

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 244/2015
(22) Anmeldetag: 22.04.2015
(45) Veröffentlicht am: 15.08.2016

(51) Int. Cl.: **G01N 21/77** (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

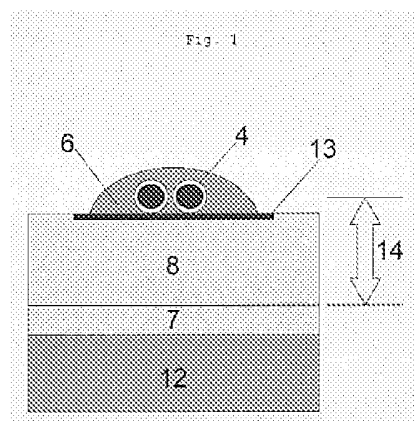
(56) Entgegenhaltungen:
PALKOVITS, R; ET.AL.; Development of a microfluidic-based lateral flow immunoassay for the detection of human serum Albumin; 9. Oktober 2012; Proceedings of 10th 4M Conference, Vienna, Austria,
ASSADOLLAHI, S.; ET.AL.; From Lateral Flow Devices to a Novel Nano-Color Microfluidic Assay; 31. Juli 2009; Sensors 2009, Vol. 9(Issue 8), Seiten 6084-6100.
WO 0126038 A1
US 2013224771 A1

(73) Patentinhaber:
Attphotronics Biosciences GmbH
2700 Wiener Neustadt (AT)

(72) Erfinder:
Schalkhammer Thomas
2811 Wiesmath (AT)
Schlauf Marlies
1230 Wien (AT)
Assadollahi Saied
1200 Wien (AT)

(54) Analytisches Messsystem auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben

(57) Die Erfindung betrifft ein analytisches Messsystem auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein Silberkomplexierender Stabilisator (1), ein Reduktionsmittel (2) und ein Silbersalz (3) in einer lagerfähigen, bevorzugt getrockneten, Form sowie katalytisch aktive Nanopartikel (4) im Messsystem vorliegen welche nach Zugabe einer chloridhaltigen Analytflüssigkeit (5) miteinander reagieren und dadurch eine nanometrische Metallschicht (6) auf einer Lichtwellen-reflektierenden Oberfläche (7), die zumindest eine 15 bis 500 nm dicke transparente Beschichtung (8) trägt, abscheidet und dies eine sichtbare und oder messbare resonante Interferenzfarbe erzeugt.



Beschreibung

ANALYTISCHES MESSSYSTEM AUF BASIS IN-SITU VERSTÄRKTER RESONANTER FARBEN

[0001] Die Erfindung beschreibt ein mit integrierter Verstärkungstechnologie ausgestattetes Messsystem zur Detektion von biologischen oder chemischen Analyten in flüssigen chloridhaltigen Proben mit optischer Signalanzeige auf Basis von Resonanzfarbtechnologie und integrierter Verstärkungstechnologie.

[0002] Der erfindungsgemäße Aufbau erlaubt die Konstruktion von einfachen Analysesystemen, die ohne zusätzliche Laborausstattung auskommen und aufgrund integrierter Verstärkungstechnologie sensitiver sind als bekannte Analysesysteme auf Basis resonanter Strukturen.

[0003] Resonanzfarben ermöglichen dabei eine Signalanzeige ohne Instrumente erkennbar mit bloßem Auge, und sind daher ideal geeignet, um in Teststreifen, mikrofluidischen Chips, aber auch auf Verpackungen oder den Produkten selbst eingesetzt zu werden.

[0004] Die erfindungsgemäßen Vorzüge der vorgeschlagenen REA- Interferenzfarbsensoren sind:

- [0005]** • Für das Auge sichtbares Signal
- [0006]** • integrierte chemische Signal- Verstärkungstechnologie
- [0007]** • dadurch empfindlicher als vergleichbare Systeme
- [0008]** • Stabilität (Messwert kann auch nach Jahren noch dokumentiert werden)
- [0009]** • Multicolor
- [0010]** • Multi-Analyt-fähig durch beliebig viele Farben
- [0011]** • Maschinen-lesbar - z.B. als gedruckter Barcode
- [0012]** • Zeigt nicht nur Linien sondern auch Text und Symbole an (im Gegensatz zu typischen Lateral-Flow-Assays)
- [0013]** • Ressourcen-schonend
- [0014]** • Test an Ort und Stelle durchführbar (keine weiteren Reagenzien oder ein Labor notwendig)
- [0015]** • Etwaiges Vorhandensein von Chlorid in den analysierten Proben beeinträchtigt die Funktionalität des Testsystems nicht

[0016] Mithilfe der Resonanzfarbtechnologie, einer Technik, die von Wissenschaftlern der Fachhochschule Wiener Neustadt (FHWN), der Universitäten Wien und Graz als auch der TUDELFT (NLT) untersucht wurde, erstmals (bio)analytisch von Schalkhammer et al. eingesetzt wurde und von Attophotonics Biosciences GmbH vermarktet wird, wird ein visuelles Signal durch eine Änderung der Nanostruktur eines entsprechenden Resonanzfarbsystems erzeugt.

