



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 37 513 T2 2007.12.13

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 021 554 B1

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/58** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 37 513.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/06584

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 922 363.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/040181

(86) PCT-Anmeldetag: 17.04.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 30.10.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 26.07.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 21.03.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 13.12.2007

(30) Unionspriorität:

16383 P 25.04.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Genicon Sciences Corp., San Diego, Calif., US;
The Regents of the University of California,
Oakland, Calif., US

(72) Erfinder:

YGUERABIDE, Evangelina E., La Jolla, CA 92037,
US; KOHNE, David E., La Jolla, CA 92037, US;
JACKSON, Jeffrey T., Poway, CA 92064, US;
YGUERABIDE, Juan, La Jolla, CA 92037, US

(74) Vertreter:

Bosch, Graf von Stosch, Jehle
Patentanwaltsgesellschaft mbH, 80639 München

(54) Bezeichnung: TEILCHENFÖRMIGES MARKIERUNGSMITTEL VERWENDENDES ANALYTASSAY

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Im Folgenden wird eine Übersicht relevanter existierender Detektionsverfahren gegeben. Es handelt sich ebenso um eine Zusammenfassung der relevanten wissenschaftlichen Erkenntnisse, um dem Leser ein besseres Verständnis der Details der beanspruchten Erfindung zu ermöglichen. Jedoch handelt es sich bei der gesamten zitierten Technik nicht um Stand der Technik in Bezug auf die Ansprüche. Insbesondere werden diejenigen Abschnitte, die sich auf allgemeine Methoden der „Bindungspaar“-Methodik beziehen, und Methoden zur Messung der Lichtstreuung mit umfasst.

Sensitive Analytassays

[0002] Bindungspaar-Techniken (ebenso als Ligand-Rezeptor-Bindung, molekulare Erkennungsbindung und Ähnliches bekannt), spielen eine wichtige Rolle in vielen Anwendungen biomedizinischer Analysen und sind von zunehmender Wichtigkeit in den Bereichen der Umwelttechnik, Veterinärmedizin, pharmazeutischen Forschung, Nahrungsmittel- und Wasserqualitäts-Kontrolle und Ähnlichem. Zum Nachweis von Analyten in geringen Konzentrationen (weniger als ungefähr 1 Picomol Analyt/analysiertes Probenvolumen) werden oftmals fluoreszierende, lumineszierende, chemilumineszierende oder elektrochemilumineszierende Markierungen und Detektionsverfahren verwendet.

[0003] Zum Nachweis geringer Konzentrationen von Analyten im Bereich der Diagnostik nimmt die Anwendung von Chemilumineszenz- und Elektrochemilumineszenz-Verfahren zu. Diese Chemilumineszenz- und Elektrochemilumineszenz-Verfahren stellen Mittel bereit, um geringe Konzentrationen von Analyten nachzuweisen, indem die Anzahl der lumineszierenden Moleküle oder Photonen-erzeugenden Ereignisse vielfach amplifiziert wird; die resultierende „Signal-Amplifikation“ ermöglicht dann den Nachweis von Analyten in geringen Konzentrationen.

[0004] Des Weiteren finden das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und andere verwandte Techniken zunehmende Anwendung zur Amplifizierung der Anzahl von Nukleinsäure-Analyten in einer Probe. Durch die Zugabe geeigneter Enzyme, Reagenzien und die Anwendung von Temperaturzyklen wird die Anzahl von Nukleinsäure-Analyt-Molekülen derart amplifiziert, dass der Analyt durch die meisten bekannten Detektionsmittel nachgewiesen werden kann. Das hohe Niveau der kommerziellen Aktivität bei der Entwicklung neuer Signalerzeugungs- und Detektionssysteme und die Entwicklung neuer Typen von Testkits und Vorrichtungen, die Signal- und Analytmolekül-Amplifikation anwenden, bestätigt die Wichtigkeit und den Bedarf an sensitiven Detektionsverfahren.

[0005] Jedoch bestehen bei den oben erwähnten Verfahren der Signal- und Analytmolekül-Amplifikation Einschränkungen, welche den Nachweis von Analyten durch diese Verfahren kompliziert, nicht einfach in der Anwendung, zeitaufwendig und kostenaufwendig machen. Probleme hinsichtlich der Interferenz chemischer oder enzymatischer Reaktionen, Kontamination, komplizierte und mehrstufige Verfahren, begrenzte Anwendbarkeit auf „homogene“ Einschritt-Formate und das Erfordernis kostspieliger und hoch entwickelter Instrumente sind Bereiche, in denen ständig Verbesserungen angestrebt werden.

[0006] Somit besteht ein enormer Bedarf an leicht durchführbaren, kostengünstigen, quantitativen Multianalyt-Verfahren und Vorrichtungen zum Nachweis von Analyten. Derartige Verfahren, Testkits und Instrumente könnten die Nachteile und Einschränkungen der derzeitigen Verfahren der Signal- und Analytmolekül-Amplifikation beheben und in der Forschung, einzelnen „Point-of-care“-Einrichtungen (z.B. Arztpraxis, Notaufnahme, außerhalb eines Labors, „in the field“ usw.) und in Hochdurchsatz-Testanwendungen nützlich sein.

[0007] Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Mittel bereitzustellen, um leichter ein oder mehrere Analyten in einer Probe mit geringeren Konzentrationen als es bisher möglich war nachzuweisen. Mit der vorliegenden Erfindung können geringe Konzentrationen von Analyten nachgewiesen werden, ohne dass das Erfordernis einer Signal- oder Analytmolekül-Amplifikation besteht.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt ein Signal- und Detektionssystem zum Nachweis von Analyten zur Verfügung, in dem die Verfahren vereinfacht und die Menge und Typen an Schritten und Reagenzien reduziert werden können. Die vorliegende Erfindung ermöglicht den quantitativen Nachweis einzelner oder mehrerer Analyten in einer Probe. Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine wesentliche Reduzierung der Anzahl verschiedener Tests und Mengen an analysiertem Probenmaterial. Eine derartige Reduzierung der Anzahl der

einzelnen Tests führt zu reduzierten Kosten und reduzierter Abfallproduktion, insbesondere medizinischen Abfalls, der beseitigt werden muss.

Streulicht-Detektionsverfahren und Eigenschaften lichtstreuender Partikel

[0009] Es existieren eine Fülle von Informationen betreffend das Phänomen der Lichtstreuung durch Partikel, die Verwendung von partikelförmigen Markierungen in diagnostischen Assays und die Verwendung von Lichtstreuemethoden in diagnostischen Assays, welche nun in der folgenden Diskussion der relevanten Technik dargestellt werden, wobei keine davon Stand der Technik in Bezug auf die anhängenden Ansprüche darstellt. Diese Technik wird als Hintergrund zum Verständnis der Neuheit und Nützlichkeit der beanspruchten Erfindung beschrieben.

[0010] Das allgemeine Studium der Lichtstreuung umfasst ein sehr großes Gebiet. Das Phänomen der Lichtstreuung wird seit ungefähr hundert Jahren intensiv untersucht, und die Anwendungen des Wissens um die Lichtstreuung auf verschiedene Aspekte menschlicher Belange sind weit und vielfältig.

[0011] Die klassische Theorie der Lichtstreuung durch kleine, homogene, nicht lichtabsorbierende, sphärische Partikel mit einer Größe von ungefähr 1/20 oder weniger der Wellenlänge der einfallenden Strahlung wurde anfänglich von Rayleigh entwickelt. Später wurde eine allgemeinere phänomenologische Theorie der Lichtstreuung durch homogene sphärische Partikel jeglicher Größe und Zusammensetzung von Mie entwickelt. Die Mie-Theorie ist sowohl auf lichtabsorbierende als auch nicht absorbierende Partikel anwendbar. Anhand der Mie-Theorie wurde außerdem gezeigt, dass die Formeln von Rayleigh leicht verallgemeinert werden können, so dass sie auf Partikel angewendet werden können, die Licht absorbieren, solange die Partikel viel kleiner sind als die Wellenlänge des einfallenden Lichts. Für diese Partikel mit kleinem Durchmesser ergeben die Mie-Theorie und die verallgemeinernde Rayleigh-Theorie ähnliche Ergebnisse. Lichtstreuung (elastische) kann aus dem klassischen oder quantenmechanischen Blickwinkel betrachtet werden. Eine ausgezeichnete quantitative Beschreibung kann durch die klassische Betrachtungsweise erhalten werden.

[0012] Ein historischer Hintergrund sowie eine Beschreibung der grundlegenden Theorien von Streulicht und anderer elektromagnetischer Strahlung wird in der folgenden Literatur gegeben; Absorption and Scattering of Light by Small Particles (1983), C. F. Bohren, D. R. Huffman, John Wiley and Sons; The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation (1969), M. Kerker, Academic Press.

[0013] Weitere Hintergrundinformation des Phänomens der Lichtstreuung kann den folgenden Veröffentlichungen entnommen werden.

[0014] Zsigmondy, Colloids and the Ultramicroscope – A Manual of Colloid Chemistry and Ultramicroscopy, 1914, John Wiley & Sons, Inc. beschreibt verschiedene Lichtstreueneigenschaften von Goldpartikeln und anderen Partikeltypen.

[0015] Hunter, Foundation of Colloid Science, Vol. I, 105, 1991, beschreibt die Verwendung optischer Mikroskope, Ultramikroskope und Elektronenmikroskope bei der Beobachtung von Partikeln.

[0016] Shaw et al., Introduction to Colloid and Surface Chemistry, 2nd ed., 41, 1970, beschreiben optische Eigenschaften von Kolloiden und die Verwendung von Elektronenmikroskopie und Dunkelfeldmikroskopie, z. B. das Ultramikroskop.

[0017] Stoltz, SpringerTracts, Vol. 130, beschreibt die Zeitauflösung von Lichtstreuemethoden.

[0018] Klein und Metz, 5 Photographic Science and Engineering 5–11, 1961, beschreiben die Farbe kolloidaler Silberpartikel in Gelatine.

[0019] Eversole und Broida, 15 Physical Review 1644–1654, 1977, beschreiben den Einfluss der Größe und der Form verschiedener Metallpartikel, wie beispielsweise Silber, Gold und Kupfer, auf die Lichtstreuung.

[0020] Kreibig und Zacharias, 231 Z. Physik 128–143, 1970, beschreiben Oberflächen-Plasma-Resonanzen in kleinen sphärischen Silber- und Goldpartikeln.

[0021] Bloemer et al., 37 Physical Review 8015–8021, 1988, beschreiben die optischen Eigenschaften von Silbernadeln in Submikrometer-Größe; die Verwendung derartiger Nadeln ist in dem US-Patent 5,151,956 von

Bloemer beschrieben, wo eine Oberflächen-Plasmon-Resonanz kleiner Metallpartikel zur Polarisierung des Lichts, welches sich in einem Wellenleiter fortpflanzt, beschrieben ist.

[0022] Wiegel, 136 Zeitschrift für Physik, Bd., 642–653, 1954, beschreibt die Farbe von kolloidalem Silber und die Anwendung der Elektronenmikroskopie.

Verwendung von Partikeln, Lichtstreuungs- und anderen Verfahren zum Nachweis von Analyten

[0023] In den letzten 35 Jahren wurden Metallpartikel, einschließlich Gold und Silber, sowohl als kontrastverstärkende Mittel als auch als lichtabsorbierende Markierung in vielen verschiedenen Typen analytischer und/oder diagnostischer Anwendungen verwendet. Die große Mehrheit dieser Anwendungen fallen in die Kategorie der Cytoimmunochemie-Studien, welche Gold- oder Silber-verstärkte Goldpartikel als Markierungen zum Studium struktureller Aspekte der zellulären, subzellulären oder Gewebe-Organisation verwendeten. In diesen Studien werden Metallpartikel gewöhnlich durch Elektronenmikroskopie, einschließlich Scannen, Transmission und BEI („backscattered electron imaging“) detektiert und lokalisiert. Diese Methoden nutzen die Elektronendichte der Metalle oder die hohe Atomzahl der Metalle aus, um die Detektion der Goldpartikel mit Hilfe der großen Mengen an sekundären und zurück gestreuten Elektronen, die durch die dichten Metalle erzeugt werden, zu vereinfachen (siehe Hayat, Immunogold-Silver Staining, Referenz Seite 1 und Kapitel 1, 6, 15; und Hayat, Colloid Gold, Referenz Kapitel 1, 5, 7 und andere).

[0024] Es liegen einige Veröffentlichungen bezüglich der Verwendung von Gold- und Silber-verstärkten Goldpartikeln in lichtmikroskopischen Studien vor. Beispielsweise wurden 1978 Goldpartikel als Immunogold-Färbung mit Detektion durch Lichtmikroskopie verwendet. Ein Review der Verwendung von Goldpartikeln in der Lichtmikroskopie (siehe Hayat, Immunogold-Silver Staining, Referenz Seite 3), der 1995 veröffentlicht wurde, diskutiert diese Arbeit von 1978 und präsentiert folgende Analyse:

„Geoghegan et al. (1978) waren die ersten, die die rote oder rosa Farbe kolloidaler Goldsole für lichtmikroskopische Immunogold-Färbung unter Verwendung von Paraffinschnitten verwendeten. In halbdünnen Harzschnitten wurde rotes Streulicht von Goldpartikeln mit einer Größe von nur 14 nm in Zellorganellen, welche hohe Konzentrationen markierter Antigene enthielten, im Lichtmikroskop beobachtet (Lucocq und Roth, 1984). Da die Sensitivität der Immunogold- Färbung in der Lichtmikroskopie im Vergleich zu anderen immunocytochemischen Techniken geringer ist, gelangte diese zu keiner allgemeinen Akzeptanz; die rosa Farbe des Goldniederschlags ist schwer zu visualisieren.“.

[0025] Dieser Absatz ist ein Hinweis auf den Verständnisstand der Lichtstreuereigenschaften von Gold und anderen Metallpartikeln für diagnostische und analytische Studien. Insbesondere heißt es in dem Absatz „In halbdünnen Harzschnitten wurde rotes Streulicht von Goldpartikeln mit einer Größe von nur 14 nm in Organellen, welche hohe Konzentrationen markierter Antigene enthielten, im Lichtmikroskop beobachtet.“

[0026] Jedoch ist bei Bestrahlung mit weißem Licht das Streulicht von 14 nm großen Goldpartikeln vorwiegend grün. Dass die Partikel im Lichtmikroskop rot erscheinen, ist ein Hinweis dafür, dass Interaktionen, bei denen es sich nicht um reine Lichtstreuung handelt, beobachtet wurden. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei der im Lichtmikroskop beobachteten roten Farbe hauptsächlich um transmittiertes Licht und nicht um Streulicht handelt. Wenn Goldpartikel ausreichend an der Zielstelle in Zellen, Gewebeschnitten oder anderen Oberflächen akkumulieren, wird rote Farbe auf Grund transmittierten Lichts beobachtet (siehe ebenso J. Roth (1983) Immunocytochemistry 2 p217; und Dewaele et al. (1983) in Techniques in Immunochemistry Vol. 2 p1, Eds. Bullock and Petrusz, Academic Press).

[0027] Wie oben erwähnt, schien es, dass die Sensitivität von Immunogold-Färbung in der Lichtmikroskopie der anderer Methoden unterlegen ist, wodurch die Verwendung von Goldpartikeln als Markierung für lichtmikroskopische Detektion keine allgemeine Akzeptanz erreichte. In dem 1995 erschienenen Review von Gao und Gao ist in Kapitel 12, Seite 198, folgendes Zitat bezüglich des gleichen Themas zu finden:

„Kolloidales Gold wurde anfänglich nur als Markierung für Elektronenmikroskopie (EM) verwendet auf Grund seiner Elektronendichte und sekundären Elektronenemission (Horisberger, 1979). Die direkte Visualisierung von kolloidalem Gold in der Lichtmikroskopie (LM) war begrenzt. Die Größe von kolloidalem Gold ist zu gering, um mit dem Lichtmikroskop detektiert zu werden, obwohl unter Verwendung von hoch konzentriertem Immunogold Zellen durch dieses Reagens rot angefärbt werden können (Geoghegan et al., 1978; Roth, 1982, Holgate et al., 1983.“

[0028] In beiden der oben zitierten Veröffentlichungen wird davon ausgegangen, dass die Sensitivität der Detektion von kolloidalem Gold mittels Lichtmikroskopie zu gering ist. Das Verfahren der Silberverstärkung von

Goldpartikeln wurde entwickelt, um diesen vermeintlichen Nachteil zu beheben. Es folgt ein weiteres Zitat aus dem 1995 erschienenen Review-Buch.

„Der wirkliche Durchbruch der Immunogold-Färbung in der Lichtmikroskopie kam mit der Einführung von Silberverstärkung von kolloidalen Goldpartikeln (20 nm), gebunden an Immunoglobulin in Paraffinschnitten von 5 Mikrometer (Holgate et al., 1983). Dieser Ansatz verstärkte signifikant die Sensitivität, Effizienz und Genauigkeit der Antigen-Nachweisbarkeit mit dem Lichtmikroskop. Unter Verwendung von IGSS können Goldpartikel mit einer Größe von nur 1 nm Durchmesser mit dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden. Dünnschnitte, die IGSS unterworfen werden, können ebenso mit dem Lichtmikroskop betrachtet werden, insbesondere bei Verwendung von Phasenkontrast oder Auflicht-Polarisations-Beleuchtung (Stierhof et al., 1992).“

[0029] Das Verfahren der Silberverstärkung von Goldpartikeln findet breite Anwendung. Bei der Verstärkungsmethode wird das Markierungs-Goldpartikel in ein größeres Metallpartikel oder eine noch größere Struktur überführt, welche Dimensionen von einigen Mikrometern oder mehr aufweist. Diese Strukturen bestehen hauptsächlich aus Silber, und derartige vergrößerte Partikel können leichter visuell mit dem optischen Hellfeld-Mikroskop detektiert werden. Einzelne vergrößerte Partikel wurden durch hoch auflösende konfokale Laser- und Auflicht-Polarisations-Lichtmikroskopie sichtbar gemacht. Id, 26 und 203.

[0030] Jedoch wurde erkannt, dass auch bei Verwendung der Silberverstärkungstechniken nicht die Sensitivität und Spezifität anderer Verfahren erreicht wird. Beispielsweise diskutierten in der Veröffentlichung von Verner, T. I. et al., Analytical Biochemistry 198, p 308–311 (1991), die Autoren ein neues Verfahren der sensitiven Analyten-Detektion welches als Latex-Hybridisierungs-Assay (LHA) bezeichnet wird. In diesem Verfahren werden große Polymerpartikel von 1,8 Mikrometer Durchmesser, welche mit vielen stark fluoreszierenden Farbstoffmolekülen als Analyten-Tracer gefüllt sind, verwendet, wobei die gebundenen Analyten durch Fluoreszenz-Signale nachgewiesen werden. Folgender Abschnitt stammt aus dieser Veröffentlichung:

„Um die Vorzüge von LHA zu bewerten, wurde unsere Technik mit zwei anderen indirekten, nicht radioaktiven Techniken, die in der Literatur beschrieben sind, verglichen. Die geeigneteste Technik zum Vergleich stellt die Streptavidin-Kolloid-Gold-Methode mit Silberverstärkung eines Hybridisierungssignals dar, da es sich hierbei um eine konkurrierende Korpuskular-Technik handelt. Jedoch ist dieses Verfahren, auch mit dem zusätzlichen Schritt der Silberverstärkung, nicht sehr sensitiv: 8 pg λ-Phagen-DNA werden durch dieses Verfahren detektiert, im Vergleich zu 0,6 pg oder 2×10^4 Molekülen λ-DNA, die durch LHA auf Nylonmembran detektiert werden können.“

[0031] In Stimpson et al., 92 Proc. Natl. Acad. Sci, USA 6379–6383, Juli 1995, ist ein Echtzeit-Detektionsverfahren zum Nachweis von DNA-Hybridisierung beschrieben. Die Autoren beschreiben die Verwendung einer partikelförmigen Markierung auf einer Target-DNA, welche als

„Streulichtquelle“ bei Beleuchtung durch die evaneszente Welle des Wellenleiters wirkt, wobei nur die an die Oberfläche gebundene Markierung ein Signal erzeugt. ... Die evaneszente Welle, die durch den Wellenleiter erzeugt wird, wird verwendet, um Licht von einer partikelförmigen Markierung, welche an mehreren DNA-Einfangszonen, platziert auf der Wellenleiteroberfläche, adsorbiert ist, zu streuen. Da sich die evaneszente Welle nur einige hundert Nanometer von der Wellenleiteroberfläche ausbreitet, streut die ungebundene/dissoziierte Markierung kein Licht, wodurch ein Waschschnitt nicht erforderlich ist. Die Signalintensität ist ausreichend, um die Messung der Oberflächenbindung zu ermöglichen, und die Desorption der lichtstreuenden Markierung kann in Echtzeit bestimmt werden, d. h., die Detektion ist nicht geschwindigkeitsbegrenzend. Das Hybridisierungsmuster auf dem Chip kann visuell bewertet werden oder einer quantitativen Analyse unter Verwendung einer Standard-CCD-Kamera mit einem 8-Bit-Video-Framegrabber in 1/30 einer Sekunde unterzogen werden.“

[0032] Die Experimente wurden mit Goldpartikeln mit 70 Nanometer Durchmesser und Selenpartikeln mit einem Durchmesser von 200 Nanometern durchgeführt. Intensivere Signale wurden mit den Selenpartikeln beobachtet. Die Autoren beschreiben

„die Erzeugung eines Wellenleitersignals, das ausreichend ist, um einzelne DNA-Basen zwischen 4 und 40 nm zu unterscheiden und somit mit einem Fluoreszenzsignal-System vergleichbar ist.“

[0033] Dieses Verfahren verwendet Wellenleiter und Beleuchtung vom evaneszenten Typ. Außerdem ist dieses Verfahren ungefähr so sensitiv wie derzeitige Detektionssysteme auf Fluoreszenzbasis. Partikel mit 70 nm Durchmesser und größer werden als bevorzugt beschrieben.

[0034] Schutt et al., US-Patent 5,017,009, beschreibt ein Immunoassay-System zum Nachweis von Liganden oder Ligandenbindungspartnern in einem heterogenen Format. Dieses System beruht auf der Detektion von „zurückgestreutem Licht von einer evaneszenten Welle, welches durch die Anwesenheit einer kolloidalen Goldmarkierung, welche durch eine immunologische Reaktion in die Grenzfläche gebracht wurde, gestört wird.“

... Die Platzierung des Detektors an einem Rückwinkel über dem kritischen Winkel gewährleistet einen hervorragenden Störabstand."

[0035] Die Autoren führen aus, dass das beschriebene Immunoassay-System totale Innenreflexion verwendet, d. h., die Fortpflanzung von evaneszenten Wellen. Sie weisen darauf hin, dass die Anwesenheit von kolloidalem Gold die Ausbreitung der Evaneszenten Welle stört, wodurch Streulicht erzeugt wird, welches durch einen Photoelektronenvervielfacher oder anderen Lichtsensor detektiert werden kann, wodurch ein ansprechendes Signal bereitgestellt wird. Sie weisen darauf hin, dass ein wichtiger Aspekt ihrer Erfindung die physikalische Lage des Detektors ist.

