

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 299/2013
(22) Anmeldetag: 12.04.2013
(43) Veröffentlicht am: 15.08.2014

(51) Int. Cl.: **G01N 21/64** (2006.01)
G01N 21/55 (2014.01)

(56) Entgegenhaltungen:
DE 69531125 T2
JP H1078390 A
JP 2010243267 A
WO 2011019713 A1

(71) Patentanmelder:
JOANNEUM RESEARCH
FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH
8010 GRAZ (AT)

(72) Erfinder:
Gilli Eduard Dr.
8010 Graz (AT)
Reil Frank Dr.
8043 Graz (AT)
Köstler Stefan Dr.
8010 Graz (AT)
Schmidt Volker Dr.
8212 Pischelsdorf 463 (AT)

(74) Vertreter:
CUNOW PATENTANWALTS KG
WIEN

(54) **Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung sowie Verfahren zur Detektion**

(57) Eine Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) umfassend eine Lichtquelle (2) zur Generierung von linear polarisiertem Anregungslicht (4), wenigstens ein Prisma (6) mit dessen Basisfläche (7) ein Träger für ein anzuregendes oder zu analysierendes Material verbunden ist, sowie eine parallel zu dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material angeordnete Detektionseinheit (13) ist dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Prisma (6) und der Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material als einstückiger Mikrochip (15) ausgebildet sind, wobei eine Basisfläche (7) des Prismas (6) ausbildende Seite des Mikrochips (15) den Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material ausbildet, auf welcher das anzuregende bzw. zu analysierende Material im Bereich der Totalreflexion des Anregungslichts (4) angeordnet ist und dass beide Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) im Brewster-Winkel (θ_B) zum Anregungslicht (4) angeordnet sind sowie Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) umfassend eine Lichtquelle (2) zur Generierung von linear polarisiertem Anregungslicht (4), wenigstens ein Prisma (6) mit dessen Basisfläche (7) ein Träger für ein anzuregendes oder zu analysierendes Material verbunden ist, sowie eine parallel zu dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material angeordnete Detektionseinheit (13), dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Prisma (6) und der Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material als einstückiger Mikrochip (15) ausgebildet sind, wobei eine Basisfläche (7) des Prismas (6) ausbildende Seite des Mikrochips (15) den Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material ausbildet, auf welcher das anzuregende bzw. zu analysierende Material im Bereich der Totalreflexion des Anregungslichts (4) angeordnet ist und dass beide Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) im Brewster-Winkel (θ_B) zum Anregungslicht (4) angeordnet sind sowie Verfahren zur Detektion von Fluoreszenzlicht.

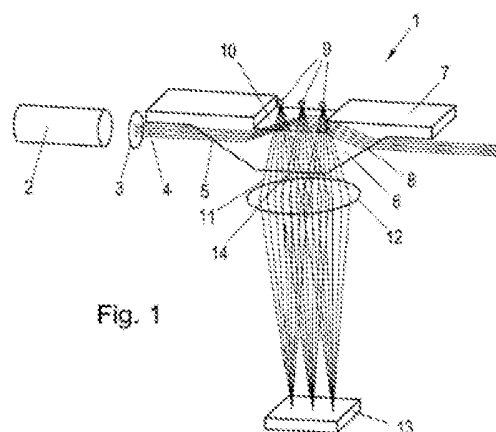
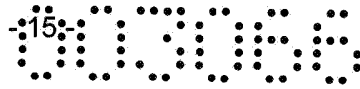


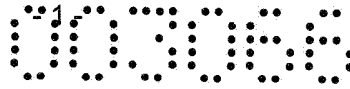
Fig. 1



Zusammenfassung

Eine Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) umfassend eine Lichtquelle (2) zur Generierung von linear polarisiertem Anregungslicht (4), wenigstens ein Prisma (6) mit dessen Basisfläche (7) ein Träger für ein anzuregendes oder zu analysierendes Material verbunden ist, sowie eine parallel zu dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material angeordnete Detektionseinheit (13) ist dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Prisma (6) und der Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material als einstückiger Mikrochip (15) ausgebildet sind, wobei eine Basisfläche (7) des Prismas (6) ausbildende Seite des Mikrochips (15) den Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material ausbildet, auf welcher das anzuregende bzw. zu analysierende Material im Bereich der Totalreflexion des Anregungslichts (4) angeordnet ist und dass beide Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) im Brewster-Winkel (θ_B) zum Anregungslicht (4) angeordnet sind sowie Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) umfassend eine Lichtquelle (2) zur Generierung von linear polarisiertem Anregungslicht (4), wenigstens ein Prisma (6) mit dessen Basisfläche (7) ein Träger für ein anzuregendes oder zu analysierendes Material verbunden ist, sowie eine parallel zu dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material angeordnete Detektionseinheit (13), dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Prisma (6) und der Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material als einstückiger Mikrochip (15) ausgebildet sind, wobei eine Basisfläche (7) des Prismas (6) ausbildende Seite des Mikrochips (15) den Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material ausbildet, auf welcher das anzuregende bzw. zu analysierende Material im Bereich der Totalreflexion des Anregungslichts (4) angeordnet ist und dass beide Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) im Brewster-Winkel (θ_B) zum Anregungslicht (4) angeordnet sind sowie Verfahren zur Detektion von Fluoreszenzlicht.

(Fig. 1)



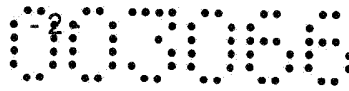
Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung umfassend eine Lichtquelle zur Generierung von linear polarisiertem Anregungslicht, wenigstens ein Prisma mit dessen Basisfläche ein Träger für ein anzuregendes oder zu analysierendes Material verbunden ist, sowie eine parallel zu dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material angeordnete Detektionseinheit, sowie ein Verfahren zur Detektion von Fluoreszenzlicht in einer Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung, eines auf einem mit einer Basisfläche eines Prismas verbundenen Träger angeordneten, anzuregenden oder zu analysierenden Materials, bei welchem linear polarisiertes Licht von einer Anregungslichtquelle auf eine Seitenfläche des Prismas gerichtet wird wobei an der Basisfläche des Prismas das anzuregende oder zu analysierende Material zur Emission von Fluoreszenzlicht unter gleichzeitiger Reflexion des Anregungslichts angeregt wird und das von dem anzuregenden oder zu analysierenden Material ermittelte Fluoreszenzlicht in einer Detektionseinheit ausgewertet wird.

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von verschiedenen Fluoreszenzdetektionsvorrichtungen bekannt geworden. Hierbei wurden sowohl Systeme mit Mikrolinsen und/oder Mikrogittern als auch Strukturen, welche Wellenleiter und eine TIRF-Anregung verwenden, beschrieben. Unter diesen beschreibt beispielsweise die US 2010/0225915 ein Prisma für das Induzieren einer Brewster-Winkeltransmission und eine Fluoreszenzdetektionsvorrichtung zum Erhöhen eines Signal-zu-Rausch-Verhältnisses derselben, in welcher Struktur evaneszierende Wellen generiert werden, wenn Licht auf Fluoreszenzmaterial, welches auf eine Probenoberfläche aufgebracht ist, in einem Winkel der größer als ein kritischer Winkel ist, auftrifft. Die evaneszierenden Wellen werden hierbei als Anregungslicht für die Fluoreszenz verwendet, um eine interne Totalreflexion von Licht derart zu induzieren, dass Licht durch das Prisma in einem Brewster-Winkel hindurchtritt.

Nachteilig bei einer derartigen Vorrichtung ist, dass der Lichteintritt nicht unter einem Brewster-Winkel sondern normal zur Prismenfläche erfolgt was unerwünschte Reflexionen des Anregungslichts auf der Lichteintrittsseite zur Folge hat, und dass zumindest zwischen dem Prisma und einem Träger für die zu analysierende Probe eine Grenzfläche existiert, an welcher unerwünschte Lichtstreuungen stattfinden können. Weiterhin muss zum Verbinden des Trägers für die zu analysierende Probe mit dem in die Detektionseinheit integrierten Prisma ein Immersionsmedium verwendet werden, um die nötige Totalreflexion an der Oberfläche des Trägers zu erreichen.

Weitere Systeme, in welchen unterschiedliche Materialien für den Wellenleiter, d.h. beispielsweise das Prisma und den Probenträger, auf welchem das anzuregende bzw. zu analysierende Material aufgebracht ist, eingesetzt werden, sind vielfach bekannt.

A. Brandenburg et al., Sensor. Actuat. B-Chem. (2009), 139, 245-249 haben erstmals Polymerfolien als Wellenleiter verwendet, welche mit einem Einkupplungs- und Auskuppelungsprisma für das Anregungslicht durch Heißprägen ausgebildet wurden. Die Lichtquelle umfasst

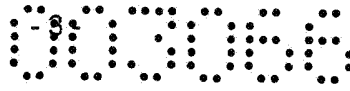


bei diesem System eine Laserdiode und das System weist weiterhin Strahlteiler, Aperturen und einen durch einen Schrittmotor angetriebenen Steuer- bzw. Regelspiegel, bei welchem nach einem Filtern des Fluoreszenzlichts das punktförmige Feld durch eine nicht gekühlte CCD-Kamera detektiert wurde, auf.

