gestaltet werden können.

Das zeigt sich besonders beim Nachweis von biotinylierten Oligonukleotiden und DNA-Fragmenten, bei dem geringste Mengen erfaßt werden können. Die erfindungsgemäß eingesetzte beschichtete Festphase ist in der Lage, sensibel auf kleinste Differenzen zu reagieren.

Das Klettprotein kann unvernetzt als Einzelmolekül, vernetzt oder derivatisiert verwendet werden. Die Methoden zur Herstellung sind dem Fachmann bekannt, ebenso die Methode der Biotinylierung. Wesentlich für die Realisierung der Erfindung ist eine Abstimmung des Vernetzungs- und des Biotinylierungsgrades, die Wahl der entsprechenden Klettsubstanz, Menge der Klettsubstanz und der des Streptavidins und/ oder Avidins zueinander und zur biotinylierten Klettsubstanz. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform als Klettprotein ist Immunglobulin-gamma. Es kann sowohl unvernetzt als auch bevorzugt vernetzt mit den bekannten Spacern eingesetzt werden.

Als Faustregel gilt, je höher der Vernetzungs- und Biotinylierungsgrad, desto weniger Klettprotein ist einzusetzen. Wichtig ist, daß nicht zu viele Biotin-Bindungsstellen am Streptavidin und/ oder Avidin besetzt werden, sonst kehrt sich der Effekt um. Die Menge Streptavidin/Avidin muß auf die Menge des biotinylierten Klettproteins abgestimmt werden.

Tabelle: eingesetzte Vernetzungsmittel

Kurzform	chemische Bezeichnung
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DMS	Dimethylsuberimidat
MHS	Malimidohexanoyl-N-Hydroxysuccinimidester
MABI	Methyl-4-azidobenzoimidat * HCL
SAMBA	S'-Acetyl-mercaptopbernsteinsäureanhydrid
MBS	m-Maleinimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
SATP	N-Succinimidyl-S-acetylthiopropionat
SATA	N-Succinimidyl-S-Acetylthioacetat
SADP	N-Succinimidyl-(4-azidophenyl)-1,3'-dithiopropionat

Nach der Vernetzung wird vorzugsweise das Immunglobulin gamma biotinyliert nach den üblichen Methoden.

Tabelle: eingesetzte Biotinylierungsreagenzien

NHS-Biotin	Biotin-Hydrazid
NHS-LC-Biotin	Biotin-LC-Hydrazid
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Biotinamido-pentylamin
NHS-SS-Biotin	

Der Biotinylierungsgrad bewegt sich erfindungsgemäß in einem Bereich zwischen 10 - 35. Die eingesetzten Mengen an vernetztem, biotinylierten Klettprotein liegen zwischen 5 - 15 µg/ml Beschichtungslösung je nach Biotinylierungsgrad.

Nachfolgend wird die Biotin-Streptavidin- und/ oder Avidin-Bindung auf der festen Phase durchgeführt. Die Mengen bewegen sich je nach Vorbeladung mit dem Klettprotein zwischen 2.5 und 20 µg/ml. Anschließend wird die feste Phase nach den dem Fachmann bekannten Methoden stabilisiert. Sie kann jetzt über Monate aufbewahrt werden, ist universell einsetzbar für alle

Bestimmungsverfahren, in denen ein Reaktionspartner mit Biotin modifiziert wurde. Die beschichtete feste Phase ist so eingestellt, daß sie für alle bekannten Verfahren Verwendung finden kann. In einer besonderen Ausführungsform ist die feste Phase so ausgebildet (Wells von Mikrotiterplatten), daß sie gleichzeitig als photometrische Küvette dient. So kann die Messung der zu bestimmenden Substanz an der Oberfläche nach Ablauf der Reaktion im gleichen Gefäß erfolgen.