„Der Detektor wird idealerweise mit einem Winkel platziert, der größer ist als der kritische Winkel, und an einem Ort, an dem nur das zu der Lichtquelle zurückgestreute Licht detektiert wird. Durch diese Lage wird idealerweise die Detektion von höherem Streulicht innerhalb des Flüssigmediums verhindert.“

[0036] Eine totale Innenreflexion des einfallenden Strahls wird verwendet, um den evaneszenten Wellen-Modus der Beleuchtung zu erzeugen, und die Detektion wird auf einer optisch durchlässigen Oberfläche durchgeführt. Bevorzugt ist die Verwendung einer spezialisierten Vorrichtung.

[0037] Leuvering, US-Patent 4,313,734, beschreibt ein Verfahren zum Nachweis spezifisch bindender Proteine unter Verwendung einer markierten Komponente, die durch Koppelung von Partikeln „aus einer wässrigen Dispersion eines Metalls, einer Metallverbindung oder eines Polymeren, beschichtet mit einem Metall oder einer Metallverbindung, mit einem Durchmesser von wenigstens 5 nm“ erhalten wird. Das Verfahren wird als besonders geeignet zur Bewertung immunochemischer Komponenten, wie beispielsweise Haptene, Antigene und Antikörper, beschrieben. Die Metallpartikel wurden angeblich bereits als kontrastverstärkende Markierungen in der Elektronenmikroskopie verwendet, ihre Verwendung in Immunoassays wurde jedoch offensichtlich „zuvor nicht beschrieben und stellte sich überraschenderweise als möglich heraus. ... Die immunochemische Metallsolpartikel-Technik gemäß der vorliegenden Erfindung, welche entwickelt wurde, kann nicht nur sensivier sein als die bekannten Radio- und Enzym-Immunotechniken, sondern ermöglicht es außerdem, mehr als eine immunologische Komponente in dem gleichen Testmedium gleichzeitig durch Verwenden von Solpartikeln verschiedener chemischer Zusammensetzungen als Markierungen zu zeigen und zu bestimmen.“

[0038] Zu Beispielen für Metalle zählen Platin, Gold, Silber und Kupfer und ihre Salze.

„Das Messen der physikalischen Eigenschaften und/oder der Konzentration des Metalls und/oder des gebildeten metallhaltigen Agglomerats in einer bestimmten Phase der Reaktionsmischung kann unter Verwendung verschiedener Techniken, welche an sich bekannt sind, durchgeführt werden. Als Beispiele für diese Techniken seien genannt: die kolorimetrische Bestimmung, in der die intensive Farbe einiger Dispersionen, welche außerdem ihre Farbe im Verlauf physikochemischer Veränderungen ändern; das visuelle Verfahren, welches oftmals bei qualitativen Bestimmungen anwendbar ist hinsichtlich der oben erwähnten Tatsache, dass Metallsole gefärbt sind; die Verwendung von Flammen-Emissions-Spektrophotometrie oder anderer spektrometrischer Plasma-Emissions-Verfahren, welche gleichzeitige Bestimmung ermöglichen, und das hoch sensitive Verfahren der flammenlosen Atomabsorptions-Spektrophotometrie.“

[0039] Zwei oder mehr Analyten in einer Probe werden bevorzugt unter Verwendung von Flammen-Emissions-Spektrophotometrie oder eines anderen spektrometrischen Plasma-Emissions-Verfahrens nachgewiesen. Das bevorzugte Detektionsverfahren mit der höchsten Sensitivität ist die flammenlose Atomabsorptions-Spektrophotometrie.

[0040] Swope et al., US-Patent 5,350,697, beschreibt eine Vorrichtung zur Messung des Streulichts, in dem die Lichtquelle derart angeordnet, dass das Licht mit weniger als dem kritischen Winkel auf die Probe gerichtet wird. Der Detektor ist derart angeordnet, dass er Streulicht außerhalb der Enveloppe des kritischen Winkels detektiert.

[0041] Craig et al., US-Patent 4,480,042, beschreibt die Verwendung von Partikel-Reagenzien mit hohem Brechungsindex in Lichtstreuungs-Immunoassays. Die bevorzugten Partikel bestehen aus Polymermaterialien. Die Konzentration der Verbindungen von biologischem Interesse wurde durch Messen der Veränderung der Trübung, die durch Partikelagglutination oder Inhibition der Agglutination verursacht wird, bestimmt. Die bevorzugten Partikel besitzen einen Durchmesser von weniger als ungefähr 0,1 µm und mehr als 0,03 µm. „Kürzere Wellenlängen, wie beispielsweise 340 nm, ergeben größere Signalunterschiede als längere Wellenlängen, wie beispielsweise 400 nm.“

[0042] Cohen et al., US-Patent 4,851,329, und Hansen, US-Patent 5,286,452, beschreiben Verfahren zum

Nachweis agglutinierter Partikel durch optische Impuls-Partikelgrößen-Analyse oder unter Verwendung einer optischen Partikel-Durchfluss-Analysevorrichtung. Diese Systeme werden als nützlich zur Bestimmung von Antigen- oder Antikörper-Konzentrationen beschrieben. Diese Verfahren verwenden aufwendige Apparaturen und spezialisierte Signalverarbeitungsmittel. Die bevorzugten Partikeldurchmesser betragen ungefähr 1 Mikrometer für das Verfahren von Cohen und ungefähr 0,5 bis ungefähr 7,0 Mikrometer Durchmesser für das Verfahren von Hansen.

[0043] Okano et al., 202 Analytical Biochemistry 120, 1992, beschreibt ein heterogenes Sandwich-Immunoassay, welches Mikropartikel verwendet, die mit einem umgekehrten optischen Mikroskop gezählt werden können. Die Mikropartikel besaßen einen Durchmesser von ungefähr 0,76 Mikrometer; es handelte sich um carbonylierte Mikropartikel aus Acrylat.

[0044] Andere Partikeldetectionsverfahren sind von Block, US-Patent 3,975,084, Kuroda, US-Patent 5,274,431, Ford, Jr., US-Patent 5,305,073, Furuya, US-Patent 5,257,087, und Taniguchi et al., US-Patent 5,311,275, beschrieben.

[0045] Geoghegan et al., 7 Immunological Communications 1–12, 1978, beschreiben die Verwendung kolloidalen Golds zur Markierung von Kaninchen-Anti-Ziegen-IgG zum indirekten Nachweis anderer Antikörper. Zur Detektion der markierten Partikel wurden Licht- und Elektronenmikroskope verwendet. Die Goldpartikel besaßen eine durchschnittliche Größe von 18–20 Nanometer und es wurde Hellfeld-Lichtmikroskopie angewendet. Für Elektronenmikroskopie wurden Araldit-Silber-Gold-Dünnabschnitte verwendet. „Ähnliche prozentuale Anteile der oberflächenmarkierten Zellen wurden durch Immunofluoreszenz und das Hellfeld-Verfahren mit kolloidalem Gold festgestellt.“ Es konnten 1–5 Partikel pro Zelle durch Elektronenmikroskopie detektiert werden; die Autoren führen jedoch aus, dass:

„Derartige kleine Mengen der Markierung nicht durch Fluoreszenz oder Hellfeld-Mikroskopie detektiert werden konnten und entweder nicht spezifische und Fc-Rezeptor-gebundene GAD und GAM, wo ein geringes Niveau an Oberflächen-Immunoglobulin (S. Ig.) auf den GAD- und GAM-behandelten Zellen vorliegt, repräsentieren.“

[0046] Hari et al., US-Patent 5,079,172, beschreibt die Verwendung von Goldpartikeln in Antikörperreaktionen und die Detektion dieser Partikel unter Verwendung eines Elektronenmikroskops. Beispielhaft sind Goldpartikel von nur 15 Nanometer erwähnt. In dem bevorzugten Verfahren wird Elektronenmikroskopie angewendet.

[0047] DeMey et al., US-Patent 4,420,558, beschreibt die Verwendung eines Hellfeld-Lichtmikroskop-Verfahrens zur Spezifizierung von Zellen, die mit Gold-markierten Antikörpern markiert sind. Das Verfahren verwendet ein Lichtmikroskop in Hellfeld-Anordnung und Vergrößerungen von 500 oder größer, wobei Immersions-Öllinsen verwendet werden, um Gold-markierte Peroxidase-negative Zellen zu zählen. Die Visualisierung der markierten Oberflächen beruht auf den Aggregateigenschaften der Goldpartikel, welche, unter den beschriebenen Umständen, umfassendem „Patching“ unterliegen, wobei diese „Patches“ auf der Zelloberfläche mit dem beschriebenen Verfahren auflösbar sind. Es stellte sich heraus, dass Gold von 40 Nanometern optimale Ergebnisse erzielt.

[0048] DeMey et al., US-Patent 4,446,238, beschreibt ein ähnliches immunocytochemisches Hellfeld-Lichtmikroskop-Verfahren zur Lokalisierung von mit kolloidalem Gold markierten Immunoglobulinen als rot gefärbte Markierung in histologischen Schnitten. Das Verfahren der Immuno-Gold-Färbung (IGS) wird von den Autoren folgendermaßen beschrieben:

„In beiden Verfahren ist das Endprodukt eine Akkumulation einer großen Zahl von Gold-Granula über Antigen-enthaltenden Bereichen, wodurch die typische Rotfärbung der kolloidalen Goldsole hervorgerufen wird.“

[0049] DeBrabander et al., US-Patent 4,752,567, beschreibt ein Verfahren zum Nachweis einzelner Metallpartikel mit einem Durchmesser von weniger als 200 nm unter Verwendung von Hellfeld- oder Auflicht-Polarisations-Mikroskopie und Kontrastverstärkung mit einer Videokamera. Die Erfinder führen aus:

„Typischerweise besitzen in den oben erwähnten Verfahren die verwendeten Metallpartikel einen Durchmesser von ungefähr 10 bis ungefähr 100 nm. Dies liegt deutlich unter der Auflösungsgrenze der Hellfeld-Mikroskopie, welche im Allgemeinen bei 200 nm liegt. Daraus folgt logischerweise, dass alle zuvor bekannten visuellen Lichtmikroskop-Verfahren in Bezug auf ihre Anwendung zur Detektion immobilisierter Aggregate aus Metallpartikeln begrenzt sind. Einzelne Partikel können nur mit ultramikroskopischen Techniken, insbesondere mit Elektronenmikroskopie, beobachtet werden. Nun stellte sich völlig überraschend heraus, dass einzelne Metallpartikel mit einem Durchmesser von weniger als 200 nm mittels Hellfeld-Mikroskopie oder Auflicht-Polarisationsmikroskopie im sichtbaren Spektrum deutlich sichtbar gemacht werden können, wenn das resultierende

Bild elektronischer Kontrastverstärkung unterworfen wird."

[0050] In den nachfolgenden Abschnitten führen die Autoren aus:

„Im Vergleich zu existierenden diagnostischen Verfahren, basierend auf Sol-Partikel-Immuno-Assays, besitzt das vorliegende Verfahren eine deutlich höhere Sensitivität. Tatsächlich beruhen die existierenden Verfahren im Allgemeinen auf Lichtabsorption oder -streuung durch den Großteil der absorbierten oder suspendierten Metallpartikel. Offensichtlich erfordert das Beobachten einer Farbe, z. B. auf einem Blotting-Medium, die Anwesenheit einer großen Anzahl von Partikeln. Im Gegensatz dazu ermöglicht es das vorliegende Verfahren, einzelne Partikel zu beobachten und zu zählen. Somit erleichtert das vorliegende Verfahren die Entwicklung von diagnostischen Blots in Anwendungen, bei denen existierende, z. B. visuelle oder kolorimetrische Techniken, eine zu geringe Sensitivität aufweisen, z. B. zum Nachweis von Hepatitis".

[0051] Schafer et al., 352 Nature, 444–448, 1991, beschreiben die Verwendung von Goldpartikeln in Nanometergröße, welche unter Verwendung von Video-verstärkter Differentialinterferenz-Kontrastmikroskopie beobachtet werden konnten. Es wurde ein Goldpartikel mit einem Durchmesser von 40 Nanometern verwendet.

[0052] DeBrabander et al., 6 Cell Motility and the Cytoskeleton 105–113, 1986, (und US-Patent 4,752,567) beschreiben die Verwendung submikroskopischer Goldpartikel und die Anwendung von Hellfeld-Videokontrastverstärkung. Insbesondere wurden die Zellen durch Video-verstärkte Hellfeld-Kontrastmikroskopie mit Goldpartikeln von 5–40 Nanometern Durchmesser beobachtet. Ebenso wurde ausgeführt, dass „einzelne Goldpartikel mit einer Größe von weniger als ungefähr 100 Nanometer, die unter Glas oder an Zellen adsorbiert oder in Zellen mikroinjiziert sind, nicht im Lichtmikroskop sichtbar sind. Sie werden jedoch leicht visualisiert, wenn die Leistung einer Videokamera verwendet wird, um den Kontrast elektronisch zu verstärken.“

[0053] Die Autoren beschreiben die Verwendung von Auflicht-Illumination mit polarisiertem Licht und das Einfangen von reflektiertem Licht oder die Verwendung eines „leichteren und offensichtlich sensitiveren Wegs“ mit einer Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung unter Verwendung monochromatischen Lichts und einer einfachen Kamera. Die Autoren führen aus, dass die Goldpartikel leicht mit Phasenkontrast-Mikroskopie detektiert werden können.

„Im Gegensatz zu dem, was mit größerem Gold (üblicherweise 20–40 nm) möglich ist, sind auch dichte Akkumulationen von 5-nm-Gold, z. B. auf Strukturen, wie beispielsweise Mikrotubuli, nicht im Lichtmikroskop sichtbar. Sie erzeugen keine detektierbare rote Farbe. Kürzlich wurde dies durch eine physikalische Entwicklung mit Silbersalzen, welche die Größe der Partikel erhöht, wodurch eine leichte sichtbare Schwarzfärbung erzeugt wird, korrigiert. Wir beschrieben ein Verfahren zur Lokalisierung von Liganden auf einem nahezu molekularen Niveau. Das Verfahren ist neu, da es erstmalig dies in einem Lichtmikroskop ermöglicht, wobei einzelne individuelle Markierungen eindeutig von Hintergrundstrukturen unterscheidbar sind. Da das Verfahren auch auf lebende Zellen anwendbar ist, kann somit das dynamische Verhalten einzelner Proteine verfolgt werden. Das Verfahren kombiniert zwei gut entwickelte Techniken: Gold-Markierung (Labeling) und Videomikroskopie. Die meisten Anwendungen können mit kostengünstiger Videoausrüstung erfolgen, deren Preis unter dem der besten 100×-Ölobjektive liegt. Noch sehr viel mehr Möglichkeiten entstehen, wenn dies mit modernen digitalen Bildmanipulationen kombiniert wird. Es sind einige zusätzliche Vorteile erwähnenswert. Da die Markierung aus individuellen einzelnen Markierungen besteht, sind sowohl manuelle als auch automatische (computerunterstützte) Zählung leicht durchführbar und zuverlässig. Die kleine Größe der Markierung minimiert die Probleme der Penetration und der Diffusion. Die Möglichkeit der nahezu willkürlichen Veränderung der Ladung der Markierung ist hilfreich bei der Abschwächung nichtspezifischer Bindung in jeder beliebigen Anwendung.“

[0054] Dieses Verfahren wurde von den Autoren als „Nanopartikel-Video-Ultramikroskopie“ oder kurz „Nanovid-Ultramikroskopie“ bezeichnet. Eine ähnliche Technologie ist in Geerts et al., 351, Nature, 765–766, 1991, beschrieben.

[0055] Die vorangegangenen Diskussionen des Stands der Technik von Lichtstreuungsverfahren und die Verwendung von lichtstreuenden Partikeln und Verfahren im Bereich der Diagnostik zeigt deutlich die Grenzen derzeitiger Methoden der Analytdetektion und die Neuheit und den großen Nutzen der vorliegenden Erfindung. Es ist das Ziel dieser Erfindung, nicht nur die derzeitigen Einschränkungen und Nachteile der diagnostischen Assays auf Grundlage von Lichtstreuung zu überwinden, sondern ebenso die Einschränkungen und Nachteile anderer Verfahren, die keine Lichtstreuung verwenden, wie beispielsweise Signal- und Analytmolekül-Amplifikation, zu überwinden. Die hierin beschriebene Erfindung ist leichter in der Anwendung und besitzt größere Detektions-Sensitivität; mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Analyten über breitere Analytkonzentrationsbereiche zu messen als es bisher möglich war. Die vorliegende Erfindung ist allgemein anwendbar auf die meisten Probentypen und Assay-Formate als Signalerzeugungs- und Detektionssystem für einen Analyten-

nachweis.

Zusammenfassung der Erfindung

[0056] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zum Nachweis und zur Messung eines oder mehrerer Analyten in einer Probe. Das Verfahren beruht auf der Verwendung bestimmter Partikel mit einer spezifischen Zusammensetzung, Größe und Form und der Detektion und/oder Messung einer oder mehrerer Lichtstreuereigenschaften der Partikel. Der Nachweis und/oder die Messung der Lichtstreuereigenschaften der Partikel wird mit der Anwesenheit und/oder Menge oder der Abwesenheit eines oder mehrerer Analyten in einer Probe in Korrelation gebracht. Die vorliegende Erfindung ist vielseitig und in verschiedenen Formen anwendbar, um einen oder mehrere Analyten in einer Probe nachzuweisen und zu messen.

[0057] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe durch Binden dieser Analyten an wenigstens ein detektierbares lichtstreuendes Partikel mit einer Größe kleiner als die Wellenlänge des Beleuchtungslichts. Dieses Partikel wird mit einem Lichtstrahl unter Bedingungen angestrahlt, in denen das Licht, welches von dem Strahl durch das Partikel gestreut wird, durch das menschliche Auge mit weniger als 500-facher Vergrößerung detektiert werden kann. Das Licht, das von dem Partikel gestreut wird, wird dann unter diesen Bedingungen als ein Maß für die Anwesenheit eines oder mehrerer Analyten detektiert. Es stellt sich überraschenderweise heraus, dass durch einfaches Sicherstellen der geeigneten Beleuchtung und Sicherstellen der maximalen Detektion des spezifischen Streulichts ein extrem empfindliches Detektionsverfahren erhalten werden kann. Das Beleuchtungs- und Detektionsverfahren wird vom Anmelder als „DLASLPD“ („Abwinkelung des direkten Lichts zur ausschließlichen Detektion des vom Partikel gestreuten Lichts“; engl: „direct light angled for scattered light only from particle detected“) bezeichnet.

[0058] Das Verfahren und die damit verbundene Vorrichtung sind derart konstruiert, dass nur die Detektion von Streulicht von den Partikeln maximiert wird, und ist somit vielfach empfindlicher als die Verwendung von Fluorophoren oder die Verwendung der Partikel in den oben beschriebenen Verfahren. Derartige Partikel können unter Verwendung eines Mikroskops mit geringer Vergrößerung (2- bis 500-fache Vergrößerung, z. B. 10- bis 100-fache Vergrößerung) detektiert werden, ohne dass irgendeine elektronische Amplifikation des Signals erfolgen muss. Des Weiteren werden Verfahren bereitgestellt, in denen kein Mikroskop oder Abbildungssystem notwendig ist; vielmehr werden ein oder mehrere der Lichtstreuereigenschaften einer Flüssig- oder Festphasen-Probe, durch welche Licht gestreut wird, nachgewiesen. Diese Streulicht-Eigenschaften können verwendet werden, um die Anwesenheit, Abwesenheit oder Menge eines in einer beliebigen Probe vorliegenden Analyten zu bestimmen.

[0059] Die Lichtquelle muss im Allgemeinen nicht in einer bestimmten Weise behandelt werden (z. B. polarisiert oder Laser oder hohe Intensität), sondern lediglich derart ausgerichtet werden, dass eine Detektion des von den Partikeln gestreuten Lichts ermöglicht wird. Räumliches Filtern kann verwendet werden, um die Reduzierung nicht spezifischer Lichtstreuung zu gewährleisten. Derartiges Filtern kann durch andere Vorrichtungskomponenten und Probenkammern, welche Stör- bzw. Nebenlicht reduzieren, ergänzt werden.

[0060] Das direkte Licht kann polychromatisch oder monochromatisch, andauernd oder gepulst, sein; es kann sich um kohärentes oder nicht kohärentes Licht handeln. Es muss nicht polarisiert werden und kann von einer leistungsschwachen Lichtquelle, wie beispielsweise einer lichtemittierenden Diode (LED) oder einer 12-Watt-Glühlampe und Ähnlichem, erzeugt werden. Bei dem Licht handelt es sich nicht um evaneszentes Licht, wie von Stimpson, supra, beschrieben. Das Licht wird auf eine Probe, welche die Partikel enthalten kann, mit einem Winkel gerichtet, derart, dass das direkte Licht selbst nicht von dem Detektor wahrgenommen wird, bis es durch die Partikel gestreut wird. Das Verfahren und die Vorrichtung unterscheiden sich von denen von Swope, supra, dadurch, dass eine derartige Streuung innerhalb des kritischen Winkels, bevorzugt innerhalb des Beleuchtungswinkels, beobachtet werden kann. Jedoch kann es ebenso bei einem Winkel größer als dem kritischen Winkel und außerhalb der Intensitäts-Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts detektiert werden. Bei Verwendung mit einer Abbildungsvorrichtung, z. B. einem Mikroskop, verwendet das vorliegende Verfahren bevorzugt einen Detektor senkrecht zu der Ebene der Probe.

[0061] Im Gegensatz zu der diagnostischen Technik, die im Abschnitt „Hintergrund der Erfindung“ beschrieben wurde, fand der Anmelder heraus, dass spezifische Partikeltypen in sehr geringen Konzentrationen bis zu einem hohen Spezifitätsgrad und über breite Konzentrationsbereiche detektiert und gemessen werden können, wobei die Handhabung leichter ist und die Verfahren und Vorrichtungen weniger kostenintensiv sind. Die Erfindung ermöglicht den Nachweis von Analyten mit leichterer Handhabung, Sensitivität, Spezifität und geringerem Kostenaufwand als bekannte Verfahren der Analytdetektion.