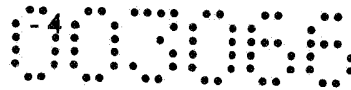
Aufgrund der stetig steigenden Nachfrage nach miniaturisierten Vorrichtungen, welche eine direkte Detektion von insbesondere Biomolekülen oder Pathogenen in Anwendungen, wie der Diagnose, Nahrungsmitteluntersuchung oder Umweltbeobachtung eingesetzt sind, wurden die sogenannten "Lab-on-a-Chip" oder "Mikrogesamtdiagnosesysteme (μ -TAS) entwickelt, um das gesamte Verfahren von der Probenzubereitung, Messung, Reaktion, Inkubation, usw. bis zur Detektion auf ein und demselben Chip ausführen zu können. Allerdings wurden frühe derartige, miniaturisierte Fluoreszenzvorrichtungen auf Glassubstraten oder Siliziumsubstraten aufgebaut und es mussten Herstellungstechnologien aus dem Gebiet der Elektronik und Halbleiterindustrie angewandt werden, wodurch derartige Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtungen nicht nur teuer sondern auch kompliziert und aufwendig herzustellen sind und überdies die Systeme noch nicht ausreichend miniaturisiert sind.

In letzter Zeit wurde versucht, derartige Mikroanalysenvorrichtungen in Kunststoffchips zu integrieren, welche einerseits eine hohe Transparenz und andererseits eine niedrige Autofluoreszenz aufweisen. Ein regelmäßig auftretendes Problem bei derartigen Vorrichtungen, sowohl auf Glas- oder Siliziumsubstraten, als auch auf Kunststoffsubstraten, ist, dass eine Trennung des Fluoreszenzlichts von dem Anregungslicht mittels eines Spektrometers oder mittels optischer Filter geschehen muss, was sich als nicht zufriedenstellend erweist. Am günstigsten ist hierbei eine effektive, geometrische Trennung zwischen Fluoreszenzlicht und Anregungslicht, da die Intensität des Anregungslichts üblicherweise um ein Vielfaches höher als die Intensität des erzeugten Fluoreszenzlichts ist, was insbesondere bei miniaturisierten Systemen ein großes Problem in Bezug auf die Messgenauigkeit darstellt, da meist nicht unbeträchtliche Mengen an Streulicht die Messung stören bzw. verfälschen.

Die vorliegende Erfindung zielt nun darauf ab, eine miniaturisierte Fluoreszenzdetektionsvorrichtung sowie ein Verfahren zur Detektion von Fluoreszenzlicht zur Verfügung zu stellen, bei welchem möglichst viel Anregungslicht in einen Fluoreszenzfarbstoff eines anzuregenden bzw. zu analysierenden Materials eingekoppelt wird und gleichzeitig möglichst wenig Anregungslicht den Detektor erreicht, um eine effektive, geometrische Trennung von Fluoreszenzlicht und Anregungslicht und somit eine erhöhte Messgenauigkeit zu erzielen. Weiterhin zielt die Erfindung darauf ab, die unerwünschte Reflexion des Anregungslichts beim Ein- und Austritt in das Prisma und eine darauffolgende mögliche Streuung von Anregungslicht auf ein Minimum herabzusetzen und somit nach einer effektiven Anregung des fluoreszierenden Materials in einem zu analysierenden Material bzw. zu detektierenden Material das Fluoreszenzlicht ausreichend sensibel und genau mit einem ortsauflösenden Detektor zu messen.



Zur Lösung dieser Aufgabe ist die erfindungsgemäße Vorrichtung dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Prisma und der Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material als einstückiger (monolithischer) Mikrochip ausgebildet sind, wobei eine Basisfläche des Prismas ausbildende Seite des Mikrochips den Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material ausbildet, auf welcher das anzuregende bzw. zu analysierende Material im Bereich der Totalreflexion des Anregungslichts angeordnet ist und dass beide Seitenflächen des Prismas im Brewster-Winkel zum Anregungslicht angeordnet sind. Indem das wenigstens eine Prisma und der Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material als einstückiger Mikrochip ausgebildet sind, existiert in der Vorrichtung keine Grenzfläche zwischen dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material und dem Lichtwellenleiter, nämlich dem Prisma, wodurch eine unerwünschte Reflexionen bzw. Streulicht vermieden wird. Indem weiterhin das anzuregende oder zu analysierende Material, auf die eine Basisfläche des Prismas ausbildende Seite des Mikrochip als Träger aufgebracht ist, wird eine Anregung unter abgeschwächter Totalreflexion (attenuated total reflection; ATR) erreicht. Hierbei wird das anzuregende oder zu analysierende Material auf der Seite des Prismas unter einem Winkel, welcher größer als der kritische Winkel der Totalreflexion ist, beleuchtet, weshalb keine Anregungslichtintensität aus dem Prisma im Bereich des anzuregenden oder zu analysierenden Materials herausdringt, sondern im Inneren des Prismas vollständig reflektiert wird. Die auf derselben Basisfläche des Prismas aufgebrachte anzuregende oder zu analysierende Substanz, welche gleichzeitig eine absorbierende Substanz für das Anregungslicht ist, wird somit durch eine im Nahfeld austretende evaneszente Welle angeregt und zur Abgabe von Fluoreszenzlicht veranlasst, welches Fluoreszenzlicht, in der Folge in der Detektionseinheit ausgewertet wird. Indem weiterhin beide Seitenflächen des Prismas im Brewster-Winkel zum Anregungslicht angeordnet sind, wird das Anregungslicht in das Prisma ein- oder ausgekoppelt, im Wesentlichen ohne irgendwelche Reflexionen zu erzeugen. Für eine Verbesserung bzw. für eine weitere Herabsetzung der Reflexionen des Anregungslichts wird hierbei linear polarisiertes Licht, welches beispielsweise aus einer Laserdiode als Lichtquelle stammen kann, deren Polarisationssebene parallel zur Einfallsebene eingestellt ist, d.h. p-polarisiertes Licht in dem Brewster-Winkel auf die Seitenflächen des Prismas eingestrahlt. Eine weitere Erhöhung der Effizienz der Ein- und Auskopplung des Anregungslichts ohne unerwünschte Reflexion des Anregungslichts beim Lichtein- und -austritt wird hierbei gemäß der Erfindung dadurch erzielt, dass der Mikrochip der Fluoreszenzdetektionsvorrichtung aus einem nicht absorbierenden Material gebildet ist, welches für p-polarisiertes Licht im Brewster-Winkel nicht reflektierend ist. Durch eine derartige Konfiguration wird somit eine Maximierung der Ein- und Auskopplung des Anregungslichts erzielt und gleichzeitig eine Minimierung bzw. vollständige Vermeidung des Streulichts erzielt, weshalb insbesondere Fluoreszenzlicht des anzuregenden oder zu analysierenden Materials ohne jedes Streulicht exakt detektiert werden kann.

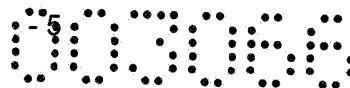


Indem, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, die Fluoreszenzdetektionsvorrichtung so ausgebildet ist, dass die den Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material darstellende Basisfläche des Mikrochips strukturiert ausgebildet ist und dass die Strukturierung eine oder mehrere Komponenten oder Strukturen gewählt aus mikrofluidischen Strukturen und Kanälen, mikrooptischen Strukturen, Elektroden, Ventilen oder Membranen umfasst, gelingt es in einfacher Weise ein sogenanntes Lab-on-a-Chip-System zur Verfügung zu stellen, bei welchem die Zahl der Grenzflächen zwischen dem anzuregenden oder zu analysierenden Material auf ein Minimum herabgesetzt ist, wodurch möglichst viel Anregungslicht in den in dem anzuregenden oder zu analysierenden Material enthaltenen Lumineszenzfarbstoff eingekoppelt wird. Überdies kann mit einer derartigen Vorrichtung bei Einsatz für fluide Materialien die Verwendung von Immersionsflüssigkeiten vermieden werden.

Indem, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, das anzuregende oder zu analysierende Material als Raster aus fluoreszierenden Punkten auf der den Träger ausbildenden Seite bzw. die Basisfläche des Mikrochips aufgebracht ist, gelingt es bei gleichzeitiger effektiver Anregung mit einem herkömmlichen ortsauflösenden Detektor, wie einer CCD-Kamera, ausreichend sensibel die Fluoreszenz des anzuregenden oder zu analysierenden Materials zu messen. Eine Zuordnung der einzeln zu vermessenden Punkte zu einem speziellen Analyten bzw. zu vermessendem Material oder Parameter gelingt mit einer herkömmlichen Software, welche nicht Teil der Erfindung ist.

Indem, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, ein Durchmesser jedes Punkts des Rasters aus fluoreszierenden Punkten 0,05 bis 1mm, insbesondere 0,1 bzw. 0,4 mm beträgt, kann bei gleichzeitiger homogener Bestrahlung auch eine Quantifizierung der mittleren Intensität der individuellen Sensorpunkte erreicht werden. Je größer der Raster aus fluoreszierenden Punkten und je größer der Punktdurchmesser ist, desto inhomogener werden die Ergebnisse, so dass besonders homogene und aussagekräftige Messwerte erreicht werden können.

