

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Juli 2007 (19.07.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/079893 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 21/77 (2006.01) **G01N 33/569** (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/012000

(22) Internationales Anmeldedatum:

13. Dezember 2006 (13.12.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

102005062377.8

23. Dezember 2005 (23.12.2005) DE

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

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BURMEISTER, Jens** [DE/DE]; An Der Ruthen 5, 51061 Köln (DE). **DORN, Ingmar** [DE/DE]; Ursulagartenstr. 29, 50668 Köln (DE). **RABE, Uwe** [DE/JP]; Denenchofu 3-13-1, Ota-ku, Tokyo 145-0071 (JP). **HÄUSER-HAHN, Isolde** [DE/DE]; Dünfelder Str. 22, 51375 Leverkusen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH**; Law And Patents, Patents And Licensing, 51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

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

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

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR IDENTIFYING MYCOTOXINS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MYKOTOXINEN

(57) Abstract: The invention relates to a device and a method for identifying mycotoxins and to kits which are suitable for carrying out said method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen sowie Kits, die zur Durchführung des Verfahrens geeignet sind.



WO 2007/079893 A1

Vorrichtung und Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen sowie Kits, die zur Durchführung des Verfahrens geeignet sind.

Der Nachweis von Mykotoxinen umfasst ein großes Anwendungsgebiet z.B. im Nahrungs- und Futtermittelbereich, in der Umweltanalytik, im Pflanzenschutz sowie in der biochemischen Forschung.

Mykotoxine sind von Schimmelpilzen gebildete Giftstoffe mit sehr unterschiedlicher chemischer Struktur. Mykotoxine kommen in Ernteprodukten wie Getreide, ölhaltigen Samen und Früchten vor und können Ursache von Vergiftungen bei Mensch und Tier sein. Inzwischen sind über 300 verschiedene Mykotoxine identifiziert worden, die in ca. 25 Strukturtypen eingeteilt werden und unterschiedliche toxische Wirkungen zeigen. Mykotoxine können, je nach Toxinart, akute oder chronische Vergiftungen hervorrufen. Häufig vorkommende Gruppen von Mykotoxinen sind Aflatoxine, Ochratoxine, Mutterkornalkaloide, Patulin und Fusarientoxine. Unter den Fusarientoxinen sind Deoxynivalenol, Zearalenon, Nivalenol, T-2-/HT2-Toxin und die Fumonisine von besonderer Bedeutung, da sie häufig in Getreideerzeugnissen vorkommen. Entsprechend sollte ein Test auf Mykotoxine, beispielsweise auf Toxine von Feldpilzen, z.B. Fusarientoxine, oder auf Toxine von Lagerpilzen an den Getreideannahmestellen, bei Getreidehändlern sowie Getreideverarbeitern, beispielsweise Mühlen, Mälzereien, Futtermittelhersteller, bei Landwirten, Beratungsstellen, Universitäten oder Ministerien beispielsweise dem Ministerium für Verbraucherschutz durchgeführt werden, um die Qualität der Nahrungsmittel sicherzustellen.

Im Stand der Technik sind eine Reihe von Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen bekannt. Der Nachweis von Mykotoxinen erfolgt zum Beispiel durch chromatographische Verfahren wie HPLC, die mit fluoreszenzbasierter, absorptiver oder massenspektrometrischer Detektion gekoppelt sein kann. Vor der HPLC-Analyse, beispielsweise einer Getreide-Probe, erfolgt in der Regel die Anreicherung und Aufreinigung des Analyten mittels Immuno-Affinitäts-Säulen. Nachteile aller HPLC-basierten Verfahren sind die hohen Investitionskosten, die relativ komplexe Probenhandhabung sowie lange Analysezeiten. Aufgrund der genannten Nachteile sind HPLC-basierte Nachweisverfahren nicht zur schnellen, billigen und einfachen Analyse, beispielsweise von Getreideproben in Getreide erzeugenden, annehmenden, handelnden oder verarbeitenden Betrieben geeignet. Stattdessen erfolgt die HPLC-basierte Analyse in spezialisierten, analytischen Labors. In der Praxis steht das Ergebnis dementsprechend erst mit einer Zeitverzögerung von mehreren Tagen zur Verfügung.

Eine alternative Methode zum Nachweis von Mykotoxinen ist die ELISA-Technik (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Für den ELISA-Test werden Mikrotiterplatten bereitgestellt, deren Vertiefungen beispielsweise mit Fänger-Antikörpern beschichtet sind, die spezifisch an ein Mykotoxin binden. Nachteile des ELISA-Tests sind die vielen Pipettier-, Wasch- und Inkubationsschritte, die zu relativ langen Analysezeiten von mehr als 30 Minuten führen können. Dies verhindert es, den Test schnell vor Ort außerhalb eines analytischen Labors durchzuführen. Zudem erlaubt der Test nicht den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Analyten, da in der Regel jede Mikrotiterplatte nur mit einer Sorte von Antikörpern beschichtet ist.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Mykotoxinen sind Lateral Flow Assays (LFA). Zum Nachweis von Mykotoxinen mittels LFA kann beispielsweise ein direkter, kompetitiver Immunoassay auf einem Nitrozellulosestreifen ausgeführt werden, wobei die zu analysierende Probe aufgrund von Kapillarkräften durch den gesamten Nitrozellulosestreifen durchgezogen wird. Nachteilig ist, dass das Verfahren nur einen qualitativen Mykotoxin-Nachweis erlaubt. Weiterhin nachteilig ist, dass für jedes Mykotoxin bei diesem Test ein separater Streifen benötigt wird.

Im Stand der Technik finden sich auch Arbeiten zur Entwicklung von Nachweisverfahren für Mykotoxine, beispielsweise beschrieben von M. M. Ngundi et al., Anal. Chem. 2005, 77, 148-154. In diesem Verfahren wird ein indirekt, kompetitiver Immuno-Assay zum Nachweis von Ochratoxin A ausgeführt, indem Ochratoxin A auf Glasobjektträgern immobilisiert wird. Das Gemisch eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen Ochratoxin A und der zu bestimmenden Probe wird auf den Glasobjektträger gegeben und nach Entfernen der nichtgebundenen Antikörper durch Waschen kann dieser ausgelesen werden. Nachteilig bei diesem Verfahrens ist, dass Waschschritte und Inkubationszeiten von 10 bis 20 Minuten benötigt werden und aufwändige Fluoreszenz-Imaging-Systeme zum Auslesen der Ergebnisse erforderlich sind. Dieses ermöglicht es nicht, einen vor Ort durchführbaren Schnelltest außerhalb eines analytischen Labors auf dieser Grundlage zu entwickeln.

Die im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen benötigen somit hohe Investitionskosten aufgrund komplizierter Auslesegeräte, beinhalten viele manuelle Schritte, oder sind nicht außerhalb eines analytischen Labors einsetzbar.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das wenigstens einen der vorgenannten Nachteile des Standes der Technik überwindet, insbesondere, ein Verfahren bereitzustellen, das schnell, einfach handhabbar und kostengünstig den Nachweis von Mykotoxinen in einer Probe ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Schnell-Nachweis von Mykotoxinen umfassend folgende Schritte:

- 5 a) Bereitstellen eines Dünnschichtwellenleiters umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), auf dem spezifische und/oder affine Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für Mykotoxine und/oder einen Bindungspartner räumlich separiert immobilisiert werden,
- b) Aufbringen einer Mykotoxin(e) enthaltenden Probe und von Bindungspartnern zu den immobilisierten Bindungspartnern auf dem Dünnschichtwellenleiter,
- 10 c) Detektieren eines Signals im Evaneszentfeld aufgrund der Wechselwirkung der auf dem Dünnschichtwellenleiter immobilisierten Bindungspartnern mit den Mykotoxinen aus der Probe und/oder den Bindungspartnern,
- d) Bestimmen der in der Probe vorliegenden Menge an Mykotoxin(en).

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von Mykotoxinen.

Ein weiterer Gegenstand ist ein Kit geeignet zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von Mykotoxinen.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

20 Überraschend wurde gefunden, dass das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen einfach durchzuführen ist, und außerhalb spezialisierter Analyselabors durchgeführt werden kann. Dies ermöglicht es, dass das erfindungsgemäße Verfahren in Form eines Schnelltests durchgeführt werden kann, ohne dass Proben notwendigerweise in ein Labor zur Analyse gegeben werden müssen. Weiterhin vorteilhaft ist, dass der Mykotoxinnachweis gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren lediglich wenige oder keine Waschschrte benötigt. Dies ist insbesondere von
25 Vorteil, da die Durchführung von Waschschrten zeitaufwändig ist, den Erhalt eines Analyseergebnisses verzögert, und insbesondere bei wenig sorgfältiger oder unsachgemäßer Durchführung die Analyseergebnisse verzerren oder den Nachweis gänzlich unmöglich machen kann.

