

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21)

Anmeldenummer:

A 50290/2019

(22)

Anmeldetag:

03.04.2019

(43)

Veröffentlicht am:

15.09.2020

(51)

Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

(56)

Entgegenhaltungen:
WO 2017046320 A1
Hawa G, Sonnleitner L, Missbichler A, Prinz A, Bauer G, Mauracher C. Single step, direct fluorescence immunoassays based on metal enhanced fluorescence (MEF-FIA) applicable as micro plate-, array-, multiplexing- or point of care-format. Anal Biochem. 2018 May 15;549:39-44. WO 2007094817 A2

(71)

Patentanmelder:
FIANOSTICS GmbH
2700 Wiener Neustadt (AT)

(74)

Vertreter:
Schwarz & Partner Patentanwälte OG
1010 Wien (AT)

(54)

Substrat zur Verstärkung der Chemilumineszenz

(57)

Die vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines Substrats zur Verstärkung der Chemilumineszenz eines oder mehrerer in einer Chemilumineszenzreaktion erzeugten Luminophore, wobei das Substrat einen festen polymeren Träger mit einer Mehrzahl voneinander getrennter Vertiefungen umfasst und der feste Träger zumindest teilweise mit mindestens einem Metall beschichtet ist.

Fig. 1

Zusammenfassung:

Die vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines Substrats zur Verstärkung der Chemilumineszenz eines oder mehrerer in einer Chemilumineszenzreaktion erzeugten Luminophore, wobei das Substrat einen festen polymeren Träger mit einer Mehrzahl voneinander getrennter Vertiefungen umfasst und der feste Träger zumindest teilweise mit mindestens einem Metall beschichtet ist.

Substrat zur Verstärkung der Chemilumineszenz

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Substrats mit einer nano-strukturierten Oberfläche zur Verstärkung der Chemilumineszenz. Dieser Effekt ist auch als metall-verstärkte Chemilumineszenz (MEC, "Metal Enhanced Chemiluminescence") bekannt.

Chemilumineszenz ist ein Prozess, bei dem durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlung im Bereich des ultravioletten und/oder sichtbaren Lichts emittiert wird. Bei Chemilumineszenz-Reaktionen sind meist oxidationsempfindliche Verbindungen beteiligt, welche zunächst zu instabilen Zwischenverbindungen oxidieren, um in einer anschließenden Reaktion Licht freizusetzen. Derartige Verbindungen werden auch als Luminophore bezeichnet. Ein bekanntes und häufig eingesetztes Luminophor ist Luminol. Dieses wird u. a. bei der Spurensicherung verwendet, da sich mit Luminol Blutreste nachweisen lassen. Dabei macht man sich zunutze, dass Luminol nach dessen Oxidation mit einem Oxidationsmittel unter Abgabe von bläulichem Licht reagiert. Diese Reaktion verläuft jedoch nur in Anwesenheit von Katalysatoren (z.B. komplex-gebundenes Fe^{3+}) ausreichend schnell, d.h. in Abwesenheit von Katalysatoren ist keine Reaktion und damit keine Chemilumineszenz zu beobachten. Luminophore können auch mittels Umsetzung bestimmter Verbindungen in Anwesenheit von Enzymen erzeugt werden. Die Tatsache, dass Enzyme in der Lage sind, Luminophore zu erzeugen, wird u.a. in der Analytik zunutze gemacht. So werden beispielsweise bei ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Anwendungen vielfach Analyt-bindende Moleküle mit entsprechenden Enzymen gekoppelt, um die Anwesenheit bestimmter Analyten in einer Probe durch Erzeugung von Luminophoren zu bestimmen.

Insbesondere bei analytischen Verfahren ist es von großer Bedeutung bereits geringe Mengen eines Analyten in einer Probe zu bestimmen. Herkömmliche Verfahren zur Bestimmung und Quantifizierung von Analyten in einer Probe haben häufig den Nachteil, dass diese nicht in der Lage sind Analytkonzentrationen im Nano- oder Pikogrammbereich zu erfassen.

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung Mittel und Verfahren bereitzustellen, die in der Lage sind, die Sensitivität der zuvor beschriebenen analytischen Verfahren zu erhöhen.

Diese Aufgabe wird durch die Verwendung eines Substrats zur Verstärkung der Chemilumineszenz eines oder mehrerer in einer Chemilumineszenzreaktion erzeugten Luminophore gelöst, wobei das Substrat einen festen polymeren Träger mit einer Mehrzahl voneinander getrennter Vertiefungen umfasst und der feste Träger zumindest teilweise mit mindestens einem Metall beschichtet ist.

Derartige Substrate sind für die Fluoreszenzverstärkung z.B. aus der WO 2017/046320 bekannt. Durch die nano-strukturierte Oberflächen dieser Substrate ist es möglich die Fluoreszenzausbeute von fluoreszierenden Verbindungen signifikant zu erhöhen, wodurch die Sensitivität von Fluoreszenzmessungen durch einen sogenannten MEF („Metal enhanced Fluorescence“)-Effekt drastisch erhöht wird. Dadurch wird die Messung geringster Fluorophor-Konzentrationen ermöglicht. Diese Fluoreszenzverstärkung ist jedoch nur dann beobachtbar, wenn sich das Fluorophor in unmittelbarer Nähe (weniger als 50 nm) des Substrats befindet (Hawa et al. Analytical Biochemistry 549(2018): 39-44). Dieser MEF-Effekt ist nur dann beobachtbar, wenn die Fluoreszenz entweder durch das transparente Substrat oder nach Entfernung einer etwaig vorhandenen Lösung, die nicht oberflächengebundenes und damit nicht verstärktes Fluorophor enthält, direkt an der Oberfläche gemessen wird. Eine Verstärkung mittels eines MEF-Effekts von frei in Lösung befindlichen Molekülen ist somit nicht möglich.

Es hat sich jedoch überraschenderweise herausgestellt, dass Oberflächenstrukturen, welche in der Lage sind, die Fluoreszenz von fluoreszierenden Stoffen zu verstärken auch dazu verwendet werden können, um die elektromagnetische Emission von in einer Chemilumineszenzreaktion erzeugten Luminophoren zu verstärken. Jedoch zeigte sich, dass der Lumineszenz-verstärkende Effekt nicht nur dann zu beobachten ist, wenn sich das Luminophor in unmittelbarer Nähe (d.h. weniger als 50 nm) zum eingangs beschriebenen Substrat befindet und dieser Effekt sich scheinbar

auf die gesamte Lösung erstreckt. Er kann also auch bei der Messung von oben durch die gesamte Bulklösung beobachtet werden. Im Gegensatz zu analytischen Verfahren, in denen die Fluoreszenz eines indirekt an einem festen Träger gebundenen Fluorophors bestimmt wird (z.B. ELISA), befinden sich Luminophore, die von indirekt an einem festen Träger gebundenen Enzyme erzeugt werden, in freier Lösung und können in der zu untersuchenden wässrigen Lösung frei diffundieren. Dadurch befinden sich die meisten Luminophore in einem Reaktionsansatz nicht in unmittelbarer Nähe des Substrats sondern diffundieren von diesem weg. Trotz dieser Diffusionseffekte zeigt sich, dass das erfindungsgemäße Substrat die Chemilumineszenz der Luminophore in unerwarteter Weise signifikant verstärkt. Dies ist in Anbetracht der Erkenntnisse aus Hawa et al. (Analytical Biochemistry 549(2018): 39-44) nicht zu erwarten, da die Autoren dieser Publikation zeigen konnten, dass ein Fluoreszenzverstärkender Effekt nur in unmittelbarer Nähe des erfindungsgemäßen Substrats beobachtet werden kann.

Die erfindungsgemäßen festen Träger inklusive Vertiefungen können grundsätzlich mit verschiedenen Verfahren hergestellt werden, wie dies auch in der WO 2017/046320 dargelegt ist.