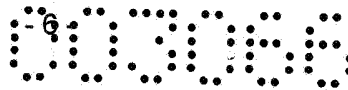
Um insbesondere eine gleichzeitige Anregung mehrerer zu analysierenden Materialien oder anzuregender Materialien zu ermöglichen ist gemäß einer Weiterbildung die Vorrichtung so ausgebildet, dass eine Mehrzahl von Prismen auf einem gemeinsamen Mikrochip angeordnet ist und dass die Prismen in eine Oberfläche des Mikrochips integriert sind. Die Mehrzahl von auf einem gemeinsamen Mikrochip angeordneten Prismen ermöglicht es, eine Mehrzahl von Träger für zu analysierendes oder anzuregendes Material und insbesondere beispielsweise eine Mehrzahl von mikrofluidischen Kanälen, welche in die Prismengrundfläche eingeschnitten sind, zur Verfügung zu stellen. Mit einer derartigen Ausbildung gelingt es mit einer einzigen Lichtquelle, eine Mehrzahl von beleuchteten Detektionszonen zur Verfügung zu stellen und somit eine kleinbauende Vorrichtung für die gleichzeitige Vermessung von mehreren untereinander gleichen oder verschiedenen Materialien bzw. Detektionszonen zur Verfügung zu stellen.



Gemäß einer Weiterbildung kann die Fluoreszenzdetektionsvorrichtung hierbei so ausgebildet sein, dass die Mehrzahl von Prismen parallel zueinander mit zu dem Anregungslicht gerichteten Seitenflächen angeordnet ist. Eine andere Variante wird hierbei dadurch erreicht, dass die Mehrzahl von Prismen hintereinander angeordnet ist und ein Lichteinfall des Anregungslichts auf die Prismen nacheinander erfolgt. Indem eine Mehrzahl von Prismen parallel zueinander mit zu dem Anregungslicht gerichteten Seitenflächen angeordnet ist, gelingt es, dass mehrere voneinander verschiedene Proben bzw. eine Mehrzahl untereinander gleicher Proben gleichzeitig mit Anregungslicht zu Emissionen von Fluoreszenzlicht angezeigt werden. Eine derartige Vorrichtung ist beispielsweise für eine Anwendung zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten oder dgl. bevorzugt, da nur geringste Mengen an Substanz in der Probe enthalten sind und mit einer derartigen Ausbildung insgesamt eine gleichzeitige und dennoch sehr empfindliche Messung mehrerer Parameter erreicht werden kann indem eine Mehrzahl von Prismen hintereinander angeordnet ist.

Wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, kann die Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung dahingehend weitergebildet sein, dass die Detektionseinheit dem Scheitel des Prismas gegenüberliegend angeordnet ist. Insbesondere indem die Detektionseinheit dem Scheitel des Prismas gegenüberliegend angeordnet ist, gelingt es, eine extrem kleinbauende Vorrichtung im Vergleich zu einer Variante, bei welcher die Detektionseinheit der Basisfläche des Prismas gegenüberliegend angeordnet ist, zur Verfügung zu stellen. Weiterhin gelingt es mit einer Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung, bei welcher die Detektionseinheit dem Scheitel des Prismas gegenüberliegend angeordnet ist, eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, bei welcher ein extrem einfacher Austausch des Biochips aufgrund der leichten Zugänglichkeit desselben ermöglicht wird und somit die Zeiten und der Aufwand zum Wechsel, der in der Regel zum Einmalgebrauch bestimmten, Analysenchips gegenüber herkömmlichen Bauweisen deutlich herabgesetzt sind.

Indem, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, der gesamte Mikrochip der Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung aus ein und demselben Material, insbesondere aus Kunststoff gebildet ist, gelingt es einerseits ein nicht absorbierendes Medium für das p-polarisierte Licht zur Verfügung zu stellen und andererseits kann eine derartige Vorrichtung einfach, beispielsweise in einem einzigen Fertigungsschritt, wie mit Spritzgießen, Heißprägen und dgl. hergestellt werden, wodurch insgesamt der Fertigungsaufwand für die Herstellung der der zum Einmalgebrauch bestimmten, Analysenchips deutlich herabgesetzt ist. Weiterhin gelingt es, indem der gesamte Mikrochip aus ein und demselben Material hergestellt ist, einen inerten Träger für das zu analysierende Material zur Verfügung zu stellen und gleichzeitig ein Prisma zur Verfügung zu stellen, welches die für die Strahlengeometrie, welche für die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung erforderlich ist, erforderlichen Brechzahlen aufweist zur Verfügung zu stellen.



Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung ist hierbei der Mikrochip, insbesondere der Biochip aus einem Polymermaterial basierend auf Cycloolefinpolymer (COP), Cycloolefincopolymer (COC), Polykarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyren (PS), Polyethylenterephthalat (PET), Polyacrylat, Polyurethanacrylat (PUA), Polyuretanmethacrylat (PUMA), Polypropylen (PP) gefertigt, insbesondere aus Cycloolefinpolymer oder -copolymer (COP/COC), Polykarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polystyren (PS) gefertigt. Derartige Materialien sind nicht nur chemisch inert, sondern weisen die für die vorliegende Erfindung erforderlichen Brechzahlen und Transparenz auf und sind wegen ihrer einfachen Verarbeitbarkeit für eine Massenproduktion von Mikrochips für eine Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet.

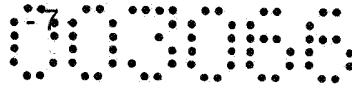
Um insbesondere das zu analysierende oder das anzuregende Material vor einem übermäßigen Fotobleichen zu schützen, ist gemäß einer Weiterbildung die Vorrichtung so ausgebildet, dass sie in einem Gehäuse, insbesondere einem Aluminiumgehäuse oder Kunststoffgehäuse angeordnet ist und dass im Inneren des Gehäuses eine Trennwand für eine Trennung in ein Abteil enthaltend die Lichtquelle und ein Abteil enthaltend die Detektionsvorrichtung, angeordnet ist. Durch die Abteilung des Gehäuses der Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung in ein Abteil enthaltend die Lichtquelle und ein Abteil enthaltend die Detektionsvorrichtung kann die Lichtquelle kontinuierlich betrieben werden und gleichzeitig das zu analysierende Material bzw. das anzuregende Material vor einem Fotobleichen geschützt werden. Insbesondere wenn die Lichtquelle, wie beispielsweise eine Laserdiode kontinuierlich betrieben wird, wird die Lebensdauer desselben gegenüber einer Lichtquelle, die häufig an- und ausgeschaltet wird, deutlich erhöht.

Um sicherzustellen, dass auch für konvergente oder divergente Strahlenbündel des Anregungslichts jeder einzelne Lichtstrahl unter einem Brewster-Winkel auf die Seitenfläche des Prismas auftrifft, ist die Erfindung dahingehend weitergebildet, dass die Seitenflächen des Prismas als gekrümmte Freiformflächen ausgebildet sind.

Die vorliegende Erfindung zielt weiterhin auf ein Verfahren zur Detektion von Fluoreszenzlicht in einer Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung ab, bei welcher die Menge an störendem Streulicht auf eine Detektionseinheit auftrifft, minimiert wird und gleichzeitig sicher und reproduzierbar wiederholbare Ergebnisse erzielt werden.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist das erfindungsgemäße Verfahren im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht im Brewster-Winkel auf die Seitenfläche des Prismas eingestrahlt wird, dass das unmittelbar auf der Basisfläche des Prismas angeordnete anzuregende oder zu analysierende Material unter einem Winkel, der größer als ein kritischer Winkel einer Totalreflexion ist, zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt wird.

Indem das Anregungslicht im Brewster-Winkel auf die Seitenfläche des Prismas eingestrahlt wird, wird sichergestellt, dass das Anregungslicht in das Prisma ein- und ausgekoppelt



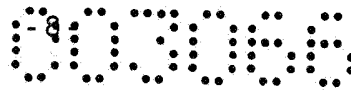
werden kann, ohne dass unerwünschte Reflexion des Anregungslichts beim Lichtein- und -austritt aus dem Prisma erzeugt wird, wodurch die Messgenauigkeit und insbesondere das Signal-zu-Rausch-Verhältnis einer Messung deutlich verbessert werden kann. Indem weiterhin das anzuregende oder zu analysierende Material direkt auf der Basisfläche des Prismas angeordnet ist und unter einem Winkel, der größer als der kritische Winkel der Totalreflexion ist, beleuchtet wird, wird weiterhin sichergestellt, dass keine Anregungsintensität des Anregungslichts aus dem Prisma an der Fläche des Prismas, auf welcher die zu detektierende bzw. anzuregende Probe bzw. das anzuregende Material aufgebracht ist, herausdringt, wodurch wiederum das Signal-zu-Rausch-Verhältnis einer Messung deutlich verbessert werden kann und insbesondere exakte und scharfe Messpunkte bzw. Messlinien des generierten Fluoreszenzlichts in einer Detektionseinheit erhalten werden können.

Indem, wie dies einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens entspricht, gleichzeitig eine Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien detektiert wird, wird einerseits die Geschwindigkeit des Messverfahrens erhöht und andererseits sichergestellt, dass eine Mehrzahl von verschiedenen zu analysierenden Substanzen rasch und unkompliziert analysiert wird oder eine Mehrzahl von untereinander gleichen Substanzen analysiert werden kann, wodurch nach einer entsprechenden Mittlung der Messfehler im Vergleich zu herkömmlichen Messverfahren deutlich herabgesetzt werden kann.