[0017] Die Grundlagen der Resonanzfarbtechnologie wurden beschrieben in: "Metal nano clusters as transducers for bioaffinity interactions", invited review in Chemical Monthly 129, 1067-1092 (1998) by T. Schalkhammer; "Surface enhanced resonance of metal nano clusters: A novel tool for Proteomics", Journal of Nanoparticle Research 3, 361-371 (2001) by C. Mayer, R. Palkovits, G. Bauer, T. Schalkhammer. Erste Anwendungen der REA-Nano-Farbtechnologie wurden publiziert in: „Foodallergen assays on chip based on metal nano-cluster resonance“, SPIE 4265, 134-141 (2001) by C. Mayer, R. Verheijen, Th. Schalkhammer und Anwendungen von REA-Filmen in der Bioanalyse wurden beschrieben in: „Phage display antibody-based proteomic device using resonance-enhanced detection“, J. Nanoscience and Nanotechnology 2V3/4,375-381 (2002) by N. Stich, A. Gandhum, V. Matyushin, J. Raats, Ch. Mayer, Y. Alguel,

Th. Schalkhammer.

[0018] Spezielle sensorische Varianten wurden erstmals 1999 in einer Diplomarbeit von K. Hüttner untersucht und weitere Details in „Structural behavior of nanometric carbohydrate films transduced by resonant technique“, Biopolymers 69(3), 333-342 (2003) by R. Palkovits, Ch. Mayer, G. Bauer, H. Winkler, F. Pittner, Th. Schalkhammer; und in: "Nanotechnology for smart polymer optical devices", Macromolecular Symposia, 217 (1), 109 - 134 (2004), H. Rauter, V. Matyushin, Y. Alguet, F. Pittner, T. Schalkhammer; und in "Resonant nano-cluster devices", IEEE Pro. in Nanobiotechnology, 152, 53-63 (2005) by J. Haglmüller, H. Rauter, G. Bauer, F. Pittner, T. Schalkhammer sowie in "Nanocluster optical resonance devices for molecular structure transduction" Current Nanoscience1, 3-20 (2005) by J. Haglmüller, V. Matyushin, H. Rauter, C. Mayer, H. Winkler, G. Bauer and Th. Schalkhammer, ; und in: "Nanocluster optical resonance devices for molecular structure transduction", Current Nanoscience1, 3-20 (2005) by J. Haglmüller, V. Matyushin, H. Rauter, C. Mayer, H. Winkler, G. Bauer and Th. Schalkhammer beschrieben, wobei insbesondere eine detaillierte Beschreibung der Verwendung von abbaubaren REA-Dünnschichten für die Anwendung in Lebensmittelsensoren in der Diplomarbeit von Martin Dragosists, 2005, University of Vienna, Betreuer Prof. Schalkhammer und im Detail im Buchkapitel: „Nanocluster Biochips and Cluster Nanotechnology" in „Biochips Nanotechnology" (Copyright Dezember 2005 - gedruckt 2007, American scientific publishers) by J. Haglmüller, M. Dragosists, C. Gauglhofer, M. Koelber-Bauer, Th. Schalkhammer beschrieben wird.

[0019] Aus der Literatur ist die US6669906, Reinforced cluster optical sensors, Schalkhammer et al bekannt, wobei die Bindung zwischen der Reflektorschicht und einem Nanopartikel durch ein spezifisches Molekül hergestellt wird. Die Veränderung dieser Bindung führt zu einem optischen Signal. Die vorliegende Anwendung kann und will eine partielle Abhängigkeit von diesem Patent nicht ausschließen sondern baut in spezifischen Anwendungsfällen auf dieser Technologie auf.

[0020] Weitere Patente des Erfinders der vorliegenden Anmeldung im Bereich der Resonanzfarbtechnologie beschreiben andere Anwendungsbereiche z.B. „Optical sensor with nanoparticles transfer“, WO2005054857 - 2005-06-16 und diverse technische Ausführung (siehe Patente Th. Schalkhammer).

[0021] Der Aufbau von resonanten-Farbsystemen ist bereits in vorangegangenen Patenten des Anmelders z.B. EP0677738 beschrieben; kurz: Der Aufbau bezog sich auf einen optochemischen Sensor zur Messung von Stoffkonzentrationen mit einer reaktiven Sensorschicht. Diese optochemischen REA-Sensoren basierten darauf, dass eine chemische Reaktion zwischen dem Sensormaterial und dem Analyten zu einer Veränderung der optischen Eigenschaften des Sensors führt. Eine Veränderung der optischen Eigenschaften kann beispielsweise in einer Änderung der Absorptions- bzw. der Fluoreszenzeigenschaften liegen, sodass die Reaktion in der Folge durch spektroskopische Methoden nachweisbar wird.