- (a) Die festen Träger werden mit samt den Vertiefungen in einem Schritt gefertigt (z.B. Spritzguss)
- (b) Die Vertiefungen werden in einen bestehenden festen Träger in weiteren Prozessschritten einbracht (z.B. Heißprägen, Elektronenstrahllithografie oder "Extreme Ultra Violet" (EUV) in Verbindung mit Reaktiven Ionenätzen oder Laserablation)
- (c) Auf einem festen Träger wird eine dünne strukturierbare Polymerschicht aufgebracht, in welche die Vertiefungen eingebracht werden, wie beispielsweise bei der Herstellung der BD-50 Blu-ray Disc (UV-Nanoimprintlithographie)

Besonders geeignet zur Herstellung dieser Strukturen ist auch die sogenannte Nanoprägelithografie (Chou S. et al., Nanoimprint lithography, Journal of Vacuum Science & Technology B

Volume 14, Nr. 6, 1996, S. 4129-4133) angewandt werden. Zur Herstellung von Nanostrukturen mittels Nanoprägelithografie benötigt man ein Positiv, meist ein Monomer oder Polymer, sowie einen nanostrukturierten Stempel ("Master"). Der Stempel selbst kann durch Nanolithographie produziert werden, wobei dieser alternativ auch durch Ätzen hergestellt werden kann. Das Positiv wird auf ein Substrat aufgebracht und anschließend über die Temperatur des Glasübergangs erhitzt, d.h., es wird verflüssigt, bevor der Stempel eingedrückt wird. Um ein kontrollierbares (und kurzzeitiges) Aufheizen zu erreichen, wird häufig Laser bzw. UV- Licht eingesetzt. Auf Grund der Viskosität des Positivs beim Erhitzen werden die Zwischenräume des Stempels vollständig damit ausgefüllt. Nach dem Abkühlen wird der Stempel wieder entfernt. Das Positiv, das den festen Träger des erfindungsgemäßen Substrats darstellt, wird mittels Sputter-Verfahren mit Metall beschichtet.

Die Strukturierung der Stempel für die Lithografie kann wiederum mit Nanoimprint erfolgen. Als Materialien wird dabei Glas oder lichttransparenter Kunststoff verwendet.

Besonders bevorzugt ist die Herstellung des festen Trägers inklusive Vertiefungen mittels Spritzguss. Die Formeinsätze hierfür werden typischerweise mittels Ni-Galvanik von einem lithografisch hergestellten Si-Wafer abgezogen.

Der feste Träger kann grundsätzlich eine beliebige Form (z.B. kugelförmig, planar) aufweisen, wobei eine planare Form besonders bevorzugt ist.

Eine "Vertiefung", wie hier verwendet, bezieht sich auf das Niveau der die Vertiefung umgebenden Oberfläche des festen Trägers und erstreckt sich in den Träger hinein und nicht wie eine Erhebung oder Erhöhung aus diesem heraus. Eine Vertiefung im Sinne der vorliegenden Erfindung weist einen Boden auf, der durch die Seitenwände begrenzt ist. Die Tiefe ist somit der Abstand von der Oberfläche bis zu einem Boden der Vertiefung. Die Vertiefungen am festen Träger können unterschiedliche Formen (z.B. rund, oval, viereckig, rechteckig) aufweisen.

Eine "Mehrzahl" von Vertiefungen, wie hier verwendet, bedeutet, dass der erfindungsgemäße feste Träger mindestens eine, vorzugsweise mindestens zwei, noch mehr bevorzugt mindestens 5,

noch mehr bevorzugt mindestens 10, noch mehr bevorzugt mindestens 20, noch mehr bevorzugt mindestens 30, noch mehr bevorzugt mindestens 50, noch mehr bevorzugt mindestens 100, noch mehr bevorzugt mindestens 150, noch mehr bevorzugt mindestens 200, Vertiefungen aufweist. Diese Vertiefungen können auf einer Fläche des festen Trägers von $1000\text{ }\mu\text{m}^2$, vorzugsweise von $500\text{ }\mu\text{m}^2$, noch mehr bevorzugt von $200\text{ }\mu\text{m}^2$, noch mehr bevorzugt von $100\text{ }\mu\text{m}^2$, vorgesehen sein. Alternativ können sich die Vertiefungen über eine Länge von vorzugsweise $1000\text{ }\mu\text{m}$, noch mehr bevorzugt von $500\text{ }\mu\text{m}$, noch mehr bevorzugt von $200\text{ }\mu\text{m}$, noch mehr bevorzugt von $100\text{ }\mu\text{m}$, erstrecken.

"Voneinander getrennte Vertiefungen", wie hier verwendet, bedeutet, dass die Vertiefungen durch deren Seitenbegrenzungen voneinander getrennt und keine Verbindung zueinander aufweisen - auch nicht an der Oberfläche des festen Trägers.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen die Vertiefungen einen Abstand ("Periode") zueinander von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $2,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,4\text{ }\mu\text{m}$, mehr bevorzugt von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,3\text{ }\mu\text{m}$, auf. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wiesen die Vertiefungen einen Abstand zueinander von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $2\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,8\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,6\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,4\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,2\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,3\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $2,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $2\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,8\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,6\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,3\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ bis $2,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ bis $2\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,8\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,6\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,4\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $2,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $2\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,8\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,6\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,4\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,5\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,3\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,6\text{ }\mu\text{m}$ bis $2,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,6\text{ }\mu\text{m}$ bis $2\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,6\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,8\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,6\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,6\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise von $0,6\text{ }\mu\text{m}$ bis $1,5\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise

von 0,6 μm bis 1,4 μm , vorzugsweise von 0,6 μm bis 1,3 μm , vorzugsweise von 0,7 μm bis 2,5 μm , vorzugsweise von 0,7 μm bis 2 μm , vorzugsweise von 0,5 μm bis 1,8 μm , vorzugsweise von 0,7 μm bis 1,6 μm , vorzugsweise von 0,7 μm bis 1,5 μm , vorzugsweise von 0,7 μm bis 1,4 μm , vorzugsweise von 0,7 μm bis 1,3 μm , auf, wobei die Vertiefungen am meisten bevorzugt einen Abstand von 0,2 μm bis 1,4 μm bzw. 0,3 μm bis 1,3 μm zueinander aufweisen. Der Abstand zwischen den Vertiefungen ("Periode") wird vom Mittelpunkt der Vertiefung gemessen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen die Vertiefungen des festen Trägers eine Länge und eine Breite auf, wobei das Verhältnis der Länge zur Breite 2:1 bis 1:2, insbesondere ca. 1:1, beträgt.

Die Vertiefungen am festen Träger können im Prinzip jede Form aufweisen. Besonders bevorzugt sind jedoch Vertiefungen, die ein Verhältnis der Länge zur Breite von 2:1 bis 1:2, vorzugsweise 1,8:1, vorzugsweise 1,6:1, vorzugsweise 1,5:1, vorzugsweise 1,4:1, vorzugsweise 1,3:1, vorzugsweise 1,2:1, vorzugsweise 1,1:1, vorzugsweise 1:1,8, vorzugsweise 1:1,6, vorzugsweise 1:1,5, vorzugsweise 1:1,4, vorzugsweise 1:1,3, vorzugsweise 1:1,2, vorzugsweise 1:1,1, insbesondere 1:1, aufweisen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beträgt die Länge und die Breite der Vertiefungen 0,1 μm bis 2 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 2 μm , vorzugsweise 0,3 μm bis 2 μm , vorzugsweise 0,1 μm bis 1,8 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 1,8 μm , vorzugsweise 0,3 μm bis 1,8 μm , vorzugsweise 0,1 μm bis 1,5 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 1,5 μm , vorzugsweise 0,3 μm bis 1,5 μm , vorzugsweise 0,1 μm bis 1,2 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 1,2 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 1,2 μm , vorzugsweise 0,1 μm bis 1 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 1 μm , vorzugsweise 0,3 μm bis 1 μm , vorzugsweise 0,1 μm bis 0,8 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 0,8 μm , vorzugsweise 0,3 μm bis 0,8 μm , vorzugsweise 0,1 μm bis 0,6 μm , vorzugsweise 0,2 μm bis 0,6 μm , vorzugsweise 0,3 μm bis 0,6 μm , am meisten bevorzugt 0,2 μm bis 0,6 μm .

Besonders bevorzugt weisen die Vertiefungen des erfindungsgemäßen festen Trägers eine im Wesentlichen runde

Form auf, wobei "im Wesentlichen rund" auch ovale und ellipsoide Formen einschließt. Die Form der Vertiefung ist bei einer Draufsicht auf die Oberfläche des festen Trägers erkennbar.

Die Vertiefungen weisen vorzugsweise eine Tiefe von 0,1 µm bis 5 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 4 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 3 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 2 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 1,5 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 1,2 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 1 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 0,9 µm, vorzugsweise von 0,1 µm bis 0,8 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 5 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 4 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 3 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 2 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 1,5 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 1,2 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 1 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 0,9 µm, vorzugsweise von 0,2 µm bis 0,8 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 5 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 4 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 3 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 2 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 1,5 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 1,2 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 1 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 0,9 µm, vorzugsweise von 0,3 µm bis 0,8 µm, auf. Die Tiefe der Vertiefung ist der Abstand von der Oberfläche des festen mit Metall bedampften Trägers bis zu dem Boden der Vertiefung.