Wenn, wie dies einer Weiterbildung einer Erfindung entspricht, das Verfahren so geführt wird, dass die gleichzeitig zu detektierende Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien auf einer Mehrzahl von parallel zueinander angeordneten Basisflächen von Prismen aufgebracht wird, bzw. dass die gleichzeitig zu detektierende Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien auf einer Mehrzahl von hintereinander angeordneten Basisflächen von Prismen aufgebracht wird, wird die Mehrzahl von Prismen mit ein und demselben Anregungslicht hintereinander beaufschlagt und angeregt, wodurch ein und dieselbe Probe mehrmals angeregt werden kann und auf diese Weise fehlerhafte Messungen bzw. Auslesefehler nach einer Detektion in der Detektionsvorrichtung durch direkten Vergleich der Messergebnisse mit Sicherheit hintangehalten werden können.

Indem, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, das anzuregende oder zu analysierende Material als Raster aus fluoreszierenden Punkten auf der Basisfläche des Prismas aufgebracht wird, gelingt es bei gleichzeitiger effektiver Anregung mit einem herkömmlichen ortsauflösenden Detektor, wie einer CCD-Kamera, ausreichend sensibel die Fluoreszenz des anzuregenden oder zu analysierenden Materials zu messen.

Dadurch, dass, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, die fluoreszierenden Punkte durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Molekülen aus einer Lösung auf an der Basisfläche des Prismas festgelegten Fänger- oder Sondenmolekülen gebildet werden, erlaubt die Vorrichtung den Nachweis und die Quantifizierung von in der Probelösung vorhan-



denen Analyten. Hierfür werden die fluoreszierenden Punkte durch die Anlagerung/Bindung von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Molekülen oder Partikeln, wie Oligonukleotide, Proteine, Peptide, Biomarker, Antikörper, Antigene, etc. aus der zur analysierenden Lösung an auf der Basisfläche des Prismas punktförmig aufgebracht Bindungspartner, d.h. wiederum entsprechende komplementäre Oligonukleotide, Proteine, Antigene, etc. gebildet werden, wird der Nachweis und die Quantifizierung von in der Probelösung vorhandenen Analyten möglich.

Indem, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, das Verfahren so geführt wird, dass gleichzeitig eine Mehrzahl von verschiedenen Parametern von einem oder mehreren anzuregenden oder zu analysierenden Materialien analysiert wird, können beispielsweise in biologischen Proben verschiedene Bestandteile, wie beispielsweise Nukleinsäuresequenzen, Proteine, Peptide, Biomarker, Pathogene, Viren und dgl. detektiert und quantifiziert werden indem an der Basisfläche des Prismas entsprechende Sondenmoleküle zur Bindung dieser Probenbestandteile aufgebracht sind gleichzeitig oder auch hintereinander detektiert werden, wodurch eine Vielzahl von wesentlichen Messsignalen rasch und unkompliziert erhalten werden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert. In dieser zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung.

Fig. 2 eine schematische Darstellung von im Brewster-Winkel auf die Seitenflächen eines in ein Trägersubstrat integrierten Prismas einfallendem Licht.

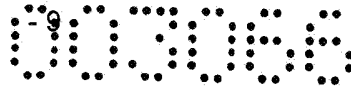
Fig. 3 eine teilweise perspektivische Darstellung eines auf einem Trägersubstrat aufgetragenen Prismas sowie die schematische Darstellung des Lichtdurchtritts durch dieses Prisma.

Fig. 4 eine zur Fig. 3 ähnliche Darstellung mit einer Mehrzahl von auf einem Träger integrierten Prismen,

Fig. 5 eine Mehrzahl von hintereinander angeordneten Prismen, welche nach und nach durch Anregungslicht durchdrungen werden, gemäß einer anderen Ausbildung der Erfindung und

Fig. 6 ein Diagramm betreffend die Fluoreszenzabbildung und die zeitliche Auswertung der Fluoreszenzintensität für eine Streptavidinkonzentration von 7 nM.

Im Einzelnen ist die Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung 1 gezeigt, in welcher aus einer Lichtquelle 2 beispielsweise einer Laserdiode ein Bündel aus linear polarisiertem Licht auf einen Strahlschräfer 3 aufgebracht und von diesem das schematisch dargestellte Strahlbündel 4, welches eine Polarisation in einer zur Einfallsebene 5 des Prismas 6 parallelen Ebene aufweist, einfällt. Das Strahlbündel 4, welches mit der Einfallsebene 5 den in Fig. 1 nicht eingezeichneten Brewster-Winkel einschließt, wird im Inneren des Prismas 6 gebrochen, wird an einer Basisfläche 7 des Prismas 6 vollständig reflek-



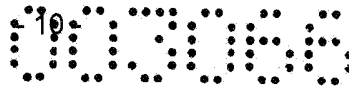
tiert und tritt an einer zweiten Seitenfläche 8 des Prismas 6 wiederum unter dem Brewster-Winkel aus dem Inneren des Prismas 6 aus. Auf der Basisfläche 7 sind insbesondere in dem Bereich, wo die Totalreflexion des Strahlbündels 4 stattfindet, eine Mehrzahl von fluoreszierenden Punkten 9, insbesondere ein Raster aus fluoreszierenden Punkten 9 in einem mikrofluidischen System aufgebracht. Das mikrofluidische System ist in Fig. 1 durch die Vertiefung 10, welche der Basisfläche 7 des Prismas 6 ausgebildet ist, schematisch dargestellt und soll beispielsweise einen Mikrokanal symbolisieren. Die fluoreszierenden Punkte 9 können bei einer derartigen Ausbildung einen Durchmesser von je 0,05 bis 1 insbesondere 0,1 bis 0,4 mm aufweisen. Indem sich die Punkte 9 bzw. der Raster von Punkten 9 des anzuregenden oder zu analysierenden Materials befinden, wird sie/er prismenseitig, d.h. auf der Seite der Oberfläche 7 des Prismas 6 unter einem Winkel, welcher größer als der kritische Winkel der Totalreflexion ist, beleuchtet, weshalb keinerlei Anregungslicht aus dem Prisma 6 herausdringt. Dadurch, dass sich eine absorbierende Substanz, insbesondere in den Punkten 9 auf der Oberfläche 7 des Prismas 6 befindet, kann diese durch eine im Nahfeld austretende evaneszente Welle angeregt werden und das nach Anregung emittierte Fluoreszenzlicht 11 wird in der Folge durch eine Kameralinse 12, welche eine Sammellinse darstellt, wiederum fokussiert und durch einen Detektor 13, welcher beispielsweise eine CCD-Kamera ist und einer in Fig. 1 nicht dargestellten Auswerteelektronik ausgewertet.

Um das Auftreten von jeglichem Streulicht zu vermeiden, sind hierbei mehrere wesentliche Merkmale eingehalten, einerseits ist nur eine Grenzfläche zwischen dem Prisma 6 und der zu analysierenden Probe 9 vorhanden und somit ein ansonsten nötiger Verbund des Prismas mit einem separaten Träger, auf welchem die zu analysierenden Moleküle aufgebracht werden können, vermieden.

Weiterhin ist es wesentlich, dass das Prisma 6 aus einem nicht absorbierenden Medium gebildet ist, da nicht absorbierende Medien für p-polarisiertes Licht, d.h. Licht, dessen Polarisationsebene parallel zu Einfallsebene 5 des Prismas 6 eingestellt ist, d.h. für Licht, welches im Brewster-Winkel auf die Einfallsebene 5 des Prismas 6 auftrifft, nicht reflektierend sind. Schließlich wird das Licht im Brewster-Winkel auf die Oberfläche des Prismas eingestrahlt. Der Brewster-Winkel (θ_B) ist hierbei durch die Formel $\tan(\theta_B) = n_2/n_1$ definiert, wobei n_1 und n_2 die Brechungsindices der beteiligten Medien, d.h. im vorliegenden Fall Luft und das Material des Prismas 6 sind.

Durch Einhalten einer derartigen Konfiguration, gelingt es, eine Messung des emittierten Fluoreszenzlichtes durchzuführen, welche absolut frei von unerwünschten Reflexionen des Anregungslichts ist, sodass das Signal-zu-Rauschverhältnis der Messung optimiert ist.

Schließlich ist in der in Fig. 1 dargestellten Ausführungsform die Detektionseinheit 13 auf der Seite des Scheitels 14, im vorliegenden Fall einer Scheitelfläche, des Prismas 6 angeordnet. Eine derartige Konfiguration ist gegenüber der ebenfalls von der vorliegenden Erfindung um-



fassten Konfiguration, in welcher die Detektionseinheit 13 auf der Seite der zu analysierenden bzw. anzuregenden Probe 9 angeordnet ist, auf Grund ihres verringerten Platzbedarfes begünstigt, da durch Anordnung von sowohl der Lichtquelle 2 als auch der Detektionseinheit 13 auf der Seite des Prismas 6 eine verbesserte Zugänglichkeit der die Proben aufweisenden Oberfläche 7 des Prismas erreicht wird und somit beispielsweise ein Tausch des gesamten Prismas 6 bedeutend einfacher möglich ist, als bei einer Anordnung, in welcher die Lichtquelle 2 und die Detektionseinheit 13 auf verschiedenen Seiten des Prismas 6 angeordnet sind.