[0022] Die vorliegende Anmeldung nutzt die REA-Farbtechnologie in einem Messsystem zur Detektion und Sichtbarmachung von chemischen bzw. biochemischen Analyten in Lösungen. Die Detektion erfolgt mittels der Ausbildung von Analyt-Nanopartikel-Komplexen über Erkennungselemente und Bindung dieser Komplexe auf REA-Oberflächen, wiederum über Fänger- bzw. Erkennungselemente, wodurch ein für das menschliche Auge erkennbares farbiges Signal generiert wird. Dieses Signal wird durch nachfolgende stromlose, Nanopartikel-katalysierte Abscheidung von Metall-Dünnschichten auf und um die Komplexe verstärkt, wodurch eine hohe Sensitivität des Systems erzielt wird.

[0023] Die prinzipielle Umsetzung analytischer Messsysteme wurde bereits in Assadollahi S. et al., „From Lateral Flow Devices to a Novel Nano-Color Microfluidic Assay“, Sensors 2009, 9, 6084-6100 und Palkovits R. et al., „Development of a microfluidic-based lateral flow immunoassay for the detection of human serum albumin“, Proceedings of 10th 4M Conference, Vienna, Austria, 9th-11th October 2012 beschrieben. Hierbei wurden die für die Detektionsreaktion benötigten Erkennungselement-Nanopartikel-Konjugate und weitere allenfalls erforderliche Stoffe in einer mikrofluidischen Flusszelle in getrockneter Form vorgelegt und durch Zugabe der

Probe freigesetzt, wodurch der Detektionsprozess gestartet wurde. Für die Signalverstärkung wurde Nanopartikel-katalysierte, stromlose Silberabscheidung, auch als „Silver Enhancement“ bezeichnet, eingesetzt, wobei die dafür benötigten Reagenzien frisch in einer Pufferlösung gemischt wurden und die Lösung dem Messsystem nach Durchfluss der Probe zugegeben wurde.

[0024] Im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung konnten die verwendeten Verstärkungsreagenzien generell nicht direkt der Probe zugegeben werden, da die enthaltenen Silberionen mit Chloridionen, die in den getesteten biologischen Proben (gemeinhin Urin oder Blut) im Allgemeinen in hoher Konzentration vorliegen, unlösliche Komplexe bilden, wodurch deren Reduktion und die Abscheidung als Metallschicht verhindert wird.

[0025] Des Weiteren konnten bis dato die eingesetzten Reagenzien nicht einer Form in dem Messsystem vorgelegt werden, aus welcher sie durch Probenzugabe in Lösung gebracht werden konnten. Demnach handelte es sich hier um Zwei-Schritt-Detektionsverfahren, wobei für den zweiten Schritt zumindest gewisse grundlegende Laborausstattung für die Handhabung von flüssigen Reagenzien erforderlich war.

[0026] Die erfindungsgemäße Verbesserung derartiger Messsysteme gegenüber den genannten Publikationen betrifft erstens die Integration der für die Verstärkungsreaktion benötigten Reagenzien im Messsystem und zweitens die Stabilisierung derselben gegenüber allfälligen hohen Chloridkonzentrationen in den zu testenden Proben. Dies wird erfindungsgemäß durch den Ersatz einiger bisher verwendeter Reagenzien und durch den Zusatz eines Stabilisators sowie allenfalls weiterer Hilfsstoffe ermöglicht.

[0027] Die Anwendung des analytischen Messsystems für den Einsatz zur Analyse von biologischen Proben, Blut, Urin, Speichel, Lebensmitteln oder pharmazeutischen Produkten erfolgt in Form einer fluidischen Zelle, in welche die Probe bewusst oder durch standardmäßig auftretende Prozesse im Anwendungsgebiet bzw. im Umfeld des Anwendungsgebietes ohne Zutun des Verwenders eingebracht wird.

[0028] Die Anwendung des analytischen Messsystems erfolgt zur Detektion von Stoffen, die mithilfe von Erkennungselementen wie z.B. Antikörpern, Rezeptormolekülen, Avidin/Biotin, einer Vielzahl von Tag-bindenden Molekülen bis hin zur Hybridisierenden Molekülen wie DNA in einem Komplex mit metallischen Nanopartikeln gebunden werden können.