Die Kombination der vorteilhaften Eigenschaften des erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglicht es, dass ein Nachweis von Mykotoxinen in Nahrungsmitteln beispielsweise an Getreideannahmestellen, bei Getreidehändlern oder Getreideverarbeitern durchgeführt werden kann. Insbesondere
30

ermöglicht die einfache und schnelle Durchführbarkeit des Verfahrens, dass dieses auch von Personen durchgeführt werden kann, die keine spezialisierten Analytiker eines Fachlabors sind.

In bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens verwendet man als Dünnschichtwellenleiter einen Evaneszent-Feld-Biochip, der auf einem Dünnschichtwellenleiter basiert, vorzugsweise einen planaren optischen Wellenleiter-Biochip, der auf einem Dünnschichtwellenleiter basiert.

Optische Wellenleiter sind eine Klasse von Signalwandlern, mit denen man die Änderung der optischen Eigenschaften eines Mediums detektieren kann, das an eine wellenleitende Schicht, typischer Weise ein Dielektrikum, grenzt. Wird Licht als geführte Mode in der wellenleitenden Schicht transportiert, fällt das Lichtfeld an der Grenzfläche Medium/Wellenleiter nicht abrupt ab, sondern klingt in dem an den Wellenleiter angrenzenden sogenannten Detektionsmedium exponentiell ab. Dieses exponentiell abfallende Lichtfeld wird als evaneszentes Feld bezeichnet. Ändern sich die optischen Eigenschaften des an den Wellenleiter grenzenden Mediums innerhalb des evaneszenten Feldes, kann dies über einen geeigneten Messaufbau detektiert werden.

Vorteilhaft bei der Verwendung von Wellenleitern als Signalwandler ist, dass bei an der Grenzfläche des Wellenleiters immobilisierten Erkennungselementen das Binden an das Erkennungselement oder die Reaktion des Erkennungselementes detektiert werden kann, wenn sich dabei die optischen Eigenschaften des Detektionsmediums an der Grenzfläche zum Wellenleiter ändern.

Entsprechend wird eine Zeitersparnis bei der Durchführung des Nachweises ermöglicht, wie auch eine Vereinfachung des Ablaufs.

Somit kann die Detektion eines Signals bzw. eines markierten Elements über die sich ändernden optischen Eigenschaften des Mediums, beispielsweise einer zu analysierenden Probe, direkt an der Oberfläche des Signalwandlers bzw. Dünnschichtwellenleiters erfolgen, beispielsweise über eine Änderung der Absorption, der Fluoreszenz, der Phosphoreszenz, der Lumineszenz oder ähnlichem.

Vorzugsweise detektiert man im Evaneszentfeld ein Fluoreszenzsignal. Erfindungsgemäß verwendbare Markierungselemente für eine Markierung der Bindungspartner, beispielsweise Mykotoxine, Mykotoxin-Konjugate, Antikörper-Konjugate oder Antikörper sind vorzugsweise organische Fluorophore, Nanopartikel, fluoreszente Nanopartikel, Beads, fluoreszente Beads, fluoreszente Proteine oder andere signalgebende Moleküle oder Einheiten oder beliebige Kombinationen verschiedener Markierungselemente. Bevorzugt verwendet man lumineszenzfähig markierte Bindungspartner. Bevorzugte Markierungselemente sind organische Fluorophore und/oder fluoreszente Proteine.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren kann der vorzugsweise fluoreszente markierte Bindungspartner durch ein evaneszentes Feld angeregt werden. In bevorzugten Ausführungsformen wird das Evaneszente Feld durch einen planaren optischen Wellenleiter, wie in US 5,959,292, Duveneck et al. beschrieben erzeugt. Die isotrop emittierte Fluoreszenz ist durch einen geeigneten Aufbau detektierbar. In anderen Ausführungsformen kann die in den Wellenleiter eingekoppelte Fluoreszenz durch ein geeignetes optisches Element aus dem Wellenleiter wieder ausgekoppelt und mit einem geeigneten optischen Aufbau detektiert werden.

Von besonderem Vorteil ist, dass ein Abwaschen vorzugsweise fluoreszent markierter Bindungspartner oder einer markierte Bindungspartner enthaltenden Probe bzw. Lösung vor der Detektion eines Signals eingeschränkt oder sogar völlig darauf verzichtet werden kann. Dieses ermöglicht eine Zeitersparnis bei einem Mykotoxinnachweis wie auch eine Vereinfachung der Durchführung, da auch auf die Bereitstellung der üblicherweise verwendeten verschiedenen Pufferlösungen des Waschprotokolls verzichtet werden kann.

Verwendbare Dünnschichtwellenleiter umfassen vorzugsweise eine optisch transparente wellenleitende Schicht (a) enthaltend Oxide ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 und/oder ZrO_2 , bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , Ta_2O_5 und/oder Nb_2O_5 . Vorzugsweise ist die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) aus TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 oder ZrO_2 , bevorzugt TiO_2 , Ta_2O_5 oder Nb_2O_5 ausgebildet. Insbesondere hat sich die Verwendung von Tantalpentoxid als vorteilhaft herausgestellt, insbesondere bei der Detektion eines Fluoreszenzsignals.

In bevorzugten Ausführungsformen bringt man auf den Dünnschichtwellenleiter, insbesondere auf die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) enthaltend Oxide ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 und/oder ZrO_2 , Mono- oder Mehrfachschichten von Organophosphorsäuren gemäß der nachstehenden Formel (I)



und/oder Organophosphonsäuren gemäß der nachstehenden Formel (II)



und/oder deren Salze auf, wobei

R steht für Alkyl mit C_{10} bis C_{24} .

Bevorzugt verwendbar sind Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren, vorzugsweise Organophosphate und/oder Organophosphonate, mit R ist ausgewählt aus der Gruppe umfas-

send unverzweigtes Alkyl mit C₁₀ bis C₂₀, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend unverzweigtes Alkyl mit C₁₂ bis C₁₈, bevorzugt Dodecylphosphorsäure, Dodecylphosphat, Octadecylphosphonat und/oder Octadecylphosphonsäure.

- 5 Vorzugsweise sind Organophosphorsäuren bzw. Organophosphate, die in Form wasserlöslicher Salze aus wässriger Lösung auf den Dünnschichtwellenleiter aufgebracht werden können verwendbar.

- 10 In bevorzugten Ausführungsformen werden die Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren, vorzugsweise Organophosphate, in Form einer Monoschicht auf den Dünnschichtwellenleiter, insbesondere einen Evaneszent-Feld-Biochip, vorzugsweise einen planaren optischen Wellenleiter-Biochip, aufgebracht. Das Aufbringen kann in Form von Tauchverfahren erfolgen.

- 15 Die Monoschicht oder Monolayer kann als eine Haftvermittlungsschicht auf die optisch transparente Schicht ausgebildet aus Oxiden aufgebracht werden. Vorteilhafter Weise können Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren mit Erkennungselementen, insbesondere mit Proteinen oder an Proteine gekoppelten Erkennungselementen wechselwirken und die Bindung der Erkennungselemente an den Biochip verstärken.

- 20 Verwendbare Bindungspartner sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Anti-Mykotoxin-Antikörper, Anti-Mykotoxin-Antikörper-Konjugate, Mykotoxine, Mykotoxin-Konjugate, Fragmente von Anti-Mykotoxin-Antikörpern, Mykotoxin-bindende Peptide, Mykotoxin-bindende Anticaline, Mykotoxin-bindende Aptamere, Mykotoxin-bindende Spiegelmere und/oder Mykotoxin-bindende imprinted Polymers, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend Anti-Mykotoxin-Antikörper, Anti-Mykotoxin-Antikörper-Konjugate, Mykotoxine und/oder Mykotoxin-Konjugate.