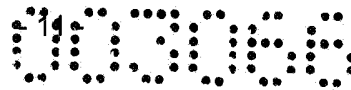
In Fig. 2 ist eine schematische Darstellung eines Trägers mit integriertem Prisma, d.h. ein Mikrochip 15 gemäß der Erfindung gezeigt. In dem Mikrochip 15 ist das Prisma 6 als Teil der Basisfläche des Mikrochips 15 ausgebildet und eine Grenzfläche zwischen dem Chip 15 und dem Prisma 6 existiert nicht, sodass die Zahl der optischen Grenzflächen minimiert ist.

In Fig. 4 ist weiterhin das Bündel von einfallenden Lichtstrahlen 4 dargestellt, welche auf die Oberfläche 5 des Prismas 6 unter dem Brewster-Winkel θ_B einfallen. Im Inneren des Prismas 6 wird das einfallende Lichtbündel 4 zur Basisfläche 7 gebrochen und von dort reflektiert und tritt an der an der Seitenfläche 8 wiederum unter dem Brewster-Winkel θ_B aus dem Prisma 6 aus. Das in Fig. 2 dargestellte Prisma 6 ist hierbei ein herkömmliches Prisma 6 mit einem Scheitel und einer Basisfläche 7.

In Fig. 3 ist eine ähnliche Darstellung wie in Fig. 2 in der Perspektive gezeigt, wobei das Prisma 6 in Fig. 3 als stumpfes Prisma 6 mit zwei waagrechten Seiten ausgebildet ist. Auch in Fig. 3 ist der Weg des Lichtes schematisch durch die Linie 16 angedeutet. In Fig. 3 ebenso wie in Fig. 4 ist die Basisfläche 7 ebenso wie auch in Fig. 1 des Prismas 6 verlängert dargestellt und stellt somit die Basis des Mikrochips 15 dar. Hierbei ist das Prisma 6 direkt an dem Mikrochip 15 angeformt, wie dies durch die punktierte Linie 17 schematisch dargestellt ist, um die Zahl der Grenzflächen zu minimieren.

In Fig. 4 ist eine Mehrzahl von Prismen 6, welche analog zu jenen von Fig. 3 ausgebildet sind, parallel zueinander auf einem Mikrochip 15 angeordnet, wobei jedes der Prismen 6 durch Licht beaufschlagt ist, wobei der Lichtweg wiederum schematisch mit 16 bezeichnet ist. Hierbei kann die Lichtquelle 2, welche die Mehrzahl von Prismen 6 beaufschlagt, eine gemeinsame Lichtquelle 2 sein oder es kann eine Mehrzahl von parallel zueinander angeordneten Lichtquellen 2 verwendet werden.

Schließlich ist in der Darstellung von Fig. 5 eine Mehrzahl von Prismen 6 dargestellt, welche hintereinander angeordnet sind und welche durch ein Lichtbündel 4 nacheinander durchdrungen werden. Aufgrund der Tatsache, dass das einfallende Licht 6 wiederum im Brewster-Winkel θ_B auf die Oberfläche 5 des Prismas 6 auftrifft und exakt im Brewster-Winkel θ_B aus dem ersten Prisma 6 austritt, gelingt es sämtliche Prismen 6 mit exakt der gleichen Lichtgeometrie zu beaufschlagen, sodass Fehler aufgrund von Streulicht, welches durch die Nichteinhaltung der Lichtgeometrie bewirkt sein können, vermieden werden.



In der Darstellung von Fig. 5 sind weiterhin in der Basisfläche 7 des Prismas 6 wiederum Vertiefungen 10 dargestellt, welche Mikrokanäle symbolisieren sollen, in welchen fluides Material geführt sein kann.

Es erübrigt sich, festzuhalten, dass die Prismengeometrie beliebig gewählt werden kann und dass beispielsweise auch Freiformprismen eingesetzt werden können, welche zur Kompensation von möglichen Strahlendivergenzen angewandt werden.

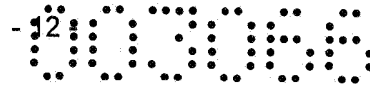
Die Erfindung wird weiterhin nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels erläutert.

Beispiel 1:

Ein Biochip gemäß Fig.3 mit den Außenmaßen 25 x 75 mm wird durch Heißpressen oder Spritzgießen aus COP Material, nämlich einem thermoplastischen Polyolefinharz, welches unter dem Markennamen Zeonor® 1060R (eine Marke der Zeon Corporation) vertrieben wird, hergestellt, wobei der Chip ein integriertes Prisma beinhaltet, dessen Winkel der Seitenflächen zur Basisfläche 33,2° betragen.

Auf der Basisfläche dieses Prismas wird mit Biotin funktionalisiertes bovines Serumalbumin (BSA) in Form eines punktförmigen Rasters aufgedruckt. Anschließend wird dieser Chip mit einem weiteren Chip, in welchem ein mikrofluidisches Kanalsystem bestehend aus mindestens einem Kanal, welcher es erlaubt eine Probelösung über den auf der Basisfläche des Prismas aufgetragenen Raster zu leiten und in welchem weiterhin ein Flüssigkeitsein- und -auslass) eingearbeitet ist, verbunden. Auf diese Weise wurde ein Mikrochip, insbesondere Biochip zur Detektion von Biotin oder Biotin bindenden Proteinen, wie Streptavidin oder Neutravidin hergestellt.

In den mikrofluidischen Kanal wird nun eine Probe oder Lösung welche eine bestimmte Menge an Biotin und an mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiertes Streptavidin enthält eingebracht und in Folge die Fluoreszenzintensität des auf der Basisfläche des Prismas aufgedruckten Rasters mit einer CCD Kamera verfolgt. Eine entsprechende Zunahme der Fluoreszenzintensität mit der Inkubationszeit zeigt eine Bindung des Cy3 markierten Streptavidin an die aufgedruckten Rasterpunkte aus biotinyliertem BSA an. Die Geschwindigkeit dieses Anstiegs bzw. die erreichbaren Fluoreszenzintensitäten hängen von der Konzentration von Biotin und Streptavidin in der Probelösung ab. Die entsprechende Fluoreszenzabbildung und die zeitliche Auswertung der Fluoreszenzintensität sind für eine Cy3 Streptavidinkonzentration von 7nM in Fig.6 gezeigt.



Patentansprüche:

1. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) umfassend eine Lichtquelle (2) zur Generierung von linear polarisiertem Anregungslicht (4), wenigstens ein Prisma (6) mit dessen Basisfläche (7) ein Träger für ein anzuregendes oder zu analysierendes Material verbunden ist, sowie eine parallel zu dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material angeordnete Detektionseinheit (13), dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Prisma (6) und der Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material als einstückiger Mikrochip (15) ausgebildet sind, wobei eine Basisfläche (7) des Prismas (6) ausbildende Seite des Mikrochips (15) den Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material ausbildet, auf welcher das anzuregende bzw. zu analysierende Material im Bereich der Totalreflexion des Anregungslichts (4) angeordnet ist und dass beide Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) im Brewster-Winkel (θ_B) zum Anregungslicht (4) angeordnet sind.

2. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die den Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material darstellende Basisfläche (7) des Mikrochips (15) strukturiert ausgebildet ist und dass die Strukturierung (10) eine oder mehrere Komponenten oder Strukturen gewählt aus mikrofluidischen Strukturen und Kanälen, mikrooptischen Strukturen, Elektroden, Ventilen oder Membranen umfasst.

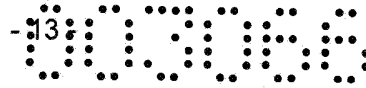
3. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das anzuregende oder zu analysierende Material als Raster aus fluoreszierenden Punkten (9) auf die Basisfläche (7) des Mikrochips (15), insbesondere in mikrofluidischen Strukturen (10) und Kanälen des Mikrochips (15) aufgebracht ist.

4. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein Durchmesser jedes Punkts des Rasters aus fluoreszierenden Punkten 0,05 bis 1 mm, insbesondere 0,1 bzw. 0,4 mm beträgt

5. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Mehrzahl von Prismen (6) auf einem gemeinsamen Mikrochip (15) angeordnet ist und dass die Prismen (6) in eine Oberfläche des Mikrochips (15) integriert sind.

6. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Mehrzahl von Prismen (6) parallel zueinander mit zu dem Anregungslicht (4) gerichteten Seitenflächen (5) angeordnet ist.

7. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Mehrzahl von Prismen (6) hintereinander angeordnet ist und ein Lichteinfall des Anregungslichts (4) nacheinander erfolgt.



8. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinheit (13) dem Scheitel (14) des Prismas (6) gegenüberliegend angeordnet ist.

9. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der gesamte Mikrochip (15) aus ein und demselben Material, insbesondere aus einem Kunststoff gebildet ist.

10. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikrochip (15) aus einem Polymermaterial basierend auf Cycloolefinpolymer (COP), Cycloolefincopolymer (COC), Polykarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyren (PS), Polyethylenterephthalat (PET), Polyacrylat, Polyurethanacrylat (PUA), Polyuretanmethacrylat (PUMA), Polypropylen (PP), und dgl. Gefertigt ist, insbesondere aus Cycloolefinpolymer oder -copolymer (COP/COC), Polykarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polystyren (PS) gefertigt ist.