[0029] Jede Art eines Bindungsassays ist mit der vorliegenden Erfindung kompatibel. Im Prinzip kann daher jeder Lateral Flow Assay (LFA) wie z.B. ein Drogentest oder Schwangerschaftstest in diesem Assayformat genutzt werden bzw. in dieses Format konvertiert werden.

[0030] Ein typischer Aufbau des Messsystems und ein typischer Ablauf der Messung sind wie folgt beschrieben:

- [0031]** • Flusszelle: eine mikrostrukturierte Flusszelle oder Mikrofluidikzelle z.B. aus Kunststoff, Glas oder Papier, die die Komponenten des Messsystems in einzelnen, miteinander durch Kanäle verbundenen Abschnitten enthält.
- [0032]** • Analyt-Detektionsreagenzien: Erkennungselemente z.B. Antikörper bzw. Antikörper-Nanopartikel-Konjugate vorliegend in der Flusszelle in einer Form (z.B. getrocknet), aus welcher sie durch Zugabe der flüssigen Probe freigesetzt werden können, die- nend zur Bindung des Analyten in einem Nanopartikel-Analyt-Komplex, der wiederum von der Erkennungselement-Beschichtung des REA-Sensor-Chips gebunden werden kann
- [0033]** • REA-Sensor-Chip: ein dünnes spiegelndes Plättchen oder ein dünnes Plättchen vorzugsweise aus Kunststoff mit spiegelnder Beschichtung des Weiteren beschichtet mit einer transparenten Dünnschicht im Bereich von 50-300 nm, einer oder mehrerer Schichten von Bindungs-vermittelnden Molekülen sowie einer Schicht von Erkennungselement-Molekülen zur direkten oder indirekten Bindung des zu detektierenden Analyten in einem Komplex mit Nanopartikeln und gegebenenfalls weiteren Molekülen, wodurch eine REA-Farbe auf dem Chip sichtbar wird

- [0034]** • Verstärkungsreagenzien: vorliegend in der Flusszelle zumindest teilweise verkapselt bzw. in einer Form, aus welcher sie zumindest teilweise verzögert z.B. 2-3 min nach Zugabe der flüssigen Probe freigesetzt werden können, dienend zur Verstärkung des Farbsignals nach Bindung der Analyt-Nanopartikel-Komplexe auf dem REA-Sensor-Chip durch stromlose Abscheidung einer metallischen Schicht
- [0035]** • Absorptions-, Saug- und Reagenzien-„Pads“: Gewebestücke verschiedener Porosität und Art z.B. aus Naturfasern oder Kunststofffasern, allenfalls hydrophilisiert oder hydrophobisiert, dienend zur Aufnahme der Probe, der Weiterleitung derselben in der Flusszelle sowie als Reservoir für Analytdetektions-Reagenzien bzw. Verstärkungsreagenzien
- [0036]** Typischerweise wird die Probe durch Auftropfen auf die Einlassöffnung in die Flusszelle eingebracht, wodurch die Detektionsreagenzien freigesetzt werden. Diese bilden mit dem zu detektierenden Analyten in der Probe, sofern vorhanden, einen Komplex. Die Analyt- Nanopartikel-Komplexe werden durch passiven Kapillarsog oder allenfalls mittels Pumpe in der Flusszelle zum REA-Sensor-Chip transportiert, wo sie an der Erkennungselement-Beschichtung des Chips binden. Währenddessen wird die Verkapselung der Verstärkungsreagenzien von der Probe aufgelöst und die Reagenzien werden durch den Probenfluss ebenfalls zum REA-Sensor-Chip befördert, wo sie mit den gebundenen Analyt-Nanopartikel-Komplexen reagieren. Daraufhin wird um und auf den Komplexen stromlos eine metallische Schicht abgeschieden. Diese verstärkt den Resonanzfarbeffekt der gebundenen Komplexe auf dem REA- Sensor-Chip und damit die optische Wahrnehmung desselben.
- [0037]** Die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen gemäß den Zeichnungen näher erläutert, wobei
- [0038]** Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Spiegel/Metallschicht-REA-Interferenzfarbsystems nach Ablauf der Analytdetektionsreaktion sowie der Verstärkungsreaktion zeigt
- [0039]** Fig. 2 eine schematische Darstellung des analytischen Messsystems vor Ablauf der Analytdetektionsreaktion zeigt
- [0040]** Fig. 3 eine schematische Darstellung eines optimierten analytischen Messsystems vor Ablauf der Analytdetektionsreaktion zeigt
- [0041]** Die Zuordnung der Bezugszeichen ist wie folgt vorzunehmen:
- [0042]** (1) Silber-komplexierender Stabilisator
- [0043]** (2) Reduktionsmittel
- [0044]** (3) Silbersalz
- [0045]** (4) katalytisch aktive Nanopartikel (mit Erkennungselement-Schicht umgeben)
- [0046]** (5) chloridfreie oder chloridhaltige Analytflüssigkeit
- [0047]** (6) nanometrische Metallschicht (katalytisch abgeschieden)
- [0048]** (7) Lichtwellen-reflektierende Oberfläche (Spiegel, meist Silber oder Aluminium)
- [0049]** (8) 15 bis 500 nm dicke transparente Beschichtung (bestimmt die Farbe)
- [0050]** (9) sich zeitverzögert auflösende Folie oder Schicht
- [0051]** (10) Freisetzungverzögerer
- [0052]** (11) Flussrichtung der Analytflüssigkeit
- [0053]** (12) Analytisches Messsystem (Träger, zumeist aus Kunststoff gefertigt)
- [0054]** (13) Fängermoleküle für Analytkonjugat (auf Oberfläche von (8))
- [0055]** (14) Farbbestimmender Resonanzabstand von Spiegel (7) zu Metallschicht (6)