Das Verfahren führt zu hohen Signalausbeuten auf der beschichteten Festphase unter Minimierung der unspezifischen Bindungen. Die Festphase ist stabil gegen Einflüsse von Detergenzien. Deshalb kann die entwickelte Festphase bevorzugt in solchen Bestimmungsverfahren eingesetzt werden, wo dies eine besondere Rolle spielt. Es eignet sich vorzüglich in der RNA- und DNA-Diagnostik, wobei dafür Streptavidin/Avidin-Gemische besonders bevorzugt sind.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1 Thyreoglobulin-ELISA (TG-ELISA) an der beschichteten Fetsphase

Der TG-ELISA ist ein enzymimmunometrischer Assay, der aus einem biotinylierten Fänger-Antikörper (monoclonal), einem TG-Standard und einem POD-markierten Signal-Antikörper (monoclonal) besteht. Die Trennung erfolgt an der beschriebenen beschichteten festen Phase (Wells von Mikrotiterplatten (MTP)). Beide Antikörper binden an unterschiedlichen Bindungsdomänen des TG, so daß TG eine spezifische Brücke zwischen beiden Antikörpern (sandwich) bildet.

Beschreibung:

Zweihundert Mikroliter einer biotinylierten, mit DSS vernetzten Immunglobulin-gamma (huIgG) Lösung in 0.1M Karbonatpuffer pH

9.6 (vernetzt mit einem 20fachen Überschuß an DSS und biotinyliert mit einem Biotinylierungsgrad von 15) werden für 30 min. in die Wells einer MTP gegeben. Nach 2x Waschen mit 0.9% NaCl inkubieren die Wells in einem zweiten Schritt mit zweihundert Mikroliter einer Lösung aus 10 µg Streptavidin und 10µg Avidin pro Milliliter 0.1M Karbonatpuffer pH 9.6. Nach vier Stunden wird 2x mit 0.9% NaCl gewaschen, für 30 min. mit 0.1% Casein nachgeblockt und weitere 30 min. mit 5% Denhardt'scher Lösung in 0.1M Mc Ilvaine-Puffer pH 6 (0.05% RSA) geblockt. Zuletzt wird abgesaugt und die MTP über Nacht getrocknet. Die so beschichteten Platten werden bis zu ihrer Verwendung mit Trockenmittel eingeschweißt in Folie bei 4°C aufbewahrt.

Für den TG-Assay wird die MTP mit 200 µl biotinyliertem Fänger-Antikörper über Nacht beladen und anschließend mit 0.2% Trockenmilch für 30 min geblockt. Zur Assaydurchführung läßt man 100µl Mc Ilvaine-Puffer pH 6 (0.5% RSA), 50µl TG-Standard in einer Verdünnungsreihe bzw. 50µl Probe unbekannter Konzentration und 50µl Signal-Antikörper-POD mit dem an die feste Phase gebundenen Antikörper reagieren. Nach 4 h werden der umgesetzte Komplex und die nicht umgesetzten Reaktionspartner durch Absaugen getrennt. TG bindet in der Menge an die Oberfläche, in der es in der Lösung vorhanden ist. Der Signal-Antikörper-POD erkennt die gebundene Menge TG. Über eine nachgeschaltete Substrat-POD -(Horseradishperoxidase-Enzym) Reaktion kann die gebundene TG-Menge bestimmt werden. Als Substrat wird O-Phenylendiamin (OPD) verwendet. Die Höhe des Signals ist proportional der Menge vorhandenen TG's. Unbekannte Proben werden anhand ihrer Signalhöhe aus einer Eichkurve bestimmt.

Beispiel 2: Hybridisierung zweier Oligonucleotide komplementärer Struktur auf der beschichteten Oberfläche (artifizielles System)

Zweihundert Mikroliter einer biotinylierten, mit DSS vernetzten Immunglobulin-gamma (huIgG) Lösung in 0.1M Karbonatpuffer pH