[0062] Der Anmelder bestimmte anhand von theoretischen Modellen und physikalischen Experimenten, dass beschichtete metallartige Partikel ähnliche Lichtstreuereigenschaften aufweisen wie unbeschichtete metallähnliche Partikel, wobei beide bessere Lichtstreuereigenschaften im Vergleich zu nicht-metallartigen Partikeln aufweisen. Unter „metallartigen“ Partikeln wird jegliches Partikel oder jegliche partikelartige Substanz verstanden, die aus einem Metall, Metallverbindungen, Metalloxiden, Halbleitern (SC), Superleitern besteht, oder ein Partikel, das aus einer gemischten Zusammensetzung besteht, die wenigstens 0,1 Gew.-% eines Metall, einer Metallverbindung, eines Metalloxids, Halbleiters oder Superleiter-Materials enthält. Unter „beschichtetem“ Partikel wird ein Partikel verstanden, der auf seiner Oberfläche eine Schicht aus einem zusätzlichen Material aufweist. Die Schicht dient der chemischen Stabilisierung des Partikels in verschiedenen Probenumgebungen und/oder der spezifischen Bindung von Analyten durch molekulare Erkennungsmittel. Derartige Beschichtungen bestehen beispielsweise aus anorganischen und/oder organischen Verbindungen, Polymeren, Proteinen, Peptiden, Hormonen, Antikörpern, Nukleinsäuren, Rezeptoren und Ähnlichem. Unter „nicht-metallartigen“ Partikeln werden Partikel verstanden, die nicht aus einem Metall, Metallverbindungen, einem Superleiter, Metalloxiden, Halbleiter oder gemischten Zusammensetzungen bestehen, die nicht aus wenigstens 0,1 Gew.-% eines Metalls, einer Metallverbindung, eines Metalloxids, eines Superleiter- oder Halbleiter-Materials bestehen.

[0063] Der Anmelder bestimmte außerdem Folgendes: (1) ein oder mehrere Analyten in einer Probe können durch Detektion und/oder Messung einer oder mehrerer der spezifischen Lichtstreuereigenschaften von metallartigen Partikeln nachgewiesen und gemessen werden. Diese Lichtstreuereigenschaften umfassen die Intensität, Wellenlänge, Farbe, Polarisation, Winkelabhängigkeit und den RIFSLIW-Wert (individuelle Rotations-Fluktuationen in der Streulichtintensität und/oder Wellenlänge) des Streulichts. Eine oder mehrere dieser Eigenschaften des Partikelstreulichts können verwendet werden, um Information bezüglich des/der Analyten in der Probe zu liefern; (2) durch Variieren der Größe und/oder der Form und/oder der Zusammensetzung eines metallartigen Partikels in verschiedenen Kombinationen können eine oder mehrere der Lichtstreuereigenschaften derart eingestellt werden, dass sie leichter detektierbare und messbare Streulichtsignale erzeugen; (3) die Beleuchtung und die Detektion der metallartigen Partikel bestimmter Größe, Form und Zusammensetzung mit DLASLPD stellt ein hoch sensitives und leicht handhabbares Verfahren zur Detektion und zur Messung metallartiger Partikel durch ihre Lichtstreuereigenschaften bereit. Das Verfahren ermöglicht die Detektion eines einzelnen Partikels mit leicht handhabbaren und kostengünstigen Vorrichtungsmitteln; (4) das DLASLPD-Verfahren kann zusammen mit Partikelzählung und/oder integrierten Lichtintensitätsmessungen angewendet werden, um die Detektion und die Messung von Partikeln über breite Konzentrationsbereiche zu ermöglichen; (5) die Anwendung von Verfahren zur Verstärkung des Brechungsindex ermöglicht die Verstärkung der Lichtstreuereigenschaften des Partikels und/oder die Herabsetzung des nichtspezifischen Lichthintergrunds; (6) die Anwendung von DLASLPD-Video-Kontrast-Verstärkungsverfahren kann eine empfindlichere Detektion in vielen verschiedenen Probentypen und diagnostischen Assay-Formaten ermöglichen; (7) für einen sensitiven Nachweis der Analyten in einem kleinen Festphasen-Bereich, wie beispielsweise allgemein in Mikroarray- und Arraychip-Formaten verwendet wird, werden bestimmte Typen metallartiger Partikel bevorzugter verwendet als andere. Metallartige Partikel in Mikroarray- und Arraychip-Formaten können am einfachsten und kostengünstigsten unter Verwendung von DLASLPD-Verfahren nachgewiesen werden. Derartige Partikel in diesen Formaten können ebenso durch Verfahren der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, Hellfeld- oder Auflicht-Polarisations-Mikroskopie und Reflexionskontrast- und differentialen Interferenz-Kontrast-Mikroskopie nachgewiesen werden. Jedoch sind diese Verfahren und Vorrichtungen nicht so einfach in der Anwendung und kostengünstig wie die Detektion durch die DLASLPD-Verfahren und Vorrichtungen; (8) es können geeignete Vorrichtungen und Partikeltypen für spezifische Testkits konstruiert werden. Diese verschiedenen Testkits und damit verbundene Vorrichtungen sind geeignet für Verwendung durch den Verbraucher, Anwendungen außerhalb eines Labors („in the field“), „Point-of-Care“-Anwendungen, wie beispielsweise Arztpraxen, Kliniken, Notfallaufnahme und Ähnliches, Forschungslabore und bei zentralisierten Hochdurchsatz-Tests. Die obigen Aspekte der vorliegenden Erfindung ermöglichen den Nachweis eines oder mehrerer Analyten in vielen verschiedenen Probentypen und diagnostischen Assay-Formaten.

[0064] Wie im Folgenden detaillierter diskutiert wird, gibt es viele Variationen des Partikeltyps und der Lichtquelle sowie des Lichtdetektionsmechanismus. Außerdem können Variationen an den verwendeten Partikeltypen vorgenommen werden.

[0065] In bevorzugten Ausführungsformen besitzt das Partikel eine Größe, Zusammensetzung und Form, die zur Erzeugung eines oder mehrerer spezifischer Lichtstreuesignale spezifischer Wellenlänge(n), Farbe(n), Polarisation, Winkelabhängigkeit und RIFSLIW des Streulichts, welches durch das Auge oder Photodetektormittel detektierbar ist, geeignet ist; die Detektion umfasst Verfahren der Partikelzählung und/oder Messung der Intensität des Streulichts als Maß für die Partikelkonzentration; das Partikel ist aus metallartigen Materialien gebildet oder besteht aus einer gemischten Zusammensetzung, welche nicht-metallartige Materialien enthält;

die Partikel sind sphärisch, oval oder asymmetrisch (unter asymmetrisch wird eine nicht annähernd sphärische Form verstanden); die Partikel sind mit Bindungsagenzien, Polymeren, reaktiven chemischen Gruppen, Ausgangsmaterialmolekülen, anorganischen oder organischen Verbindungen beschichtet; es wird die Änderung der Streulichteigenschaften, wenn zwei oder mehr Partikel in Assay-Formaten in engen Kontakt miteinander gebracht werden, verwendet; es werden Partikelreagenzien verwendet, die aus einem metallartigen Material bestehen und mit Ausgangsmaterialmolekülen beschichtet sind, die zur Bindung an ein Bindungsagens ausgebildet sind; es werden Assay-Formate verwendet, in denen zwei oder mehr Partikel ausreichend nahe zusammengebracht werden, so dass die Lichtstreuereigenschaft der zwei oder mehr Partikel von einzelnen Partikeln unterschieden (aufgelöst) werden kann; es werden Assay-Formate verwendet, in denen zwei oder mehr Partikel, die in enger Nachbarschaft zueinander gehalten werden, voneinander getrennt werden, so dass die Lichtstreuereigenschaft jedes beliebigen Partikels verändert wird; es werden Assay-Formate verwendet, in denen zwei oder mehr Partikel durch eine oder mehrere molekulare Interaktionen miteinander verbunden werden, so dass bei Unterbrechung der molekularen Interaktion, welche die Partikel zusammenhält, ein oder mehrere Partikel aus der molekularen Interaktion freigesetzt werden; es werden Assay-Formate verwendet, in denen die amplifizierte Detektion von Analyten durch Vernetzung zweier oder mehr Partikel unter Verwendung chemischer oder biologischer Vernetzungsmittel erreicht wird; die Partikel bestehen aus zusätzlichen Materialien, um ihre Orientierung in einem elektrischen, magnetischen oder elektromagnetischen Feld (EMF) zu ermöglichen; die Partikel werden an andere Partikel mit magnetischen oder ferro-elektrischen Eigenschaften gebunden; der Beleuchtungslichtstrahl besitzt eine Wellenlänge, die derart ausgewählt ist, dass der Hintergrund im Vergleich zu anderen Wellenlängen reduziert ist.

[0066] In anderen Ausführungsformen ist das Beleuchtungslicht andauernd oder gepulst; das Beleuchtungslicht ist kohärent oder nicht-kohärent; das Beleuchtungslicht ist polarisiert oder nicht-polarisiert; es werden zwei oder mehr verschiedene Wellenlängen entweder von der gleichen Lichtquelle oder von zwei oder mehr verschiedenen Lichtquellen verwendet, um die Probe zu beleuchten, und die gestreuten Lichtsignale detektiert.

[0067] In anderen Ausführungsformen beinhaltet das Verfahren die Verwendung mehrerer verschiedener Partikel, von denen jedes ein oder mehrere Lichtstreuereigenschaften aufweist, die durch das Auge oder durch Photodetektormittel detektiert werden können; und/oder es werden mehrere verschiedene Wellenlängen des Lichts im Beleuchtungs- oder Detektionsschritt verwendet; es werden Verfahren zur Verstärkung des Brechungsindeks verwendet, um den nichtspezifischen Lichthintergrund zu reduzieren; der Detektor wird in Winkelaußenhalb der Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts der Probe und des Lichtstrahls platziert; es werden räumliche Filterverfahren angewendet; optische Filter, wie beispielsweise Kantenfilter und/oder Schmalbandfilter werden im Detektionsschritt verwendet, um nicht-spezifisches Hintergrundlicht zu reduzieren.

[0068] In noch einer anderen Ausführungsform wird die Partikelgröße vor der Detektion durch Autometallographie erhöht; der Beleuchtungslichtstrahl weist keine Infrarotstrahlung auf; der Analyt liegt in Serum vor; die Partikel werden vor der Detektion in die Lösung freigesetzt; die Partikel werden vor der Detektion zu einem kleinen Volumen oder in einem Festphasenbereich konzentriert; die Partikel werden durch zeitabhängige Bindung an eine Oberfläche detektiert, oder fließende Partikel passieren einen Detektor oder eine Reihe von Detektoren; mehrere Analyten werden auf einer Festphase in einem Mikroarray detektiert; der Mikroarray ist mit Flüssigkeit bedeckt oder trocken; einzelne oder mehrere Analyten werden auf einer Zelloberfläche, in einem Zell-Lysat oder einer Chromosomenpräparation detektiert; der Beleuchtungslichtstrahl ist polychromatisches weißes Licht oder monochromatisches Licht; der Analyt liegt in Lösung oder Festphase vor oder liegt auf einem Objekträger, einer Mikrotiterplatte oder einem anderen Kunststoffbehältnis vor; das Partikel ist ein Gold- oder Silberpartikel mit einer Größe von 1 bis 500 nm, bevorzugt 10 bis 200 nm; der Detektionsschritt umfasst nicht die Amplifikation des Streulichts durch elektronische Mittel; der Beleuchtungslichtstrahl wird auf das Partikel durch ein Prisma oder ein anderes Lichtwellenleitersystem gerichtet.

[0069] Des Weiteren kann die Detektion das Beobachten des Partikels durch mindestens ein 10×-Objektiv umfassen; es wird das Verfahren der DLASLPD-Video-Kontrastverstärkung angewendet; es werden faseroptische Beleuchtung und Detektion verwendet; es werden Detektionsverfahren mittels Hellfeld-, konfokaler Laser-Scanning-, Reflexionskontrast- oder differentieller Interferenz-Kontrast-Mikroskopie angewendet; es wird eine Detektion und Aufreinigung von kombinatorisch synthetisierten Molekülen durchgeführt; Partikel und/oder spezielle Beschichtungen werden als synthetische Festphasenträger für kombinatorische oder andere synthetisierte Moleküle verwendet; es werden speziell konstruierte Probenkammern verwendet; es werden entspiegelte Beschichtungen auf optischen Komponenten und Probenkammern verwendet; es werden Vorrichtungen für den Gebrauch außerhalb eines Labors („in the field“), in der Arztpraxis, in Kliniken und Krankenhäusern verwendet; spezifische Partikeltypen werden in geeigneten Testkits bereitgestellt.

[0070] Die hohe Sensitivität und die Einfachheit der Anwendung des Signalerzeugungs- und Detektionssystems der vorliegenden Erfindung ermöglicht es einem Fachmann auf dem Gebiet, durch kostengünstige Mittel ein oder mehrere Analyten in einer Probe in extrem geringen Konzentrationen nachzuweisen und zu messen, ohne dass Verfahren der Signal(Markierungs)- oder Target-Analyt-Molekül-Amplifikation angewendet werden müssen.

[0071] Der große Bereich spezifischer Lichtstreuesignale von verschiedenen Partikeltypen in der vorliegenden Erfindung ermöglicht es dem Fachmann auf dem Gebiet, ein oder mehrere Analyten in einer Probe mit einem hohen Spezifitätsgrad nachzuweisen und zu messen.

[0072] Die hohe optische Auflösbarkeit von zwei oder mehr verschiedenen Partikeltypen in der vorliegenden Erfindung ermöglicht eine sehr einfache Multi-Analyt-Detektion (d. h. zwei oder mehr verschiedene Analyten) in einer Probe ohne das Erfordernis einer komplexen Vorrichtung.

[0073] Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass neue Verfahren und Vorrichtungen mit breiter Anwendbarkeit bereitgestellt werden. Die vorliegende Erfindung kann in der ein oder anderen Form auf die meisten Situationen angewendet angepasst werden, in denen es erforderlich/wünschenswert ist, ein Signalerzeugungs- und Detektionssystem als Teil eines Assay-Systems zur Quantifizierung und/oder Detektion der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Analyten zu verwenden. Zu derartigen Analyten zählen industrielle und pharmazeutische Verbindungen aller Typen, Proteine, Peptide, Hormone, Nukleinsäuren, Lipide und Kohlehydrate sowie biologische Zellen und Organismen aller Arten. Die ein oder andere Ausführungsform dieser Erfindung kann auf die meisten Assay-Formate, die üblicherweise in diagnostischen Assays aller Arten angewendet werden, angepasst werden. Beispielsweise zählen dazu heterogene und homogene Assay-Formate vom Sandwich-Typ, Aggregations-Typ, indirekten oder direkten Typ oder Ähnliches. Die Probe kann als Flüssigphase, Festphase oder Gemischphase vorliegen.

[0074] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen und aus den Ansprüchen ersichtlich.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0075] Zunächst erfolgt eine kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Zeichnungen

[0076] In [Fig. 1](#) ist die Beleuchtung einer Probe von unten dargestellt. L ist eine Linse; D ist der Durchmesser der Linse; O ist der detektierte Bereich der Oberfläche S; C ist der Kegel (Konus), der die Winkel angibt, in denen die Linse L Licht sammelt; LB ist der Beleuchtungslichtstrahl.

[0077] In [Fig. 2](#) ist der Sammelwinkel einer Linse dargestellt. D ist der Durchmesser der Linse; f ist die Brennweite; O ist der detektierte Bereich; θ_H ist der planare Halbwinkel des Sammelkegels.

[0078] [Fig. 3](#) ist ein Diagramm, in dem die Winkel definiert sind, die zur Beschreibung der Reflexion und Refraktion (Lichtbrechung) an einer Oberfläche verwendet werden. S ist die Oberfläche; n_i und n_t sind die Brechungsindeks des einfallenden Mediums bzw. des Oberflächenmediums; RFRB und RFLB sind die gebrochenen bzw. reflektierten Lichtstrahlen; IB ist der einfallende Lichtstrahl; θ_i , θ_r und θ_t sind die Einfalls-, Reflexions- und Refraktionswinkel des Lichtstrahls.

[0079] In den [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#) und [Fig. 4C](#) sind Lichtreflexionsgraphiken für $n_i < n_t$, die verschiedenen Texten entnommen wurden, dargestellt.

[0080] In den [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) sind Lichtreflexionsgraphiken für $n_i > n_t$, die verschiedenen Texten entnommen wurden, dargestellt.

[0081] In [Fig. 6](#) sind Refraktion und Reflexion bei der Beleuchtung von Partikeln auf einer trockenen Oberfläche in Luft veranschaulicht.

[0082] [Fig. 7](#) ist eine Plotgraphik von θ_{i2} vs. θ_{i1} für $n_2 = 1,5 + n_3 = 1$ (siehe [Fig. 6](#)).

[0083] In [Fig. 8](#) ist die Winkelverteilung des durch Oberflächenartefakte und Partikel gestreuten Lichts darge-

stellt; die gestrichelten Linien stellen das von den Partikeln gestreute Licht dar; die durchgezogene Linie mit einem Pfeil stellt den einfallenden weißen Lichtstrahl und einen durch Oberflächenartefakte erzeugten Streulichtstrahl dar; der Kreis ist eine Intensitäts-Enveloppe für das Licht, das in Vorförwärtsrichtung gestreut wird.

[0084] [Fig. 9](#) zeigt eine Probe in einem Dünnfilm aus Wasser, welche sich auf einem Objektträger befindet und mit einem Deckglas bedeckt ist. Der Beleuchtungsstrahl trifft auf vier Medien-Grenzflächen; S1 (Luft zu Glas); S2 (Glas zu Wasser); S3 (Wasser zu Glas); S4 (Glas zu Luft). Die Partikel befinden sich auf der Oberfläche S2 bei 0 oder bewegen sich frei oberhalb der Oberfläche S2. Das einfallende Licht trifft auf die Oberfläche S1.

[0085] In [Fig. 10](#) ist die Beleuchtung einer Probe von oben dargestellt. L ist die Linse; C ist der Sammelkegel.

[0086] In [Fig. 11](#) ist die Beleuchtung unter Verwendung einer Prismen-Anordnung (Beleuchtung von unten) dargestellt. S1 ist die Oberfläche des Prismas, auf die Licht einfällt; S2 und S3 sind die untere bzw. obere Oberfläche eines Kunststoffsubstrats.

[0087] In den [Fig. 12A](#), [Fig. 12B](#), [Fig. 12C](#), [Fig. 12D](#) und [Fig. 12E](#) sind ein Porenprisma (**12A**), ein gleichseitiges Prisma (**12B**), ein im Haus hergestelltes Prisma (**12C** und **12D**) bzw. eine ebene konvexe Linse dargestellt.

[0088] In [Fig. 13](#) ist ein Beleuchtungslichtstrahl, beobachtet mit einem Rhodamin-Kunststoffblock, dargestellt.

[0089] [Fig. 14](#) zeigt eine Oberfläche und damit verbundene Ebenen zur Erläuterung von [Fig. 15](#); S1 ist ein optisch durchlässiges oder optisch nicht-durchlässiges festes Substrat; SP1 ist der dreidimensionale Raum oberhalb der Ebene der Oberfläche S1, SP2 ist der dreidimensionale Raum unterhalb der Ebene der Oberfläche S1. Lichtstreuende Partikel oder lichtstreuendes Material befindet sich in der SP1-Ebene an oder in der Nähe der Oberfläche S1.

[0090] In [Fig. 15](#) sind die verschiedenen Verfahren der DLASLPD-Beleuchtung und -Detektion zusammengefasst.

[0091] [Fig. 16](#) zeigt die experimentell bestimmte Streulichtintensität in Abhängigkeit des Spektrums der Einfallswellenlänge für beschichtete und nicht-beschichtete Goldpartikel von 100 nm Durchmesser.

[0092] Die [Fig. 17](#), [Fig. 18](#) und [Fig. 19](#) zeigen verschiedene Probenkammer-Konstruktionen zur Reduzierung des Niveaus des nicht-spezifischen Lichthintergrunds. Mit diesen Probenkammern können sowohl flüssige als auch immobilisierte Proben getestet werden. In [Fig. 17](#) ist S1 die Oberfläche, an der der Lichtstrahl auf die Probenkammer trifft; S2 ist die Oberfläche, welche das lichtstreuende Material (für immobilisierte Proben) enthält. S3 ist eine weitere abgeschrägte Oberfläche; die Oberflächen S1 und S3 sind mit Winkeln von ungefähr 20 Grad bis 70 Grad, in Abhängigkeit des Beleuchtungswinkels, abgeschrägt; die Seite der Oberfläche S1 sollte derart gewinkelt sein, dass der Lichtstrahl auf S1 mit 0 Grad in Bezug auf die Senkrechte auftrifft; S4 ist eine optisch durchlässige Oberfläche mit oder ohne Öffnung; S5 ist die gegenüberliegende Seite der Oberfläche S2. Wenn die Kammer geschlossen ist (d. h., S4 ist durchgehend ohne Öffnung), wird eine schmale Öffnung an einer der Oberflächen zur Einführung der Probe und gegebenenfalls zum Waschen platziert.

[0093] [Fig. 18](#) ist ähnlich aufgebaut wie [Fig. 17](#) mit dem Unterschied, dass die abgeschrägten Seiten durch gebogene Seiten ersetzt sind. Ansonsten gilt das Gleiche wie bei dem Aufbau von [Fig. 17](#).

[0094] In [Fig. 19](#) ist S1 eine flach abgeschrägte optisch durchlässige Oberfläche, an der der Lichtstrahl auf die Probenkammer trifft. Die Seite der Oberfläche S1 sollte derart gewinkelt sein, dass der Lichtstrahl auf S1 mit 0 Grad trifft; S2 ist die Oberfläche, die das lichtstreuende Material enthält, wenn das Material immobilisiert ist; S3 ist eine weitere gebogene oder abgeschrägte Oberfläche. S4 ist eine optisch durchlässige Oberfläche für eine eingeschlossene Probenkammer; alternativ besitzt S4 eine Öffnung veränderlicher Größe und Form zur Einführung und zum Waschen der Probe und zur Detektion; S5 ist die gegenüberliegende Seite der Oberfläche S2. Wenn die Kammer eingeschlossen ist, ist eine schmale Öffnung an einer der Oberflächen zur Einführung und/oder zum Waschen der Probe erforderlich.

[0095] [Fig. 20](#) zeigt ein Koordinatensystem, welches verwendet wird, um die Interaktion von Partikeln mit polarisiertem Licht zu beschreiben. Das Licht bewegt sich entlang y und wird in z-Richtung polarisiert. D ist der Detektor der Streulichtintensität. γ ist die Beobachtungsrichtung. θ und ϕ sind die Kernwinkel bzw. Polarwinkel.