[0056] Beispiel 1: Verspiegelung des Sensorchips

[0057] Eine Platte oder Folie mit einer Dicke von weniger als 1 mm oder ein bereits in Form eines Chips konfektioniertes Stück davon wird entfettet und nach üblichen Verfahren mit einer nahezu nicht transparenten spiegelnden Schicht ausgestattet (nasschemisch, ABS- Technik, galvanisch, Vakuum,...) - Gasphasenmetallisierung bietet sich für edlere Metalle als Aluminium an. Die Platte bzw. Folie kann kostengünstiger Weise aus Kunststoff bestehen aber auch aus Keramik, Glas oder Vollmetall sein. Kunststofffolien werden zumeist mit Aluminium metallisiert. Alternativ können Aluminiumfolien, Edelstahlfolien, Nickel-, Chrom und Titanfolien sowie Kupfer und deren Legierungsfolien massiv, laminiert oder als Beschichtung eingesetzt werden.

[0058] Beispiel 2: Aufbringung der inerten Schicht

[0059] Auf einer Platte oder Folie bzw. einem Plättchen bzw. Folienstück gemäß Beispiel 1 wird eine weitgehend transparente inerte Schicht einer Dicke von 50-300 nm in einem oder mehreren Beschichtungsschritten aufgebracht. Die inerte Schicht wird zumeist als Sol/Gel-Schicht ausgeführt. Alternativ ist eine Vielzahl von zumeist elektrochemischen Verfahren verwendbar. Typische Rohstoffe sind hier Metallate von Titan (z.B. Titanethoxylate), Silane wie z.B. Tetraethoxysilan, Zirkonmetallate oder ähnliche Verbindungen die zumeist mit Wasser unter Hydrolyse zuerst zu Hydroxiden und nach thermischer Behandlung zu vernetzten, chemisch-mechanisch-stabilen Oxiden mit guter Oberflächenhaftung reagieren. Eine Vielzahl von handelsüblichen Produkten kann hier eingesetzt werden.

[0060] Beispiel 3: Haftvermittler und Erkennungselement-Schicht

[0061] Auf einer Platte oder Folie bzw. einem Plättchen bzw. Folienstück beschichtet gemäß Beispielen 1-2 wird eine Erkennungselement-Schicht in Form von Text, eines Symbols oder vollflächig aufgebracht. Hierfür wird zunächst generell nasschemisch durch Adsorption eine Haftvermittlerschicht aufgebracht. Typische Rohstoffe sind hier Silane mit funktionellen Gruppen wie Aminopropyltriethoxysilan, Dextrane, Cellulosederivate oder ionische Polymere wie Polyacrylsäure-(Co)polymere aber auch verschiedene Polyamine. Anschließend wird die Erkennungselement-Schicht bestehend z.B. aus Antikörpern, Antigenen, Rezeptormolekülen, Tag-Molekülen bzw. Tag-bindenden Molekülen mittels kovalenter Bindung unter Einsatz von Vernetzern und/ oder reaktiven Gruppen oder mittels Adsorption auf der Haftvermittlerschicht gebunden. Alternativ können die Erkennungselement-Moleküle in Lösung an geeignete Haftvermittler wie beschrieben gekoppelt werden und das Konjugat auf der Oberfläche gemeinhin durch Adsorption abgeschieden werden. Die Auswahl des Haftvermittlers hängt stark von den eingesetzten Erkennungselement-Molekülen ab und umgekehrt. Beide werden wiederum durch den zu detektierenden Analyten determiniert.