- 25 Die Bindungspartner wechselwirken jeweils spezifisch und/oder affin mit dem jeweils anderen Bindungspartner. Beispielsweise binden Anti-Mykotoxin-Antikörper, die auf einem Dünnschichtwellenleiter aufgebracht werden, affin an auf diesem Dünnschichtwellenleiter immobilisierte Mykotoxine. Ebenso binden auf einem Dünnschichtwellenleiter immobilisierte Anti-Mykotoxin-Antikörper affin an Mykotoxine oder Mykotoxin-Konjugate, die auf den Dünnschichtwellenleiter aufgebracht werden. Die Spezifität der Bindung hängt dabei von den verwendeten Affinitätspartnern ab. So binden verwendbare kreuzreaktive Anti-Mykotoxin-Antikörper affin an die entsprechenden Mykotoxine, beispielsweise der Gruppe der Fumosine, aber weniger spezifisch als beispielsweise ein spezieller Antikörper gegen Fumosin B1 wäre. Bindungspartner, die immobilisiert sind, werden auch als Erkennungselement oder "Fängermoleküle" bezeichnet.
- 30

Anti-Mykotoxin-Antikörper-Konjugate und Mykotoxin-Konjugate sind beispielsweise ausbildbar aus einem Protein und Anti-Mykotoxin-Antikörper oder Mykotoxin.

In bevorzugten Ausführungsformen beispielsweise bei indirekt kompetitiven Assays sind die immobilisierten Bindungspartner Mykotoxin-Konjugate. Mykotoxin-Konjugate sind vorzugsweise ausbildbar aus Mykotoxin gebunden an Proteine, beispielsweise Rinderserumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumine). Von besonderem Vorteil bei der Verwendung eines solchen Mykotoxin-BSA-Konjugats ist, dass eine Verbesserung der Bindung des Mykotoxins an den Dünnschichtwellenleiter über eine Wechselwirkung zwischen Protein und Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren ausgebildet werden kann. Dies kann eine Verbesserung der Haftung der Erkennungselemente an dem Dünnschichtwellenleiter zur Verfügung stellen.

Ein Markierungselement, beispielsweise ein Fluoreszenzfarbstoff oder Fluorophor, kann direkt an einen Bindungspartner, beispielsweise an einen Anti-Mykotoxin-Antikörper oder an ein Mykotoxin gebunden sein, oder über ein spacer-Element, beispielsweise ein Protein oder eine Alkyl- oder Polyethylenglycol-Kette. Das Markierungselement, beispielsweise ein Fluoreszenzfarbstoff oder Fluorophor, ist vorzugsweise über ein Protein an die Mykotoxine gebunden. Ein geeignetes Protein ist beispielsweise BSA. Eine Bindung eines Fluorophors an ein Mykotoxin mittels BSA kann die Bindung des Markierungselements an die Bindungspartner, beispielsweise Antikörper, deutlich verbessern. Ein weiterer Vorteil ergibt sich dadurch, dass aufwändige Verfahren zur direkten Bindung beispielsweise eines Fluorophors an ein Mykotoxin vermieden werden können. Vorzugsweise sind als Bindungspartner für einen immobilisierten Anti-Mykotoxin-Antikörper fluoreszenzmarkierte Mykotoxin-BSA-Konjugate verwendbar, beispielsweise in einem direkt kompetitiven Assay.

Der Nachweis der Mykotoxine kann grundsätzlich in auf einem Dünnschichtwellenleiter aufbringbare Proben, Lösungen oder sonstigen Medien erfolgen. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Proben Nahrungsmittel für Mensch oder Tier. Bevorzugt erfolgt der Nachweis von Mykotoxinen gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren in Getreide, Getreideprodukten, Wein, Säften oder Früchten, und/oder in Getreide, Wein, Säfte und/oder Früchte enthaltenden Produkte. Hierbei kann die zu analysierende Probe beispielsweise ein Nahrungsmittel oder Produkt auf den Dünnschichtwellenleiter aufgebracht werden oder mit einem Lösemittel oder Lösemittelgemisch extrahiert werden und der extrahierter Extrakt verwendet werden. Der Extrakt kann verdünnt oder konzentriert verwendbar sein.

Die Mykotoxine können aus der zu untersuchenden Probe, zum Beispiel Getreide oder andere Nahrungsmittel, durch Behandlung mit einem Lösemittel oder Lösemittelgemisch herausgelöst werden. Beispielsweise können Mykotoxine aus Getreideproben durch Mahlen und anschließende Extraktion mit Wasser oder organischen Lösemitteln oder Lösemittelgemischen, beispielsweise mit Gemischen aus Wasser, das gegebenenfalls mit Puffersubstanzen, Salzen, Säuren oder Basen und anderen Zusät-

zen versetzt sein kann, und organischen Lösemitteln, beispielsweise mit Gemischen aus Wasser und Methanol oder Ethanol oder Wasser und Acetonitril herausgelöst werden. Andere Verfahren, die zur Extraktion der Mykotoxine führen, sind dem Fachmann bekannt. Die erhaltenen, gelösten Mykotoxine können anschließend direkt oder nach Verdünnung oder Anreicherung auf dem Dünnschichtwellenleiter oder Chip analysiert werden.

Verwendbare Erkennungselemente, die auch als "Fängermoleküle" bezeichnet werden, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Anti-Mykotoxin-Antikörper, Anti-Mykotoxin-Antikörper-Konjugate, Mykotoxine und/oder Mykotoxin-Konjugate, vorzugsweise zwei oder mehrere verschiedene, können auf der Dünnschichtwellenleiter- oder Chip-Oberfläche kovalent oder nichtkovalent, beispielsweise durch hydrophobe Adsorption, immobilisiert werden. Ein Immobilisieren kann beispielsweise durch ein als Spotting bezeichnetes Aufbringen der Erkennungselemente in Form von Messfeldern, sogenannten Spots, auf die Dünnschichtwellenleiter- oder Chipoberfläche erfolgen. Vorzugsweise erfolgt ein Spotting von Lösung vorzugsweise von Pufferlösungen, den das oder die Bindungspartner als Erkennungselement enthalten, durch Geräte zum automatischen Aufbringen, sogenannte Spotter. Vorzugsweise werden die Dünnschichtwellenleiter oder Chips nach dem Spotten wenigstens eine Stunde, vorzugsweise einige Stunden inkubiert, so dass die Erkennungselemente auf dem Dünnschichtwellenleiter oder Chip anheften können.

Es ist bevorzugt, dass die Biochips nach dem Spotten für wenigstens eine Stunde, vorzugsweise 2 Stunden bis 6 Stunden, besonders bevorzugt 3 Stunden bis 4 Stunden mit einer Proteinlösung, vorzugsweise einer Lösung eines verwendbaren Blocking-Proteins, beispielsweise BSA, behandelt werden. Nach dem Entfernen der Lösung können die Dünnschichtwellenleiter oder Biochips getrocknet und gelagert werden.

Das Aufbringen der Probe und der vorzugsweise fluoreszent markierten Bindungspartner zu den immobilisierten Erkennungselementen auf dem Dünnschichtwellenleiter, bevorzugt Evaneszent-Feld-Biochip, vorzugsweise einen planaren optischen Wellenleiter-Biochip, kann gleichzeitig oder nacheinander erfolgen. So kann die Zugabe von vorzugsweise fluoreszent markierten Bindungspartnern, beispielsweise von einem oder mehreren vorzugsweise fluoreszenzmarkierten Mykotoxinen, Mykotoxin-Konjugaten oder Antikörpern gegen ein oder mehrere Mykotoxine, vor oder während der Inkubation einer Probe, beispielsweise eines Extrakts auf dem Chip erfolgen. Es kann auch beispielsweise ein Extrakt einer zu untersuchenden Probe im Gemisch mit bevorzugt markierten, vorzugsweise fluoreszenzmarkierten Mykotoxinen, Mykotoxin-Konjugaten oder Antikörpern gegen ein oder mehrere Mykotoxine auf den Chip gegeben werden.

Von besonderem Vorteil ist, dass die Probe gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren weniger als 15 Minuten, vorzugsweise weniger als 10 Minuten, besonders bevorzugt weniger als 5 Minuten,

vor der Detektion des Signals mit den immobilisierten Bindungspartnern als chemisches oder biochemisches Erkennungselement auf dem Dünnschichtwellenleiter und/oder den Bindungspartnern inkubieren kann.