Erfindungsgemäß ist der feste polymere Träger "zumindest teilweise" mit mindestens einem Metall beschichtet. "Zumindest teilweise", wie hier verwendet, bedeutet, dass jener Bereich des festen Trägers, in dem sich die Vertiefungen befinden zumindest zu 20%, vorzugsweise zumindest zu 30%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 40%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 50%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 60%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 70%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 80%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 90%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 95%, noch mehr bevorzugt zumindest zu 98%, insbesondere zu 100%, mit mindestens einem Metall beschichtet ist. Da der MEF-Effekt eine metallische Oberfläche voraussetzt, ist es besonders bevorzugt, dass die Oberfläche des festen Trägers zumindest im Bereich der Vertiefungen mit mindestens einem Metall beschichtet ist. Dabei kann der feste Träger auch mehrere (z.B.

mindestens zwei, mindestens drei, mindestens vier oder mindestens fünf) übereinander angeordnete Metallschichten aus demselben oder unterschiedlichen Metallen umfassen. Ein Vorteil für die Verwendung mehrerer Schichten an Metall am festen Träger ist, dass die erste Metallschicht (z.B. Chrom), die direkt auf den Träger aufgebracht wird, die Haftung der weiteren Metallschichten verbessern kann.

Der Begriff „übereinander angeordnet“, wie hierin verwendet, bedeutet, dass eine Metallschicht mittelbar oder unmittelbar auf einer anderen Metallschicht angeordnet ist. Dadurch ergibt sich ein mehrschichtiges System aus Metallschichten des gleichen Metalls oder unterschiedlicher Metalle.

Die Metallschichten sind vorzugsweise kontinuierlich und nicht unterbrochen. Erfindungsgemäß konnte jedoch festgestellt werden, dass die Metallschicht oder Metallschichten am festen polymeren Träger auch unterbrochen sein können, ohne dass der Fluoreszenz-verstärkende Effekt beeinträchtigt wird. Die unterbrochene Metallschicht kann beispielsweise durch eine Leitfähigkeitsmessung der Oberfläche des erfindungsgemäßen Substrats erfolgen. Eine geringere bzw. keine Leitfähigkeit bedeutet, dass die Metallschicht(en) an der Substratoberfläche unterbrochen sind. Unterbrochene Metallschichten können beispielsweise dadurch hergestellt werden, in dem ein im Wesentlichen vollständig mit Metall beschichtetes Substrat mit einer vorzugsweise salzhaltigen Lösung, wie beispielsweise 10mM Phosphatpuffer mit 150mM NaCl für einen bestimmten Zeitraum (10-90 Minuten) in Kontakt gebracht wird.

Der feste Träger der vorliegenden Erfindung ist mit "mindestens einem Metall beschichtet". Vorzugsweise umfasst die Metallschicht mindestens zwei, noch mehr bevorzugt mindestens drei, noch mehr bevorzugt mindestens vier, noch mehr bevorzugt mindestens fünf, verschiedene Metalle. Die Metalle können mit im Stand der Technik bekannte Methoden auf den festen Träger aufgebracht werden, wobei vorzugsweise Sputtern (Kathodezerstäubung) oder thermisches Verdampfen, Elektronenstrahlverdampfen, Laserstrahlverdampfen, Lichtbogenverdampfen, Molekularstrahlepitaxie, Ionenstrahl gestützte Deposition und Ionenplattieren eingesetzt wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Metall ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Silber, Gold, Aluminium, Chrom, Indium, Kupfer, Nickel, Palladium, Platin, Zink, Zinn und Legierungen umfassend eines oder mehrerer dieser Metalle.

Erfindungsgemäß können diese Metalle bzw. Legierungen davon zum Beschichten des erfindungsgemäßen festen Trägers verwendet werden. Besonders bevorzugt ist die Beschichtung des festen Trägers mit Silber oder Legierungen umfassend Silber, da Silber bzw. dessen Legierungen einen besonders großen Verstärkungseffekt zeigen. Besonders bevorzugt ist eine Legierung, die Silber, Indium und Zinn umfasst. Die Silber-haltigen Legierungen weisen vorzugsweise einen Silbergehalt von mehr als 10%, noch mehr bevorzugt von mehr als 30%, noch mehr bevorzugt von mehr als 50%, noch mehr bevorzugt von mehr als 70%, noch mehr bevorzugt von mehr als 80%, noch mehr bevorzugt von mehr als 90%, auf.

Nach dem Beschichten des festen Trägers mit mindestens einem Metall oder vor Verwendung des erfindungsgemäßen Substrats bzw. des erfindungsgemäßen festen Trägers, wird der feste Träger bzw. das Substrat vorzugsweise mit einer wässrigen Zusammensetzung umfassend mindestens eine Säure oder ein Salz eines Halogens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fluor, Chlor, Brom und Iod behandelt.

Es hat sich gezeigt, dass die Fluoreszenzverstärkung durch die Vorbehandlung des Substrats bzw. des festen Trägers mit einer wässrigen Lösung (z.B. einem Puffer) umfassend mindestens eine Säure eines Halogens oder seines Salzes davon nochmals verstärkt werden kann. Daher ist es besonders bevorzugt den festen Träger bzw. das Substrat mit einer säure- bzw. salzhaltigen Lösung vorzubehandeln. Alternativ dazu kann die wässrige Lösung (z.B. einem Puffer) umfassend mindestens eine Säure oder ein Salz eines Halogens anstelle anderer Lösungen auch während der Messung eingesetzt werden. Erfindungsgemäß eignen sich sämtliche Säuren der Halogensgruppe oder deren Salze, wobei jedoch die radioaktiven Halogene in der Praxis nicht erwünscht werden. Daher werden besonders bevorzugt die Säuren oder Salze der Halogene Fluor, Chlor, Brom und Iod, am meisten bevorzugt

Chloride, insbesondere Metallchloride, verwendet. Die erfindungsgemäß eingesetzten Säuren oder Salze sind besonders bevorzugt Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalze, insbesondere Natrium-, Kalium- oder Lithiumsalze.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die wässrige Zusammensetzung mindestens eine Säure oder ein Salz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus HCl, HF, HBr, HI, NaCl, NaF, NaBr, NaJ, KCl, KF, KBr und KI. Die wässrige Zusammensetzung umfassend mindestens einer Säure eines Halogens oder dessen Salzes kann neben der mindestens einen Säure oder ihres Salzes weitere Stoffe wie z.B. andere Säuren oder Salze umfassen. Besonders bevorzugt werden Stoffe, welche eine Pufferfunktion erfüllen, eingesetzt (z.B. Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Carbonate).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der feste Träger mit der wässrigen Zusammensetzung für mindestens 1, vorzugsweise für mindestens 2, noch mehr bevorzugt für mindestens 5, noch mehr bevorzugt für mindestens 10, noch mehr bevorzugt für mindestens 20, Minuten behandelt. Es hat sich erfindungsgemäß gezeigt, dass der Fluoreszenzverstärkende Effekt des mit mindestens einem Metall beschichteten Trägers besonders hoch ist, wenn der feste Träger für mindestens 1 Minute mit der wässrigen Zusammensetzung umfassend mindestens eine Säure eines Halogens oder seines Salzes, vorzugsweise bei Raumtemperatur (22°C), inkubiert wird. Erfolgt die Inkubation bei höheren Temperaturen (z.B. zwischen 30°C und 40°C) kann die Inkubationszeit entsprechend reduziert werden (z.B. mindestens 30 Sekunden). Erfolgt die Inkubation jedoch bei tieferen Temperaturen (z.B. zwischen 10°C und 20°C) kann die Inkubationszeit entsprechend verlängert werden (z.B. mindestens 2 Minuten).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die Metallschicht am festen Träger eine Dicke von 10 nm bis 200 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 100 nm, auf. Besonders bevorzugt beträgt die Dicke der Metallschicht am festen Träger 10 nm bis 190 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 180 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 170 nm,

vorzugsweise von 10 nm bis 160 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 150 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 140 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 130 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 120 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 110 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 100 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 90 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 80 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 70 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 60 nm, vorzugsweise von 10 nm bis 50 nm, vorzugsweise 15 nm bis 200 nm, vorzugsweise 15 nm bis 190 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 180 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 170 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 160 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 150 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 140 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 130 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 120 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 110 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 90 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 80 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 70 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 60 nm, vorzugsweise von 15 nm bis 50 nm, vorzugsweise 20 nm bis 200 nm, vorzugsweise 20 nm bis 190 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 180 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 170 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 160 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 150 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 140 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 130 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 120 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 110 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 100 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 90 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 80 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 70 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 60 nm, vorzugsweise von 20 nm bis 50 nm.