[0096] In [Fig. 21](#) ist schematisch eine Vorrichtung zur Analyse von Flüssigproben dargestellt. Das Licht von einer Glüh- oder Entladungslampe wird durch ein Linsensystem, welches durch die Linse L1 dargestellt ist, auf den Eingangsschlitz eines Monochromators fokussiert; monochromatisches Licht, welches aus dem Monochromator austritt, wird durch die Linse L2 gesammelt und durch die Linse L3 auf das Zentrum der transparenten Probenküvette (ST) fokussiert; die Probenküvette enthält eine flüssige Lösung fluoreszierender Moleküle oder eine Suspension lichtstreuender Partikel; die Probenküvette ist gewinkelt oder geneigt, so dass das von ihren Wänden reflektierte Licht nach unten und weg von dem Photodetektor abgelenkt wird; das von der Probe gestreute oder emittierte Licht wird durch die Linse L4 gesammelt, welche an der Ebene M ein vergrößertes Bild der Probenküvette und des flüssigen Inhalts bildet; in der Ebene M ist eine kleine Apertur positioniert, welche es dem Licht, welches von der Flüssigkeit im Zentrum der Küvette emittiert oder gestreut wird, selektiv ermöglicht, den Photodetektor zu erreichen, jedoch den Photodetektor von Licht, welches von den Seitenwänden der Probenküvette reflektiert oder gestreut wird, abschirmt; das vergrößerte Bild an M vom Zentrum des flüssigen Inhalts wird von der optischen Achse der Linse L4 durch Brechungsindex-Effekte der Wand der abgeschrägten Probenküvette, durch die das emittierte oder gestreute Licht detektiert wird, verschoben; der Photodetektor und die Apertur sind auf einer Seite der optischen Achse der Linse L4 derart positioniert, dass das verschobene Bild des Zentrums der Flüssigkeit auf die Apertur und den Photodetektor fällt; es werden Halterungen zur Einführung optischer Filter und/oder Polarisatoren in die Beleuchtungslicht- und Streulichtwege bereitgestellt (H1 und H2); eine Lichtblende ist vor dem Photodetektor positioniert. Wenn der Photodetektor einen kleinen lichtempfindlichen Bereich aufweist, wird eine Linse L5 verwendet, um das Licht, welches die Apertur an M zum lichtempfindlichen Bereich durchquert, zu fokussieren. Wenn kein monochromatisches Licht erforderlich ist, kann der Monochromator leicht entfernt werden und Licht einer Glüh- oder Entladungslampe direkt durch die Linsen L1, L2 und L3 an das Zentrum der Probenkammer abgegeben werden.

[0097] In den [Fig. 22](#), [Fig. 23](#) und [Fig. 24](#) sind Verfahren zur Verwendung lichtstreuender Partikel und spezifische DLASLPD-Verfahren, welche zu spezifischen Testkits und Vorrichtungen führen, dargestellt.

[0098] In [Fig. 25](#) sind eine Vorrichtung und ein Assay-Entwicklungsverfahren erläutert.

[0099] Die [Fig. 26A](#), B, C, D, E und F zeigen die berechneten Profile der Streulichtintensitäten versus Einfallswellenlängen für sphärische Gold-, Silber-, Aluminium-Kupfer-, Selen- bzw. Polystyrol-Partikel von 10 nm Durchmesser. L_k ist die Wellenlänge; C_{sca} ist der Lichtstreuquerschnitt.

[0100] Die [Fig. 27A](#), B, C, D, E und F zeigen die berechneten Streulichtintensitäten in Abhängigkeit der Wellenlängen des einfallenden Lichts für Goldpartikel verschiedener Größen. A, B, C, D, E und F entsprechen sphärischen Goldpartikeln mit einem Durchmesser von 10, 20, 40, 60, 80 bzw. 100 nm. REL CSCA ist der relative Lichtstreuquerschnitt; WAVE, NM ist die Wellenlänge.

[0101] [Fig. 28](#) ist ein Diagramm eines sphärischen beschichteten Partikels. (1) ist die Beschichtung aus einem Polymeren, einem Bindungsgens oder einer anderen Substanz auf der Oberfläche des Partikels; (2) ist der Partikelkern.

[0102] Die [Fig. 29A](#), B und C zeigen Diagramme von MLSP (manipulierbare lichtstreuende Partikel) gemischter Zusammensetzung. A (1) ist ein magnetisches oder ferro-elektrisches Kernmaterial, beschichtet mit (2) dem gewünschten lichtstreuenden Material; B zeigt (4) einen lichtstreuenden Materialkern, beschichtet mit (3) magnetischem oder ferro-elektrischem Material; C zeigt eine Mischung von (5) lichtstreuendem Material mit (6) magnetischem oder ferro-elektrischem Material.

[0103] Die [Fig. 30A](#), B und C zeigen dimere, tetramere Partikelkonstrukte und Partikelkonstrukte höherer Ordnung für orientierbare MLSP-Partikel. (1) sind lichtstreuende detektierbare Partikel und (2) sind magnetische oder ferro-elektrische Partikel. Die Linie (3) ist die chemische, ionische oder andere Bindung, welche die Partikel in dem Multi-Partikel-Konstrukt zusammenhält.

[0104] Es werden die folgenden Abkürzungen hierin verwendet:

E-EMR	– Emittierte elektromagnetische Strahlung
I-EMR	– Einfallende elektromagnetische Strahlung
EMF	– Elektromagnetisches Feld
SC	– Halbleiter
Sec	– Sekunde
Q _f	– Fluoreszenz-Quantenausbeute
I _{abs}	– Absorption des einfallenden Lichts (pro Sekunde absorbierte Photonen)
I _o	– Intensität des einfallsenes Lichts (Photonen pro Sekunde)
M	– Molarität (Mole pro Liter)
ml	– Milliliter
mM	– Millimolar
g	– Gramm
mg	– Milligramm
mm	– Millimeter
µl	– Mikroliter
pI	– Isoelektrischer Punkt
E oder e	– Molarer dekadischer Extinktions-Koeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$)
C	– Molare Konzentration (M)
X	– Optische Weglänge (cm)
I _f	– Fluoreszenz-Intensität (Photonen pro Sekunde)
S _{eff}	– Streueffizienz des Partikels
C _{abs}	– Absorptions-Querschnitt (cm^2)
A _{CSR}	– Verhältnis des Absorptions-Querschnitts des Partikels zu dem physikalischen Querschnittsbereich des Partikels
C _{sca}	– Streuquerschnitt (cm^2)
S _{CSR}	– Verhältnis des Streuquerschnitts des Partikels zu dem physikalischen Querschnittsbereich des Partikels
a	– Radius eines Partikels
C _{ext}	– Streu-Extinktions-Querschnitt des Partikels (cm^2)
I	– Photonen pro Sekunde, die eine Lösung nach Passieren durch eine Dicke X verlassen
N	– Partikelkonzentration (Partikel/cm ³)
t	– Trübung der Suspension
I _s	– Streuintensität (Photonen/Sekunde)
n ₂	– Brechungsindex des Materials
n ₂ Rel	– Reale Komponente von n ₂
n ₂ Im	– Imaginäre Komponente von n ₂
n ₁	– Brechungsindex des Mediums
m	– Verhältnis von Brechungsindex des Partikelmaterials zu Brechungsindex des Mediums
I _o	– Wellenlänge des einfallsenen Lichts (nm)
RI	– Brechungsindex-Faktor
Refmed	– Brechungsindex des Mediums (n ₁)
e _m	– Dielektrische Konstante des Mediums
n _m	– Brechungsindex des Mediums
a	– Bestimmt die Polarisierbarkeit des beschichteten Partikels
nm	– Nanometer
cm	– Zentimeter
µm	– Mikrometer

Beschreibung der Erfindung

[0105] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur Messung eines oder mehrerer Analyten in einer Probe. Das Verfahren beruht auf der Verwendung spezifischer Partikeltypen bestimmter Zusammensetzung, Größe und Form und der Detektion und/oder Messung einer oder mehrerer der Lichtstreuereigenschaften des/der Partikel(s).

[0106] Die vorliegende Erfindung ist einfacher in der Handhabung, besitzt höhere Sensitivität und Spezifität und ermöglicht die Detektion und die Messung über einen breiteren Konzentrationsbereich des/der Analyten als es bisher möglich war. Die vorliegende Erfindung besitzt viele Vorteile gegenüber der Anwendung der Verfahren der Signal- und Target-Analyt-Amplifikation (z. B. Chemilumineszenz und PCR), Fluoreszenz-Markie-

rungen und Fluoreszenz-Verfahren und früheren Assays und Lichtstreuverfahren auf Partikelbasis. Das Verfahren ist vielseitig einsetzbar und kann im Bereich der Diagnostik sowie auf anderen Gebieten Anwendung finden. Das Verfahren kann in den meisten, wenn nicht sogar in allen, Standard-Assays vom Bindungspaaartyp, beispielsweise Immunoassays und Nukleinsäure-Assays und Ähnlichem, für Proben in Flüssigphasen-, Gemischphasen-, Festphasen- und Festphasen-Mikroarray-Assay-Formaten angewendet werden.

[0107] Anstatt der Darstellung der breiten Anwendbarkeit durch explizite Darstellungen jeder spezifischen Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Beschreibung der wesentlichen Elemente und Überlegungen, um einen Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet in die Lage zu versetzen, die Erfindung auszuüben und an die meisten, wenn nicht sogar alle, Erfordernisse der Analytdetektion anzupassen. Derartige Ausübung führt zu spezifischen Vorrichtungen und Testkits.

[0108] Die hierin gegebene Offenbarung ermöglicht es einem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet, die vorliegende Erfindung in vielen verschiedenen Formen durchzuführen, um gewünschte Analyt- oder Partikel-detectionsmöglichkeiten zu erreichen und sie an die meisten, wenn nicht sogar alle, Typen von Proben, Analyten, diagnostischen Assay-Formaten und Vorrichtungen anzupassen. Die vorliegende Erfindung ist so vielfältig einsetzbar, dass sie zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten außerhalb eines Labors oder in einem kleinen medizinischen oder analytischen Labor, am Krankenbett, in Notfallaufnahmen, spezialisierten Krankenhauseinrichtungen (wie beispielsweise Herzzentren, Intensivstationen, Unfallstationen und Ähnlichem) oder einem Forschungslabor praktiziert werden kann, wobei es auch möglich ist, viele Proben am Tag zu bearbeiten. Es können verschiedene Typen kostengünstiger Vorrichtungen und Testkits durch die Ausübung der Erfindung in einer oder anderen Form zur Anpassung an einen spezifischen Analyten oder ein bestimmtes diagnostisches Erfordernis hergestellt werden.

[0109] Es existieren verschiedene Ausführungsformen der Erfindung, die, wenn sie in verschiedenen Kombinationen praktiziert werden, die Möglichkeiten der Analytdetektion für eine spezifische Ausführung der Erfindung definieren. Zwei dieser Aspekte sind (1) die Verwendung von spezifischen Partikeltypen, die in hohem Maße messbare und detektierbare Lichtstreu-eigenschaften in einem definierten Assay-Format und Probentyp aufweisen, und (2) die Verwendung spezifischer Partikeltypen mit einer bevorzugten Methode der DLAS-LPD-Beleuchtung und -Detektion. In bestimmten Anwendungen werden ebenso Verfahren zur Brechungsin-dex-Verstärkung und DLASLPD-Video-Kontrast-Verstärkung angewendet.

Bestimmung der geeigneten Lichtstreu-eigenschaften metallartiger Partikel

[0110] Im Folgenden wird hilfreiche Information zum vollständigen Verständnis der beanspruchten Erfindung gegeben. Diese Formeln sind nützlich bei der Durchführung und Optimierung der Erfindung, stellen jedoch hinsichtlich der Ansprüche keinen Stand der Technik dar.

[0111] Bei der Entwicklung neuer Signalerzeugungs- und -Detektionssysteme zum Nachweis von Analyten der vorliegenden Erfindung stellte es sich als nützlich heraus, neue Formeln zu entwickeln, welche die Bewertung verschiedener Lichtstreu-eigenschaften verschiedener Partikeltypen in Form von Fluoreszenz-Parametern ermöglichen. Dies ermöglichte das Studium von ϵ , Qf, Fluoreszenz- und Erregungsspektren, der Abhängigkeit der Intensität des emittierten Lichts von dem Beobachtungswinkel und des Polarisationszustands des emittierten Lichts (diese werden später definiert). Diese neuen Formeln ermöglichen es einem Fachmann auf dem Gebiet, spezifische Partikelparameter, wie beispielsweise Zusammensetzung, Größe und Form, auszuwählen, um gewünschte Lichtstreu-eigenschaft(en) darzustellen, die detektiert und gemessen werden können, wenn sie in diagnostischen Assays oder in irgendwelchen anderen Anwendungen verwendet werden. Die Gleichungen 1 bis 7 stellen Hintergrundinformation dar, so dass der Leser die neuen Formeln der Gleichungen 8 bis 15 verstehen kann. Keine der beschriebenen Formeln oder Lichtstreu-parameter stellt Stand der Technik in Bezug auf die Ansprüche dar.

[0112] Der Anmelder entwickelte ein analytisches Verfahren basierend auf bestimmten Modifikationen der bekannten Lichtstreu-theorien von Rayleigh und Mie zur Bewertung vieler verschiedener Typen von Partikeln mit verschiedenen Parametern der Größe, Form, Zusammensetzung und Homogenität, um zu bestimmen, welche spezifischen Konfigurationen der Partikelparameter zu den gewünschten Lichtstreu-signalen führen, die in analytischen und diagnostischen Assays leicht detektiert und gemessen werden können.

Definitionen der Fluoreszenz-Parameter

[0113] Für fluoreszierende Materialien wird die Fluoreszenz-Intensität durch das Produkt der Anzahl von Pho-

tonen, welche pro Sekunde absorbiert werden, und den Anteil absorbieter Photonen, die als Licht re-emittiert werden (Q_f), wie in Gleichung 1 dargestellt, bestimmt.

$$I_{abs}(\lambda) = 2,303 I_o(\lambda) e(\lambda) C x \quad (1)$$

wobei $I_o(\lambda)$ die Intensität des einfallenden Lichts (Photonen/Sekunde) der Wellenlänge λ ist, $I(\lambda)$ der molare dekadische Extinktions-Koeffizient in Einheiten von $M^{-1}cm^{-1}$ bei der Wellenlänge λ ist, und C die molare Konzentration (in Einheiten von M) des Fluorophoren ist, und x die optische Weglänge ist cm ist.

[0114] Die integrierte Fluoreszenz-Intensität $I(\lambda_f)$ (Summe der Photonen, die pro Sekunde in alle Richtungen emittiert werden) bei der Emissions-Wellenlänge λ_f und der Erregungswellenlänge λ_e (für geringe Fluorophor-Konzentrationen) ergibt sich durch

$$I(\lambda_f) = 2,303 I_o(\lambda_e) Q_f(\lambda_f) e(\lambda_f) C x \quad (2)$$

[0115] Die Bewertung der Eignung einer fluoreszierenden Verbindung in einer Assay-Anwendung mit Hilfe der aufgeführten Parameter stellt ein gut bekanntes Verfahren dar. Die Verwendung von fluoreszierenden Molekülen und Fluoreszenz-Techniken wird durch die Photostabilität des fluoreszierenden Moleküls und die Fähigkeit, spezifische Fluoreszenz-Emissionssignale in Proben mit hohen Niveaus nichtspezifischer Fluoreszenz, Phosphoreszenz und Streulicht nachzuweisen, begrenzt. Zum sensitiven Nachweis von fluoreszierenden Molekülen oder anderen fluoreszierenden Substanzen, wie beispielsweise Partikeln, die aus fluoreszierenden Farbstoffmolekülen bestehen, sind höher entwickelte Vorrichtungen erforderlich.

Definitionen der Lichtstreu-Parameter

Absorptions-Querschnitt (C_{abs}) eines Partikels

[0116] Es wird ein Partikel betrachtet, das mit einem monochromatischen Lichtstrahl der Wellenlänge λ beleuchtet wird. Der Absorptions-Querschnitt C_{abs} des Partikels ist definiert als ein Bereich (üblicherweise in Einheiten von cm^2 oder μm^2 ausgedrückt), welcher das Partikel umgibt, so dass jediges Photon, welches auf diesen Bereich fällt, irreversibel durch das Partikel absorbiert wird. Der Wert von C_{abs} ist abhängig von der Partikelgröße, Zusammensetzung, Form und Homogenität. Er ist ebenso abhängig von der Wellenlänge des Lichts, und ein Plot von C_{abs} vs. die Wellenlänge ergibt das reine Absorptionsprofil des Partikels. Das Profil von C_{abs} vs. die Wellenlänge kann für ein beliebiges sphärisches Partikel mit einer homogenen Zusammensetzung mit Hilfe der Rayleigh- oder Mie-Theorie berechnet werden. In der vorliegenden Terminologie bezieht sich C_{abs} auf die irreversible Lichtabsorption. Die Natur von C_{abs} kann besser in Bezug auf einen späteren Abschnitt, in dem der Extinktions-Querschnitt C_{ext} definiert wird, verstanden werden.

Relativer Absorptions-Querschnitt A_{csr}

[0117] Der relative Absorptions-Querschnitt A_{csr} ist definiert als das Verhältnis des C_{abs} des Partikels geteilt durch den physikalischen Querschnittsbereich des Partikels πa^2 , wobei a der Radius des Partikels ist, d. h., $A_{csr} = C_{abs}/\pi a^2$. A_{csr} liefert ein Maß für die Fähigkeit des Partikels, irreversibel Photonen zu absorbieren, die auf den Bereich fallen, der das Partikel umgibt. A_{csr} kann Werte im Bereich von 0 bis 6 annehmen, in Abhängigkeit der Zusammensetzung, der Form und der Größe des Partikels sowie der Wellenlänge des Lichts. Ein Wert größer als 1 bedeutet, dass ein Partikel über seine physikalischen Dimensionen hinaus reichen kann, um Photonen anzuziehen und zu absorbieren. In der physikalischen Literatur wird A_{csr} als Absorptions-Effizienzfaktor des Partikels bezeichnet. Diese Bezeichnung ist missverständlich, da A_{csr} Werte größer als 1 annehmen kann, was für eine Effizienz nicht charakteristisch ist.

Lichtstreuquerschnitt (C_{sca}) eines Partikels

[0118] Es besteht eine begrenzte Wahrscheinlichkeit, dass ein Lichtphoton, welches durch ein streuendes Partikel absorbiert wird (hiervon werden reversible und irreversible Absorption umfasst) bei derselben Wellenlänge wie das absorbierte Photon re-emittiert wird (quantenmechanischer Gesichtspunkt). Das re-emittierte Photon kann in Richtungen emittiert werden, die sich von der Richtung des einfallenden Photons unterscheiden. Das bedeutet, die einfallenden Photonen werden durch Absorption und Re-Emission gestreut. Der Streuquerschnitt eines Partikels (C_{sca}) bei der Einfallswellenlänge ist definiert als ein Bereich, welcher das Partikel umgibt, so dass jedes Photon, welches auf diesen Bereich fällt, gestreut wird (also aus quantenmechanischer Sicht absorbiert und dann re-emittiert wird). C_{sca} wird üblicherweise in Einheiten von cm^2 oder μm^2 ausgedrückt

und ist abhängig von der Zusammensetzung, der Form, Größe und Homogenität des Partikels sowie der Wellenlänge. Das Lichtstreuprofil C_{sca} versus die Wellenlänge kann für jedes sphärische Partikel homogener Zusammensetzung unter Verwendung der Rayleigh- oder Mie-Theorie berechnet werden.

Verhältnis von C_{sca} zu dem physikalischen oder geometrischen Querschnittsbereich eines Partikels (S_{csr})

[0119] Das Verhältnis des C_{sca} eines Partikels geteilt durch den physikalischen oder geometrischen Querschnittsbereich des Partikels πa^2 (wobei a der sphärische Radius des Partikels ist) liefert ein Maß für die Fähigkeit des Partikels, Photonen aus dem Bereich, der das Partikel umgibt, anzuziehen, zu absorbieren und zu re-emittieren. Das heißt, $S_{\text{csr}} = C_{\text{sca}}/\pi a^2$. In der physikalischen Literatur wird S_{csr} als Streueffizienzfaktor bezeichnet.

[0120] Experimentelle und theoretische Ergebnisse zeigen, dass der Wert von S_{csr} im Bereich von 1 bis 5 oder höher liegen kann, in Abhängigkeit der Partikelzusammensetzung, Form, Homogenität und Größe sowie der Wellenlänge des Lichts. Ein S_{csr} -Wert größer als 1 bedeutet, dass ein Partikel über seine physikalischen Dimensionen hinausreichen kann, um Photonen anziehen, sie zu absorbieren und dann zu re-emittieren. Dies ist möglich, da eine elektrische Interaktion des Partikels mit der elektromagnetischen Welle des Photons bei Abständen, die größer als der Radius des Partikels sind, auftreten kann. Im Allgemeinen nimmt S_{csr} mit der Partikelgröße zu. Bei kleinen Partikeln (weniger als ~40 nm) beträgt S_{csr} weniger als 1, während bei größeren Partikeln S_{csr} größer als 1 ist und bei großen Partikeln einen Wert von 5 erreichen kann.

Extinktions-Querschnitt (C_{ext}) eines Partikels

[0121] Der Extinktions-Querschnitt C_{ext} eines lichtstreuenden Partikels ist definiert als die Summe des Streuquerschnitts (C_{sca}) und des Absorptions-Querschnitts (C_{abs}) des Partikels.

$$C_{\text{ext}} = C_{\text{sca}} + C_{\text{abs}} \quad (3)$$

[0122] C_{ext} wird üblicherweise in cm^2 oder μm^2 ausgedrückt.

[0123] Der Extinktions-Querschnitt C_{ext} eines beliebigen Partikels kann leicht bei einer beliebigen gegebenen Wellenlänge in einem üblichen Absorptions-Spektrometer gemessen werden. I_o (Photonen/Sekunde) sei die Intensität eines Lichtstrahls, der auf eine Suspension von Partikeln fällt, die mit einer Konzentration von N Partikeln/ cm^3 vorliegen. X (cm) ist die Dicke der Lösung und I (Photonen/Sekunde) ist die Menge an Licht, welche die Lösung nach Zurücklegen der Distanz x verlässt. Die Intensitäten werden mit C_{ext} folgendermaßen in Zusammenhang gebracht:

$$I_{(\lambda)} = I_{o(\lambda)} e^{-N C_{\text{ext}(\lambda)} X} \quad (4)$$

[0124] Diese Gleichung zeigt explizit die von λ abhängenden Parameter. Es wird vorausgesetzt, dass der Photodetektor derart positioniert ist, dass er kein Streulicht detektiert.

[0125] Wenn die Partikel reine Lichtstreuer sind, das heißt, keinerlei Licht irreversibel absorbieren, ist $C_{\text{ext}} = C_{\text{sca}}$, und die obige Gleichung kann beschrieben werden als:

$$I = I_o e^{-N C_{\text{sca}} X} \quad (5)$$

$$= I_o e^{-tX} \quad (6)$$

wobei $t = N C_{\text{sca}}$ die Trübung der Suspension ist.

Molarer dekadischer Extinktions-Koeffizient

[0126] Im Bereich der Chemie wird die Stärke, mit der eine Substanz in Lösung bei einer gegebenen Wellenlänge Licht absorbiert, als molare dekadische Extinktion e ausgedrückt, welche die Einheiten $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (M steht für Mole/Liter) besitzt. Dieser Koeffizient wird zu der experimentell bestimmten Absorbanz durch den Ausdruck

$$A_{(\lambda)} = e_{(\lambda)} C X \quad (7)$$

in Beziehung gebracht.

Die vom Anmelder entwickelte Formel zum Studium der Lichtstreu-Parameter eines Partikels

[0127] Im Folgenden werden kurz die angewendeten, vom Anmelder entwickelten theoretischen Methoden dargestellt. Ein Fachmann auf dem Gebiet kann die folgenden Methoden anwenden, um spezifische Partikel-Parameter der Zusammensetzung, Größe, Form und Homogenität zu bewerten, zu modifizieren und einzustellen, um ein oder mehrere gewünschte Lichtstreuereigenschaften herzuleiten, die leicht detektiert und gemessen werden können. Die Betrachtungen müssen im Hinblick auf die Probentypen, die diagnostischen Formate und die Beschränkungen durch die Vorrichtungsmittel vorgenommen werden. Beispielsweise kann in einer Anwendung Multianalyt-Detektion auf einer Festphasenprobe, welche einen hohen nichtspezifischen Lichthintergrund enthält, auf einer Hochdurchsatz-Testvorrichtung durchgeführt werden, während bei einer anderen Anwendung Einzelanalyt-Detektion in Lösung in einer Arztpraxis durchgeführt wird.