- 5 Diese ermöglicht einen großen Vorteil gegenüber bekannten Verfahren, die Inkubationszeiten mit aufgebrachtem Mykotoxinkonjugat mit einer Lösung von markierten Mykotoxinantikörpern von teilweise bis zu zwei Stunden benötigen, oder gegenüber Verfahren, die Vorinkubationen der Proben mit markierten Anti-Mykotoxin-Antikörpern erfordern. Dies ermöglicht, dass die Bestimmung der Mykotoxine gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren gegenüber bekannten Verfahren deutlich schneller erfolgen kann, Insbesondere kann die Inkubationszeit deutlich verkürzt werden. In
- 10 besonders bevorzugten Ausführungsformen kann die Inkubationszeit unter 10 Minuten oder sogar lediglich 5 Minuten betragen. Insbesondere in Kombination mit dem weiteren Vorteil, dass auf Waschschrte verzichtet werden kann, wird ermöglicht, dass durch das erfindungsgemäße Verfahren ein Ergebnis in weniger als 20 Minuten, vorzugsweise in weniger als 15, besonders bevorzugt in weniger als 10 Minuten vorliegen kann.
- 15 Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können Mykotoxine quantitativ und vorzugsweise mit geringer Variation bestimmt werden. Beispielsweise kann der sogenannte Interlabor-Variationskoeffizient, ein Maß für die Vergleichspräzision, weniger als 50 %, bevorzugt weniger als 40 % betragen. Weiterhin kann der sogenannte Intralabor-Variationskoeffizient, ein Maß für die Wiederholpräzision, weniger als 20 % betragen. Dies ermöglicht die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Rahmen eines standardisierten und einfachen Verfahrens zur
- 20 Bestimmung von Mykotoxinen in Nahrungsmitteln, beispielsweise Getreide, Getreideprodukten oder Wein.

- Nachweisbare Mykotoxine sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Aflatoxine, Ochratoxine, Mutterkornalkaloide, Patulin und/oder Fusarientoxine beispielsweise ausgewählt aus
- 25 der Gruppe umfassend Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Ochratoxin A und/oder Fumonisine. Fumonisine sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Fumonisin B1, Fumonisin B2 und/oder Fumonisin B3.

- Entsprechend sind verwendbare Bindungspartner bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Mykotoxine umfassend Aflatoxine, Ochratoxine, Mutterkornalkaloide, Patulin und/oder Fusarientoxine
- 30 beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Ochratoxin A und/oder Fumonisine und Antikörper gegen Mykotoxine ausgewählt aus der Gruppe umfassend Aflatoxine, Ochratoxine, Mutterkornalkaloide, Patulin und/oder Fusarientoxine beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, HT-2 Toxin und/oder Fumonisine.

Abhängig von der Art des verwendeten Immunoassay werden einer der Bindungspartner, beispielsweise im Fall eines indirekt kompetitiven Immunoassays eines oder mehrere der Mykotoxine, als Erkennungselement auf dem Dünnschichtwellenleiter immobilisiert, während der andere Bindungspartner, beispielsweise im Fall eines indirekt kompetitiven Immunoassays einer oder
5 mehrere der Anti-Mykotoxin-Antikörper, vor oder gleichzeitig mit der Probe, auf den Dünnschichtwellenleiter gegeben werden. hierbei ist der zuzugebende Bindungspartner vorzugsweise lumineszenzfähig markiert, bevorzugt mit einem Fluorophor markiert.

Vorzugsweise sind verwendbare Bindungspartner ausgewählt aus der Gruppe umfassend Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Ochratoxin A und/oder Fumonisin B1,
10 Fumonisin B2 und/oder Fumonisin B3 und Antikörper gegen Mykotoxine ausgewählt aus der Gruppe umfassend aus der Gruppe umfassend Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Ochratoxin A und/oder Fumonisin B1, Fumonisin B2 und/oder Fumonisin B3.

Hierbei sind vorzugsweise monoklonale Antikörper gegen Mykotoxin verwendbar, beispielsweise Anti-Fumonisin B1, Anti-Fumonisin B2 oder Anti-Fumonisin B3. Weiterhin verwendbar sind Antikörper,
15 per, die gegen die Gruppe der Fumosine wirken. Verwendbare Bindungspartner, vorzugsweise Antikörper gegen Mykotoxine, können einzeln oder im Gemisch verwendet werden, weiterhin sind ebenfalls kreuzreaktive Antikörper verwendbar.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ergibt sich daraus, dass Mykotoxine durch das erfindungsgemäße Verfahren mit erhöhter Sensitivität nachweisbar sind. Beispielsweise
20 können Mykotoxine, insbesondere in Nahrungsmitteln für Mensch oder Tier, beispielsweise Getreide, Wein, Säfte, Früchte und/oder Produkte daraus, oder in Extrakten der Nahrungsmittel oder Produkte noch im Bereich nanomolarer oder picomolarer Konzentrationen der Mykotoxine nachweisbar sein. Beispielsweise können Mykotoxine in Getreideextrakt noch im Bereich von 0,1 pM bis 100 nM Mykotoxin, vorzugsweise im Bereich von 1 pM bis 1 nM Mykotoxin, nachgewiesen
25 werden. insbesondere können Konzentrationen von weniger als 1 nM, vorzugsweise von weniger als 100 pM Mykotoxin, bevorzugt von weniger als 10 pM Mykotoxin, besonders bevorzugt weniger als 1 pM Mykotoxin nachweisbar sein.

Weiterhin können Mykotoxine in Getreideextrakt im Bereich von 10^{-4} ppb bis 10000 ppb Mykotoxin, in Getreide im Bereich von 10^{-2} ppb bis 10000 ppb Mykotoxin, nachweisbar sein. Vorzugsweise
30 weise können Mykotoxine in Getreideextrakt im Bereich von $\leq 0,1$ ppb Mykotoxin, bevorzugt im Bereich von $\leq 0,01$ ppb Mykotoxin, besonders bevorzugt im Bereich von $\leq 10^{-4}$ ppb Mykotoxin, in Getreide im Bereich von $\leq 0,1$ ppb Mykotoxin, bevorzugt im Bereich von $\leq 0,01$ ppb Mykotoxin, besonders bevorzugt im Bereich von $\leq 10^{-4}$ ppb Mykotoxin, nachweisbar sein.

Dies ermöglicht außerhalb eines analytischen Labors eine genauere Bestimmung der in Nahrungsmitteln enthaltenen Mykotoxine als bislang möglich.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht, dass man wenigstens zwei Mykotoxine, vorzugsweise 2 bis 1000 Mykotoxine, bevorzugt 5 bis 100 Mykotoxine nachweisen kann. Insbesondere können die Mykotoxine gleichzeitig bestimmt werden. Dies bedeutet einen großen Vorteil gegenüber bekannten Verfahren, die zumeist lediglich den Nachweis eines einzigen Mykotoxins gleichzeitig erlauben.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens zum Nachweis von Mykotoxinen sieht vor, dass man auf der Oberfläche eines Dünnschichtwellenleiters umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), spezifische und/oder affine Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für Mykotoxine und/oder einen Bindungspartner räumlich separiert immobilisiert. Anschließend können die zu analysierende Probe und die vorzugsweise mit einem Fluorophor markierten Bindungspartner gleichzeitig oder aufeinanderfolgend zugegeben werden. Die spezifische und/oder affine Wechselwirkung zwischen den auf dem Dünnschichtwellenleiter immobilisierten Bindungspartnern, den Mykotoxin(en) der Probe und/oder den vorzugsweise mit einem Fluorophor markierten Bindungspartnern kann als Signaländerung im evaneszenten Feld detektiert werden. Die Anwesenheit eines Mykotoxins in der Probe führt dabei zu einer Änderung des Signals im evaneszenten Feld.

Erfindungsgemäß kann der Nachweis der Mykotoxine durch einen Assay, beispielsweise einen Immuno-Assay auf dem Chip erfolgen. Der Nachweis der Mykotoxine erfolgt vorzugsweise in Form eines Immunoassays, bevorzugt eines kompetitiven Immunoassays, beispielsweise eines direkt oder indirekt kompetitiven Immunoassays, besonders bevorzugt in Form eines indirekt kompetitiven Immunoassays.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens zum Nachweis von Mykotoxinen in Form eines direkt kompetitiven Immunoassays kann vorsehen, dass man auf der Oberfläche eines Dünnschichtwellenleiters umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), Anti-Mykotoxin-Antikörper als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für Mykotoxine räumlich separiert immobilisiert. Anschließend können vorzugsweise mit einem Fluorophor markierte Mykotoxine oder vorzugsweise mit einem Fluorophor markierte Mykotoxin-BSA-Konjugate gleichzeitig oder vor der zu analysierenden Probe zugegeben werden. Die Wechselwirkung zwischen den auf dem Dünnschichtwellenleiter immobilisierten Anti-Mykotoxin-Antikörper, den Mykotoxin(en) der Probe und/oder den vorzugsweise mit einem Fluorophor markierten Myko-

toxine oder Mykotoxin-BSA-Konjugate kann als Signaländerung im evaneszenten Feld detektiert werden.