Der "feste Träger" kann erfindungsgemäß aus einem beliebigen polymeren Material bestehen, sofern sich dieses mit einem Metall beschichten lässt und sofern Vertiefungen erzeugt werden können. Beispielsweise umfasst oder besteht der feste polymere Träger aus synthetischen Polymeren wie Polystyrol, Polyvinylchlorid oder Polycarbonat, Cyloolefin, Polymethylemethacrylat, Polylaktat oder Kombinationen davon. Grundsätzlich wären auch nichtpolymere Träger wie Metalle, Keramiken oder auch Glas einsetzbar, sofern sich dieser mit einem Metall beschichten lässt und sofern Vertiefungen erzeugt werden können.

Der feste Träger umfasst vorzugsweise mindestens ein Material ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Gruppe der thermoplastischen Polymere und der Polykondensate.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das thermoplastische Polymer ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyolefine, Vinylpolymere, Styrolpolymere, Polyacrylate, Polyvinylcarbazol, Polyacetal und Fluorkunststoffe.

Das Polykondensat ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus thermoplastische Polykondensate, duroplastische Polykondensate und Polyaddukte.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Material des polymeren festen Trägers organische und/oder anorganische Zusatzstoffe und/oder Füllstoffe, wobei diese vorzugsweise ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus TiO_2 , Glas, Kohlenstoff, Farbpigmente, Lipide und Wachse.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Substrat Teil einer Kapillare, einer Mikrotiterplatte, eines mikrofluidischen Chips, eines Teststreifens (für "Lateral Flow Assays"), eines Trägers (z.B. Objektträgers) für die Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere für hochauflösende Verfahren wie die konfokale Lasermikroskopie nach dem Punktscanner-Prinzip sowie 4Pi-Mikroskope und STED (Stimulated Emission Depletion)-Mikroskope, eines Sensor Arrays oder sonstigem optischen Detektorfeldes ist.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Substrats in Mikrotiterplatten, wobei die Mikrotiterplatten 6, 12, 24, 48, 96, 384 oder 1536 Wells umfassen können. Mikrotiterplatten werden für verschiedenste Messungen und Assays eingesetzt, bei denen auch häufig die Fluoreszenz von Proben gemessen wird. Durch das Vorsehen des erfindungsgemäßen Substrats in den Wells von Mikrotiterplatten kann die Fluoreszenzausbeute der Proben signifikant gesteigert werden. Die Substrate können mit verschiedensten Methoden in den Wells eingebracht und fixiert werden. Vorzugsweise werden die Substrate dabei mittels Kleben, Schweißtechniken (z.B. Laserschweißen) und thermisches Verfügen in den Wells fixiert.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst oder besteht der feste Träger aus einem Cyclo-Olefin-Copolymer oder Cyclo-Olefin-Polymer und ist

Teil einer Mikrotiterplatte bzw. Teil der Wells einer Mikrotiterplatte. Als besonders geeignet hat sich dabei COP 1060R (Zenon[®]1060R) erwiesen. Der Träger ist dabei vorzugsweise mit 10 bis 60 nm, bevorzugt mit bis 40 nm, Metall (z.B. Silber) beschichtet.

Bestimmte Messungen mit fluoreszierenden Substanzen wie Fluorophore werden in Kapillaren durchgeführt. Daher ist es bevorzugt die erfindungsgemäßen Substrate in Kapillaren vorzusehen. Eine beispielhafte Anwendung ist die Zytometrie bzw. die Durchflusszytometrie, bei der die Anzahl oder auch die Art fluoreszierender Zellen oder fluoreszenzmarkierter Zellen mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung bestimmt wird.

Zahlreiche Anwendungen zur Fluoreszenzmessung erfolgen in mikrofluidischen Chips (z.B. als "Lab-on-a-chip"-Anwendung), wobei im Detektionsbereich solcher Chips die erfindungsgemäßen Substrate vorgesehen sein können. Auch in herkömmlichen Küvetten können die erfindungsgemäßen Substrate vorgesehen sein. Dadurch kann bei Fluoreszenzmessungen die Fluoreszenzausbeute ebenfalls signifikant gesteigert werden, so dass geringsten Mengen an fluoreszierenden Stoffen in einer Probe gemessen werden können. Erfindungsgemäß kann jede Küvettenform verwendet werden. Auch bei Teststreifen Systemen ("Lateral Flow Assays"), die für Schnelltestungen oder In-Feld Testungen (Point of Care) eingesetzt werden, können die erfindungsgemäßen Substrate (z.B. im Detektionsbereich („Detection Line“) eingesetzt werden, um die Fluoreszenz eines markierten Analyten (z.B. eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers) zu verstärken und so die Empfindlichkeit des Tests zu verbessern.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das Luminophor durch ein Enzym erzeugt.

Luminophore sind chemische Verbindungen, welche bei einer bestimmten Reaktion (z.B. Oxidation mit Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid) zu einem Produkt reagieren. Während dieser Reaktion wird elektromagnetische Strahlung im ultravioletten und/oder sichtbaren Bereich emittiert. Luminophore können erfindungsgemäß mit Hilfe eines oder mehrerer Enzyme erzeugt werden. Diese Enzyme sind dabei in der Lage, Vorstufen von Lumino-

phoren umzusetzen, um diese Vorstufen in energiereiche und instabile Luminophore zu überführen.

Vorzugsweise ist das oder sind die erfindungsgemäß eingesetzten Enzyme ausgewählt aus der Gruppe der Peroxidasen und Oxygenase, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Meerrettichperoxidase (HRP), alkalischer Phosphatase (ALP) und Luciferase. Diese Enzyme sind in der Lage, bestimmte Verbindungen in einer Weise umzusetzen, dass diese elektromagnetische Strahlung emittieren. Geeignete chemilumineszente Verbindungen sind dem Fachmann hinreichend bekannt (siehe z.B. „Chemiluminescence in Organic Chemistry“, Karl-Dietrich Gundermann Frank McCapra, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1987, ISBN 978-3-642-71647-8) und werden dem Enzym entsprechend ausgewählt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Luminophor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Luminol und seinen Derivaten, 1,2-Dioxetane, Acridiniumestern und Luciferinen. Zusätzlich zu einem oder mehreren dieser Luminophore, können auch Oxalsäurederivate, vorzugsweise Oxalsäurearylester, wie z.B. Bis(2,4,6-trichlorphenyl)oxalat (TCPO), Bis(2,3-dinitrophenyl)oxalat (DNPO) oder Bis(2,4,5-trichlorphenyl-6-carbopentoxyphenyl)oxalat (CPPPO), eingesetzt werden, die bekannter Weise bei Umsetzung mit Peroxiden, wie z.B. Wasserstoffperoxid, instabile Peroxyoxalate, wie z.B. 1,2-Dioxetandion, bilden können, welche während deren Zerfallsreaktion z.B. UV Licht emittieren können.

Das oder die erfindungsgemäßen Luminophor-erzeugenden Enzyme sind vorzugsweise direkt und/oder indirekt an das Substrat gebunden. Dadurch ist es möglich das erfindungsgemäße Substrat, beispielsweise, mit Enzyme zu beschichten, die in der Lage sind, Luminophore zu erzeugen. Dies ist insbesondere bei der Bestimmung von Analyten in einer Lösung durch Bindung der zu bestimmenden Analyten an einer Oberfläche von Vorteil (z.B. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)).

Je nach Anwendungsgebiet kann das Enzym direkt oder indirekt über ein oder mehrere weitere Moleküle an das Substrat gebunden werden. Verfahren zur Bindung von derartigen Molekülen an Metallstrukturen sind hinreichend bekannt. Im einfachsten

Fall erfolgt die Bindung durch physikalisch chemische Adsorption (vermittelt über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen) der Proteine an die Metalloberfläche (z.B. Nakanishi K. et al. J Biosci Bioengin 91(2001):233-244). Auch kovalente Methoden zur Immobilisierung von Proteinen nach Derivatisierung der Metalloberflächen sind bekannt (z.B. GB Sigal et al. Anal Chem 68(1996):490-7).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Enzym indirekt über ein Trägermolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, Antikörperfragmente, vorzugsweise Fab, F(ab)₂ oder scFv Fragmente, Nukleinsäuren, Lipiden, Viruspartikeln, Aptameren und Kombinationen davon an das Substrat gebunden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verstärkung der Chemilumineszenz eines oder mehrerer in einer Chemilumineszenzreaktion erzeugten Luminophore in einer wässrigen Lösung umfassend den Schritt des Inkontaktbringens der wässrigen Lösung mit einem Substrat wie oben definiert.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das von Luminophoren in einer wässrigen Lösung freigesetzte Licht durch Inkontaktbringen dieser Lösung mit dem erfindungsgemäßen Substrat verstärkt werden. Damit erhöht sich die Sensitivität von Reaktionen, beispielsweise, in denen ein Luminophor erzeugt wird. Beispielhaft kann der Nachweis von Blutspuren mit Hilfe von Luminol erwähnt werden. Dabei kann in wässrigen Proben bzw. in einer wässrigen Lösung gespülte bzw. gelöste Proben, die nur geringste Mengen an Blut aufweisen, Blut nachgewiesen werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung oder zur Quantifizierung mindestens eines Analyten in einer wässrigen Probe umfassend die Schritte:

- a) Inkontaktbringen der Probe mit einem erfindungsgemäßen Substrat umfassend ein direkt oder indirekt am Substrat gebundenes Analyt-bindendes Molekül,
- b) Zugabe mindestens eines weiteren Analyt-bindenden Moleküls, an das mindestens ein Enzym direkt oder indirekt gebunden ist, das in einer Chemilumineszenzreaktion aus

einem oder mehreren Substraten ein oder mehrere Lumino-
phore erzeugt und

- c) Messen der durch die Chemilumineszenzreaktion in Schritt
b) entstehenden Lichtemission.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Bestimmung oder zur Quantifizierung mindestens eines Analyten in einer wässrigen Probe beruht auf Nachweisverfahren, die dem Fachmann hinreichend bekannt sind (z.B. ELISA), mit dem Unterschied, dass die wässrige Probe mit dem nachzuweisenden und/oder zu quantifizierenden Analyten mit einem erfindungsgemäßen und in der WO 2017/046320 offenbarten Substrat in Kontakt gebracht wird. Durch das Vorhandensein dieses Substrats ist es möglich das im Zuge einer Chemilumineszenzreaktion freigesetzte Licht signifikant zu verstärken.

In einem bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren wird eine wässrige Probe mit einem Analyt-bindenden Molekül (z.B. Antikörper oder Antikörperfragment), das am Substrat mit bekannten Verfahren gebunden ist, in Kontakt gebracht. Dadurch werden in der wässrigen Probe vorhandene Analytmoleküle indirekt an die Substratoberfläche gebunden. Im Zuge eines Waschschriffs werden nicht an die Substratoberfläche indirekt gebundene Analyten entfernt. Mit Hilfe eines weiteren Analyt-bindenden Moleküls wird mindestens ein Enzym ebenfalls indirekt an das erfindungsgemäße Substrat gebunden. Nach einem weiteren Waschschriff, in welchem das nicht an einem Analyten gebundene weitere Analyt-bindende Molekül entfernt wurde, wird ein Substrat zugesetzt, aus dem das Enzym ein Luminophor erzeugen kann, welches in einem der letzten Schritte des Verfahrens Licht freisetzt. Diese Licht kann mit herkömmlichen Methoden qualitative oder quantitativ bestimmt werden.

Das Luminophor wird - wie bereits eingangs ausgeführt - in einer Chemilumineszenzreaktion von einem Enzym erzeugt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Enzym ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Meerrettichperoxidase, Alkalischer Phosphatase, Luciferase und generell hydrolytischen Enzymen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Luminophor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Luminol und seinen Derivaten, 1,2-Dioxetane, Acridniumestern oder Luciferinen.

Bevorzugte Kombinationen aus Enzymen und Substraten können ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Meerettichperoxidase/Luminol, alkalischer Phosphatase/1,2-Dioxetanen und Luciferase/Luciferin.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das am Substrat gebundene und das mindestens eine weitere Analyt-bindende Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, Antikörperfragmente, vorzugsweise Fab, F(ab)'₂ oder scFv Fragmente, Nukleinsäuren, und Kombinationen davon.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung das Enzym indirekt über ein Trägermolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antikörper und Antikörperfragmente, vorzugsweise Fab, F (ab) '2 oder scFv Fragmente, gebunden ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Lichtemission in Schritt b) bei einer Wellenlänge von 280 nm bis 850 nm gemessen wird.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Lichtemission in Schritt b) in einem Abstand von mehr als 40 nm, vorzugsweise von mehr als 50 nm, vom Substrat gemessen wird.

Die gegenständliche Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele eingehender erläutert ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt das erfindungsgemäße Substrat umfassend einen festen Träger, der mit einer Metallschicht überzogen ist. Der feste Träger weist Vertiefungen mit einer Tiefe, einer Breite und einer Länge auf. Die Vertiefungen befinden sich am festen Träger in einem bestimmten Abstand (Periode) zueinander.

Fig. 2 zeigt die Draufsicht (A) und einen Querschnitt (B) eines erfindungsgemäßen festen Trägers. Die Vertiefungen am festen Träger sind durch eine Breite, Länge und Tiefe gekenn-

zeichnet und weisen einen bestimmten Abstand (Periode) zueinander auf.

Fig. 3 zeigt die MEC-Verstärkung in Abhängigkeit von der Antikörper-Konzentration.

Fig. 4 zeigt die Signal/Rauschverhältnisse bei 2-stufigem Assay-Aufbau SRVs auf MEF- und Standard-MTPs. Tabelle 2 und die nachfolgende Graphik geben die erhalten SRVs bzw. MEC-Verstärkungen in Abhängigkeit von Konzentration des beschichteten Ziegenantikörpers

BEISPIELE:

Mittels der im folgenden beschriebenen Beispiele wurde untersucht, ob sich die für die Metal Enhanced Fluorescence entwickelten Substrate auch zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses von Chemilumineszenzmessungen eignen.

Für die folgenden Beispiele wurden Mikrotiterplatten verwendet, die auf ihrem Boden die in der AT 517 746 offenbarten Strukturen aufweisen. Konkret wurden mit Silber beschichtete polymere Träger mit einer Mehrzahl voneinander getrennter Vertiefungen mit einem Durchmesser von 0,4 µm, einer Periode (d.h. Abstand zwischen zwei Vertiefungen) von 1 µm und einer Tiefe von 0,7 µm auf dem Boden der Mikrotiterplatten aufgebracht. Kommerziell erhältliche Mikrotiterplatten der Firma Greiner (Österreich) wurden zu Vergleichszwecken eingesetzt, um das Ausmaß des erzielten Verstärkungseffektes zu erfassen.

Beispiel 1: Direkte Detektion adsorbierter, enzymmarkierter Antikörper

Die einfachste Methode zum Nachweis eines MEC („Metal Enhanced Chemiluminescence“)-Verstärkungseffektes besteht in der Adsorption eines enzymmarkierten Antikörpers an den Boden einer oben beschriebenen Mikrotiterplatte und, nach einem Waschschritt, Nachweis des gebundenen Antikörpers mittels eines Chemilumineszenzsubstrates für das entsprechende Enzym.

Vorgehensweise

- 50 µl einer Esel Anti-Ziege Antikörper (Sigma, SAB3700287, 1mg/ml) Verdünnung in 50mM Phosphatpuffer/100mM NaCl mit Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-15} mol/L wurden für 2h bei RT im Dunkeln auf den MEF-

bzw. Greiner 1x8 HB Strip MTPs (VWR, 737-0195) inkubiert.

- Der Inhalt der Wells (Vertiefungen auf Mikrotiterplatten) wurde verworfen und die Platten 3x mit 200 µl 50mM Phosphatpuffer/100mM NaCl/0,1% TritonX100 gewaschen
- Entsprechend den Herstellerangaben (BM Chemiluminescence ELISA Substrate Kit, Sigma, 11759779001) wurden 10µl des Chemilumineszenz-Substrates mit 100µl des mitgelieferten Verstärkers und 890µl des ebenfalls enthaltenen Assaypuffers gemischt. Bei dem im Kit enthaltenen Substrat handelt es sich um CSPD (Dinatrium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphat) das von der ALP in ein instabiles Dioxetane Anion umgewandelt wird und bei 477nm sein Emissionsmaximum hat. Als Verstärker zur Erhöhung der Quantenausbeute kommt in diesem Kit Emerald II zum Einsatz.
- 150µl dieses Reaktionsgemisches wurden auf die MTPs pipettiert und das entstehende Chemilumineszenzsignal mit einem SPARK Mikrotiterplattenlesegerät von TECAN verfolgt.

Ergebnisse

Zeitlicher Verlauf des Signal/Rauschverhältnisses (SRV, Chemilumineszenz eines Wells mit Antikörper/Chemilumineszenz ohne Antikörper)

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich nahm das SRV bei den Mikrotiterplatten mit einem strukturierten Boden wie eingangs beschrieben (MEF-MTP) über die Zeit zu, während es auf einer Standard Mikrotiterplatte („Greiner MTP“) von Greiner stagniert bzw. sogar abnimmt.