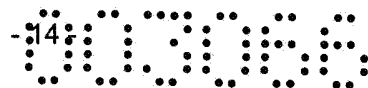
11. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) in einem Gehäuse, insbesondere Aluminiumgehäuse oder Kunststoffgehäuse angeordnet ist und dass im Inneren des Gehäuses eine Trennwand für eine Trennung in ein Abteil enthaltend die Lichtquelle (2) und ein Abteil enthaltend die Detektionseinheit (13), angeordnet ist.

12. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) als gekrümmte Freiformflächen ausgebildet sind.

13. Verfahren zur Detektion von Fluoreszenzlicht in einer Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1), eines auf einem mit einer Basisfläche (7) eines Prismas (6) verbundenen Träger angeordneten, anzuregenden oder zu analysierenden Materials, bei welchem linear polarisiertes Licht (4) von einer Anregungslichtquelle (2) auf eine Seitenfläche (5) des Prismas (6) gerichtet wird, wobei an der Basisfläche (7) des Prismas (6) das anzuregende oder zu analysierende Material zur Emission von Fluoreszenzlicht unter gleichzeitiger Reflexion des Anregungslichts angeregt wird und das von dem anzuregenden oder zu analysierenden Material emittierte Fluoreszenzlicht in einer Detektionseinheit (13) ausgewertet wird, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht im Brewster-Winkel (θ_B) auf die Seitenfläche (5) des Prismas (6) eingestrahlt wird und dass das unmittelbar auf der Basisfläche (7) des Prismas (6) angeordnete anzuregende oder zu analysierende Material unter einem Winkel, der größer als ein kritischer Winkel einer Totalreflexion ist, zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass gleichzeitig eine Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien detektiert wird.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die gleichzeitig zu detektierende Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien auf einer



Mehrzahl von parallel zueinander angeordneten Basisflächen (7) von Prismen (6) aufgebracht wird.

16. Verfahren nach Anspruch 13, 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die gleichzeitig zu detektierende Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien auf einer Mehrzahl von hintereinander angeordneten Basisflächen (7) von Prismen (6) aufgebracht wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das anzuregende oder zu analysierende Material als Raster aus fluoreszierenden Punkten auf der Basisfläche (7) des Prismas (6) aufgebracht wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die fluoreszierenden Punkte durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Molekülen aus einer Lösung auf an der Basisfläche (7) des Prismas (6) festgelegten Fänger- oder Sondenmolekülen gebildet werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren so geführt wird, dass gleichzeitig eine Mehrzahl von verschiedenen Parametern von einer oder mehreren anzuregenden oder zu analysierenden Materialien analysiert wird.