Im Falle eines direkten kompetitiven Immuno-Assays können, vorzugsweise zwei oder mehrere verschiedene, Anti-Mykotoxin-Antikörper auf der Chip-Oberfläche kovalent oder nichtkovalent immobilisiert werden, beispielsweise durch Spotting. Wird beispielsweise ein Extrakt einer zu untersuchenden Probe im Gemisch mit vorzugsweise fluoreszenzmarkierten Mykotoxinen oder Mykotoxin-Konjugaten auf den Chip gegeben, kommt es zur Konkurrenz der markierten und unmarkierten Mykotoxine bzw. Mykotoxin-Konjugate um die auf dem Chip verfügbaren Antikörper-Bindungsstellen. Die Zugabe der fluoreszenzmarkierten Mykotoxine kann vor oder während der Inkubation des Extrakts auf dem Chip erfolgen. Die Menge der an die immobilisierten Antikörper gebundenen markierten Mykotoxine ist umgekehrt proportional zu der im Extrakt befindlichen Menge an Mykotoxinen.

Der Nachweis kann auch in Form eines Sandwich-Assays ausgeführt werden. In diesem Fall werden anstelle der markierten Mykotoxine oder Mykotoxin-Konjugate markierte Detektionsantikörper verwendet, die an einen immobilisierten Komplex aus auf dem Chip immobilisierten Antikörper und Mykotoxin binden. Beim Sandwich-Assay ist die Menge der an die Antikörper gebundenen Fluorophore proportional zu der Konzentration der Mykotoxine im Extrakt.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens zum Nachweis von Mykotoxinen in Form eines indirekt kompetitiven Immunoassays kann vorsehen, dass man auf der Oberfläche eines Dünnschichtwellenleiters umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), Mykotoxine oder vorzugsweise mit einem Fluorophor markierte Mykotoxin-BSA-Konjugate als chemisches oder biochemisches Erkennungselement räumlich separiert immobilisiert. Anschließend können vorzugsweise mit einem Fluorophor markierte Anti-Mykotoxin-Antikörper gleichzeitig oder vor der zu analysierenden Probe zugegeben werden. Die Wechselwirkung zwischen den auf dem Dünnschichtwellenleiter immobilisierten Mykotoxinen oder vorzugsweise mit einem Fluorophor markierte Mykotoxin-BSA-Konjugate, den Mykotoxin(en) der Probe und/oder den vorzugsweise mit einem Fluorophor markierten Anti-Mykotoxin-Antikörper kann als Signaländerung im evaneszenten Feld detektiert werden.

Erfindungsgemäß kann der Nachweis der Mykotoxine auch durch einen indirekten, kompetitiven Immuno-Assay erfolgen. In diesem Fall können Mykotoxine oder Mykotoxin-Konjugate, beispielsweise Mykotoxin-Protein-Konjugate, vorzugsweise Mykotoxin-BSA-Konjugate, auf dem Chip immobilisiert werden. Wird ein Extrakt einer zu untersuchenden Probe im Gemisch mit vorzugsweise fluoreszenzmarkierten Anti-Mykotoxin-Antikörpern auf den Chip gegeben, kommt es zur Konkurrenz

on der immobilisierten und der in Lösung befindlichen Mykotoxine um die verfügbaren Bindungsstellen der fluoreszenzmarkierten Antikörper. Die Zugabe der fluoreszenzmarkierten Anti-Mykotoxin-Antikörper kann vor oder während der Inkubation des Extrakts auf dem Chip erfolgen. Die Menge der gebundenen markierten Antikörper ist in diesem Fall umgekehrt proportional zu der
5 im Extrakt befindlichen Menge an Mykotoxinen.

Weiterhin ist von Vorteil, dass die Detektion des Signals im Evaneszentfeld mittels eines Auslesegeräts erfolgen kann. Das Auslesegerät kann beispielsweise ein robustes und kostengünstiges Auslesegerät sein.

Die Auswertung der Signalintensität, beispielsweise der Fluoreszenzintensität kann mittels einer
10 geeigneten Software erfolgen, ebenso wie die Berechnung der in der Probe vorliegenden Menge der Mykotoxine.

Die zur Verfügung gestellten Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere eine Kombination eines einfach durchführbaren Verfahrens, der Möglichkeit gleichzeitig mehrere Mykotoxine quantitativ auf einem robusten und kostengünstigen Auslesegerät nachweisen zu können,
15 ermöglicht einen einfachen und schnellen Nachweis von Mykotoxinen außerhalb eines analytischen Labors.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von Mykotoxinen.

Die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis von Mykotoxinen weist einen
20 Dünnschichtwellenleiter, bevorzugt einen planaren optischen Wellenleiter-Biochip auf, der auf einem Dünnschichtwellenleiter basiert, umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a). Vorzugsweise sind die Erkennungselemente auf der Schicht (a) immobilisiert.

25 Geeignete planare optische Wellenleiter sind beispielsweise in der WO 01/92870 oder in US 5,959,292 beschrieben.

In bevorzugten Ausführungsformen der Vorrichtung kann die optisch transparente Schicht (b) des Dünnschichtwellenleiters, vorzugsweise planaren optischen Wellenleiter-Biochips, aus Silikaten wie Glas oder Quarz oder aus einem transparenten Kunststoff, bevorzugt ausgewählt aus der
30 Gruppe umfassend Polycarbonate, Polyimide, Polymethacrylate, Polystyrene, zyklische Polyolefine, und/oder zyklische Polyolefin-Copolymere vorzugsweise aus zyklischen Polyolefinen oder

zyklischen Polyolefin-Copolymeren, ausgebildet sein. Geeignete Kunststoffe zur Herstellung der optisch transparenten Schicht (b) sind beispielsweise in der WO 03/020488 beschrieben.

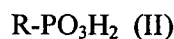
Bevorzugt sind transparente thermoplastische oder spritzbare Kunststoffe, beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polycarbonat, Polyimid, Acrylat, insbesondere Polymethylmethacrylat, oder Polystyrol.

In bevorzugten Ausführungsformen der Vorrichtung kann die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) Oxide ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 und/oder ZrO_2 , bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , Ta_2O_5 und/oder Nb_2O_5 umfassen. Es sind auch Kombinationen mehrerer derartiger Oxide verwendbar. Vorzugsweise ist eine optisch transparente wellenleitende Schicht (a) aus TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 oder ZrO_2 , bevorzugt TiO_2 , Ta_2O_5 oder Nb_2O_5 ausgebildet. Insbesondere hat sich die Verwendung von Tantalpentoxid als vorteilhaft herausgestellt.

In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der Dünnschichtwellenleiter, insbesondere auf der optisch transparenten Schicht enthaltend Oxide ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 und/oder ZrO_2 , Mono- oder Mehrfachschichten von Organophosphorsäuren gemäß der nachstehenden Formel (I)



und/oder Organophosphonsäuren gemäß der nachstehenden Formel (II)



und/oder deren Salze, wobei

R steht für Alkyl mit C_{10} bis C_{24} .

Bevorzugt verwendbar sind Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren, vorzugsweise Organophosphate und/oder Organophosphonate mit R ist ausgewählt aus der Gruppe umfassend unverzweigtes Alkyl mit C_{10} bis C_{20} , vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend unverzweigtes Alkyl mit C_{12} bis C_{18} , bevorzugt Dodecylphosphorsäure, Dodecylphosphat, Octadecylphosphonat und/oder Octadecylphosphonsäure.

Vorzugsweise sind Organophosphorsäuren bzw. Organophosphate, die in Form wasserlöslicher Salze aus wässriger Lösung auf den Dünnschichtwellenleiter aufgebracht werden können.

In bevorzugten Ausführungsformen sind die Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren, vorzugsweise Organophosphate, in Form einer Monoschicht auf den Dünnschichtwellenleiter, insbesondere einen Evaneszent-Feld-Biochip, vorzugsweise einen planaren optischen Wellenleiter-Biochip, aufgebracht.

- 5 Die Monoschicht oder Monolayer kann als eine Haftvermittlungsschicht auf die optisch transparente Schicht ausgebildet aus Oxiden aufgebracht werden. Vorteilhafter Weise können Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren mit Erkennungselementen, insbesondere mit an Trägerproteine gekoppelten Erkennungselementen wechselwirken und die Bindung der Erkennungselemente an den Biochip verstärken.
- 10 In einer bevorzugten Form der Vorrichtung sind die Organophosphorsäuren und/oder Organophosphonsäuren, vorzugsweise Organophosphate, auf dem Dünnschichtwellenleiter vorzugsweise auf der optisch transparenten Schicht ausgebildet aus Oxiden in Form einer Haftvermittlungsschicht aufgebracht. Die Haftvermittlungsschicht kann die Bindung der Erkennungselemente an den Dünnschichtwellenleiter oder Biochip verstärken.
- 15 Es ist bevorzugt, dass die Haftvermittlungsschicht eine Dicke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, aufweist.