[0128] Das Hauptinteresse des Anmelders bestand darin, Partikeltypen zu optimieren, um sie in analytischen und diagnostischen Assays zu verwenden. In den meisten dieser Anwendungen sollten die Partikel mit einer makromolekularen Substanz, wie beispielsweise einem Polymeren, einem Protein oder Ähnlichem, beschichtet sein, um dem Partikel eine geeignete chemische Stabilität in verschiedenen Medien zu verleihen. Dies ist auf dem Gebiet bekannt. Der Anmelder plazierte außerdem Bindungsagenzen, wie beispielsweise Antikörper, Rezeptoren, Peptide und Ähnliches, auf der Oberfläche des Partikels, so dass das beschichtete Partikel in einem analytischen oder diagnostischen Format verwendet werden kann. Bei einigen Anwendungen besitzt das Bindungsagens duale Funktion, derart, dass es das Partikel in Lösung stabilisiert und die spezifische Erkennungs-Bindungskomponente zur Bindung des Analyten bereitstellt. Die Beschichtung der Partikel mit Proteinen, wie beispielsweise Antikörpern, ist auf dem Gebiet bekannt. Jedoch war der Anmelder an der Messung eines oder mehrerer spezifischer Parameter der Lichtstreuesignale verschiedener Typen von Partikeln, welche in einigen Fällen ähnliche Größe und/oder Form und/oder Zusammensetzung aufweisen, interessiert, und es war nicht klar, ob ein derartiges optisches Auflösungsvermögen einer oder mehrerer der spezifischen Lichtstreuereigenschaften beschichteter Partikel möglich ist.

[0129] Der Anmelder bestimmte durch physikalische Experimente und theoretische Modelle, dass die Anwesenheit dünner Beschichtungen aus Bindungsagenzen, nicht optisch absorbierenden Polymeren (im sichtbaren Bereich des Spektrums) oder anderen Materialien auf der Partikelloberfläche die Lichtstreuereigenschaften, die spezifisch für diesen nicht mit diesen Materialien beschichteten Partikeltyp sind, nicht merklich verändert. Unter „dünner Beschichtung“ werden Monoschichten verschiedener Mengen und Zusammensetzungen der obigen Materialien, aufgetragen auf die Oberfläche des Partikels, verstanden.

[0130] Der Anmelder bestimmte, dass ein molarer dekadischer Extinktions-Koeffizient bei jeder beliebigen Wellenlänge für eine Suspension beschichteter oder unbeschichteter Partikel durch Messen ihrer Absorbanz bei dieser Wellenlänge bestimmt werden kann. Der molare dekadische Extinktions-Koeffizient bei dieser Wellenlänge kann dann mit Gleichung (7) und der folgenden Formel berechnet werden, um die Partikelkonzentration von N (Partikel/cm³) in C (M) zu überführen. M bedeutet Mole/Liter.

$$C(M) = 1000 N (\text{Partikel}/\text{cm}^3)/6,03 \times 10^{23} \quad (8)$$

[0131] Der molare dekadische Extinktions-Koeffizient kann durch folgende Formel mit dem Extinktions-Querschnitt C_{ext} (oder vice versa) in Beziehung gebracht werden:

$$e(M^{-1}\text{cm}^{-1}) = [C_{\text{ext}}(\text{cm}^2/\text{Partikel})(6,03 \times 10^{23})]/2,303 \times 1000 \quad (9)$$

$$= 2,63 \times 10^{20} C_{\text{ext}} (\text{cm}^2/\text{Partikel}) \quad (10)$$

oder

$$C_{\text{ext}} (\text{cm}^2/\text{Partikel}) = 2,303 (M^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 1,000/6,03 \times 10^{23} \quad (11)$$

$$= 3,82 \times 10^{-21} e(M^{-1}\text{cm}^{-1}) \quad (12)$$

[0132] Mit der Gleichung (9) oder (10) kann ε aus C_{ext} berechnet werden.

[0133] Wie zuvor beschrieben, ist auf dem Gebiet bekannt, dass bei Partikeln der Extinktions-Querschnitt (C_{ext}) gleich der Summe des Streuquerschnitts (C_{sca}) und des Absorptions-Querschnitts (C_{abs}) ist. Der Extinktions-Koeffizient e spiegelt den Verlust von Photonen aus dem einfallenden Strahl durch irreversible Absorption

sowie durch Streuung (Absorption und Re-Emission) wider. Der Anmelder bestimmte, dass der molare dekadische Extinktions-Koeffizient eines Partikels, der experimentell bestimmt oder aus dem Extinktions-Querschnitt berechnet wird, verwendet werden kann, um das Absorptionsvermögen eines Partikels, beispielsweise mit dem eines Fluorophors, wie später gezeigt, zu vergleichen.

Lichtstreueffizienz (S_{eff})

[0134] Der Anmelder bestimmte, dass die Lichtstreueffizienz S_{eff} für ein beschichtetes oder unbeschichtetes Partikel, analog zur Fluoreszenz-Effizienz Q_f , als Anteil der durch ein Partikel absorbierten Photonen (reversibel plus irreversible Absorption), die als Streulicht re-emittiert werden, definiert werden kann. Mathematisch definierte der Anmelder die Streueffizienz durch die Formel

$$\begin{aligned} S_{\text{eff}} &= C_{\text{sca}}/C_{\text{ext}} \\ &= C_{\text{sca}}/(C_{\text{sca}} + C_{\text{abs}}) \end{aligned} \quad (13)$$

[0135] Bei Partikeln, die reine Lichtstreuer sind, dass heißt, Partikel, die aus einem Material bestehen, welches Photonen nicht irreversibel absorbiert, sondern ausschließlich Photonen absorbiert und re-emittiert, ist C_{abs} gleich Null, und S_{eff} ist gleich 1. Kleine Polystyrolpartikel verhalten sich wie reine Lichtstreuer im sichtbaren Bereich des Spektrums, und S_{eff} ist für diese Partikel 1. Bei Partikeln, die aus Materialien bestehen, die reversibel und irreversibel Photonen absorbieren, ist S_{eff} kleiner als 1. Goldpartikel verhalten sich wie der letzte Typ im sichtbaren Bereich des Spektrums.

Durch ein Partikel gestreute Lichtintensität

[0136] Der Anmelder bestimmte, dass die Lichtintensität, die von einem beschichteten oder unbeschichteten Partikel gestreut wird, als Produkt der Anzahl an Photonen, welche pro Sekunde absorbiert werden (reversibel und irreversibel) und des Anteils der absorbierten Photonen, die re-emittiert werden (quantenmechanischer Gesichtspunkt), bestimmt werden kann. Messungen der Streulichtintensität werden üblicherweise in verdünnten Lösungen durchgeführt, wobei die Menge des absorbierten Lichts, I_{abs} (pro Sekunde absorbierte Photonen) gegeben ist durch

$$I_{\text{abs}} = I_o 2,303 \epsilon Cx \quad (14)$$

[0137] I_o ist die Intensität des einfallenden Lichts (Photonen/Sekunde), ϵ ist der molare dekadische Extinktions-Koeffizient der Partikel, ausgedrückt in $M^{-1}cm^{-1}$, C ist die molare Konzentration der Partikel, und x ist die optische Weglänge in cm.

[0138] Der Anmelder stellte des Weiteren fest, dass die gesamte Streulichtintensität I_s , die Intensität integriert über alle Lichtstreuwinkel, dann durch folgende Gleichung gegeben ist:

$$I_{s(\lambda)} = 2,303 I_{o(\lambda)} S_{\text{eff}(\lambda)} e(\lambda) (C)(x) \quad (15)$$

wobei $I_{o(\lambda)}$ die Intensität des einfallenden Lichts ist. Diese Gleichung ist vergleichbar mit der Gleichung (2) für ein Fluorophor.

[0139] Wenn die Ausdrücke für ϵ und S_{eff} als C_{sca} und C_{ext} in die obige Gleichung eingesetzt werden, zeigen die Ergebnisse, dass die Streulichtintensität direkt proportional zu der Größenordnung (Magnitude) des Streuquerschnitts (C_{sca}) ist und durch diese bestimmt werden kann. Dies bedeutet, dass die relativen Streuintensitäten verschiedener Partikel aus ihren Streuquerschnitten vorhergesagt werden können.

Spezifische Lichtstreuereigenschaften von Partikeln

[0140] Im Folgenden sind kurz einige der wichtigsten Lichtstreuereigenschaften zusammengefasst, die verwendet werden können, um Analyten in verschiedenen Probentypen unter Anwendung einer Vielzahl verschiedener Assay-Formate zu detektieren. Zu den gemessenen Lichtstreuereigenschaften, die nachgewiesen werden, zählen eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften: die Intensität, die Wellenlänge, die Farbe, die Polarisation, die Winkelabhängigkeit und die RIFSLIW (individuelle Rotationsfluktuationen in der Streulichtintensität und/oder Wellenlänge) des Streulichts.

[0141] Beschichtete und unbeschichtete metallartige Partikel besitzen ähnliche Lichtstreuereigenschaften, und

beide weisen bessere Lichtstreuereigenschaften im Vergleich zu nicht-metallartigen Partikeln auf. Zudem stellt sich heraus, dass es relativ einfach ist, die Typen der Lichtstreuereigenschaften in metallartigen Partikeln einzustellen, indem – in der einen oder anderen Form – die Größe, Form, Zusammensetzung und Homogenität derart variiert wird, dass die spezifischen Lichtstreuereigenschaften der metallartigen Partikel in verschiedenen Probenarten gemessen werden können.

[0142] Metallartige Partikel können mit extremer Sensitivität detektiert werden. Die einzelnen Partikel werden leicht bis zur Einzel-Partikel-Grenze unter Anwendung von DLASLPD-Beleuchtungs- und Detektionsverfahren mit kostengünstigen und leicht handhabbaren Vorrichtungen nachgewiesen.

[0143] Ein oder mehrere Typen metallartiger Partikel werden in einer Probe durch Messen ihrer Farbe unter Weißlicht- oder ähnlicher Breitbandbestrahlung mit Beleuchtungs- und Detektionsverfahren vom DLAS-LPD-Typ nachgewiesen. Beispielsweise können etwa sphärische Partikel aus Gold (beispielsweise mit einem Bindungssagens beschichtet, an einen Analyten gebunden, in die Lösung freigesetzt oder an eine Festphase gebunden) mit 40, 60 und 80 nm Durchmesser und ein Silberpartikel mit ungefähr 30 nm Durchmesser leicht in einer Probe detektiert und quantifiziert werden, indem jeder Partikeltyp durch seine jeweilige einzigartige Streulichtfarbe identifiziert wird und/oder die Intensität gemessen wird. Dies kann auf einer Festphase, wie beispielsweise einer Mikrotiter-Kavität, einem Mikroarray-Chip oder in Lösung, erfolgen. Die Messung in Lösung ist komplizierter, da die Partikel nicht – wie im Festphasen-Format – räumlich aufgelöst werden. Beispielsweise können verschiedene Partikeltypen in Lösung nachgewiesen werden, indem die Lösung durch eine Reihe von Detektoren geleitet wird, von denen jeder derart eingestellt ist, dass er eine andere Wellenlänge oder einen anderen Farbbereich des Spektrums misst, und die Intensität bei diesen verschiedenen Wellenlängen gemessen wird. Alternativ kann eine Reihe verschiedener Beleuchtungswellenlängen und/oder Detektionswellenlängen mit oder ohne Durchflusssystem verwendet werden, um die verschiedenen Partikeltypen zu detektieren.

[0144] Bei analytischen Festphasen-Anwendungen ist ein sehr großer Konzentrationsbereich von metallartigen Partikeln detektierbar, indem – in Abhängigkeit der Konzentration der Partikel – vom Partikelzählen zu integrierten Lichtintensitätsmessungen gewechselt wird. Die Partikel können von sehr geringen zu sehr hohen Partikeldichten pro Einheitsbereich detektiert werden.

[0145] In anderen Assay-Anwendungen können die Partikel, die an ein festes Substrat, wie beispielsweise ein Bead, eine Oberfläche, wie beispielsweise den Boden einer Kavität, oder Ähnliches gebunden sind, in die Lösung freigesetzt werden, indem der pH-Wert, die Ionenstärke oder andere Flüssigkeitseigenschaften eingestellt werden. Es können Flüssigkeiten mit höheren Brechungsindizes zugegeben werden und die Lichtstreuereigenschaften des Partikels in Lösung gemessen werden. Gleichfalls können Partikel in Lösung vor der Messung der Lichtstreuereigenschaften durch verschiedene Mittel zu einem kleinen Volumen oder Bereich konzentriert werden. Wiederum können Flüssigkeiten mit höheren Brechungsindizes vor der Messung zugegeben werden.

[0146] Sowohl theoretische Berechnungen als auch physikalische Experimente weisen darauf hin, dass bei sphärischen Partikeln jeglicher Zusammensetzung bis zu etwa 120 nm Durchmesser und etwas größer ein großer Anteil des von dem Partikel gestreuten Lichts außerhalb der Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts ausgestrahlt wird (siehe [Fig. 8](#)). Der Anmelder bestimmte, dass die Detektion und die Messung des Streulichts mit Winkeln außerhalb der Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts eine signifikante Abnahme des nicht-spezifischen Streulichts von dem Lichtstrahl und anderer lichtstreuender Komponenten und detektierte Objekte liefert. Dadurch wird das Verhältnis von spezifischem Lichtstreuesignal zu nicht-spezifischer Lichtstreuung bei den meisten Proben signifikant erhöht.

[0147] Die Intensität des Lichts, das durch ein Partikel in verschiedene Richtungen gestreut wird, und der Polarisationszustand des Streulichts sind abhängig von der Wellenlänge und dem Polarisationszustand des einfallenden Lichts und von der Partikelgröße, -Form und -Homogenität. Im Folgenden werden einige der wichtigsten Tatsachen in Bezug auf die Intensität und den Polarisationszustand von Licht, welches durch bestimmte Partikeltypen in verschiedene Richtungen emittiert wird, zusammenfasst.

[0148] Kleinere Partikel mit sphärischer Form (wobei kleiner etwa 1/20 oder weniger im Vergleich zu der Wellenlänge des Lichts ist) verhalten sich wie isotrope Dipol-Streuer oder -Emmitter, das heißt, das Licht ist hoch polarisiert. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu fluoreszierenden Molekülen, die sich gewöhnlich wie lineare Dipol-Emmitter verhalten. Beispielsweise ist bei derartigen Partikeln, wenn sie mit unpolarisiertem Licht angestrahlt werden, das in die Richtung $\phi = 0, \theta = 90$ gestreutes Licht (siehe [Fig. 20](#)) zu hundert Prozent linear polarisiert ($P = 1$). Diese Eigenschaft ermöglicht eine spezifischere und sensitivere Detektion von Analyten

durch Messung der Lichtstreuereigenschaften im Vergleich zu fluoreszierenden Molekülen in vielen verschiedenen Probentypen.

[0149] Für größere Partikel ($> 1/20$ der Wellenlänge des Lichts) gibt es bestimmte Bereiche der Partikelgröße, in denen der Polarisationsgrad des Lichts P abnimmt und mit zunehmender Größe von der Wellenlänge abhängig wird. Wenn die Partikel sehr groß werden, nähert sich der Polarisationsgrad für die Richtung $\theta = 0, \omega = 90^\circ$. Anscheinend gibt es bestimmte Größenbereiche, in denen die Polarisationsänderungen am größten sind, das heißt, die Steigung des Polarisationsgrads in Abhängigkeit der Größe ein Maximum erreicht. Diese Bereiche, in denen sich die Steigung ändert, werden in bestimmten analytischen Anwendungen, wie beispielsweise bei Assays vom Agglutinationstyp oder Aggregationstyp, verwendet, um ein oder mehrere Analyten in einer Probe zu detektieren und zu messen.

[0150] Bei größeren sphärischen Partikeln in bestimmten Größenbereichen, beispielsweise von ungefähr 200 nm bis ungefähr 1,2 μm Durchmesser, oszilliert die Lichtintensität (bei monochromatischem einfallenden Licht) zwischen relativen Werten von 1 bis 0, wenn sich der Winkel ϕ von 90° bis -90° bei $\theta = 0$ ändert; siehe [Fig. 20](#). Das heißt, bei Beobachtung des Streulichts in horizontaler Ebene ($\theta = 0$) oszilliert die Lichtstärke von hell zu dunkel, wenn sich das Auge von $\theta = 90^\circ$ bis zu $\theta = -90^\circ$ bewegt. Bei der Bestrahlung mit weißem Licht ändert das Licht seine Farbe, wenn das Auge von $\theta = 90^\circ$ bis $\theta = -90^\circ$ bewegt wird. Das heißt, die Partikel verhalten sich wie Beugungsgitter. Derartige Lichtstreuereigenschaften sind sehr nützlich, um ein oder mehrere Analyten in vielen verschiedenen Probentypen spezifischer und mit höherer Sensitivität nachzuweisen.

[0151] Kleine nicht sphärische Partikel verhalten sich in etwa wie lineare Dipol-Streuer, wobei die Absorptions- und Emissionsmomente entlang der Längsachse des Partikels liegen. Der Anmelder machte folgende Beobachtungen unter DLASLPD-Beleuchtungs- und Detektionsbedingungen in einem gewöhnlichen Lichtmikroskop. Wenn das Beleuchtungslicht linear polarisiert ist, flimmern nicht-sphärische Partikel, wenn sie rotieren. Die Partikel sind am intensivsten, wenn ihre Orientierung derart ist, dass ihre Längsachse in Richtung der Polarisation orientiert ist, und erreicht ein Minimum, wenn das Moment senkrecht zu dieser Richtung ist. Im Gegensatz dazu flimmern kleine sphärische Partikel nicht, wenn sie mit polarisiertem Licht bestrahlt werden. Bei nicht-sphärischen Partikeln bestimmter Zusammensetzungen ändert sich die Farbe des Streulichts (mit Weißlichtbeleuchtung) mit dem Grad der Asymmetrie. Wenn die Asymmetrie erhöht ist, verschiebt sich die Farbe in Richtung längerer Wellenlängen. Beispielsweise wurde beobachtet, dass asymmetrische Silberpartikel ihre Farbe ändern, wenn die Partikel in Lösung rotiert werden, wenn mit einem gewöhnlichen Lichtmikroskop unter DLASLPD-ähnlichen Bedingungen beobachtet wird. Diese vom Anmelder als "RIFSLIW" bezeichnete Eigenschaft (individuelle Rotationsfluktuationen der Streulichtintensität und/oder Wellenlängen) wird in vielen verschiedenen Aspekten der vorliegenden Erfindung ausgenutzt, um spezifischer und mit höherer Sensitivität ein oder mehrere Analyten oder Partikel in einer Probe nachzuweisen oder zu messen.

[0152] Der Anmelder stellte außerdem fest, dass bestimmte gemischte Zusammensetzungen von Partikeln aus metallartigen Materialien und aus nicht-metallartigen und metallartigen Materialien zusätzliche Lichtstreuereigenschaften und/oder zusätzliche physikalische Eigenschaften bereitstellen. Diese Eigenschaften umfassen die Fähigkeit, die Partikel durch Anlegen eines EMF-Feldes zu manipulieren. Diese Eigenschaft der Partikel kann in der Ausführung einer oder mehrerer Ausgestaltungen dieser Erfindung auf verschiedene Weise ausgenutzt werden. Im Weiteren werden die Partikel-abhängigen Lichtstreuereigenschaften und die Ausnutzung dieser Eigenschaften zur Detektion eines oder mehrerer Analyten in einer Probe weiter veranschaulichend diskutiert.

[0153] Zunächst wird die vorliegende Erfindung im Hinblick auf die Lichtstreuereigenschaften von homogenen sphärischen Partikeln verschiedener Größen und Zusammensetzungen beschrieben. Jedoch sind die grundlegenden Aspekte der Erfindung ebenso auf nicht-sphärische Partikel, wie von einem Fachmann auf dem Gebiet festgestellt werden kann, anwendbar. Des Weiteren ist es hilfreich, die vorliegende Erfindung im Hinblick auf die Wellenlängen des einfallenden Lichts im Bereich von 300 nm bis 700 nm zu beschreiben. Jedoch sind die grundlegenden Aspekte der Erfindung ebenso auf elektromagnetische Strahlung im Wesentlichen aller Wellenlängen anwendbar. Unter "Licht" werden ultraviolettes Licht, sichtbares Licht, Licht nahe dem Infrarotbereich, infrarotes Licht und Mikrowellen-Frequenzen elektromagnetischer Strahlung verstanden. Für die Beschreibung der vorliegenden Erfindung ist es hilfreich, Polystyrolpartikel zu verwenden, um nicht-metallartige Partikel verschiedener Typen darzustellen. Zu weiteren nicht-metallartigen Partikeltypen zählen Partikel aus Glas und vielen anderen polymeren Verbindungen. Derartige Partikel besitzen in etwa ähnliche Lichtstreuereigenschaften wie Polystyrolpartikel.

[0154] Die relativen Streulichtintensitäten, die von verschiedenen Partikeln erhalten werden, die mit der glei-

chen Intensität und den gleichen Wellenlängen des einfallenden Lichts bestrahlt werden, können direkt durch Vergleich ihrer C_{sca} -Werte verglichen werden. Je höher der C_{sca} -Wert, desto größer ist die Streukraft (Lichtstreuintensität) des Partikels. In den folgenden Abschnitten wird der Ausdruck "Streukraft" verwendet, um C_{sca} oder die Streulichtintensität zu bezeichnen.

[0155] Es wurden die Lichtstreukräfte kleiner sphärischer Partikel identischer Größe und verschiedener Zusammensetzung in Wasser für Einfallswellenlängen über einen Wellenlängenbereich von 300 bis 700 Nanometern (nm) berechnet. Bei diesen Berechnungen wurden die Werte der Brechungsindices vs. Wellenlänge, wie sie in Standardhandbüchern für verschiedene Grundstoffe im Vakuum aufgelistet sind, verwendet.

[0156] Bei einigen Partikelzusammensetzungen nahm die Lichtstreuksraft kontinuierlich von 300 bis 700 nm ab, während bei anderen Zusammensetzungen das Profil der Streukraft vs. Wellenlänge Peaks oder Banden zeigte. Wenn diese Peaks oder Banden im sichtbaren Bereich des Spektrums liegen, ist das durch die Partikel gestreute Licht farbig, wenn das einfallende Licht weiß ist.