[0062] Beispiel 4: Herstellung der Flusszelle

[0063] Die Flusszelle wird aus kostengünstigem Rohmaterial z.B. Kunststoff, Glas oder Papier gefertigt und durch Mikrostrukturierung z.B. mittels Prägen, Fräsen, Lasergravur mit Mikrofluidikstrukturen ausgestattet. In diese werden der gemäß Beispiel 1-3 hergestellte REA- Sensor-Chip sowie die übrigen Komponenten des Messsystems integriert. Das Layout der Mikrofluidikstrukturen ist abhängig vom gewünschten Ablauf der Messung (v.a. hinsichtlich Messzeit und Fließgeschwindigkeit), der Viskosität und der Fließeigenschaften der Probe sowie der Art, Anzahl und Menge der für die Messung erforderlichen, durch Probenzugabe freizusetzenden Chemikalien. Der Probenfluss wird durch passiven Kapillarfluss ermöglicht und allenfalls durch Hydrophilisierung mittels physikalischer Methoden, Aufdruck oder Beschichtung der Kanäle z.B. mit Detergenzien, hydrophilen Polymeren sowie durch integrierte Gewebe v.a. im Bereich der Probenzugabe (Einlassöffnung) sowie am Ende der Testzelle unterstützt.

[0064] Beispiel 5: Integration der Test- und Verstärkungsreagenzien

[0065] Alle im Zuge der Messung erforderlichen Reagenzien werden in einer Form in der Flusszelle vorgelegt, aus welcher sie unmittelbar oder zeitverzögert durch Probenzugabe freigesetzt und zum REA-Sensor-Chip befördert werden können. Hierfür können die Reagenzien auf hyd-

rophile oder hydrophilisierte offenmaschige Gewebe aufgetrocknet oder aber in Kapseln bzw. Plättchen verpresst vorgelegt werden. Zur verzögerten Freisetzung können diese durch Beschichtung bzw. Lamination mit wasserlöslichen Substanzen z.B. Polyvinylalkohol oder Polyvinylpyrrolidon verkapselt werden. Gemeinhin werden die Detektionsreagenzien unverkapselt vorgelegt, zumindest ein Teil der Verstärkungsreagenzien bis alle hingegen verkapselt. Als Reagenzien für die Analytdetektion werden z.B. Antikörper-Nanopartikel-Konjugate sowie allenfalls weitere Erkennungselemente eingesetzt. Als Verstärkungsreagenzien dienen zumindest ein Silbersalz, ein Silbersalz-komplexierendes Agens als Stabilisator z.B. Thiosulfat, ein Reduktionsmittel sowie pH-aktive Stoffe zur Anpassung und Stabilisierung des pH-Wertes der Probenlösung für die Verstärkungsreaktion.

[0066] Beispiel 6: Aufbau Test- und Verstärkungsreagenzien-Setup

[0067] Ein typischer Aufbau eines erfindungsgemäßen Messsystems umfasst drei aufeinanderfolgende Bereiche zur Freisetzung der Detektions- und Verstärkungsreagenzien wie in Figur 2 und Figur 3 dargestellt. Diese Bereiche können als miteinander durch Kanäle verbundene Mikrofluidik-Kammern ausgeführt sein oder können sich alle in einer Kammer befinden und durch die Positionierung der Reagenzien in derselben bestimmt werden. Im ausgehend von der Flussrichtung der Probe ersten Bereich werden die Erkennungselement- Nanopartikel-Konjugate (4) z.B. Antikörper- Nanopartikel-Konjugate gemäß Beispiel 5 vorgelegt und falls für die Bindung der Analyt-Nanopartikel-Komplexes erforderlich zusätzliche Erkennungselemente z.B. weitere Antikörper, Rezeptoren, Tag-bindende Proteine. Im zweiten Bereich wird ein Silber-komplexierender Stabilisator (1) gemäß Beispiel 5 vorzugsweise aber verkapselt vorgelegt, der Silber ausreichend stark komplexiert, um die Bildung von Silberchlorid-Präzipitat zu verhindern, jedoch nicht so stark, dass die Komplexbildung die Reduktionsreaktion zu metallischem Silber hemmt. Vorzugsweise wird hierfür Thiosulfat eingesetzt. Des Weiteren werden im zweiten Bereich ein Silbersalz (3) z.B. Silbernitrat sowie falls erforderlich pH-aktive Salze zur pH-Einstellung der Probe auf einen pH-Wert von mehr als 7, günstigstenfalls von mehr als 8 gemäß Beispiel 5 aber vorzugsweise verkapselt vorgelegt. Im dritten Bereich wird ein Reduktionsmittel (2) z.B. Ascorbinsäure gemäß Beispiel 5 aber vorzugsweise verkapselt vorgelegt. Typischerweise ergeben sich nach Freisetzung der Reagenzien in eine Probe mit einer Chloridkonzentration von beispielsweise 20 mmol/L folgende Konzentrationen in der zugesetzten Probe, die beispielsweise eine Chloridkonzentration von 20mM aufweist:

- [0068]** • Optische Dichte bevorzugt des Erkennungselement-Nanopartikel-Konjugat 2-9, besonders bevorzugt OD ~ 7
- [0069]** • 1-10 mg/ml Thiosulfat, besonders bevorzugt 2,5 mg/ ml
- [0070]** • 1-10 mg/ml Silbernitrat, besonders bevorzugt 2,25 mg/ml
- [0071]** • 1-40 mg/ml Ascorbinsäure, besonders bevorzugt etwa 6 mg/ml
- [0072]** • 0,005-0,3 M Citratpuffer, pH>7, besonders bevorzugt 0,0075 M Citratpuffer, pH>8

[0073] Neben den Bereichen zur Freisetzung der Reagenzien umfasst ein erfindungsgemäßes Messsystem einen Bereich, in welchem der REA-Sensor-Chip gemäß Beispielen 1-3 positioniert wird und der mit den beschriebenen Bereichen zur Freisetzung der Reagenzien z.B. durch Kanäle oder ähnliche Mikrofluidik-Strukturen verbunden ist, sodass ein Probenfluss über den Chip möglich ist.

Patentansprüche

1. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben, **dadurch gekennzeichnet**, dass zumindest ein Silber-komplexierender Stabilisator (1), ein Reduktionsmittel (2) und ein Silbersalz (3) in einer lagerfähigen, bevorzugt getrockneten, Form sowie katalytisch aktive Nanopartikel (4) im Messsystem vorliegen, welche nach Zugabe einer chloridhaltigen Analytflüssigkeit (5) mit dem Analyten sowie miteinander reagieren und sich dadurch eine nanometrische Metallschicht (6) auf einer Lichtwellen-reflektierenden Oberfläche (7), die zumindest eine 15 bis 500 nm dicke transparente Beschichtung (8) trägt, abscheidet und dies eine sichtbare und oder messbare resonante Interferenzfarbe erzeugt.
2. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass katalytisch aktive Nanopartikel aus Metallen beispielsweise Silber, Gold, Nickel, Kobalt, Platin, Rhodium, besonders bevorzugt Palladium eingesetzt werden.
3. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die metallischen Nanopartikel durch ein Erkennungselement-Paar beispielsweise Antikörper/Antigen oder Avidin/Biotin auf der Oberfläche der transparenten Beschichtung (8) über dem Spiegel (7) nach Ablauf der Analytreaktion gebunden sind.
4. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die metallischen Nanopartikel so aufgebracht sind, dass sie zuerst durch Zugabe des Analyten aus der getrockneten Form gelöst und sodann zur Oberfläche der transparenten Beschichtung (8) befördert werden, an welche sie abhängig von der Analytkonzentration binden.
5. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Analytflüssigkeiten (5) Körperflüssigkeiten beispielsweise Urin, Speichel und Schleim, Pflanzen, Tierprodukte oder Lebensmittel sind welche alle Chlorid enthalten und bevorzugt, ohne Zugabe von verdünnenden Flüssigkeiten direkt eingesetzt werden.
6. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Silber-komplexierende Stabilisator (1) bevorzugt ein Aminkomplexbildner oder besonders bevorzugt Thiosulfat ist.
7. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur stabilen Reaktionsführung zusätzlich ein Puffer, bevorzugt Citratpuffer, bevorzugt mitgetrocknet, mit den anderen Reagenzien, im Messsystem enthalten ist und besonders bevorzugt einen Reaktions-pH-Wert von mehr als 7 besonders bevorzugt mehr als 8 erzeugt.
8. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reaktion in einem Teststreifen oder bevorzugt in einer fluidischen Einheit bevorzugt aus mehreren verbundenen Kammern bestehend durchgeführt wird, wobei bevorzugt die metallischen Nanopartikel durch die Zugabe der Probenflüssigkeit zum Ort der Visualisierung gespült werden, bevorzugt von einer Kammer in eine andere.
9. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die analytische Nachweisreaktion innerhalb weniger als 10 Minuten bevorzugt etwa 1 bis 5 Minuten abläuft und bevorzugt ohne Zugabe weiterer Reagenzien erfolgt.
10. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Silbersalz (3) bereits vorab mit dem Silber-komplexierenden Stabilisator (1) zur Reaktion gebracht wird.