Vorzugsweise erfolgt die Einkopplung des Anregungslichtes in die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) unter Verwendung von einer oder mehreren Gitterstrukturen.

- Vorzugsweise ist die Gitterstruktur ein Reliefgitter mit beliebigem Profil, beispielsweise mit
- 20 Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil, oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a). Die Gitterstruktur kann auch ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode sein oder ein multidiffraktives Gitter. Die Gitterstruktur kann eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweisen
 - 25

- Es ist bevorzugt, dass die zur Einkopplung des Anregungslichtes verwendbaren Gitterstrukturen eine Periode im Bereich von 200 nm bis 1000 nm, vorzugsweise im Bereich von 200 nm bis 400 nm aufweisen. Es ist weiterhin bevorzugt, dass die Modulationstiefe des Gitters im Bereich von 3 nm bis 60 nm, vorzugsweise im Bereich von 10 nm bis 40 nm liegt. Es wird bevorzugt, dass das
- 30 Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten wellenleitenden Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,4 ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die Brechungsindexmo-

dulation sowohl an der Grenzfläche zwischen Schicht a und Schicht b als auch an der Grenzfläche von Schicht a zum Analysenmedium ausgeprägt ist.

Vorzugsweise weist die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) eine Dicke im Bereich von 40 nm bis 1000 nm, bevorzugt im Bereich von 40 nm bis 300 nm, noch bevorzugter im Bereich von 80 nm bis 200 nm, auf.

Der Unterschied in den Brechungsindizes zwischen Schicht (a) und (b) beträgt vorzugsweise $\geq 0,2$, bevorzugt $\geq 0,5$, und liegt noch bevorzugter bei 0,56.

Die Wellenlänge des Anregungslichts liegt vorzugsweise im Bereich von 300 nm bis 1100 nm, bevorzugt im Bereich von 300 nm bis 800 nm, noch bevorzugter im Bereich von 500 nm bis 700 nm.

Geeignetes Anregungslicht kann über eine Gitterstruktur eingekoppelt werden, an welche sich in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Lichts ein unmodulierter Bereich der Schicht (a) mit einer darauf befindlichen Vielzahl von Messbereichen in einem Array anschließt, auf denen der Nachweis der verschiedenen Mykotoxine erfolgt. Daran kann sich in der Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts vorteilhaft eine oder mehrere weitere Gitterstrukturen mit einem dahinter befindlichen weiteren Array von Messbereichen anschließen. Alternativ können sich die Messbereiche eines Arrays oder auch einer Vielzahl von Arrays auf dem modulierten Bereich der Schicht (a) befinden.

Es wird bevorzugt, dass jedem in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts nachfolgenden Array von Messbereichen eine für dieses Array spezifische Gitterstruktur zur Auskoppelung dieses Anregungslichts zugeordnet ist, wobei senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts die Gitterstrukturen spezifisch für einzelne Arrays ausgebildet sein können oder sich auch über den gesamten Dünnschichtwellenleiter in dieser Richtung erstrecken können.

Die Vorrichtung kann eine sehr große Anzahl einzelner Messfelder aufweisen. In bevorzugten Ausführungsformen der Vorrichtung sind die spezifischen und/oder affinen Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement in Form von bis zu 100.000 Messfeldern oder "Spots" in einer zweidimensionalen Anordnung aufgebracht, wobei ein Messfeld oder Spot bevorzugt eine Fläche im Bereich von $0,001 \text{ mm}^2$ bis 6 mm^2 , vorzugsweise im Bereich von $0,1 \text{ mm}^2$ bis 1 mm^2 aufweist. Bevorzugt sind mehr als 10, bevorzugt mehr als 50 Messfelder pro Quadratzentimeter auf dem Dünnschichtwellenleiter oder Biochip aufgebracht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zum Nachweis von Mykotoxinen. Der Kit enthält wenigstens einen Dünnschichtwellenleiter umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), auf dem spezifische und/oder affine Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für Mykotoxine und/oder einen Bindungspartner räumlich separiert immobilisiert sind.

Der Kit kann weiterhin wenigstens ein Reagenz umfassend vorzugsweise markierte Bindungspartner enthalten. Der Kit kann auch mehrere Reagenzien umfassend vorzugsweise markierte Bindungspartner enthalten oder ein Reagenz enthaltend ein Gemisch verschiedener markierte Bindungspartner. Der Kit kann weiterhin Puffer und/oder Lösemittel enthalten, die zur Durchführung des Nachweises nach einem der vorherigen Ansprüche benötigt werden. Es kann auch vorgesehen sein, dass der Kit eine Detektionseinheit umfasst.

Die Kits sind zum Schnell-Nachweis von Mykotoxinen verwendbar.

Ein Beispiel, das der Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung dient, ist nachstehend angegeben.

Beispiel 1

Ermittlung einer Standardkurve zur Messung von Zearalenon in einem indirekt kompetitiven Immuno-Assay auf einem Evaneszent-Feld-Biochip

5 Sieben Biochips (Firma Unaxis, Liechtenstein) mit den Außenmaßen 1 cm x 2 cm aus Glas, in das ein optisches Gitter mit einer Gittertiefe von 18 nm eingeschrieben war, versehen mit einer Schicht von 155 nm von Tantalpentoxid, wurden mit Octadecylphosphonsäure durch eintauchen in eine 500 μ M Lösung von Octadecylphosphonsäure in n-Heptan/Isopropanol im Verhältnis 9:1 beschichtet. Mit Hilfe eines Spotters des Typs "Biochip Arrayer" (Perkin Elmer, Deutschland) wurden Konjugate aus Zearalenon und Bovinem Serum Albumin (ZEA-BSA, Verhältnis ZEA:BSA = 10 50:1, hergestellt von der Fa. Biopure, Tulln, Österreich) sowie mit dem Farbstoff DyLight 647 (Pierce, Deutschland) markierte BSA-Moleküle (DyLight 647-BSA) auf den Biochip aufgebracht. Die Spotting-Lösungen enthielten DyLight 647-BSA in einer Konzentration von 5×10^{-4} mg/ml in PBS (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) mit 0,1% BSA und 0,1% Tween 20, BSA-ZEA-Konjugat der Konzentration 0,5 mg/ml in PBS mit 0,1% BSA und 15 0,1% Tween 20. Die Spots wurden in Form neuen alternierender Reihen von jeweils 10 DyLight 647-BSA-Spots und BSA-ZEA-Konjugat-Spots in Form zweier Felder (Arrays) auf den Chip aufgebracht.

Die Spots wurden über Nacht bei hoher Luftfeuchte (40%) inkubiert, anschließend behandelte man die Biochips für 4 Stunden mit einer 3%igen Lösung von BSA in PBS. Auf die Chips wurden 20 Meßkammern aufgebracht, sodass auf jedem Chip zwei Arrays mit getrennten Reaktionskammern gebildet wurden. Man bereitete wässrige Lösungen von Zearalenon in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0 μ g/l bis 31 μ g/l und versetzte diese mit einem monoklonalen Anti-Zearalenon-Antikörper (Biotez, Berlin), der mit DyLight 647 markiert war, sodass man jeweils eine 1nM Lösung des Antikörpers erhielt.

25 Die Mischungen unterschiedlicher Konzentrationen wurden jeweils in die Messkammern gegeben und die Biochips wurden ohne weitere Behandlungsschritte innerhalb von maximal zehn Minuten auf einem Fluoreszenz-Auslesegerät "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Deutschland) vermessen. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten für jeden Zearalenon-Spot wurden durch den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten des oberhalb und unterhalb des jeweiligen Spots gelegenen 30 DyLight 647-BSA-Spots dividiert. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller 40 Spots eines Arrays wurden ermittelt. Die erhaltenen konzentrationsabhängigen Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Origin 7G (Origin Lab Corporation, USA) durch einen sigmoidalen Fit angepasst.