9.6 (vernetzt mit einem 20fachen Überschuß an DSS und biotinyliert mit einem Biotinylierungsgrad von 15) werden für 30 min. in die Wells einer MTP gegeben. Nach 2x Waschen mit 0.9% NaCl inkubieren die Wells in einem zweiten Schritt mit zweihundert Mikroliter einer Lösung aus 10 µg Streptavidin und 10µg Avidin pro Milliliter 0.1M Karbonatpuffer pH 9.6. Nach vier Stunden wird 2x mit 0.9% NaCl gewaschen, für 30 min. mit 0.1% Casein nachgeblockt und weitere 30 min. mit 5% Denhardt'scher Lösung in 0.1M Mc Ilvaine-Puffer pH 6 (0.05% RSA) geblockt. Zuletzt wird abgesaugt und die MTP über Nacht getrocknet. Die so beschichteten Platten werden bis zu ihrer Verwendung mit Trockenmittel eingeschweißt in Folie bei 4°C aufbewahrt.

Auf eine beschichtete MTP werden 50µl eines biotinylierten Oligonucleotid-Einzelstranges (80mer) steigender Konzentration aufgebracht für 30 min bei 37°C. Anschließend wird einmal mit 0.9% NaCl-Tween (0.1%) gewaschen und mit 50µl eines FITC-markierten Signalstranges (18mer) hybridisiert. Danach wird erneut gewaschen mit 0.9% NaCl-Tween (0.1%). Zum Nachweis der Hybridisierung werden 100µl einer Mischung aus anti-FITC-Antikörper (monoclonal) und einem zweiten anti-Maus-Antikörper-POD zu gleichen Teilen für 15min zugegeben. Danach erfolgt die Enzym-Substrat-Reaktion mit 50µl TMB -Lösung (Tetramethylbenzidin). Aus der Eichkurve mit steigenden Mengen des biotinylierten Einzelstranges können unbekannte Konzentrationen einer biotinylierten Probe aus der Höhe des gemessenen Signals abgelesen werden.

Patentansprüche

1. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß die Schicht aus Streptavidin und/oder Avidin besteht, welche über eine biotinylierte Klettsubstanz an der Oberfläche eines festen Trägermaterials gebunden ist.
2. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Klettsubstanz vernetzt oder nicht vernetzt ist.
3. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Klettsubstanz derivatisiert ist.
4. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß Polypeptide, Kohlehydrate, Proteine, Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von hauptsächlich größer als 10 000 als Klettsubstanz eingesetzt werden.
5. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Klettsubstanz RSA, Lipase oder ein Immunglobulin ist.
6. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Klettsubstanz Immunglobulin-gamma ist.
7. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß der Vernetzungsgrad der Klettsubstanz zwischen 10 und 30 liegt.
8. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß der Biotinylierungsgrad der Klettsubstanz zwischen 15 und 35 liegt.

9. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Klettsubstanz in Beschichtungslösungen einer Konzentration zwischen 5 und 15 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wird.
10. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Beladung mit Streptavidin und/oder Avidin mittels Beschichtungslösungen einer Konzentration zwischen 5 und 20 $\mu\text{g/ml}$ erfolgt.
11. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von Streptavidin und Avidin im Verhältnis 60:40 bis 40:60 eingesetzt wird.
12. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von Streptavidin und Avidin im Verhältnis 50:50 eingesetzt wird.
13. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß 5-10 $\mu\text{g/ml}$ unvernetzte Klettsubstanz mit einem Biotinylierungsgrad von 35 eingesetzt werden.
14. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-13, dadurch gekennzeichnet, daß 10 $\mu\text{g/ml}$ vernetzte Klettsubstanz (10-30facher Überschuß an Vernetzungsmittel, bevorzugt Disuccinimidylsuberat) mit einem Biotinylierungsgrad von 15-20 eingesetzt werden.
15. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß die Klettsubstanz adsorptiv an die Oberfläche gebunden ist.
16. Streptavidin/Avidin beschichtete Oberflächen nach Anspruch 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß die Klettsubstanz an die Wells von Mikrotiterplatten gebunden ist.

17. Verfahren zur Herstellung von Streptavidin/Avidin beschichteten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß die biotinylierte Klettsubstanz auf die Oberfläche gebracht und nach deren Adsorption in einem zweiten Schritt die Streptavidin/Avidinschicht aufgebracht wird.