Wien, 12. April 2013

Joanneum Research
Forschungsgesellschaft mbH
durch:
Cunow Patentanwalts KG

003088

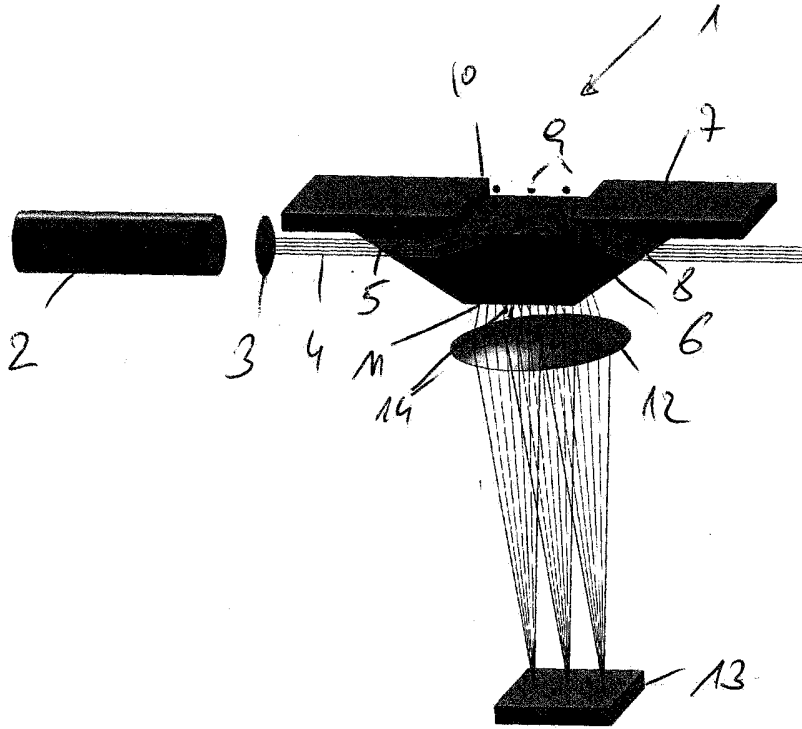


Fig. 1

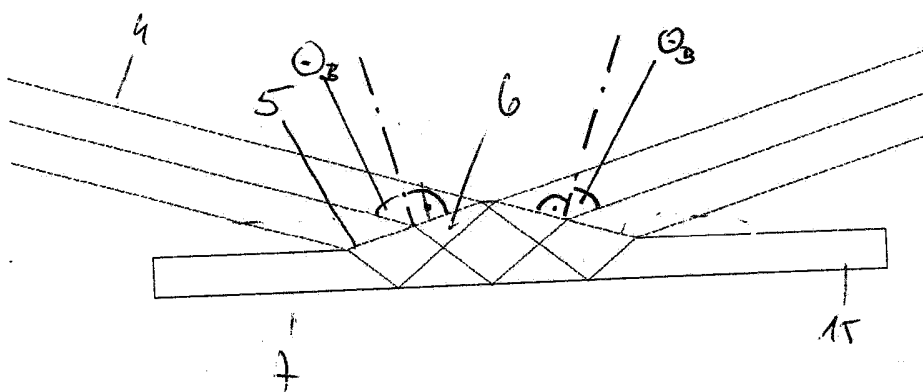


Fig. 2

003088

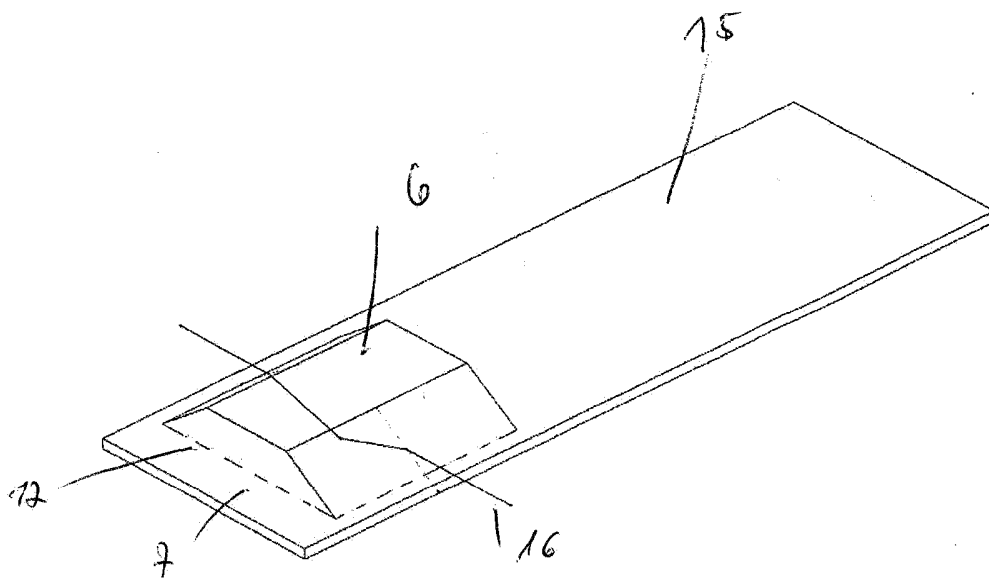


Fig. 3

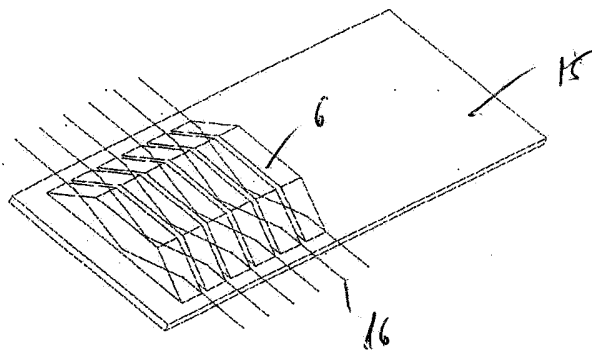


Fig. 4

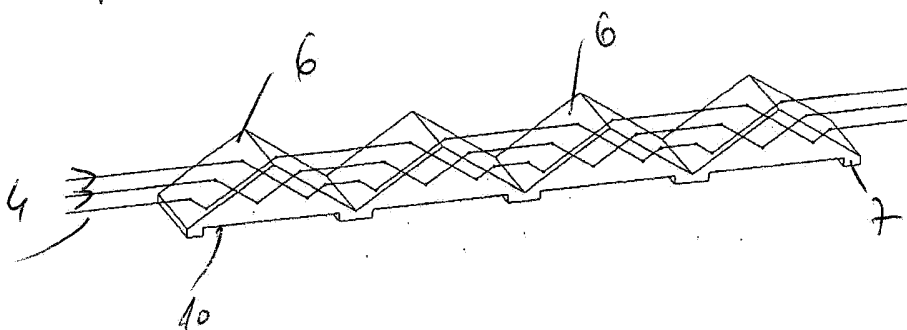


Fig. 5

003086

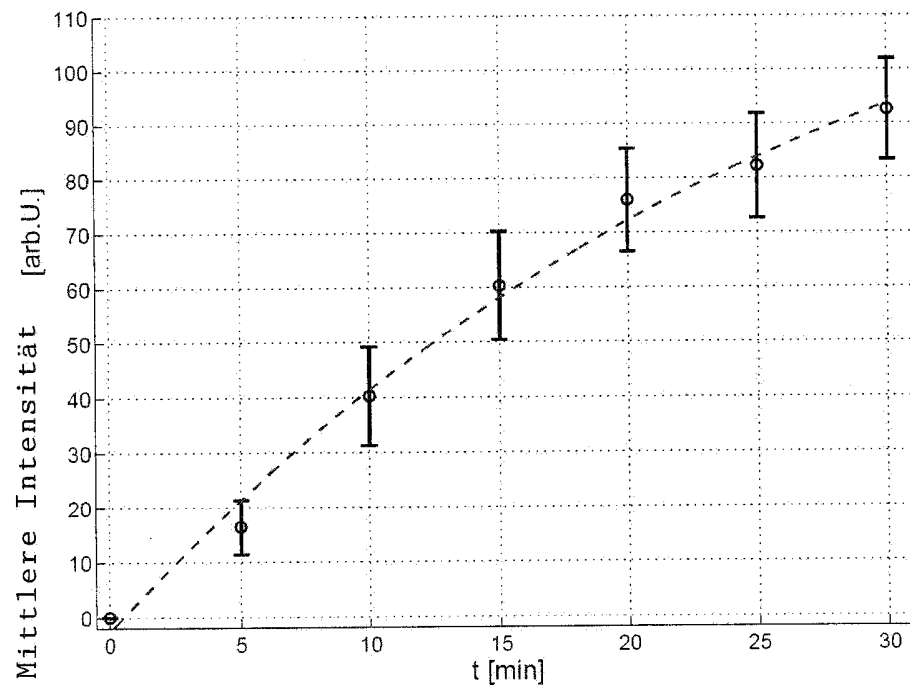
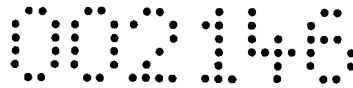


Fig. 6:



Patentansprüche:

1. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) umfassend eine Lichtquelle (2) zur Generierung von linear polarisiertem Anregungslicht (4), wenigstens ein Prisma (6) mit dessen Basisfläche (7) ein Träger für ein anzuregendes oder zu analysierendes Material verbunden ist, sowie eine parallel zu dem Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material angeordnete Detektionseinheit (13), dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Prisma (6) und der Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material als einstückiger Mikrochip (15) ausgebildet sind, wobei eine Basisfläche (7) des Prismas (6) ausbildende Seite des Mikrochips (15) den Träger für das anzuregende bzw. zu analysierende Material ausbildet, auf welcher das anzuregende oder zu analysierende Material im Bereich der Totalreflexion des Anregungslichts (4) angeordnet ist und dass beide Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) im Brewster-Winkel (q_B) zum Anregungslicht (4) angeordnet sind.

2. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die den Träger für das anzuregende oder zu analysierende Material darstellende Basisfläche (7) des Mikrochips (15) strukturiert ausgebildet ist und dass die Strukturierung (10) eine oder mehrere Komponenten oder Strukturen gewählt aus mikrofluidischen Strukturen und Kanälen, mikrooptischen Strukturen, Elektroden, Ventilen oder Membranen umfasst.

3. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das anzuregende oder zu analysierende Material als Raster aus fluoreszierenden Punkten (9) auf die Basisfläche (7) des Mikrochips (15), insbesondere in mikrofluidischen Strukturen (10) und Kanälen des Mikrochips (15) aufgebracht ist.

4. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein Durchmesser jedes Punkts des Rasters aus fluoreszierenden Punkten 0,05 bis 1 mm, insbesondere 0,1 bzw. 0,4 mm beträgt

5. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Mehrzahl von Prismen (6) auf einem gemeinsamen Mikrochip (15) angeordnet ist und dass die Prismen (6) in eine Oberfläche des Mikrochips (15) integriert sind.

6. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Mehrzahl von Prismen (6) parallel zueinander mit zu dem Anregungslicht (4) gerichteten Seitenflächen (5) angeordnet ist.

7. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Mehrzahl von Prismen (6) hintereinander angeordnet ist und ein Lichteinfall des Anregungslichts (4) nacheinander erfolgt.

8. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinheit (13) dem Scheitel (14) des Prismas (6) gegenüberliegend angeordnet ist.

9. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der gesamte Mikrochip (15) aus ein und demselben Material, insbesondere aus einem Kunststoff gebildet ist.

10. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikrochip (15) aus einem Polymermaterial basierend auf Cycloolefinpolymer (COP), Cycloolefincopolymer (COC), Polykarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyren (PS), Polyethylenterephthalat (PET), Polyacrylat, Polyurethanacrylat (PUA), Polyuretanmethacrylat (PUMA) oder Polypropylen (PP) gefertigt ist, insbesondere aus Cycloolefinpolymer oder -copolymer (COP/COC), Polykarbonat (PC), Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polystyren (PS) gefertigt ist.

11. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) in einem Gehäuse, insbesondere Aluminiumgehäuse oder Kunststoffgehäuse angeordnet ist und dass im Inneren des Gehäuses eine Trennwand für eine Trennung in ein Abteil enthaltend die Lichtquelle (2) und ein Abteil enthaltend die Detektionseinheit (13), angeordnet ist.

12. Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Seitenflächen (5, 8) des Prismas (6) als gekrümmte Freiformflächen ausgebildet sind.

13. Verfahren zur Detektion von Fluoreszenzlicht in einer Mikro-Fluoreszenzdetektionsvorrichtung (1), eines auf einem mit einer Basisfläche (7) eines Prismas (6) verbundenen Träger angeordneten, anzuregenden oder zu analysierenden Materials, bei welchem linear polarisiertes Licht (4) von einer Anregungslichtquelle (2) auf eine Seitenfläche (5) des Prismas (6) gerichtet wird, wobei an der Basisfläche (7) des Prismas (6) das anzuregende oder zu analysierende Material zur Emission von Fluoreszenzlicht unter gleichzeitiger Reflexion des Anregungslichts angeregt wird und das von dem anzuregenden oder zu analysierenden Material emittierte Fluoreszenzlicht in einer Detektionseinheit (13) ausgewertet wird, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht im Brewster-Winkel (q_B) auf die Seitenfläche (5) des Prismas (6) eingestrahlt wird und dass das unmittelbar auf der Basisfläche (7) des Prismas (6) angeordnete anzuregende oder zu analysierende Material unter einem Winkel, der größer als ein kritischer Winkel einer Totalreflexion ist, zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass gleichzeitig eine Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien detektiert wird.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die gleichzeitig zu detektierende Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien auf einer

Mehrzahl von parallel zueinander angeordneten Basisflächen (7) von Prismen (6) aufgebracht wird.

16. Verfahren nach Anspruch 13, 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die gleichzeitig zu detektierende Mehrzahl von anzuregenden oder zu analysierenden Materialien auf einer Mehrzahl von hintereinander angeordneten Basisflächen (7) von Prismen (6) aufgebracht wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das anzuregende oder zu analysierende Material als Raster aus fluoreszierenden Punkten auf der Basisfläche (7) des Prismas (6) aufgebracht wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die fluoreszierenden Punkte durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Molekülen aus einer Lösung auf an der Basisfläche (7) des Prismas (6) festgelegten Fänger- oder Sondenmolekülen gebildet werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass gleichzeitig eine Mehrzahl von verschiedenen Parametern von einem oder mehreren anzuregenden oder zu analysierenden Material(ien) analysiert wird.