Es konnte festgestellt werden, dass in einem Bereich von 0,4 ppb bis 4 ppb Zearalenon, entsprechend 80% bzw. 20% der maximalen Fluoreszenzintensität in der angepaßten sigmoidalen Kurve, entsprechend einem Bereich von 1 nM bis 10 nM der eingesetzten ZEA-Konzentration in der Lösung eine Quantifizierung der ZEA-Konzentration durch Auswertung der Fluoreszenzintensität der Proben ermöglicht wurde.

Beispiel 2

Ermittlung einer Standardkurve zur Messung von Deoxynivalenol (DON) und Messung einer kontaminierten Futtergetreide-Probe

15 Biochips (Firma Unaxis, Liechtenstein) mit den Außenmaßen 1 cm x 2 cm aus Glas, in das ein optisches Gitter (Gittertiefe 18 nm) eingeschrieben war, versehen mit einer Schicht (155 nm) von Tantalpentoxid, wurden mit Octadecylphosphonsäure (durch Eintauchen in eine Lösung von Octadecylphosphonsäure in n-Heptan/Isopropanol 9:1) beschichtet. Mit Hilfe eines Spotters des Typs Nanoplotter (GeSiM, Deutschland) wurden Konjugate aus Deoxynivalenol und Bovinem Serum Albumin (DON-BSA, Verhältnis DON:BSA = 100:1, hergestellt von der Fa. Biopure, Tulln, Österreich) sowie Hunde-IgG (dog-IgG, Rockland, USA) auf den Biochip aufgebracht. Die Spotting-Lösungen bestanden aus Hunde-IgG in einer Konzentration von 0,2 mg/ml in PBS (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) mit Trehalose sowie aus BSA-DON-Konjugat der Konzentration 1 mg/ml in PBS mit Trehalose. Die Spots wurden in Form zweier Reihen von jeweils 12 Hunde-IgG-Spots und einer dazwischen liegenden Reihe von 12 BSA-DON-Konjugat-Spots in Form zweier Felder (Arrays) auf den Chip aufgebracht.

Die Spots wurden 1h bei 37°C inkubiert, anschließend behandelte man die Biochips für bis zu 4 Stunden mit einer Lösung von BSA in PBS. Auf die Chips wurden Meßkammern aufgebracht, sodass auf jedem Chip zwei Arrays mit getrennten Reaktionskammern gebildet wurden. Man extrahierte 5g nichtkontaminiertes Weizenmehl mit einer Lösung von 70% Methanol in Wasser (v/v) durch Schütteln für 5 min. Der Extrakt wurde zentrifugiert und anschließend mit einem Tris-Citrat-Puffer (pH 7,4), der BSA, Casein, fettarmes Trockenmilchpulver, Tween 20, Polyethylenglycol und Sucrose enthielt, im Verhältnis 1:4 v/v (Extrakt:Puffer) verdünnt. Man bereitete Lösungen von Deoxynivalenol in verschiedenen Konzentrationen (15 bis 150 µg/l) und versetzte diese mit einem monoklonalen Anti-Deoxynivalenol-Antikörper, der mit DyLight 647 markiert war sowie mit einem monoklonalen Ziege-Anti-Hunde-IgG Antikörper, der ebenfalls mit DyLight 647 markiert war, sodass man jeweils eine 1nM Lösung des Antikörpers erhielt.

Die Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen wurden jeweils in die Messkammern gegeben und die Biochips wurden ohne weitere Behandlungsschritte innerhalb von maximal zehn Minuten

auf einem Fluoreszenz-Auslesegerät „Minifluo IV“ (Bayer Technology Services, Deutschland) vermessen. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten für jeden Deoxynivalenol-Spot wurden durch den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten des oberhalb und unterhalb des jeweiligen Spots gelegenen Hunde-IgG-Spots dividiert. Die normierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller 12 DON-Spots eines Arrays wurden ermittelt. Die erhaltenen konzentrationsabhängigen, normierten Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe eines Computerprogramms durch einen potentiellen Fit angepasst.

Analog zu dem oben dargestellten Extraktionsverfahren wurden 5g einer mit DON kontaminierten Futtergetreidemehl-Probe (Fa Coring, Deutschland, zertifiziert 526 ppb DON) extrahiert und der Extrakt verdünnt. 300 µl des verdünnten Extraktes wurden mit einem monoklonalen Anti-Deoxynivalenol-Antikörper, der mit DyLight 647 markiert war sowie mit einem monoklonalen Ziege-Anti-Hunde-IgG Antikörper, der ebenfalls mit DyLight647 markiert war versetzt, sodass man jeweils eine 1nM Lösung des Antikörpers erhielt. Jeweils 100 µl der Lösung wurden in eine Messkammer gegeben und die Biochips wurden ohne weitere Behandlungsschritte innerhalb von maximal zehn Minuten auf einem Fluoreszenz-Auslesegerät „Minifluo IV“ (Bayer Technology Services, Deutschland) vermessen. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten für jeden Deoxynivalenol-Spot wurden durch den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten des oberhalb und unterhalb des jeweiligen Spots gelegenen Hunde-IgG-Spots dividiert. Die normierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller 12 DON-Spots eines Arrays wurden ermittelt. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden mithilfe der oben beschriebenen Standardkurve in DON-Konzentrationen im Futtergetreidemehl umgerechnet, wobei ein durchschnittlicher Wert über die drei Messungen von 590 ppb erhalten wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Schnell-Nachweis von Mykotoxinen, umfassend die folgenden Schritte:

- 5 a) Bereitstellen eines Dünnschichtwellenleiters umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), auf dem spezifische und/oder affine Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für Mykotoxine und/oder einen Bindungspartner räumlich separiert immobilisiert werden,
- 10 b) Aufbringen einer Mykotoxin(e) enthaltenden Probe und von Bindungspartnern zu den immobilisierten Bindungspartnern auf dem Dünnschichtwellenleiter,
- c) Detektieren eines Signals im Evaneszentfeld aufgrund der Wechselwirkung der auf dem Dünnschichtwellenleiter immobilisierten Bindungspartnern mit den Mykotoxinen aus der Probe und/oder den Bindungspartnern,
- d) Bestimmen der in der Probe vorliegenden Menge an Mykotoxin(en).

15 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass man auf den Dünnschichtwellenleiter Mono- oder Mehrfachschichten von Organophosphorsäuren gemäß der nachstehenden Formel (I)



und/oder Organophosphonsäuren gemäß der nachstehenden Formel (II)



und/oder deren Salze aufbringt, wobei

R steht für Alkyl mit C₁₀ bis C₂₄.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Organophosphorsäuren, Organophosphonsäuren, Organophosphate und/oder Organophosphonate mit R ist
25 ausgewählt aus der Gruppe umfassend unverzweigtes Alkyl mit C₁₀ bis C₂₀, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend unverzweigtes Alkyl mit C₁₂ bis C₁₈, bevorzugt Organophosphorsäuren, Organophosphonsäuren, Organophosphate und/oder Organophosphonate ausgewählt aus der Gruppe umfassend Dodecylphosphorsäure, Dodecylphosphat, Octadecylphosphonat und/oder Octadecylphosphonsäure, verwendet.

4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass man einen Dünnschichtwellenleiter umfassend eine optisch transparente wellenleitende Schicht (a) umfassend Oxide ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 und/oder ZrO_2 , bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend TiO_2 , Ta_2O_5 und/oder Nb_2O_5 verwendet.
5
5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Bindungspartner auswählt aus der Gruppe umfassend Anti-Mykotoxin-Antikörper, Anti-Mykotoxin-Antikörper-Konjugate, Mykotoxine, Mykotoxin-Konjugate, Fragmente von Anti-Mykotoxin-Antikörpern, Mykotoxin-bindende Peptide, Mykotoxin-bindende Anticaline, 10 Mykotoxin-bindende Aptamere, Mykotoxin-bindende Spiegelmere und/oder Mykotoxin-bindende imprinted Polymers, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Anti-Mykotoxin-Antikörper, Anti-Mykotoxin-Antikörper-Konjugate, Mykotoxine und/oder Mykotoxin-Konjugate.
6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass man ein 15 Markierungselement, vorzugsweise ein Fluorophor, mittels eines Proteins, vorzugsweise mittels Rinderserumalbumin an Mykotoxine bindet.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Probe ein Nahrungsmittel für Mensch oder Tier, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend Getreide, Wein, Säfte, Früchte und/oder Getreide, Wein, Säfte und/oder Früchte enthaltende Produkte, oder ein mit einem Lösemittel oder Lösemittelgemisch extrahierter Ex- 20 trakt der Nahrungsmittel oder Produkte ist.
8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Probe weniger als 15 Minuten, vorzugsweise weniger als 10 Minuten vor der Detektion des Signals mit den immobilisierten Bindungspartnern als chemisches oder biochemisches 25 Erkennungselement und/oder den Bindungspartnern inkubiert.
9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mykotoxine ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Aflatoxine, Ochratoxine, Mutterkornalkaloide, Patulin und/oder Fusarientoxine beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, HT-2 Toxin und/oder Fumonisin, 30 sine, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Ochratoxin A, Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenon, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Fumonisin B1, Fumonisin B2 und/oder Fumonisin B3.