[0157] Zur Veranschaulichung werden in einigen der folgenden Tabellen verschiedene Vergleiche der Lichtstreu-eigenschaften für verschiedene Partikeltypen mit 10 nm Durchmesser gezeigt. Die allgemeinen Trends bezüglich der relativen Größenordnung (Magnitude) und Wellenlängen des Streulichts, welcher für diese Partikel mit 10 nm Durchmesser gezeigt wird, sind im Wesentlichen die Gleichen bei größeren Partikeln von bis zu etwa 100 nm. Beispielsweise wurden die Berechnungen von Tabelle 1 mit Partikeln von 10 nm Durchmesser durchgeführt. Jedoch ändern bei kleinen Partikeln (weniger als etwa 1/20 der Wellenlänge des Lichts) die Profile der Lichtstreuintensität vs. Wellenlänge nicht die Form, wenn die Partikelgröße erhöht wird, solange man im Bereich der kleinen Partikel bleibt. Der offensichtliche Effekt der Erhöhung der Partikelgröße ist der Anstieg der Amplitude der Profilgraphik. Auf dem Gebiet der theoretischen Physik und Lichtstreuung ist bestens bekannt, dass die Streukraft kleiner Partikel mit der sechsten Potenz des Radius ansteigt. Ein Fachmann auf dem Gebiet kann die relative Streukraft jedes beliebigen kleinen Partikels mit dem Durchmesser d aus dem Wert errechnen, der für das Partikel mit 10 nm Durchmesser erhalten wurde, indem die Lichtstreuksraft des 10-nm-Partikels mit $(d/10)^6$ multipliziert wird, wobei d in nm angegeben wird. Dieses Verfahren kann von einem Fachmann auf dem Gebiet angewendet werden, um die Eignung bestimmter Partikelgrößen in verschiedenen diagnostischen Assays zu bestimmen, in denen die Intensität des Streulichts eines Partikels verwendet wird, um die Anwesenheit eines Analyten nachzuweisen.

[0158] Bei diesseitigen theoretischen Überlegungen und physikalischen Experimenten stellte sich überraschenderweise heraus, dass diese allgemeine Beziehung ebenso auf größere Partikel außerhalb der Rayleigh-Grenze, das heißt, auf Partikel mit Durchmessern von über etwa 30 nm, anwendbar ist.

[0159] In Tabelle 1 sind die berechneten C_{sca} -Werte (Lichtstreuksraft) und ihre jeweiligen ungefähren Wellenlängen im sichtbaren Bereich, in dem die Partikel das Licht am intensivsten streuen, dargestellt. Die Daten von Tabelle 1 zeigen, dass metallartige Partikel sehr viel kraftvollere Lichtstreuer sind als beispielsweise Polystyrolpartikel.

[0160] **Fig. 26** zeigt ausgewählte berechnete Profile der Lichtstreuintensität vs. Wellenlänge für bestimmte Typen sphärischer 10-nm-Partikel. Kleine Partikel, bestehend aus Gold oder Silber, weisen sehr starke Streuungs- und Absorptions-Peaks im sichtbaren Wellenlängenbereich auf, während Kupferpartikel einen kleinen Streuungs- und Absorptions-Peak in diesem Bereich aufweisen. Die Streulichtmaxima von Gold und Silber treten bei ungefähr 530 nm bzw. 380 nm auf. Auch bei Einfallswellenlängen, die weit entfernt von den Lichtstreu-maxima liegen, ist die Lichtstreuksraft von Gold, Silber und anderen metallartigen Partikeln viel größer als die von nicht-metallartigen Polystyrolpartikeln ähnlicher Größe.

[0161] In Tabelle 2 sind die Werte für die berechnete Lichtstreuksraft (C_{sca} -Werte) für metallartige Partikel und Polystyrolpartikel (nicht-metallartig) von 10 nm Durchmesser dargestellt, wenn die Einfalls- (Beleuchtungs-) Wellenlänge auf sehr viel längere Wellenlängen verschoben wird. In vielen verschiedenen analytischen und diagnostischen Assays ist es bevorzugt, mit längeren Wellenlängen zu arbeiten. Aus Tabelle 2 geht hervor, dass ein Fachmann auf dem Gebiet Beleuchtungswellenlängen mit sehr viel längeren Wellenlängen verwenden kann, und dass die metallartigen Partikel für Anwendungen in analytischen oder diagnostischen Methoden sehr viel besser geeignet sind als nicht-metallartige Partikel, wie beispielsweise Polystyrolpartikel. Beispielsweise ist bei einer Wellenlänge des einfallenden Lichts von 700 nm – einer Wellenlänge, die weit entfernt von dem Lichtstreumaximum bei 530 nm für Goldpartikel liegt – die Intensität des Streulichts des Goldpartikels ungefähr 220-fach höher als die eines Polystyrolpartikels ähnlicher Größe und Form. Experimentell wurde beobachtet, dass über den sichtbaren Wellenlängenbereich des Spektrums tatsächlich die Lichtstreuksraft (Intensi-

tät) metallartiger Partikel sehr viel höher ist als die nicht-metallartiger Partikel.

[0162] Diese Ergebnisse zeigen, dass metallartige Partikel sehr viel höhere Lichtstreuikraft besitzen als nicht-metallartige Partikel vergleichbarer Größe und Form und als analytische und diagnostische „Tracer“ in den meisten Bereichen, in denen die Anwendung eines Signalerzeugungs- und -detektionssystems wünschenswert ist, vielseitig einsetzbar sind. Beispielsweise sind sie in einem beliebigen Assay, der derart konstruiert ist, dass die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Analytsubstanz durch Detektieren des Streulichts von den Partikeln nachgewiesen wird, geeignet.

Tabelle 1

BERECHNETE WERTE FÜR SPHÄRISCHE ZEHN-NANOMETER-PARTIKEL VERSCHIEDENER ZUSAMMENSETZUNGEN IN WASSER

Partikel-zusammensetzung	Wellenlänge (nm) ^(a)	Maximum C _{sca} (cm ²)	Relativer C _{sca} -Wert
Polystyrol	300	1,32 x 10 ⁻¹⁷	1
Selen	300	8,6 x 10 ⁻¹⁶	~ 65
Aluminium	300	1,95 x 10 ⁻¹⁵	~ 148
Kupfer	300	7,8 x 10 ⁻¹⁶	~ 59
Gold	530 ^(b)	1,24 x 10 ⁻¹⁵	~ 94
Silber	380 ^(b)	1,1 x 10 ⁻¹⁴	~ 833

(a) Verwendete Einfallswellenlänge, bei der ein Maximumwert im sichtbaren Bereich des EM-Spektrums (300–700 nm) auftritt.

(b) Einige Partikel zeigen Peaks in bestimmten Bereichen; siehe [Fig. 27](#).

Tabelle 2

BERECHNETE WERTE FÜR (C_{sca}) BEI 700-NM-BESTRAHLUNG FÜR SPHÄRISCHE 10-NM-PARTIKEL VERSCHIEDENER ZUSAMMENSETZUNGEN IN WASSER

Partikel-zusammensetzung	Einfallende Wellenlänge (nm)	Maximum C _{sca} (cm ²)	Relativer C _{sca} -Wert
Polystyrol	700	~ 3,1 x 10 ⁻¹⁹	1
Selen	700	~ 1,4 x 10 ⁻¹⁷	~ 45
Aluminium	700	1,4 x 10 ⁻¹⁷	~ 45
Kupfer	700	4,7 x 10 ⁻¹⁷	~ 152
Gold	700	7 x 10 ⁻¹⁷	~ 225

[0163] Tabelle 3 zeigt einen Vergleich des molaren dekadischen Extinktions-Koeffizienten (ϵ), der für sphärische Goldpartikel verschiedener Durchmesser berechnet und experimentell bestimmt wurde.

[0164] Es wurden die ϵ -Werte bei den Wellenlängen der maximalen Werte unter Verwendung der zuvor beschriebenen Formeln berechnet. Die gemessenen ϵ -Werte wurden durch Messen der optischen Absorption in einem Standard-Spektrophotometer bei der berechneten Wellenlänge der maximalen Absorption erhalten. Die Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentell bestimmten ϵ -Werten ist, wenn auch nicht perfekt, sehr gut. Die etwa zweifache Abweichung, die zwischen den beobachteten und berechneten Ergebnissen festgestellt wird, könnte die Ungenauigkeiten bei den angegebenen Durchmessern der Goldpartikel widerspiegeln.

Details der experimentellen Verfahren sind in dem Bespielabschnitt angegeben.

Tabelle 3

BERECHNETER UND GEMESSENER MOLARER DEKADISCHER EXTINKTIONS-KOEFFIZIENT (S) UND WELLENLÄNGEN BEI MAXIMALER ABSORPTION FÜR GOLDPARTIKEL VERSCHIEDENER GRÖSSE IN WASSER

	<u>Berechnet</u> ^(b)		<u>Gemessen</u> ^(b)	
Partikel-Durchmesser	$e \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	Wellenlänge bei maximaler Absorption	$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	Wellenlänge bei maximaler Absorption
10 nm	$1,8 \times 10^8$	~ 530 nm	$2,3 \times 10^8$	~ 525 nm
16 nm	9×10^8	~ 530 nm	$5,2 \times 10^8$	~ 522 nm
20 nm	$1,8 \times 10^9$	~ 528 nm	$1,2 \times 10^9$	~ 525 nm
40 nm	$1,6 \times 10^{10}$	~ 532 nm	$8,5 \times 10^9$	~ 528 nm
60 nm	$5,6 \times 10^{10}$	~ 542 nm	$2,6 \times 10^{10}$	~ 547 nm
80 nm	$1,1 \times 10^{11}$	~ 550 nm	$5,8 \times 10^{10}$	~ 555 nm
100 nm	$1,6 \times 10^{11}$	~ 574 nm	$9,2 \times 10^{10}$	~ 575 nm

(a) Bezeichnet den exakten Durchmesser des Partikels zur Berechnung der Werte.

(b) Bezeichnet den ungefähren Durchmesser von Goldpartikeln, die für die Messungen verwendet wurden. Die tatsächlichen Durchmesser lagen leicht über oder leicht unter den angegebenen Durchmessern.

[0165] Bei sichtbaren Wellenlängen des einfallenden Lichts ist die Lichtstreuikraft (d. h., C_{sca}) von metallartigen Partikeln sehr viel größer als die eines vergleichbaren nicht-metallartigen Partikels, wie beispielsweise Polystyrol. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den Lichtstreueneigenschaften metallartiger und nicht-metallartiger Partikel ist, dass bei metallartigen Partikeln das Profil der Streulichtintensität versus Wellenlänge des einfallenden Lichts für metallartige Partikel der gleichen Zusammensetzung aber variierender Größe sehr unterschiedlich sein kann. Dies steht im Gegensatz zu nicht-metallartigen Partikeln, wo im Größenbereich von ungefähr 10 nm Durchmesser bis einigen hundert nm Durchmesser das Profil im Wesentlichen das gleiche ist. Diese Unterschiede sind extrem nützlich, um metallartige Partikel in verschiedenen Proben spezifischer und mit höherer Sensitivität nachzuweisen. Die einfallende Wellenlänge, bei der eine maximale Lichtstreuung auftritt (C_{sca}), ist für Partikel verschiedener Durchmesser aus Silber, Gold, Kupfer und Aluminium in Tabelle 4 wiedergegeben.

[0166] [Fig. 16](#) zeigt das experimentell bestimmte Profil der Streulichtintensität vs. Wellenlänge des einfallenden Lichts für etwa sphärische Goldpartikel mit 100 nm Durchmesser, die entweder mit einer Polyethylenverbindung (MW = 20.000) beschichtet sind oder ohne die Polyethylenverbindung vorliegen. Die Daten zeigen, dass die Wellenlängen-abhängige Eigenschaft der Lichtstreuintensität bei beschichteten und unbeschichteten Goldpartikeln von 100 nm Durchmesser sehr ähnlich ist.

[0167] [Fig. 27](#) zeigt die berechneten Profile der Streulichtintensität versus Wellenlängenspektrum des einfallenden Lichts für sphärische Goldpartikel verschiedener Durchmesser. Die Peak-Wellenlänge der Streulichtintensität verschiebt sich mit zunehmender Größe der Goldpartikel auf längere Wellenlängen. Diese Lichtstreueneigenschaften für beschichtete und unbeschichtete Goldpartikel von 40, 60, 80 und 100 nm Durchmesser wurden direkt beobachtet, und sie erschienen als grüne, gelbgrüne, orangefarbene und orange-rote Partikel, wenn sie mit einer Weißlichtquelle in Lösung oder in einem Lichtmikroskop unter Anwendung von DLASLPD-Beleuchtungsverfahren bestrahlt wurden. Kleine sphärische Silberpartikel erschienen blau. Somit können metallartige Partikel, die mit verschiedenen Typen von Bindungsagenzien beschichtet sind, in verschiedenen Weisen in analytischen Assays verwendet werden. Die Farbeigenschaften des Streulichts der verschiedenen Typen metallartiger Partikel ermöglicht eine visuelle Multi-Analyt-Detektion. Beispielsweise können sphärische Goldpartikel von 40, 60, 80 und 100 nm Durchmesser und Silberpartikel von 20 nm Durchmesser, welche je-

weils mit verschiedenen Bindungsagenzien beschichtet sind, in der gleichen Probe verwendet werden, um fünf verschiedene Analyten in der Probe nachzuweisen. In einem Format können fünf verschiedene Typen von Zelloberflächen-Rezeptoren oder andere Oberflächenkomponenten, die auf der Zelloberfläche vorliegen, detektiert und visualisiert werden. Dies wird durch die Detektion der Streulichtfarbe der verschiedenen beschichteten Partikel, die an die Oberfläche der Zelle gebunden sind, unter DLASLPD-Bedingungen mit einem Lichtmikroskop unter Weißlicht-Bestrahlung ermöglicht. Die Anzahl und Typen von Analyten werden durch die Anzahl detekтирter grüner, gelber, orangefarbener, roter und blauer Partikel identifiziert. Ebenso können Chromosomenanalysen und genetische Analysen, wie beispielsweise In-situ-Hybridisierung und Ähnliches, unter Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens durchgeführt werden, wobei die verschiedenen Typen metallartiger Partikel als "Chromosomenfarben" verwendet werden, um verschiedene Typen von Nukleinsäure-Sequenzen, Nukleinsäure-Bindungsproteinen und anderen ähnlichen Analyten in der Probe durch die Farbe des Streulichts der verschiedenen Typen metallartiger Partikel zu identifizieren. Diese Beispiele stellen lediglich illustrative Beispiele dar, und ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass die Farbe des Streulichts der verschiedenen Typen metallartiger Partikel in vielen verschiedenen Assay-Formaten zur Einzel- oder Multi-Analyt-Detektion verwendet werden kann.

[0168] Somit stellt das Einstellen der Größe bestimmter Typen sphärischer metallartiger Partikel ein geeignetes Verfahren dar, um ihre Detektierbarkeit in verschiedenen Proben unter Verwendung der Farbe und/oder anderer Eigenschaften ihres Streulichts zu erhöhen. Durch Verwendung einer Weißlichtquelle sind zwei oder mehr verschiedene Partikeltypen leicht in sehr geringen Konzentrationen detektierbar.

[0169] Tabelle 5 zeigt, dass ein geringer Anstieg der Goldpartikelgröße zu einem großen Anstieg der Lichtstreuikraft (der C_{sca}) führt. Die Einfallswellenlänge für den maximalen C_{sca} -Wert erhöht sich signifikant mit der Partikelgröße, und die Größenordnung (Magnitude) der Streulichtintensität ist signifikant erhöht. Beispielsweise beträgt die einfallende Wellenlänge für einen maximalen C_{sca} -Wert ungefähr 535 nm, 575 nm und 635 nm für Goldpartikel von 40 nm, 100 nm bzw. 150 nm Durchmesser. Bei Bestrahlung mit weißem Licht streuen die 40-nm-Goldpartikel stark und bevorzugt Wellenlängen von ungefähr 535 nm, und die Partikel erscheinen grün, während 100-nm-Partikel orange-rot erscheinen und 140-nm-Partikel eine rote Farbe zeigen. Dies zeigt außerdem, dass bei Bestrahlung mit weißem Licht bestimmte metallartige Partikel identischer Zusammensetzung aber verschiedener Größe in der gleichen Probe durch die Farbe des Streulichts voneinander unterschieden werden können. Die relative Größenordnung (Magnitude) der Streulichtintensität kann gemessen werden und zusammen mit der Farb- oder Wellenlängen-Abhängigkeit des Streulichts verwendet werden, um verschiedene Partikel in der gleichen Probe, auch in Proben mit hohem nicht-spezifischem Lichthintergrund, spezifischer und mit höherer Sensitivität nachzuweisen.

[0170] Im Gegensatz dazu weisen nicht-metallartige Partikel diese spezifischen Lichtstreueigenschaften nicht auf, und es ist somit in den meisten Typen von Probenmedien schwieriger, nicht-metallartige Partikel nachzuweisen als metallartige Partikel.

Tabelle 4

BERECHNETE EINFALLENDE SICHTBARE WELLENLÄNGE, BEI DER EIN MAXIMALER C_{sca} -WERT IN
WASSER BEOBACHTET WIRD

Partikelmaterial	Partikeldurchmesser	Wellenlänge des einfallenden Lichts, bei der ein maximaler C_{sca} -Wert auftritt
Silber	10 nm	~ 380 nm
	40 nm	~ 400 nm
	100 nm	~ 475 nm
Gold	10 nm	~ 528 nm
	40 nm	~ 535 nm
	100 nm	~ 575 nm
	140 nm	~ 635 nm
Kupfer	100 nm	~ 610 nm
	150 nm	~ 644 nm
Aluminium	100 nm	~ 377 nm
Selen	130 nm	~ 660 nm
	200 nm	~ 702 nm

Tabelle 5

BERECHNETE WERTE FÜR DIE LICHTSTREUEIGENSCHAFTEN SPHÄRISCHER GOLDPARTIKEL VER- SCHIEDENER GRÖSSEN

Partikel-Durchmesser (nm)	Wellenlänge bei maximalem C_{sca} (nm)	Maximaler C_{sca} -Wert (cm^2)	Berechnete relative Streukraft
10	~ 528	$1,26 \times 10^{-15}$	1
20	~ 525	$8,4 \times 10^{-14}$	67,5
30	~ 530	$1,03 \times 10^{-12}$	817
40	~ 535	6×10^{-12}	$4,8 \times 10^3$
60	~ 545	$6,3 \times 10^{-11}$	5×10^4
80	~ 555	$2,3 \times 10^{-10}$	$1,8 \times 10^5$
100	~ 575	$4,6 \times 10^{-10}$	$3,6 \times 10^5$
120	~ 605	$6,9 \times 10^{-10}$	$5,5 \times 10^5$
140	~ 635	$8,8 \times 10^{-10}$	7×10^5
160	~ 665	1×10^{-9}	$7,9 \times 10^5$
200	~ 567	$1,4 \times 10^{-9}$	$1,1 \times 10^6$
300	~ 670	$2,9 \times 10^{-9}$	$2,3 \times 10^6$
600	~ 600	$1,01 \times 10^{-8}$	8×10^6
1.000	~ 620	$2,5 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^7$
1.000	~ 670	$2,5 \times 10^{-8}$	$1,8 \times 10^7$

[0171] Die relativen Lichtstreukräfte der Partikel gleicher Form und Größe, jedoch unterschiedlicher Zusammensetzung, können direkt experimentell verglichen werden, indem die Lichtstreuintensitäten im rechten Winkel mit dem Weg des einfallenden Lichts verglichen werden. Es wurden experimentell die relativen Lichtstreukräfte von Gold- und Polystyrolpartikeln gleicher Größe und Form unter Verwendung einer Lichtstreuvorrichtung, welche derart konstruiert war, dass das Streulicht im rechten Winkel zu dem Weg des einfallenden Lichts gemessen wurde, verglichen. Die Vorrichtung ist an anderer Stelle beschrieben. Die Tabelle 6 zeigt, dass die experimentell bestimmte Streukraft eines aus Gold bestehenden Partikels sehr viel größer ist als die Streukraft eines aus Polystyrol bestehenden Partikels, wenn beide Partikeltypen bei der gleichen einfallenden sichtbaren Wellenlänge verglichen werden. Die experimentell bestimmten Werte von Tabelle 6 sind um das zwei- bis dreifache geringer als die berechneten Werte. Ein großer Anteil dieser Differenz kann den ungefähr zweifach geringeren Werten zugeschrieben werden, die für die experimentell bestimmten molaren dekadischen Extinktions-Koeffizienten der Goldpartikel im Vergleich zu den berechneten Werten erhalten wurden (siehe Tabelle 3). Zudem besteht ein bestimmter Grad an Unsicherheit bezüglich der Partikelgrößen (z. B. kann bei einer Polystyrolpartikel-Präparation $21 \text{ nm} \pm 1,5 \text{ nm}$ die tatsächliche Größe ungefähr 1,5 nm größer oder kleiner sein). Diese Ungenauigkeit führt sowohl bei den Polystyrolpartikeln als auch bei den Goldpartikeln zu weniger Sicherheit in Bezug auf die qualitativen Werte, ändert jedoch nicht die grundlegenden Schlussfolgerungen betreffend die relativen Streukräfte. Aus Tabelle 6 geht hervor, dass auch bei dem größten Grad an Ungenauigkeit bei einem Minimum die Streukraft eines Goldpartikels um das 100- bis 200-fache größer ist als die eines Polystyrolpartikels vergleichbarer Größe und Form.

[0172] In Tabelle 7 ist die relative Lichtstreuraft sphärischer Gold- und Polystyrolpartikel gleicher Größe und Form bei verschiedenen Wellenlängen des sichtbaren Lichts verglichen. Aus Tabelle 7 geht hervor, dass auch

bei Beleuchtungswellenlängen, die sich weit außerhalb der Wellenlänge der maximalen Lichtstreuintensität befinden, die Lichtstrekraft eines Goldpartikels sehr viel größer ist als die eines Polystyrolpartikels vergleichbarer Größe und Form. Diese experimentellen Ergebnisse stimmen mit den berechneten Ergebnissen überein (siehe Tabelle 2).

[0173] Tabelle 8 zeigt, dass unter Anwendung weißglühender Lichtbeleuchtungsbedingungen die experimentell bestimmte Lichtstrekraft sphärischer Goldpartikel sehr viel größer ist als die vergleichbarer Polystyrolpartikel.

[0174] Insgesamt ist die Übereinstimmung zwischen den hierin dargestellten berechneten und experimentell bestimmten Ergebnissen sehr gut. Dies bestätigt die berechneten Ergebnisse sowie die Anwendbarkeit des Berechnungsverfahrens zur Identifizierung potentiell geeigneter Partikelmaterialien und -zusammensetzungen und zur Bewertung der Ausnutzbarkeit der Lichtstreuereigenschaften derartiger Partikel. Die meisten Typen von Lichtquellen, welche polychromatisches und/oder monochromatisches Licht, andauerndes und/oder gepulstes Licht und kohärentes und nichtkohärentes Licht erzeugen, können zur Bestrahlung verwendet werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass spezifischere und intensivere Lichtstreuesignale mit metallartigen Partikeln im Vergleich zu nicht-metallartigen Partikeln vergleichbarer Größe und Form erhalten werden können. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die vorliegende Erfindung ein Mittel zum Nachweis geringerer Partikelmengen und zur spezifischeren Detektion kleinerer und größerer Partikelmengen bereitstellt als es bisher möglich war.