Wien, 26. März 2014

Joanneum Research
Forschungsgesellschaft mbH
durch:
Cunow Patentanwalts KG

003386

1/3

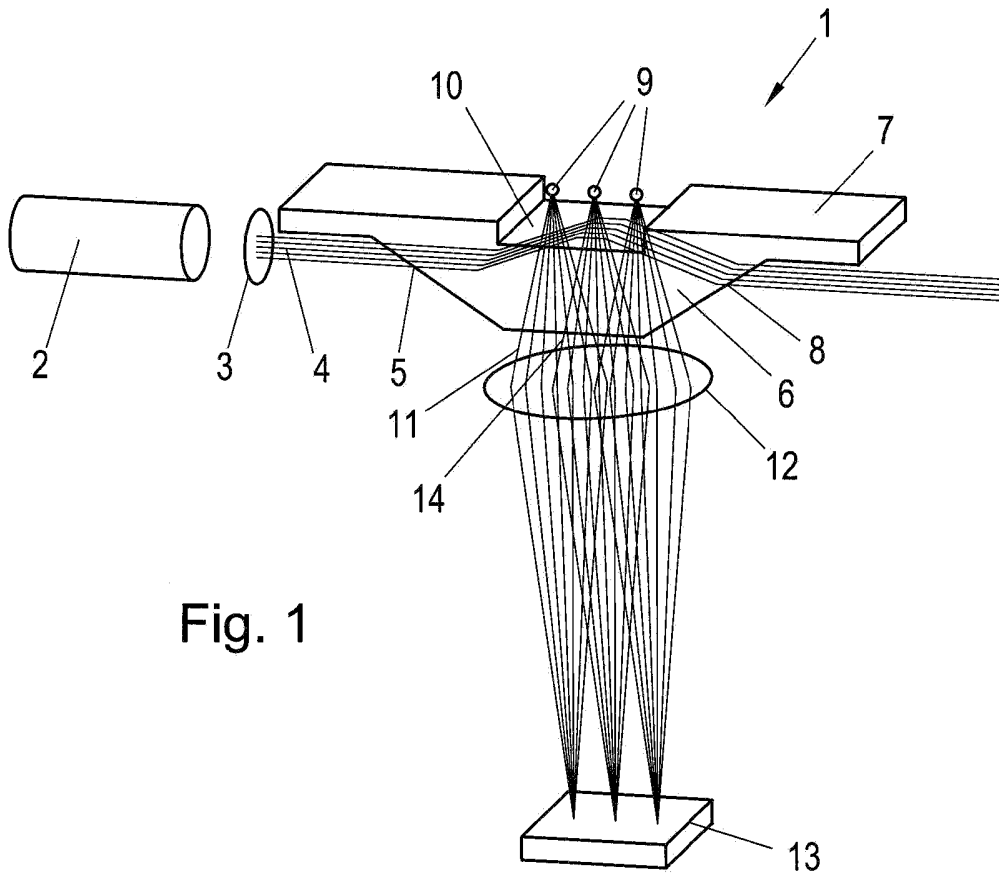


Fig. 1

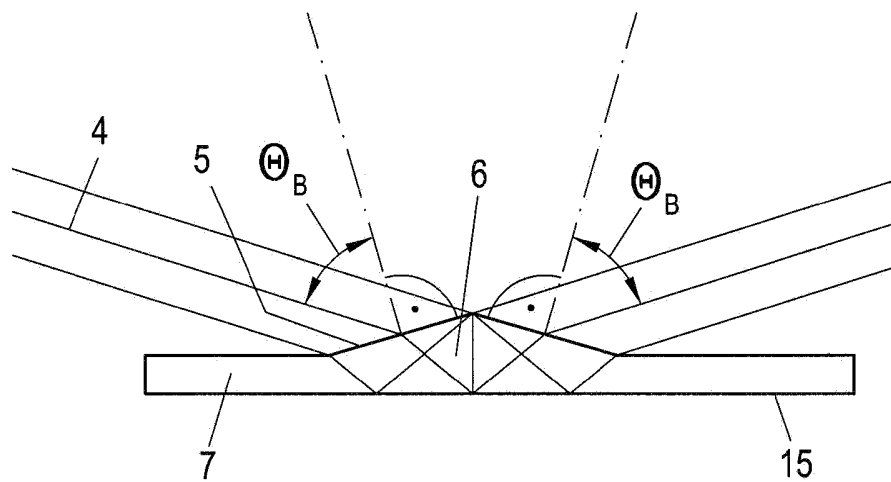


Fig. 2

003358

2/3

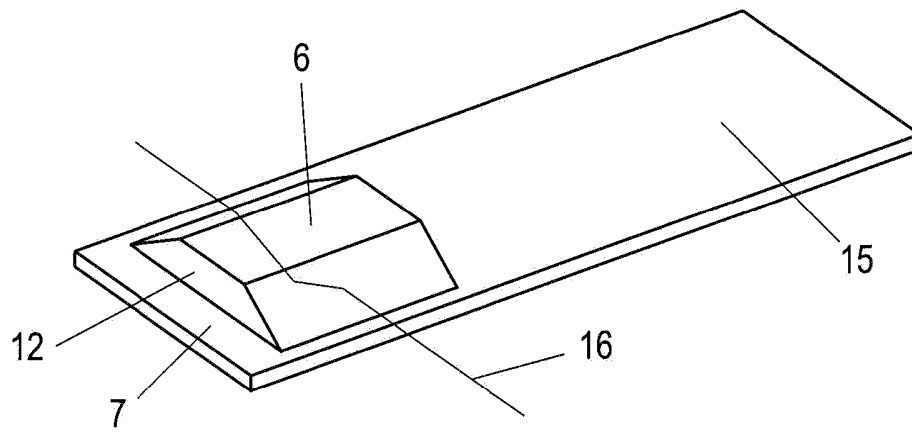


Fig. 3

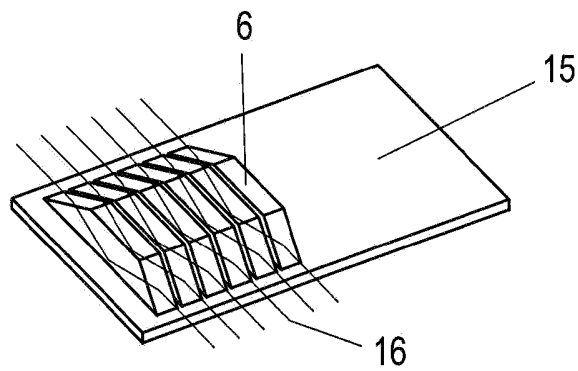


Fig. 4

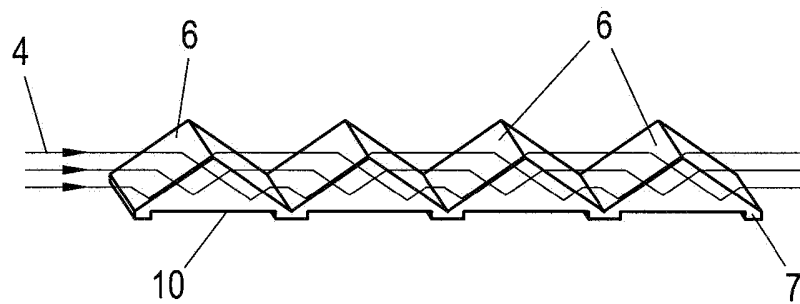


Fig. 5

003386

3/3

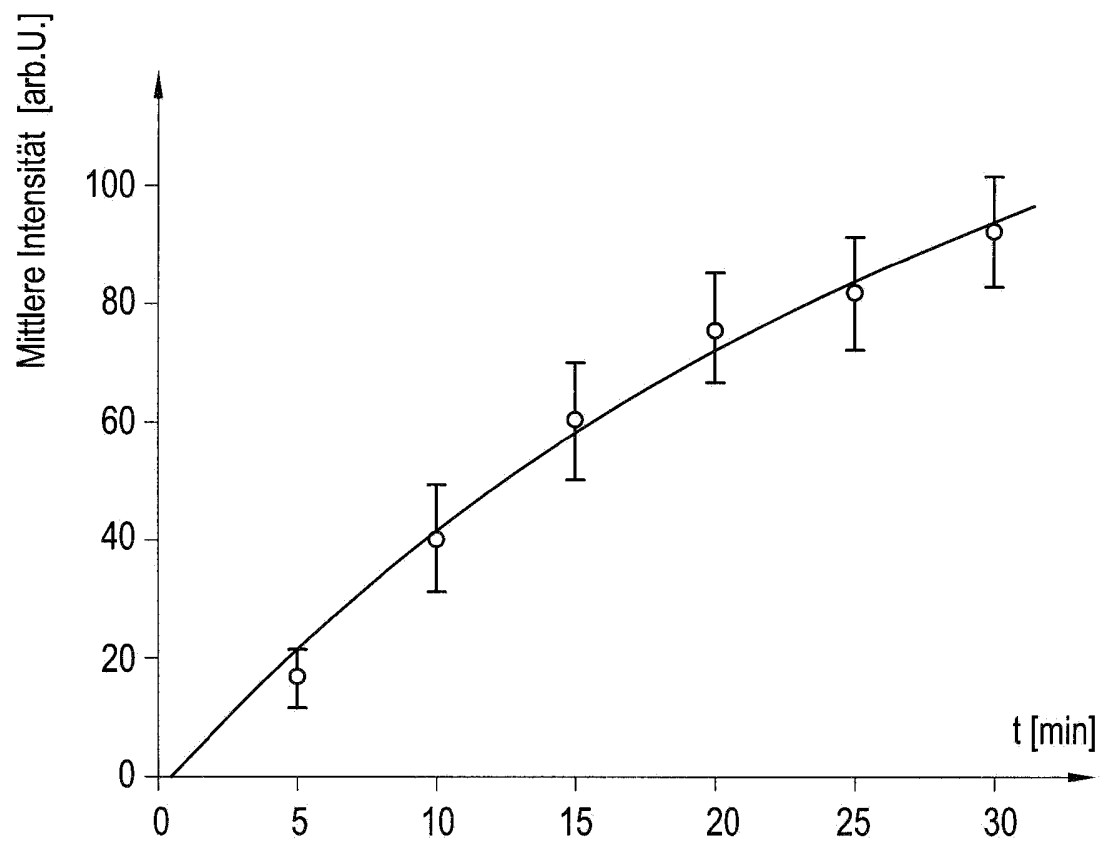


Fig. 6