10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Mykotoxine in Getreideextrakt noch im Bereich von 0,1 pM bis 100 nM Mykotoxin, vorzugsweise im Bereich von 1 pM bis 1 nM Mykotoxin, nachweist.
11. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass man den Nachweis in Form eines Immunoassays, bevorzugt eines kompetitiven Immunoassays, besonders bevorzugt eines indirekten kompetitiven Immunoassays führt.
12. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zum Schnell-Nachweis von Mykotoxinen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung einen Dünnschichtwellenleiter umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), aufweist.
13. Vorrichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die optisch transparente Schicht (b) des Dünnschichtwellenleiters umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), aus Silikaten wie Glas oder Quarz oder aus einem transparenten Kunststoff, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe umfassend Polycarbonate, Polyimide, Polymethacrylate, Polystyrene, zyklische Polyolefine und/oder zyklische Polyolefin-Copolymere, vorzugsweise aus zyklischen Polyolefinen, ausgebildet ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) eine Dicke im Bereich von 40 nm bis 1000 nm, bevorzugt im Bereich von 40 nm bis 300 nm, noch bevorzugter im Bereich von 80 nm bis 200 nm aufweist.
15. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Einkopplung des Anregungslichtes in die optisch transparente wellenleitende Schicht (a) unter Verwendung von einer oder mehreren Gitterstrukturen erfolgt.
16. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Einkopplung von Anregungslicht verwendbare Gitterstrukturen eine Periode im Bereich von 200 nm bis 1000 nm, vorzugsweise im Bereich von 200 nm bis 400 nm aufweisen.
17. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Modulationstiefe des Gitters im Bereich von 3 nm bis 60 nm, vorzugsweise im Bereich von 10 nm bis 40 nm liegt.

18. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Wellenlänge des Anregungslichts im Bereich von 300 nm bis 1100 nm, bevorzugt im Bereich von 300 nm bis 800 nm, noch bevorzugter im Bereich von 500 nm bis 700 nm liegt.
19. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass auf dem Dünnschichtwellenleiter Mono- oder Mehrfachschichten von Organophosphorsäuren gemäß der nachstehenden Formel (I)



und/oder Organophosphonsäuren gemäß der nachstehenden Formel (II)



- und/oder deren Salzen, wobei

R für Alkyl mit C₁₀ bis C₂₄ steht

aufgebracht sind.

20. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Erkennungselemente in Form von bis zu 100.000 Messfeldern in einer zweidimensionalen Anordnung aufgebracht sind, wobei ein Messfeld bevorzugt eine Fläche im Bereich von 0,001 mm² bis 6 mm², vorzugsweise im Bereich von 0,1 mm² bis 1 mm² aufweist.
21. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass mehr als 10, bevorzugt mehr als 50 Messfelder pro Quadratzentimeter auf dem Dünnschichtwellenleiter aufgebracht sind.
22. Kit zum Schnell-Nachweis von Mykotoxinen, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Kit wenigstens einen Dünnschichtwellenleiter umfassend eine erste optisch transparente wellenleitende Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b), wobei (b) einen niedrigeren Brechungsindex besitzt als (a), auf dem spezifische und/oder affine Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für Mykotoxine und/oder einen Bindungspartner räumlich separiert immobilisiert sind, enthält.
23. Kit nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Kit ein Reagenz umfassend vorzugsweise fluoreszenzmarkierte Bindungspartner enthält.
24. Verwendung eines Kits nach einem der vorherigen Ansprüche zum Schnell-Nachweis von Mykotoxinen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/012000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/77 G01N33/543 G01N33/569

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIGLER FRANCES S ET AL: "Array biosensor for detection of toxins." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY OCT 2003, vol. 377, no. 3, October 2003 (2003-10), pages 469-477, XP002430514 ISSN: 1618-2642	1,5, 7-11, 22-24
Y	the whole document ----- -/-	2-4,6

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

Date of the actual completion of the international search

23 April 2007

Date of mailing of the international search report

07/05/2007

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schlegel, Birgit

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/012000

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/20873 A (ZEPTOSENS AG [CH]; HOFER ROLF [CH]; PAWLAK MICHAEL [DE]; TEXTOR MARCUS) 14 March 2002 (2002-03-14)	12-21
Y	page 1, paragraph 1 - page 2, paragraph 2 page 6, paragraph 5 - page 7, paragraph 3 page 10, paragraph 3 - page 11, paragraph 6 page 16, paragraph 6 - page 17, paragraph 2 page 29, paragraph 4 - paragraph 5 page 30, paragraph 6 - page 31, paragraph 3 example 3 abstract	2-4
T	MARK J FELDSTEIN ET AL: "Array Biosensor: Optical and Fluidics Systems" BIOMEDICAL MICRODEVICES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 1, no. 2, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 139-153, XP019205048 ISSN: 1572-8781 page 139, column 2, paragraph 3 - page 141, column 2, paragraph 1	1-24
Y	WO 00/43552 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY RES COR [US]; VO DINH TUAN [US] UT BATTELLE LLC) 27 July 2000 (2000-07-27) page 32, paragraph 4	6
A	NGUNDI MIRIAM M ET AL: "Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages." ANALYTICAL CHEMISTRY 1 JAN 2005, vol. 77, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 148-154, XP002430515 ISSN: 0003-2700 cited in the application the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/012000

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0220873	A	14-03-2002	AU 8985901 A	22-03-2002
			EP 1315968 A2	04-06-2003
			US 2003186914 A1	02-10-2003
WO 0043552	A	27-07-2000	AU 2740000 A	07-08-2000
			CA 2358699 A1	27-07-2000
			EP 1151139 A2	07-11-2001
			US 6743581 B1	01-06-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/012000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N21/77 G01N33/543 G01N33/569

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LIGLER FRANCES S ET AL: "Array biosensor for detection of toxins." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY OCT 2003, Bd. 377, Nr. 3, Oktober 2003 (2003-10), Seiten 469-477, XP002430514 ISSN: 1618-2642	1,5, 7-11, 22-24
Y	das ganze Dokument ----- -/-	2-4,6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. April 2007

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/05/2007

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Schlegel, Birgit

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/20873 A (ZEPTOSENS AG [CH]; HOFER ROLF [CH]; PAWLAK MICHAEL [DE]; TEXTOR MARCUS) 14. März 2002 (2002-03-14)	12-21
Y	Seite 1, Absatz 1 - Seite 2, Absatz 2 Seite 6, Absatz 5 - Seite 7, Absatz 3 Seite 10, Absatz 3 - Seite 11, Absatz 6 Seite 16, Absatz 6 - Seite 17, Absatz 2 Seite 29, Absatz 4 - Absatz 5 Seite 30, Absatz 6 - Seite 31, Absatz 3 Beispiel 3 Zusammenfassung	2-4
T	MARK J FELDSTEIN ET AL: "Array Biosensor: Optical and Fluidics Systems" BIOMEDICAL MICRODEVICES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, Bd. 1, Nr. 2, 1. Dezember 1998 (1998-12-01), Seiten 139-153, XP019205048 ISSN: 1572-8781 Seite 139, Spalte 2, Absatz 3 - Seite 141, Spalte 2, Absatz 1	1-24
Y	WO 00/43552 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY RES COR [US]; VO DINH TUAN [US] UT BATTELLE LLC) 27. Juli 2000 (2000-07-27) Seite 32, Absatz 4	6
A	NGUNDI MIRIAM M ET AL: "Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages." ANALYTICAL CHEMISTRY 1 JAN 2005, Bd. 77, Nr. 1, 1. Januar 2005 (2005-01-01), Seiten 148-154, XP002430515 ISSN: 0003-2700 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/012000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0220873	A	14-03-2002	AU	8985901 A	22-03-2002
			EP	1315968 A2	04-06-2003
			US	2003186914 A1	02-10-2003
WO 0043552	A	27-07-2000	AU	2740000 A	07-08-2000
			CA	2358699 A1	27-07-2000
			EP	1151139 A2	07-11-2001
			US	6743581 B1	01-06-2004