Tabelle 1: SRV im zeitlichen Verlauf

Signal / Rausch-Verhältnis - MEC Verstärkung						
Antikörper (M)	t = 30 sec			t = 300 sec		
	MEF-MTP	Greiner MTP	MEC	MEF-MTP	Greiner MTP	MEC
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

10^{-15}	1,9	1,0	1,9	3,2	1,0	3,2
10^{-14}	4,5	2,0	2,3	10,2	1,9	5,5
10^{-13}	18,4	4,2	4,4	50,2	3,8	13,1
10^{-12}	147,4	8,6	17,1	427,9	8,8	48,7
10^{-11}	1385,8	35,3	39,2	3564,6	36,7	97,2
10^{-10}	8144,8	211,5	38,5	16237,9	176,3	92,1
10^{-9}	16176,0	441,0	36,7	25781,6	309,8	83,2

Dies lässt sich dadurch erklären, dass aufgrund des MEC, der ja die Quantenausbeute erhöht, ein Quenching durch die sich mit Luminophoren anreichende Bulk-Lösung verhindert wird. Damit wird die Detektion des adsorbierten Antikörpers auf den MEF-MTP im Gegensatz zur Standard MTP mit der Zeit immer empfindlicher und erlaubt das Detektionslimit mindestens um einen Zehnerpotenzen zu senken.

Konzentrationsabhängigkeit und Ausmaß des MEC

Eine Quantifizierung des Ausmaßes der Verstärkung erreicht man am einfachsten durch den Vergleich der SRVs auf MEF- und Standard-MTPs.

Dabei zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Größe des MECs (Daten nach 300 sec Messdauer) wie in Fig. 3 gezeigt. Die Verstärkung steigt bis zu einer Konzentration von 10^{-11} molaren Antikörperadsorptionslösungen auf fast das 100 fache an und nimmt dann aber wieder ab, was vermutlich ebenfalls auf zunehmendes Quenching zurückzuführen ist. Auch bei den geringen Konzentrationen im sub-pikomolaren Bereich ist noch eine deutliche Verstärkung vom 3-13 fachen des SRV einer Standard-MTP sichtbar.

Beispiel 2: Indirekte Detektion adsorbierter, nicht markierter Antikörper

Das Ausmaß des MEF („Metal Enhanced Fluorescence“)-Effekts ist u.a. stark vom Abstand der Fluorophore von den Nanostrukturen abhängig (s. auch Hawa et al. Analytical Biochemistry 549(2018): 39-44).

Im Gegensatz zu MEF-Tests mit z.B. direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern diffundiert im Falle eines enzymkatalysierten MEC-Testes das erzeugte Luminophor von der Oberfläche ab und kann somit nur so lange es sich an der Oberfläche befindet verstärkt werden. Um zu zeigen, dass auch bei einem Assay-

Aufbau über zwei Proteinschichten hinweg (mindestens ca. 10-15 nm) eine Verstärkung der Lumineszenz auftreten kann, wurde der in Beispiel 1 beschriebene Versuch dahingehend modifiziert, dass zuerst ein Ziegenantikörper auf die MEF-MTP aufgebracht wurde und dieser dann, nach einem Blockschritt mit ALP-markiertem Anti-Ziegen-Antikörper detektiert wurde.

Vorgangsweise:

- 50 µl einer Ziege Antikörper (Jackson, 111-005-008, 2 mg/ml) Verdünnung in 50mM Phosphatpuffer/100mM NaCl mit Konzentrationen von 0 -1 µg/ml wurden über Nacht bei 4°C im Dunkeln auf den MEF- bzw. Greiner 1x8 HB Strip MTPs (VWR, 737-0195) inkubiert.
- Der Inhalt der Wells wurde verworfen und die Platten 3x mit 200 µl 50mM Phosphatpuffer/100mM NaCl/0,1% TritonX100 gewaschen
- Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte durch zweistündige Inkubation bei RT mit 100 µl einer 50mM Phosphatpuffer/100mM NaCl/0,1% TritonX100 mit 5% Polyvinylpyrrolidon (5% PBSPTx)
- Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Platten mit 50 µl einer 30ng/ml Lösung des auch unter Punkt 2 verwendeten ALP-markiertem Anti-Ziegen-Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert
- Nach einem finalen Waschschrift wurden wieder 150µl des in Beispiel 1 beschriebenen Luminophor-Reaktionsgemisches zugesetzt und das entstehende Chemilumineszenzsignal mit einen SPARK Mikrotiterplattenlesegerät von TECAN verfolgt.

Ergebnisse

Eine Quantifizierung des Ausmaßes der Verstärkung erfolgte wieder durch den Vergleich der SRVs auf MEF- und Standard-MTPs (Greiner MTP). Tabelle 2 und Fig. 4 geben die erhaltenen SRV Werte bzw. MEC-Verstärkungen in Abhängigkeit von der Konzentration des beschichteten Ziegenantikörpers wieder.

Tabelle 2: Signal/Rauschverhältnisse bei 2-stufigem Assay-Aufbau

Signal / Rausch-Verhältnis

Antikörper (µg/ml)	MEF-MTP	Std-MTP	MEC
0	1, 0	1, 0	n.a.
0.01	24, 4	1, 0	24, 4
0.1	35, 2	1, 6	22, 0
1	77, 5	2, 9	26, 7

Auch über zwei Proteinschichten hinweg ist noch ein Verstärkungseffekt beobachtbar. Dies ist überraschend, da im Vergleich zum MEF mit oberflächengebundenen Fluorophoren die enzymgenerierten Luminophore abdiffundieren und sich weiter von der Oberfläche entfernen. Jedenfalls sind Steigerungen der Empfindlichkeit um einen Faktor von 20-30 analytisch als relevant zu betrachten zumal sie mit zunehmender Beschichtungskonzentration anzusteigen scheinen.

Diskussion

Die für Metal Enhanced Fluorescence entwickelten Strukturen eignen sich somit auch für die Metal Enhanced Chemilumineszenz.

Das ist sehr überraschend, da die Reichweite des Effekts ja nur etwa 40-50 nm (Distanz zur Oberfläche) beträgt und das vom Enzym produzierte chemilumineszente Substrat von der Oberfläche weg diffundiert. Scheinbar ist die Verstärkung so stark, dass sich im zeitlichen Mittel ausreichend Moleküle nahe der Oberfläche befinden. Auch das beobachtete Ausmaß des MEC Effektes ist unerwartet und wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Patentansprüche:

1. Verwendung eines Substrats zur Verstärkung der Chemilumineszenz eines oder mehrerer in einer Chemilumineszenzreaktion erzeugten Luminophore, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat einen festen polymeren Träger mit einer Mehrzahl voneinander getrennter Vertiefungen umfasst und der feste Träger zumindest teilweise mit mindestens einem Metall beschichtet ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen einen Abstand zueinander von 0,2 µm bis 2,5 µm aufweisen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen des festen Trägers eine Länge und eine Breite aufweisen, wobei das Verhältnis der Länge zur Breite 2:1 bis 1:2, insbesondere 1:1, beträgt.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen des festen Trägers eine Länge und eine Breite aufweisen, wobei die Länge und die Breite der Vertiefungen 0,1 µm bis 2 µm beträgt.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen eine im Wesentlichen runde Form aufweisen.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen eine Tiefe von 0,1 µm bis 5 µm aufweisen.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der feste Träger zumindest teilweise eine oder mehr als eine übereinander angeordnete Metallschichten umfasst und/oder die Metallschicht am festen Träger eine Dicke von 10 nm bis 200 nm aufweist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Metall ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Silber, Gold, Aluminium, Chrom, Indium, Kupfer, Nickel, Palladium, Platin, Zink, Zinn und Legierungen umfassend eines oder mehrerer dieser Metalle.

9 Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der feste Träger mindestens ein Material ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Gruppe der thermoplastischen Polymere und der Polykondensate umfasst, wobei das thermoplastische Polymer vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Polyolefine, Vinylpolymere, Styrolpolymere, Polyacrylate, Polyvinylcarbazol, Polyacetal und Fluorkunststoffe und das Polykondensat vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus thermoplastische Polykondensate, duroplastische Polykondensate und Polyaddukte, und das Material des polymeren festen Trägers optional organische und/oder anorganische Zusatzstoffe und/oder Füllstoffe umfasst, wobei diese vorzugsweise ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus TiO_2 , Glas, Kohlenstoff, Farbpigmente, Lipide und Wachse.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Luminophor durch ein Enzym erzeugt wird.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Meerrettichperoxidase, alkalischer Phosphatase, Luciferase und hydrolytischen Enzymen.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Luminophor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Luminol und seinen Derivaten, 1,2-Dioxetane, Acridniumestern oder Luciferinen.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym direkt und/oder indirekt an das Substrat gebunden ist.