Tabelle 6

BERECHNETE UND GEMESSENE RELATIVE STREUKRAFT VON POLYSTYROL- UND GOLDPARTIKELN
GLEICHER GRÖSSE UND FORM IN WASSER BEI DER EINFALLSWELLENLÄNGE, BEI DER MAXIMALE
STREUUNG BEI DEN GOLDPARTIKELN AUFTRITT

Partikel-zusammensetzung	Partikelgröße (b)	Einfallende Wellenlänge	Relative Streukraft Berechnet	Gemessen
PST ^(c)	$21 \pm 1,5 \text{ nm}$	~ 525 nm	1	1
Gold	$19,08 \pm 1,9 \text{ nm}$	~ 525 nm	~ 664	~ 220
PST	$32 \pm 1,3 \text{ nm}$	~ 527 nm	1	1
Gold	$29,5 \pm < 3,5 \text{ nm}$	~ 527 nm	~ 663	~ 318
PST	$41 \pm 1,8 \text{ nm}$	~ 530 nm	1	1
Gold	$39,5 \pm < 6 \text{ nm}$	~ 530 nm	~ 985	~ 461
PST	$83 \pm 2,7 \text{ nm}$	~ 560 nm	1	1
Gold	$76,4 \pm 15 \text{ nm}$	~ 560 nm	~ 708	~ 211

(a) Berechnet für perfekt sphärische Partikel

(b) Vom Hersteller angegebene Partikelgrößen. Die hergestellten Partikel besitzen sphärische Formen, sind jedoch nicht perfekt sphärisch. Dies hat geringe Auswirkung auf die quantitativen Aspekte dieses Vergleichs.

(c) PST – Polystyrol

Tabelle 7

GEMESSENE RELATIVE STREUKRAFT VON POLYSTYROL- UND GOLDPARTIKELN ÄHNLICHER GRÖSSE UND FORM IN WASSER BEI EINFALLSWELLENLÄNGEN AUSSERHALB DER GOLDPARTIKEL-ABSORPTIONSBANDE

Partikelzusammensetzung	Partikelgröße ^(a)	Einfallende Wellenlänge	Sichtbare Wellenlänge der maximalen Streuung	Relative Streukraft	
				Direkter Vergleich	Korrigiert in Bezug auf die Partikelgröße
PST ^(b)	$41,1 \pm 1,8 \text{ nm}$	~530 nm	~ 300 nm	1	1
		~ 460 nm		1	1
		~ 400 nm		1	1
Gold	$39,9 \pm < 6 \text{ nm}$	~ 530 nm	~ 530 nm	~ 377	~ 443
		~ 460 nm		~ 96	~ 113
		~ 400 nm		~ 80	~ 94
PST	$83 \pm 2,7 \text{ nm}$	~ 560 nm	~ 300 nm	1	1
		~ 430 nm		1	1
		~ 380 nm		1	1
Gold	$76,4 \pm < 15 \text{ nm}$	~ 560 nm	~ 560 nm	~ 251	~ 412
		~ 430 nm		~ 36	~ 55
		~ 380 nm		~ 27	~ 41

(a) Vom Hersteller angegebene Partikelgröße

(b) PST – Polystyrol

(c) Einstellung der relativen Lichtstreuwerte für die Goldpartikel für jeden beliebigen Größenunterschied zwischen den PST- und Goldpartikeln unter Verwendung der Beziehung, dass die Streukraft um die sechste Potenz des Radius ansteigt. Obwohl dies in diesen Größenbereichen nicht völlig genau ist, stellen die korrigierten Werte eine gute Annäherung dar.

Tabelle 8

GEMESSENE RELATIVE STREUKRAFT IN WASSER VON MIT WEISSLICHT BESTRAHLTEN POLYSTYROL (PST)- UND GOLDPARTIKELN ÄHNLICHER GRÖSSE UND ZUSAMMENSETZUNG

(a) Partikel-zusammensetzung	(b) Partikelgröße	Relative Streukraft bei gleicher Konzentration	(c) Relative Streukraft, eingesetzt auf die Partikelgröße
PST	21 nm	1	1
Gold	19,8 nm	~ 40	~ 58
PST	38 nm	1	1
Gold	39,9 nm	~ 212	~ 158
PST	37,9 nm	1	1
Gold	39,9 nm	~ 105	~ 77
PST	59 nm	1	1
Gold	59,6 nm	~ 100	~ 94
PST	79 nm	1	1
Gold	76,4 nm	~ 108	~ 132

(a) Polystyrolpartikel, bezogen von Interfacial Dynamics, Inc., Portland, Oregon oder Duke Scientific, Inc., Palo Alto, CA. Die Goldpartikel wurden von Goldmark Biologicals, Phillipsburg, N. J., einem Vertreiber für British Biocell LTD., Cardiff, UK, bezogen.

(b) Der vom Hersteller angegebene Partikeldurchmesser.

(c) Durchgeführt unter Anwendung der Beziehung, dass die Streukraft ungefähr mit der sechsten Potenz des Partikelradius ansteigt.

Lichterzeugungsvermögen eines Partikels im Vergleich zur Fluoreszenz

[0175] Fluoreszenz wird derzeit in vielen Assays verwendet, die zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Analytsubstanz konstruiert sind.

[0176] Fluoreszin ist eines der am besten verstandenen und am häufigsten verwendeten fluoreszierenden Verbindungen. Es wurden viele Studien durchgeführt mit dem Ziel, so wenig Fluoreszin-Moleküle wie möglich zu detektieren. Fluoreszin besitzt einen hohen molaren dekadischen Extinktions-Koeffizienten (etwa 6×10^4 M $^{-1}$ cm $^{-1}$) und eine sehr hohe fluoreszierende Quantenausbeute von ungefähr 0,8.

[0177] In Tabelle 9 wird das berechnete Signalerzeugungsvermögen bestimmter Partikel mit dem von Fluoreszin verglichen. Es wird deutlich, dass ein einziges Gold- oder Silberpartikel eine sehr viel intensivere Lichtquelle ist als ein einzelnes Fluoreszin-Molekül. Unter idealen Bedingungen und unter Verwendung geeigneter optischer Filter kann ein gutes Fluorimeter Fluoreszin bei einer geringen Konzentration von etwa 10 $^{-10}$ M bis 10 $^{-11}$ M detektieren. Der in Tabelle 9 dargestellte Vergleich zeigt, dass dieses gleiche Fluorimeter in der Lage sein sollte, eine geringere Konzentration eines 60-nm-Goldpartikels von ungefähr 10 $^{-15}$ M–10 $^{-16}$ M nachzuweisen. Diese Beobachtungen wurden experimentell verifiziert.

[0178] Aus Tabelle 9 geht hervor, dass der Gesamt-Output an Streulicht von einem einzigen 60-nm-Goldpartikel äquivalent zu dem Output von etwa 350.000 Fluoreszin-Molekülen ist. Während ein Fluoreszin-Molekül nicht direkt im Lichtmikroskop visualisiert werden kann, konnten einzelne metallartige Partikel in vielen verschiedenen Probentypen und Assay-Formaten direkt visualisiert werden. Das Licht wird mit einem Winkel auf die Probe gerichtet, derart, dass das von dem Partikel gestreute Licht durch das Auge oder den Photodetektor

maximal visualisiert oder gemessen werden kann. Dieses vielfältig anwendbare Verfahren der Beleuchtung und Detektion, welches vom Anmelder in der einen oder anderen Form zur Verwendung in analytischen und diagnostischen Anwendungen entwickelt wurde, wird als DLASLPD („Abwinkelung des direkten Lichts zur ausschließlichen Detektion des vom Partikel gestreuten Lichts“; engl.: "direct light angled for scattered light of particle only to be detected") bezeichnet. Diese Verfahren werden detaillierter an anderer Stelle beschrieben. Hierdurch wird der Nachweis einzelner Partikel und die Quantifizierung derartiger Partikel durch Partikelzählverfahren, einschließlich Bildanalyse, Photonenkorrelations-Spektroskopie, Lichtmikroskopie und anderer Verfahren, ermöglicht. Im Gegensatz dazu können nur sehr große Polystyrolpartikel unter Anwendung der DLASLPD-Techniken im Lichtmikroskop beobachtet werden.

[0179] In Tabelle 10 sind Ergebnisse dargestellt, in denen die experimentell bestimmten relativen Signalerzeugungsvermögen von Fluoreszin und Goldpartikeln verschiedener Größe unter Verwendung von Weißlichtbestrahlung verglichen werden. Diese Ergebnisse sind ähnlich zu denen, die in Tabelle 8 wiedergegeben sind und zeigen, dass das Lichterzeugungsvermögen eines Goldpartikels sehr viel größer ist als das eines Fluoreszin-Moleküls. Beispielsweise emittieren Goldpartikel mit einem Durchmesser von 39,9 nm und 59,6 nm eine Lichtintensität, die äquivalent ist zu der, die von ungefähr 2×10^4 bzw. 2.3×10^5 Fluoreszin-Molekülen abgegeben wird, wenn sie mit weißem Licht bestrahlt werden.

[0180] Das von mit weißem Licht bestrahlten Goldpartikeln emittierte Streulicht setzt sich aus allen Wellenlängen zusammen, die in dem einfallenden Weißlicht vorhanden sind; die Effizienz der Lichtstreuung bei irgendeiner bestimmten Wellenlänge variiert jedoch derart, dass ein oder mehrere Banden der Streulicht-Wellenlängen intensiver gestreut werden. Das Profil der tatsächlichen Wellenlängen-Zusammensetzung und der Streulichtwellenlänge versus Streulichtintensität, welches erhalten wird, wenn weißes einfallendes Licht verwendet wird, ist abhängig von einer Anzahl von Variablen, zu denen der Typ der verwendeten Lichtquelle und das Verfahren der Lichtdetektion zählen. Die Ergebnisse von Tabelle 10 wurden mit einer weißglühenden Lichtquelle oder Farbtemperatur von 2.800° Kelvin erhalten, und das Licht wurde durch einen einfachen Filter geführt, um die Infrarotkomponente zu reduzieren, bevor es durch die Probe tritt. Die Intensität des Streulichts wurde mit einer Standard-Photoelektronenvervielfacher-Rohre gemessen. Die Ergebnisse von Tabelle 10 wurden nicht bezüglich der Photoröhren- oder Lichtquellen-Eigenschaften korrigiert. Derartige Korrekturen würden sich nicht auf die hierin diskutierten Schlussfolgerungen auswirken.

Tabelle 9

BERECHNETES RELATIVES SIGNALERZEUGUNGSVERMÖGEN VON FLUORESZIN UND SPHÄRISCHEN PARTIKELN VERSCHIEDENER ZUSAMMENSETZUNGEN UND GRÖSSEN

Partikel-zusammen-setzung	Partikel-durchmesser	Partikel-volumen (μm^3)	Anzahl der Fluoreszin-Moleküle, die notwendig sind, um die Gesamt-Lichtintensität eines Partikels zu erreichen ^(a)
Polystyrol	10 nm	$5,23 \times 10^{-7}$	~ 0,07
	20 nm	$4,2 \times 10^{-6}$	~ 5
	40 nm	$3,35 \times 10^{-5}$	~ 280
	60 nm	$1,13 \times 10^{-4}$	~ 2.800
	100 nm	$5,23 \times 10^{-4}$	~ 42.000
Silber	10 nm	$5,23 \times 10^{-7}$	~ 46
	20 nm	$4,2 \times 10^{-6}$	~ 3.500
	40 nm	$3,35 \times 10^{-5}$	~ 150.000
	60 nm	$1,13 \times 10^{-4}$	~ 770.000
	100 nm	$5,23 \times 10^{-4}$	~ 2.300.000
Gold	10 nm	$5,23 \times 10^{-7}$	~ 7
	20 nm	$4,2 \times 10^{-6}$	~ 455
	40 nm	$3,35 \times 10^{-5}$	~ 35.000
	60 nm	$1,13 \times 10^{-4}$	~ 350.000
	100 nm	$5,23 \times 10^{-4}$	~ 3.100.000

(a) Fluoreszin und Partikel werden mit der gleichen Lichtintensität bei Wellenlängen, welche das maximale Fluoreszenz- oder Lichtstreuignal erzeugen, bestrahlt. Bei Polystyrol betrug die Wellenlänge des verwendeten einfallenden Lichts 300 nm, während die Wellenlänge des einfallenden Lichts, die für jedes Gold- oder Silberpartikel verwendet wurde, die Wellenlänge war, bei der ein maximaler C_{sca} -Wert für die verschiedenen Größen erhalten wurde.

[0181] Die Ergebnisse der Messung der relativen Signalerzeugungsvermögen von Fluoreszin und etwa sphärischen Goldpartikeln verschiedener Größe, wenn sie mit einfallendem monochromatischem Licht bestrahlt werden, sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Die Fluoreszinprobe wurde mit monochromatischem Licht einer Einfallswellenlänge (490 nm) bestrahlt; das resultierende emittierte Licht war nicht monochromatisch oder polarisiert und bestand aus den Wellenlängen, die charakteristisch für Fluoreszin-Emission sind. Sphärische Goldpartikel verschiedener Größen wurden mit monochromatischem Licht einer Einfallswellenlänge bestrahlt, bei der eine maximale Streuung des Einfallslichts auftritt; das resultierende Streulicht war – in Abhängigkeit der Größe des Partikels – entweder vollständig oder teilweise polarisiert.

Tabelle 10

GEMESSENES RELATIVES SIGNALERZEUGUNGSVERMÖGEN VON FLUORESZIN IM VERGLEICH ZU GOLDPARTIKELN BEI BESTRAHLUNG MIT WEISSEM LICHT^(a)

Signalquelle	Partikel-durchmesser (nm)	^(c) Gemessene Anzahl der Fluoreszin-Moleküle, die notwendig sind, um die Lichtintensität eines Goldpartikels zu erreichen
Gold	$10,1 \pm < 1,2$	~ 9
Gold	$19,8 \pm < 2$	$\sim 2,3 \times 10^2$
Gold	$29,5 \pm < 3,5$	$\sim 4,1 \times 10^3$
Gold	$39,9 \pm < 6$	$\sim 2 \times 10^4$
Gold	$49,2 \pm < 9,8$	$\sim 7,3 \times 10^4$
Gold	$59,6 \pm < 11,9$	$\sim 2,3 \times 10^5$
Gold	$76,4 \pm < 15,3$	$\sim 9 \times 10^5$
PST ^(b)	$80 \pm < 6,6$	$\sim 8,3 \times 10^3$

(a) Einfallendes Licht von einer weißglühenden Lichtquelle eines Leica-Mikroskops mit einer Farbtemperatur von 2.800°K; das emittierte Licht wurde durch eine Glaslinse geführt, um die Infrarotkomponente zu reduzieren.

(b) PST – Polystyrol

(c) Die Ergebnisse sind nicht korrigiert.

Tabelle 11

MESSUNG DES RELATIVEN SIGNALERZEUGUNGSVERMÖGENS VON FLUORESZIN IM VERGLEICH ZU GOLDPARTIKELN BEI BESTRAHLUNG MIT MONOCHROMATISCHEM LICHT

Partikel-typ	^(a) Partikel-durchmesser	^(b) Einfallende Wellenlänge	^(c) Gemessene Anzahl der Fluoreszin-Moleküle, die notwendig sind, um das Lichtsignal eines Goldpartikels zu erreichen
Gold	10,1 nm	~ 525 nm	~ 4
Gold	19,8 nm	~ 530 nm	~ 120
Gold	29,5 nm	~ 532 nm	~ 1.400
Gold	39,9 nm	~ 535 nm	~ 7.800
Gold	49,2 nm	~ 550 nm	~ 25.000
Gold	59,6 nm	~ 542 nm	~ 78.000
Gold	76,4 nm	~ 565 nm	~ 190.000
Gold	~ 100 nm	~ 560 nm	~ 550.000

(a) Durch Messungen bestimmte Größe

(b) Das einfallende monochromatische Licht bestand aus einem signifikanten Anteil an horizontal polarisiertem

Licht aus einem Monochromator. Vertikal polarisiertes einfallendes Licht würde eine signifikant größere Partikel-Signal-Intensität ergeben, jedoch nicht die Signalintensität von Fluoreszin beeinflussen.
 (c) Die Ergebnisse sind nicht korrigiert.

[0182] Tabelle 11 veranschaulicht, dass die Streulicht-Signalintensität, die von einzelnen Goldpartikeln verschiedener Größe, die mit einfallendem monochromatischem Licht bestrahlt werden, erzeugt wird, sehr viel intensiver ist im Vergleich zu der Lichtsignal-Intensität eines einzelnen Fluoreszin-Moleküls. Diese Ergebnisse veranschaulichen weiterhin, dass einzelne metallartige Partikel, wie beispielsweise Goldpartikel, wenn sie mit einfallendem monochromatischem Licht bestrahlt werden, in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden können. Eine derartige Detektierbarkeit ist extrem nützlich bei der Verwendung derartiger Partikel in geeigneten Nachweisverfahren als extrem empfindliche lichtstreuende Markierung in diagnostischen Assays und bei analytischen Anwendungen.

[0183] Nicht-metallartige Partikel, wie beispielsweise Polystyrol, welche hunderte bis tausende hoch fluoreszierende Moleküle im Partikelkörper aufweisen, sind auf dem Fachgebiet bestens bekannt. Ein Beispiel für ein derartiges Partikel ist ein Partikel mit einem Durchmesser von 110 nm, in das eine fluoreszierende Verbindung eingearbeitet ist, welche Erregungs- und Emissions-Maxima bei einer Wellenlänge von 490 nm bzw. 515 nm aufweist, die dem Fluoreszin ähnlich sind. Jedes Partikel enthält im Durchschnitt 4.400 hoch fluoreszierende Moleküle, wobei das Volumen eines derartigen Partikels ungefähr $7 \times 10^{-16} \text{ cm}^3$ beträgt, und die Konzentration des fluoreszierenden Moleküls in dem Partikel ungefähr 10^{-5} M beträgt. Tabelle 12 gibt die experimentell bestimmten Ergebnisse für das Lichterzeugungsvermögen von Polystyrol mit 110 nm Durchmesser, Polystyrol-Partikeln, beladen mit vielen Molekülen einer hoch fluoreszierenden Verbindung, und Goldpartikeln von 100 nm Durchmesser wieder. Das Lichterzeugungsvermögen dieser Partikel wird direkt mit einer Fluoreszin-Lösung, welche das gleiche Lichterzeugungsvermögen ergibt, verglichen. Interessant ist die Feststellung, dass das gesamte Streulichtsignal eines einzigen 110-nm-Polystyrolpartikels äquivalent zu dem Lichtsignal von 12.000 Fluoreszin-Molekülen ist. Die Anwesenheit der fluoreszierenden Moleküle in dem Polystyrolpartikel erhöht das Gesamt-Lichtsignal lediglich um das etwa 1,5-fache des Partikels. Das Fluoreszenz-Signal dieses Partikels kann von dem Streulichtsignal unter Verwendung eines geeigneten Filters zwischen der Probe und dem Detektor, welcher die Wellenlängen des einfallenden Lichts ausschließt und die Wellenlängen-Eigenschaften der Fluoreszenz-Emission durchlässt, getrennt werden. Ein derartiger Filter führt dazu, dass dieses Partikel eine fluoreszierende Signalintensität erzeugt, die äquivalent zu ungefähr 3.000 Fluoreszin-Molekülen ist. Das Goldpartikel mit 100 nm Durchmesser besaß ein deutliches höheres Emissionslicht-Erzeugungsvermögen gegenüber diesen Partikeln.

Tabelle 12

GEMESSENES RELATIVES SIGNALERZEUGUNGSVERMÖGEN VON FLUORESZIN, POLYSTYROLPARTIKELN, POLYSTYROLPARTIKELN, ENTHALTEND FLUORESZIERENDE MOLEKÜLE, UND GOLDPARTIKELN

Partikel-typ	^(a) Partikel-durchmesser	Fluoreszierende Moleküle pro Partikel	Einfallende Wellenlän-ge	^(c) Gemessene Anzahl der Fluoreszin-Moleküle, die notwendig sind, um das Lichtsignal eines Partikels zu erreichen
^(d) PST	110 nm	0	490 nm	~ 12.000
PST	110 nm	~ 4.400	490 nm	~ 19.000
^(e) Gold	100 nm	0	555 nm ^(b)	^(e) ~ $1,3 \times 10^6$

(a) Durch Messungen bestimmte Größe

(b) Siehe Tabelle 11 (b)

(c) Die Ergebnisse sind nicht korrigiert

(d) Polystyrol

(e) Das hierin verwendete Partikel von 100 nm Durchmesser stammt aus einem anderen Produktions-Batch als das in Tabelle 11 verwendete Partikel.

Partikel gemischter Zusammensetzung

[0184] Sphärische Partikel gemischter Zusammensetzungen wurden durch theoretische und physikalische Experimente untersucht, um ihre mögliche Eignung in verschiedenen diagnostischen und analytischen Anwendungen zu bewerten. Für die theoretischen Bewertungen wurde ein Partikel mit einem Gold-"Kern", beschichtet mit Silber in verschiedenen Dicken, und ein Partikel mit Silber-Kern, beschichtet mit Gold oder Polystyrol in verschiedenen Dicken, untersucht. Unter "Kern" wird ein sphärisches Partikel verstanden, auf das eine zusätzliche Schicht oder Überzug aus einem anderen lichtstreuenden Material aufgebracht wird, was zu einer gemischten Zusammensetzung in verschiedenen Verhältnissen führt. Direkte physikalische Experimente wurden an Partikeln durchgeführt, die aus einer gemischten Zusammensetzung bestanden, wobei ein Goldpartikelkern von 16 nm Durchmesser mit einem zusätzlichen Überzug aus Silber versehen wurde. In diesen illustrativen Beispielen sind Gold und Silber repräsentativ für metallartige Materialien, und Polystyrol ist repräsentativ für nicht-metallartige Materialien. Diese Beispiele stellen lediglich einige Beispiele aus einer großen Anzahl verschiedener möglicher Kombinationen dar, welche Partikel beinhalten, die aus Mischungen eines oder mehrerer verschiedener metallartiger und/oder nicht-metallartiger Materialien bestehen.

[0185] Die Ergebnisse aus den Berechnungen der Lichtstreuereigenschaften der obigen illustrativen Beispiele sind in den Tabellen 13 und 14 wiedergegeben. Tabelle 13, Abschnitt A, zeigt, dass bei einer Reihe sphärischer Partikel mit 10 nm Durchmesser, welche aus ansteigenden Anteilen einer Silberbeschichtung auf einem Goldkern bestehen, die Lichtstreuereigenschaften sich derart verändern, dass sie eher denen eines reinen Goldpartikels entsprechen. Von größter Bedeutung ist hierbei, dass sich anhand dieser Berechnungen und physikalischer Experimente herausstellte, dass bestimmte Anteile eines silberbeschichteten Goldpartikels zwei intensive Lichtstremaxima bei einfallenden Wellenlängen aufweisen, die in etwa den Eigenschaften reiner Gold- und reiner Silberpartikel etwa gleicher Größe entsprechen.