11. Analytisches Verfahren auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die chemische Nachweisreaktion farbige allenfalls mehrfarbige Texte, Bilder oder technische Codes insbesondere Barcodes erscheinen lässt.
12. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass zumindest ein Teil der Reagenzien nicht gemeinsam getrocknet sind, sondern im Messsystem räumlich getrennt getrocknet oder extern getrocknet und danach eingebracht bevorzugt aufgedruckt sind.
13. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nanopartikel nahe dem Proben-Aufbringort deponiert sind und durch den Analytstrom zum Visualisierungsfeld mit den restlichen getrockneten Reagenzien (1-3) befördert werden.
14. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 12 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass über den Reagenzien (1-3) einzeln oder gemeinsam eine sich innerhalb von Sekunden bis maximal 10 Minuten zeitverzögert auflösende Folie oder Schicht (9) aufgebracht ist, die die vorzeitige Reaktion von Silbersalz und Nanopartikel sowie Silbersalz und Reduktionsmittel verhindert.
15. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens auf Basis in-situ verstärkter resonanter Farben nach einem der Ansprüche 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reagenzien (1-3) einzeln oder gemeinsam mit einem sich innerhalb von Sekunden bis maximal 10 Minuten zeitverzögert auflösenden Freisetzungverzögerer (10) gemischt sind, der die vorzeitige Reaktion von Silbersalz und Antikörper sowie Silbersalz und Reduktionsmittel verhindert.

Hierzu 3 Blatt Zeichnungen

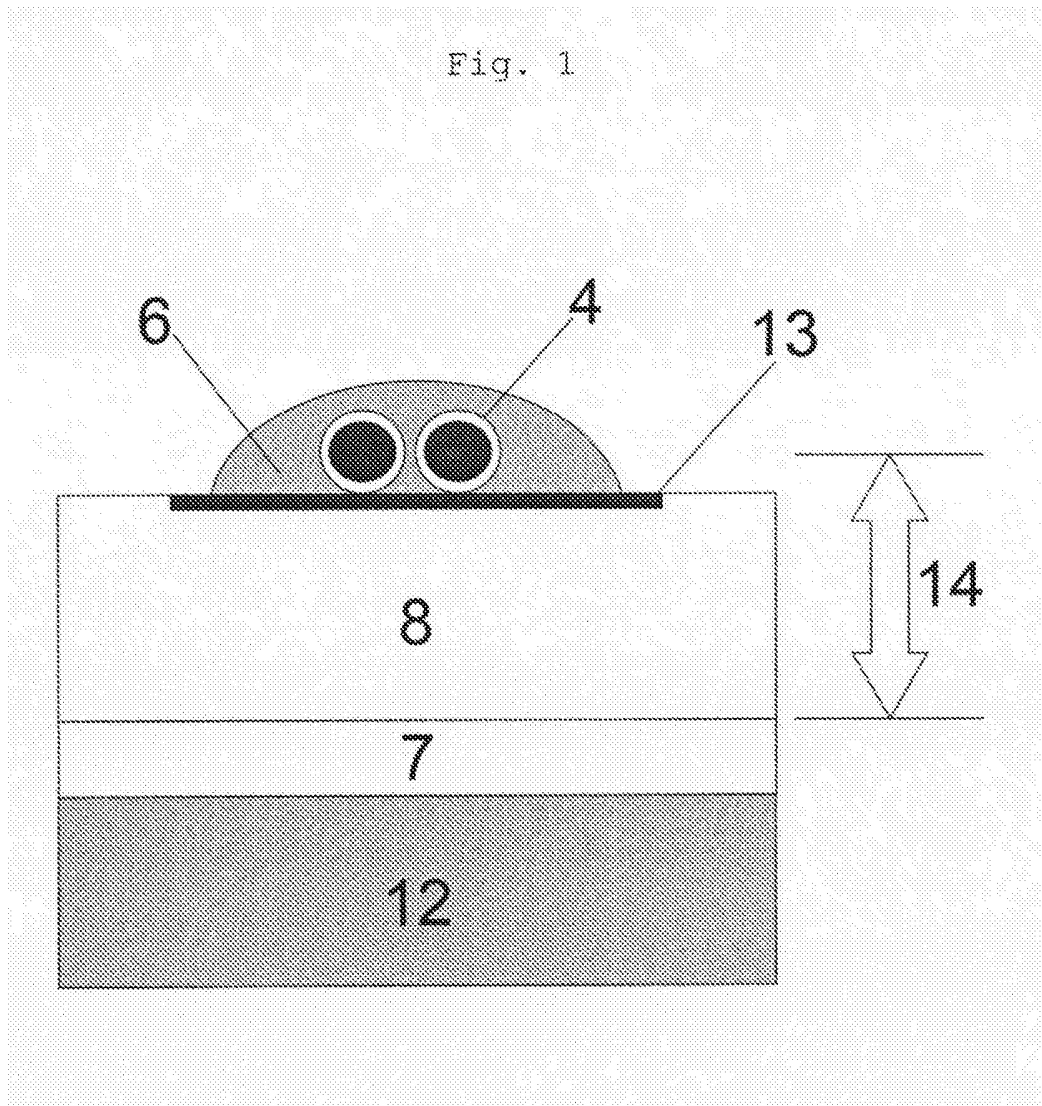


Fig. 2