14. Verfahren zur Verstärkung der Chemilumineszenz eines oder mehrerer in einer Chemilumineszenzreaktion erzeugten Luminophore in einer wässrigen Lösung umfassend den Schritt des Inkontaktbringens der wässrigen Lösung mit einem Substrat wie in einem der Ansprüche 1 bis 13 definiert.

15. Verfahren zur Bestimmung oder zur Quantifizierung mindestens eines Analyten in einer wässrigen Probe umfassend die Schritte:

- a) Inkontaktbringen der Probe mit einem Substrat wie in einem der Ansprüche 1 bis 13 definiert umfassend ein direkt oder indirekt am Substrat gebundenes Analyt-bindendes Molekül,
- b) Zugabe mindestens eines weiteren Analyt-bindenden Moleküls, an das mindestens ein Enzym direkt oder indirekt gebunden ist, das in einer Chemilumineszenzreaktion aus einem oder mehreren Substraten ein oder mehrere Lumino-phore erzeugt und
- c) Messen der durch die Chemilumineszenzreaktion in Schritt b) entstehenden Lichtemission.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Meerrettichperoxidase, Alkalischer Phosphatase und Luciferase.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Luminophor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Luminol und seinen Derivaten, 1,2-Dioxetane, Acridiniumestern oder Luciferinen.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das am Substrat gebundene und das mindestens eine weitere Analyt-bindende Molekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Antikörper, Antikörperfragmente, vorzugsweise Fab, F(ab)'₂ oder scFv Fragmente, Nukleinsäuren, Aptameren, und Kombinationen davon.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym indirekt über ein Trägermolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antikörper und Antikörperfragmente, vorzugsweise Fab, F (ab) '₂ oder scFv Fragmente, Nukleinsäuren, Aptameren, und Kombinationen davon gebunden ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtemission in Schritt b) bei einer Wellenlänge von 280 nm bis 850 nm gemessen wird.

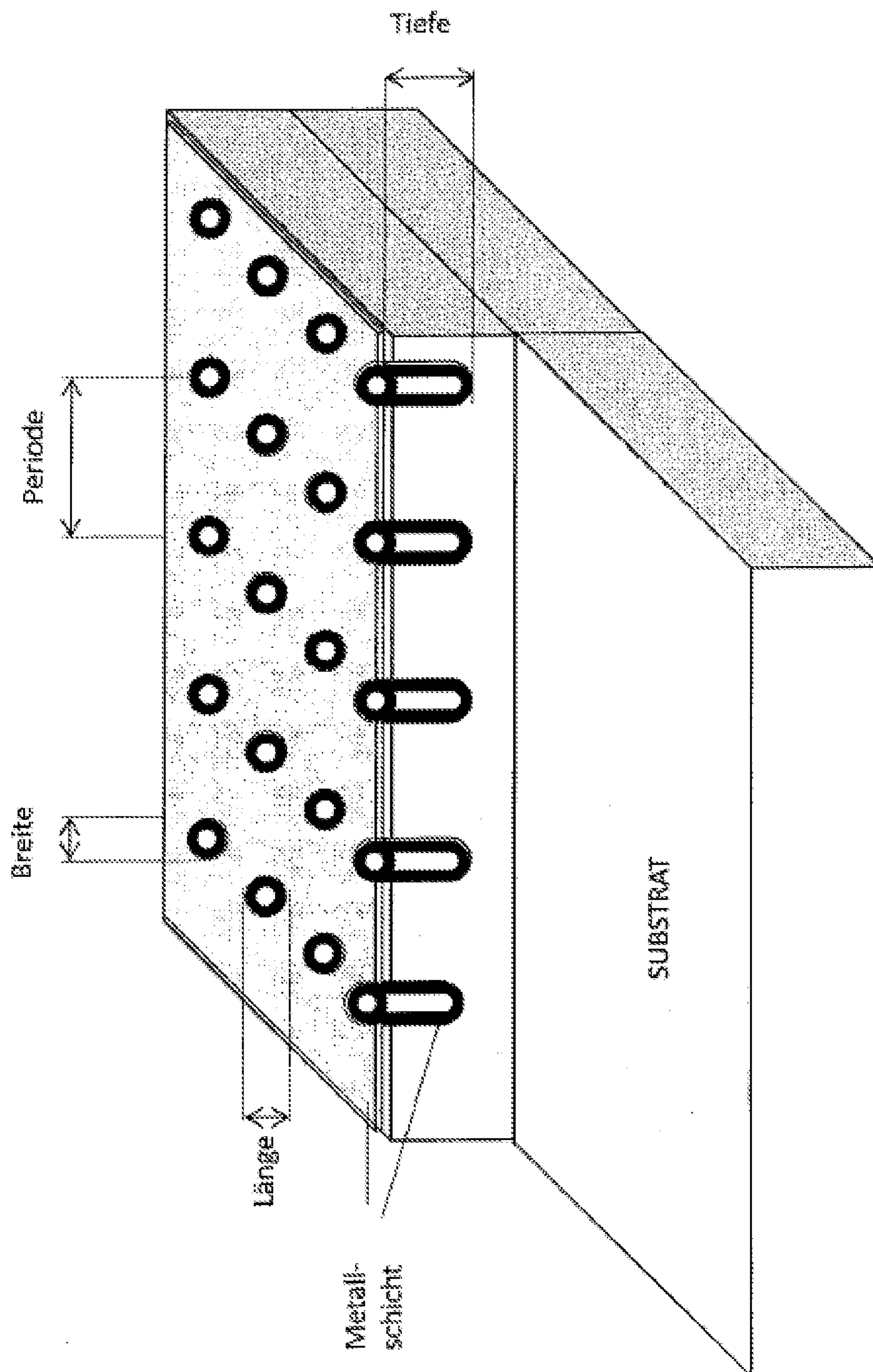


Fig. 1

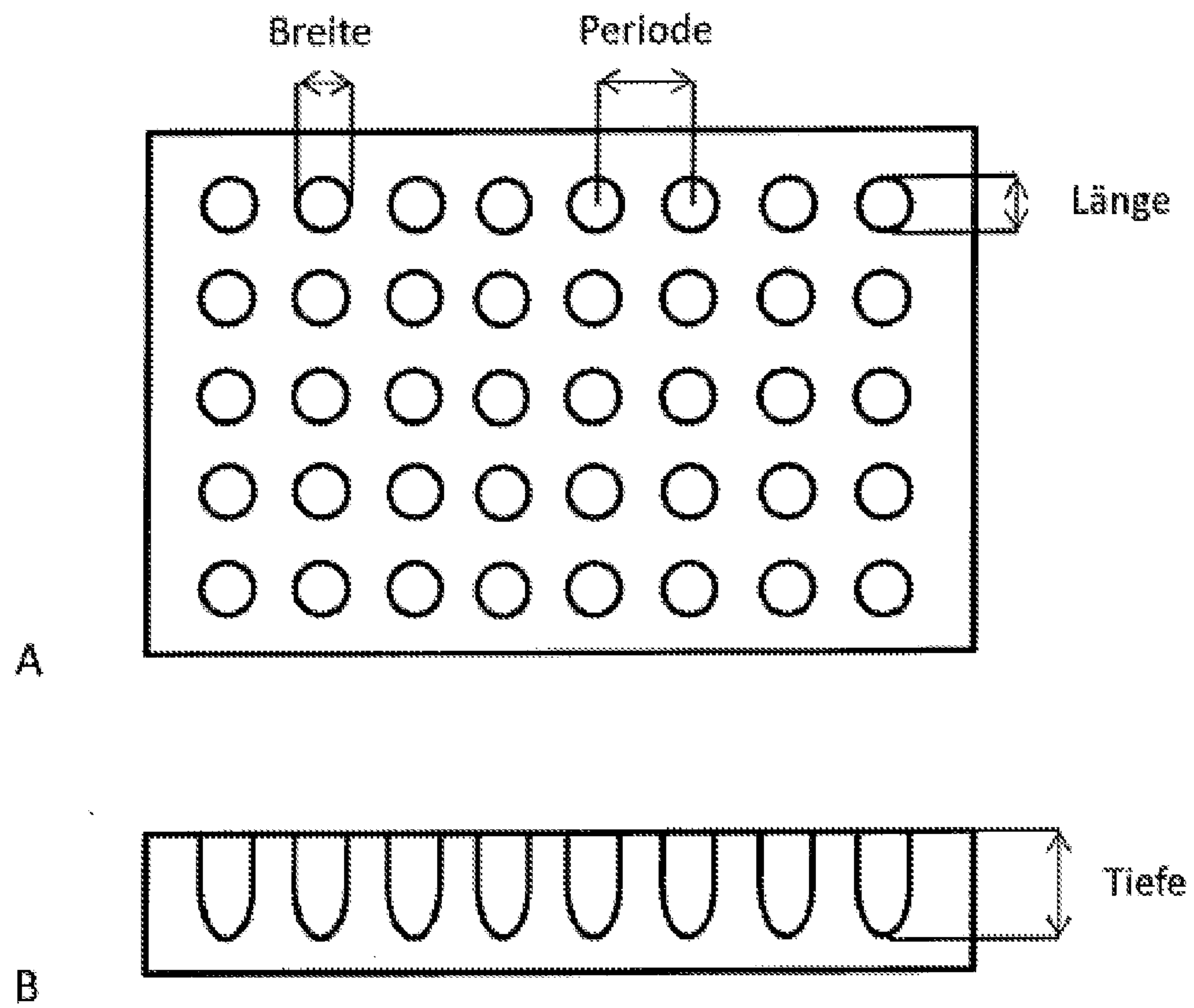


Fig. 2

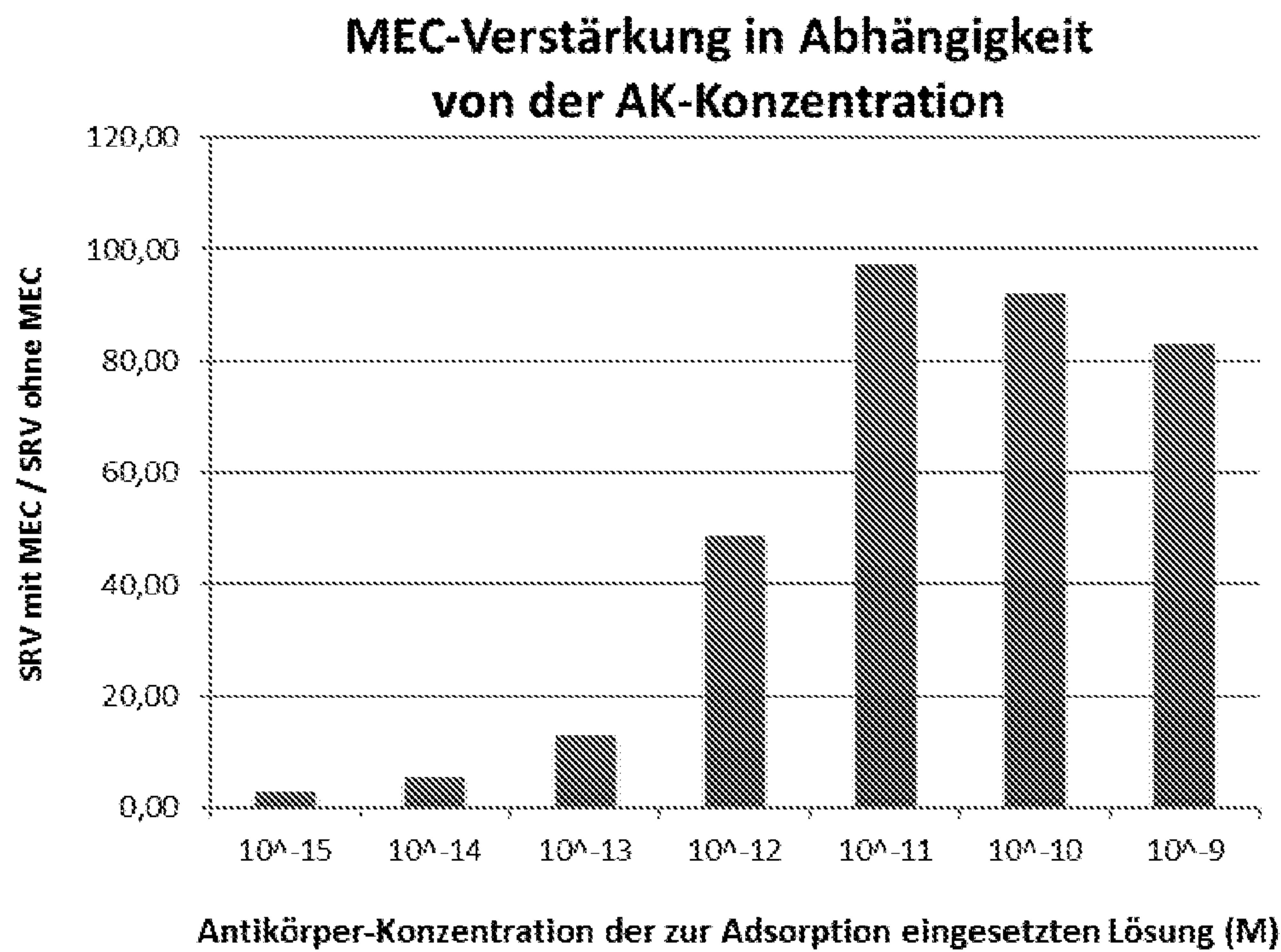


Fig. 3

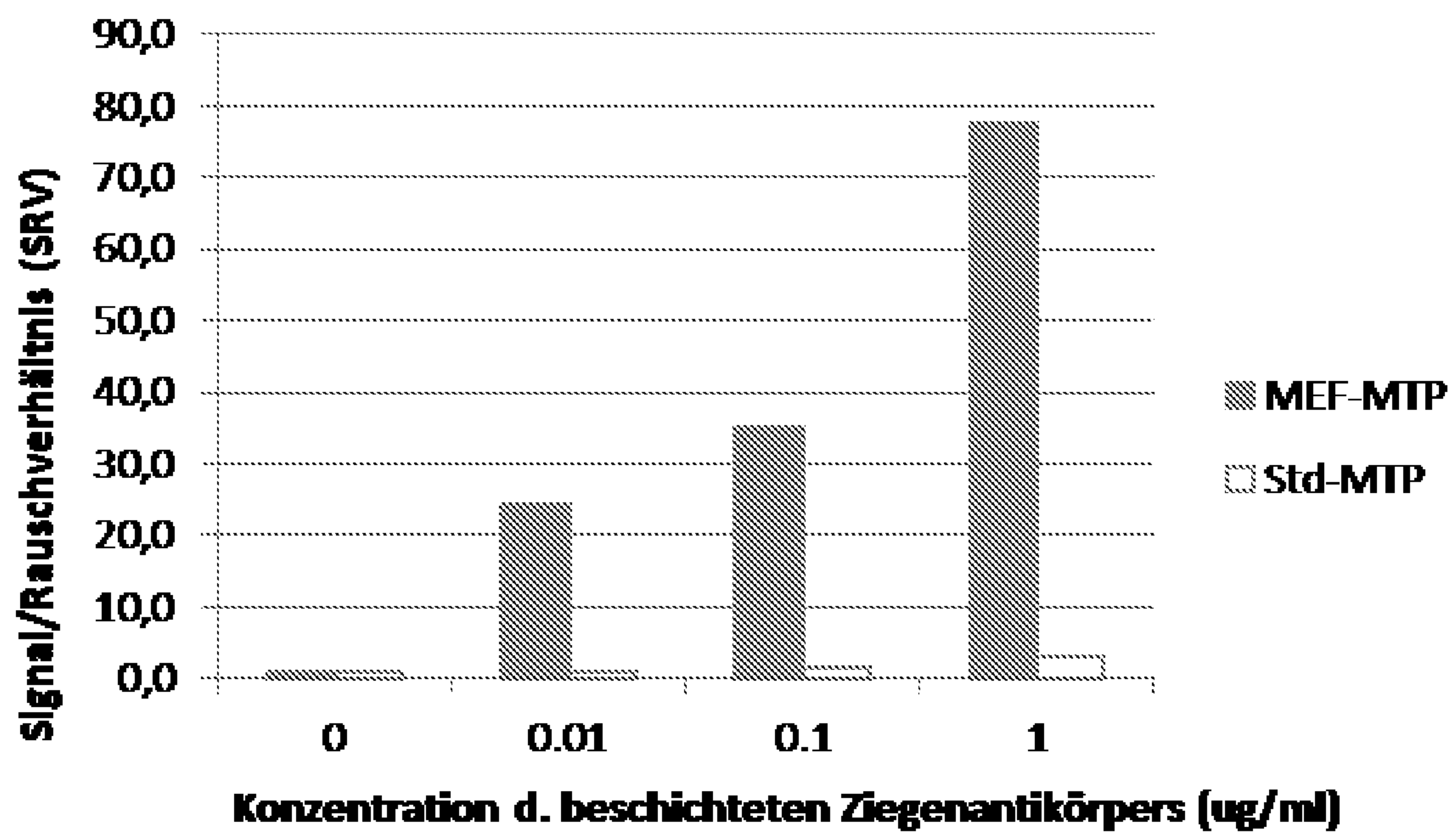


Fig. 4