[0186] Eine direkte experimentelle Beobachtung eines mit Silber beschichteten Goldpartikels von 16 nm Durchmesser unter Verwendung von Weißlichtbestrahlung unter DLASLPD-Bedingungen mit einem einfachen Lichtmikroskop zeigte, dass neue Streulichtfarben von diesen Partikeln ausgingen, die bei reinen Gold- oder reinen Silberpartikel-Präparationen zuvor nicht beobachtet worden waren. Viele dieser Partikel wiesen eine leuchtende Purpur- bis Magenta-Farbe des Streulichts auf.

[0187] Tabelle 13, Abschnitt B, zeigt einen Vergleich der berechneten Ergebnisse für Partikel gemischter Zusammensetzung, bestehend aus einer Goldkugel von 10 nm Durchmesser, die mit verschiedenen Überzügen aus Silber beschichtet ist. Die Ergebnisse zeigen ähnliche Tendenzen wie für die Lichtstreuereigenschaften dieser gemischten Zusammensetzungen beobachtet werden (Abschnitt A der Tabelle 13), wenn das Verhältnis von Silber zu Gold variiert wird. In zusätzlichen Berechnungen (Tabelle 14), bei denen ein Partikel mit Silberkern mit variierenden Goldüberzügen beschichtet wird, zeigen die Lichtstreuereigenschaften ähnliche Tendenzen bezüglich ihrer Veränderungen, wenn das Verhältnis von Gold und Silber, wie in Tabelle 13 wiedergegeben, verändert wird.

Tabelle 13

BERECHNETE STREUEIGENSCHAFTEN SPHÄRISCHER PARTIKEL, BESTEHEND AUS EINER GE-MISCHTEN ZUSAMMENSETZUNG – MIT SILBER BESCHICHTETER GOLDKERN –

	Partikel-durchmesser	Goldkern-Durchmesser	Dicke der Silberbeschichtung	Vol. Gold/Gesamt-Vol.	C_{sca} bei maximaler Wellenlänge (cm^2)	Einfallende Wellenlänge am Streumaximum (s)
A	10 nm	10 nm	0	1	$1,26 \times 10^{-15}$	~ 530 nm
	10 nm	9 nm	0,5	0,73	$7,3 \times 10^{-16}$ 8×10^{-16}	~ 340 nm ~ 516 nm
	10 nm	8,4 nm	0,8 nm	0,59	9×10^{-16} $6,8 \times 10^{-16}$	~ 340 nm ~ 510 nm
	10 nm	4 nm	3 nm	0,064	$5,7 \times 10^{-15}$	~ 380 nm
B	10 nm	10 nm	0	1	$1,26 \times 10^{-15}$	~ 530 nm
	11 nm	10 nm	0,5 nm	0,75	$1,25 \times 10^{-15}$ $1,45 \times 10^{-15}$	~ 340 nm ~ 518 nm
	12 nm	10 nm	1 nm	0,58	$2,8 \times 10^{-15}$ 2×10^{-15}	~ 340 nm ~ 505 nm
	20 nm	10 nm	5 nm	0,125	$2,4 \times 10^{-13}$	~ 375 nm
Polystyrolpartikel						
C	10 nm	0	0	--	$1,3 \times 10^{-27}$	~ 300 nm
	20 nm	0	0	--	$8,3 \times 10^{-16}$	~ 300 nm

[0188] Anhand kombinierter theoretischer und physikalischer Experimente wurden folgende Feststellungen getroffen. Für Partikel, die aus bestimmten gemischten Zusammensetzungen metallartiger Materialien bestehen, wie beispielsweise gemischte Zusammensetzungen aus Gold und Silber, treten neue Lichtstreueneigenschaften auf, welche in vielen verschiedenen Probentypen und spezifischen diagnostischen und analytischen Anwendungen ausgenutzt werden können. Partikel mit zwei oder mehr optisch verschiedenen und auflösbarren Wellenlängen mit hohen Streuintensitäten können durch Variieren der Zusammensetzung der metallartigen Materialien hergestellt werden.

[0189] Im Gegensatz dazu weisen Partikel, die aus gemischten Zusammensetzungen nicht-metallartiger und metallartiger Materialien bestehen, im Allgemeinen Lichtstreueneigenschaften auf, die denen der metallartigen Materialien bei gleichen oder geringeren Verhältnissen nicht-metallartiger Materialien zu metallartigen Materialien ähneln. Nur bei sehr hohen Verhältnissen von nicht-metallartigen zu metallartigen Materialien ähneln die Lichtstreueneigenschaften der Partikel mit gemischter Zusammensetzung denen des nicht-metallartigen Materials, wie die Ergebnisse in Abschnitt B der Tabelle 14 zeigen.

[0190] Sowohl die gemischten Silber-Gold-Zusammensetzungen als auch die Silber-Polystyrol-Zusammensetzungen weisen das hohe Lichtstreuvermögen und Streubanden sichtbarer Wellenlängen auf, die charakteristisch sind für Partikel, die aus reinen metallartigen Materialien bestehen. Partikel bestimmter gemischter Zusammensetzungen sind durch spezifisches Detektieren des Streulichts von einem oder beiden Streuintensitäts-Peaks und/oder durch die Farbe oder Farben dieser Partikel gemischter Zusammensetzung nachweisbar. Derartige Partikel gemischter Zusammensetzung verstärken die Fähigkeit, kleinere Mengen an Partikeln zu detektieren, und insbesondere, kleinere und größere Mengen an Partikeln, als es bisher möglich war, nachzuweisen.

Asymmetrische Partikel

[0191] Die physikalische Orientierung asymmetrischer Partikel im Hinblick auf einen Lichtstrahl ermöglicht die Ausnutzung zusätzlicher Streulichteigenschaften bei der Detektion dieser Partikel. Die Eigenschaft von RIFS-LIW kann in vielen verschiedenen Aspekten/Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung angewendet werden, um ein oder mehrere Analyten oder Partikel in einer Probe spezifischer und mit höherer Sensitivität nachzuweisen. Beispielsweise liefert das Flackern der Streulichtintensität und/oder die Änderung der Farbe ein zusätzliches Detektionsmittel, um zu bestimmen, welche Partikel an eine Oberfläche gebunden sind und welche Partikel nicht. Dieses ermöglicht die Entwicklung von Assays vom Nicht-Trennungs-Typ (homogene Assays). Hierbei ist lediglich erforderlich, durch Partikelzählung, Intensitätsmessungen oder Ähnliches die Partikel zu detektieren, die nicht flackern und/oder die Farbe ändern. Ungebundene Partikel in Lösung flackern und/oder ändern ihre Farbe, während diejenigen, die an eine Oberfläche gebunden sind, dies nicht tun. Zusätzliche Bildverarbeitungsmittel, wie beispielweise Video-Aufzeichnungsgeräte und Ähnliches, ermöglichen die Anwendung zusätzlicher Detektionsverfahren sowohl bei asymmetrischen als auch bei sphärischen (symmetrischen) Partikeln. Beispielsweise werden in einem Trennungs- oder Nicht-Trennungs-Format die gebundenen Partikel durch Fokussieren der Sammellinse an der Oberfläche detektiert, wobei lediglich die Streulichtsignale pro Einheitsbereich aufgezeichnet werden, die über einen bestimmten Zeitraum konstant sind. Partikel, die sich frei in Lösung befinden und Brownscher Molekularbewegung oder anderen Bewegungstypen unterliegen, führen zu einer veränderten Streulichtintensität pro Einheitsbereich pro Einheitszeit bei diesen Partikeln. Gebundene lichtstreuende Partikel werden im Raum fixiert und bewegen sich nicht. Unter Anwendung von Bildverarbeitungsverfahren zur Trennung der "sich bewegenden" lichtstreuenden Partikel von den "gebundenen" lichtstreuenden Partikeln wird die Menge gebundener Partikel bestimmt und mit der Menge des Analyten in der Probe korreliert. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass viele andere Bildverarbeitungsverfahren existieren, die verwendet werden können, um zwischen an eine Oberfläche gebundenen und ungebundenen sphärischen oder asymmetrischen Partikeln in Lösung zu unterscheiden.

Zugabe anderer Materialien zu der Oberfläche oder dem Kern des Partikels, um diesen zusätzliche physikalische Eigenschaften, die nicht mit den Lichtstreuereigenschaften in Verbindung stehen, zu verleihen

[0192] Bei bestimmten Anwendungen und bei der Verwendung bestimmter Typen von Zusammensetzungen kann es hilfreich sein, die Oberfläche eines Partikels zu "beschichten", um das Partikel außerdem chemisch zu stabilisieren, oder zusätzliche Oberflächenbindungeigenschaften hinzuzufügen, welche bei spezifischen Anwendungen in analytischen diagnostischen Assays von großer Bedeutung sein können. Beispielsweise ist bekannt, dass Silber schnell oxidiert. Zur Verwendung von Silberpartikeln oder Partikeln gemischter Zusammensetzung, welche Silber enthalten, kann das Silber-enthaltende Partikel chemisch stabilisiert werden, indem eine dünne Beschichtung aus Gold oder einer anderen Substanz auf die Oberfläche aufgetragen wird, so dass das Silber nicht länger äußeren Einflüssen auf seine chemische Stabilität unterliegt.

[0193] In anderen Beispielen kann die Beschichtung der Oberfläche der Partikel mit einem anderen Material, wie beispielsweise einem Polymeren, welches spezifisch gebundene Bindungsagentien enthält, oder anderen Materialien, die zum Binden von Bindungsagentien geeignet sind, oder dem Bindungsagenten selbst, erfolgen. In jedem dieser Beispiele verändern die "dünnen" Beschichtungen nicht signifikant die Lichtstreuereigenschaften des Kernmaterials. Unter "dünnen" Beschichtungen werden eine Monoschicht oder ein ähnlicher Beschichtungstyp auf der Oberfläche des Partikels verstanden.

[0194] Manipulierbare Lichtstrepupartikel (MLSP's) sind Partikel, welche ein oder mehrere gewünschte Lichtstreuereigenschaften aufweisen und außerdem in einem ein-, zwei- oder dreidimensionalem Raum durch Anwendung eines EMF manipuliert werden können. Ein MLSP-Partikel kann auf viele verschiedene Weisen hergestellt werden. Beispielsweise wird ein MLSP-Partikel durch Beschichten eines ferro-elektrischen, magnetischen oder ähnlichen "Kern"-Materials mit kleinem Durchmesser mit einem viel größeren Anteil eines Materials, welches die gewünschten Lichtstreuereigenschaften aufweist, hergestellt; beispielsweise wird ein Kern aus einem magnetischen oder ferro-elektrischen Material von 10 nm Durchmesser mit genügend Gold beschichtet, um ein Partikel von 50, 70 oder 100 nm Durchmesser herzustellen. Dies ist in [Fig. 29A](#) dargestellt.

[0195] Ein weiteres Verfahren zur Herstellung eines derartigen Partikels ist, das Material, welches die gewünschten Lichtstreuereigenschaften aufweist, mit einer dünnen Beschichtung des magnetischen oder ferro-elektrischen Materials zu versehen. Beispielsweise wird ein Gold- oder Silberpartikel von ungefähr 50 nm mit einer 1–2 nm dicken Beschichtung aus dem magnetischen oder ferro-elektrischen Material beschichtet. Dies ist in [Fig. 29B](#) dargestellt.

[0196] Alternativ werden die MLSP-Partikel durch Mischen der gewünschten lichtstreuenden Materialien und der ferro-elektrischen oder magnetischen Materialien in angemessenen Anteilen derart hergestellt, dass bei Bildung des Partikels ein geeignetes Verhältnis des gewünschten lichtstreuenden Materials zu dem magnetischen oder ferro-elektrischen Material pro Partikelverhältnis erreicht wird. Dies ist in [Fig. 29C](#) dargestellt.

[0197] Eine Alternative zu den obigen MLSP-Partikeln besteht darin, ein oder mehrere Partikeltypen mit gewünschten Lichtstreueneigenschaften an ein oder mehrere Partikel, die durch ein EMF bewegt werden können, zu verbinden oder zu vereinigen. Derartige Multi-Partikel-Strukturen können dann ähnliche Eigenschaften aufweisen wie die MLSPs. Beispielsweise werden kleine Partikel aus magnetischem oder ferro-elektrischem Material an ein oder mehrere Partikel, deren Lichtstreueneigenschaften detektiert werden, gebunden. Die Bindung erfolgt ionisch, chemisch oder auf irgendeine andere Weise, was zu einer stabilen Multi-Partikel-Struktur führt. Beispielsweise werden die verschiedenen Partikel mit geeigneten Polymeren beschichtet, so dass bei Mischen in einem geeigneten Verhältnis eine definierte Verteilung diskreter Multi-Partikel-Strukturen durch Vernetzung der verschiedenen einzelnen Partikeltypen erreicht wird. Es gibt viele verschiedene Wege, die Partikel miteinander zu verbinden, um die gewünschte(n) Multi-Partikel-Struktur(en) zu erreichen. Zur Veranschaulichung sind einige der möglichen Multi-Partikel-Strukturen in [Fig. 30](#) dargestellt. Die [Fig. 30A](#), B und C zeigen dimere, tetramere bzw. Partikelkonstrukte höherer Ordnung für orientierbare MLSP-Partikel. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass dies lediglich einige der vielen verschiedenen Typen möglicher Multi-Partikel-Strukturen sind, und dass verschiedene Verfahren existieren, derartige Strukturen herzustellen.

[0198] Diese Beispiele von Partikeln, die aus Mischungen eines oder mehrerer Materialien bestehen, stellen nur einige einer sehr großen Anzahl verschiedener Zusammensetzungen aus verschiedenen Materialien dar, die möglich und für einen Fachmann auf dem Gebiet offensichtlich sind.

Partikelgröße und Form-Homogenität

[0199] In Abhängigkeit davon, wie die Lichtstreueneigenschaften der Partikel detektiert werden, kann die ungefähre Größe und Verteilung der Partikelgrößen in der Partikelpopulation extrem wichtig sein. Beispielsweise sind bei vielen der kommerziell erhältlichen Goldpartikel-Präparationen Partikelgrößen-Verteilungen mit einem prozentualen Variations-Koeffizienten von etwa < 10 bis etwa < 20 angegeben. Der prozentuale Variations-Koeffizient ist definiert als Standardabweichung der Partikelgrößen-Verteilung geteilt durch den Mittelwert der Partikelpräparation. Somit beträgt bei einer 60-nm-Partikelpräparation mit einem Variations-Koeffizienten von 20% die Standardabweichung ungefähr ± 12 nm. Das bedeutet, dass etwa 10% der Partikel kleiner sind als 48 nm oder größer als 72 nm. Eine solche Variation der Größe hat signifikante Wirkungen auf die Intensität des Streulichts und die Farbe des Streulichts in Abhängigkeit von der ungefähren "mittleren" Größe der Partikel in der Präparation.

[0200] Der Anmelder entwickelte ein Partikelwachstums-Verfahren, welches engere Größenverteilungen zu ergeben scheint als bei den kommerziell erhältlichen vorliegen. Das Verfahren beinhaltet zunächst die Herstellung einer Präparation von Ausgangs-Goldpartikeln ("Keimen"), und anschließendes "Wachsen" der Ausgangs-Partikelpräparation der Goldpartikel (siehe Beispiele 11 und 15) oder Silberpartikel (Beispiel 13) verschiedener Größe durch chemische Verfahren. Beispielsweise werden Goldpartikel mit einem Durchmesser von 16 nm als "Keim"-Partikel verwendet und Goldpartikel mit größerem Durchmesser durch Zugabe geeigneter Reagenzien hergestellt (siehe Beispiel 15). Dieses Verfahren kann ebenso zur Herstellung von Partikeln gemischter Zusammensetzung angewendet werden.

Partikel-Homogenität – Nachweis von Analyten durch die Streulichtfarbe einzelner Partikel

[0201] In bestimmten Anwendungen wird die Farbe der einzelnen Partikel verwendet, um spezifische Typen von Analyten zu identifizieren und zu quantifizieren. Beispielsweise kann es bei Bildzytometrie-Anwendungen von Interesse sein, verschiedene Typen von Zelloberflächen-Antigenen oder Ähnliches durch Detektion der Anzahl und Farbe verschiedener Partikeltypen, die an der Oberfläche anhaften, zu identifizieren und zu zählen. Bei diesen oder anderen verwandten Typen der Multi-Analyt-Detektion sollten die Größenverteilungen der verschiedenen Partikel so eng wie möglich gehalten werden. Der mittlere Partikeldurchmesser der Partikelpräparation sollte derart ausgewählt werden, dass die gewünschte Farbe des Streulichts unter Weißlichtbestrahlung erhalten wird, wobei eine durchschnittliche oder "mittlere" Partikelgröße, welche so nah wie möglich an dem Größenmittelwert zwischen den mittleren Partikelgrößen der kleineren und größeren Partikel, die in der gleichen Anwendung verwendet werden, um verschiedene Farben des Streulichts zu erzeugen, liegt. Auf diese Weise wird die Auflösbarkeit der verschiedenen Partikeltypen durch die Farbe ihres Streulichts maximiert.

Partikel-Homogenität – integrierte Lichtintensitätsmessungen

[0202] In anderen Abschnitten wurde beschrieben, wie die Intensität von Streulicht in hohem Maße variieren kann, wenn die Partikelgröße erhöht oder vermindert wird. Diese Variation der Intensität muss insbesondere bei Durchführung integrierter Lichtintensitätsmessungen berücksichtigt werden. Bei Verwendung der oben beschriebenen 60-nm-Partikelpräparation mit einem Variations-Koeffizienten von 20% bedeutet dies, dass 10% der Partikel Intensitäten aufweisen, die etwa dreifach höher oder niedriger sind als die eines 60-nm-Partikels. Zudem weisen die Partikel innerhalb der verbleibenden 90% der Population ziemlich variierende Intensitäten auf. Bei Anwendungen, in denen viele Partikel gemessen werden, sollte sich die „mittlere“ integrierte Lichtintensität der eines 60-nm-Partikels annähern. Jedoch kann bei geringeren Partikelkonzentrationen die Statistik einer derartigen Variation die Genauigkeit der Ablesung von Probe zu Probe beeinflussen, wodurch Korrektur-Algorithmen notwendig werden könnten. Durch Verwendung der engst möglichen Partikelverteilung wird die Genauigkeit und Einfachheit der Messung erhöht.

Geeignete metallartige Partikel zur Detektion von Analyten durch ihre Lichtabsorptionsfarbe

[0203] Bei einigen Typen von Analyt-Assays liegen die Analyten in Konzentrationen vor, bei denen die Detektion der Analyten durch die Lichtabsorptionseigenschaften erreicht werden kann. Beispielsweise besteht ein derzeitiges Problem auf dem Gebiet der immunochromatographischen Assays und Ähnlichem darin, dass die Verwendung von Goldpartikeln der üblicherweise verwendeten Größen (4 bis 50 nm Durchmesser) lediglich Partikel ergibt, die nicht durch ihre Lichtabsorptionsfarbe optisch aufgelöst werden können. Diese Partikel besitzen bei Beobachtung auf einem Filterpapier oder ähnlichem Festphasenmedium eines diagnostischen Assays eine rosa bis rote Farbe. Durch Variieren der Größe und/oder Form von Silberpartikeln und anderen metallartigen Partikeln können viele verschiedene Lichtabsorptionsfarben erreicht werden. Diese verschiedenen Farben der Partikel durch Lichtabsorption können verwendet werden, um verschiedene Analyten durch die Lichtabsorptionsfarbe eines Partikels zu detektieren. Diese Farben, die durch das Auge detektiert werden können, können in vielen Typen von Festphasen-Assays, wie beispielsweise immunochromatographischen Durchfluss-Assays, Platten-Assays und Mikroarray-Assays oder größeren Einzel- oder Multi-Analyt-Festphasen-Assays, ausgenutzt werden. Sphärische und asymmetrische Partikel aus Silber und bestimmte gemischte Zusammensetzungen anderer metallartiger Partikel ermöglichen einen breiten Farbbereich durch Lichtabsorption.

Autometallographische Verstärkung von Lichtstreueneigenschaften von Partikeln

[0204] Auf dem Gebiet ist bestens bekannt, dass Autometallographie und verwandte Techniken angewendet werden können, um die Größe existierender metallartiger Partikel um kleine oder große Faktoren zu erhöhen. Das Lichtabsorptionsvermögen von Partikeln, die aus Metall und/oder Halbleitermaterial zusammengesetzt sind, und insbesondere von Gold- und Silberpartikeln, wurde oftmals verwendet, um diese Partikel zu quantifizieren oder ihre Anwesenheit nachzuweisen, entweder durch das Auge oder unter Verwendung einer Vorrichtung, die zum Messen von Lichtabsorption konstruiert ist. Ein solches Verfahren ist den Lichtstreuungs-Detectionsverfahren der vorliegenden Erfindung bezüglich der Fähigkeit, kleine Mengen von durch Metallographie vergrößerter Partikeln nachzuweisen, unterlegen.

[0205] Beispielsweise wurde die Vergrößerung von Goldpartikeln mit 1 nm Durchmesser durch metallographische Verfahren, die Beschichtung der Goldpartikel von 1 nm Durchmesser mit Silber bis zu einem mittleren Durchmesser von ungefähr 110 nm in ungefähr 20 Minuten beschrieben (siehe Immunogold-Silver Staining, Principles, Methods and Applications, CRC Press, 1995, M. A. Hayat Ed.). Die Partikel in dieser Präparation besaßen eine Größe im Bereich von etwa 40 nm bis 200 nm Durchmesser und eine in etwa sphärische Form. Überraschenderweise zeigten diesseitige Berechnungen, dass eine Vergrößerung des Durchmessers des Tracer-Partikels mit 1-nm-Kern auf 110 nm zu einem Anstieg der Streukraft von ungefähr 10^{10} führt, während das Lichtabsorptionsvermögen lediglich um etwa 10^5 erhöht wird.

[0206] Durch Erhöhung des Durchmessers kleiner Partikel verschiebt sich die einfallende Wellenlänge, bei der eine maximale Lichtstreuung auftritt, in Richtung längerer Wellenlängen im Vergleich zu einem kleinen Kernpartikel des gleichen Materials. Somit werden vergrößerte Partikel leicht in Anwesenheit oder Abwesenheit kleiner 1-nm-Partikel durch Messen des Lichtstreuesignals der vergrößerten Partikel detektiert. Die Verwendung von einfallendem Licht der Wellenlänge, bei der bei den vergrößerten Partikeln eine maximale Streuung auftritt, zur Detektion der vergrößerten Partikel, ermöglicht die spezifischere Detektion der vergrößerten Partikel im Vergleich zu den kleineren Partikeln, welche die Hauptquelle des nicht-spezifischen lichtstreuenden Hintergrunds bilden.

Tabelle 14

BERECHNETE STREUEIGENSCHAFTEN SPHÄRISCHER PARTIKEL GEMISCHTER ZUSAMMENSETZUNG – PARTIKEL MIT SILBERKERN, BESCHICHTET MIT GOLD ODER POLYSTYROL (PST)

	Partikel-durch-messer	Durchmes-ser des Silberkerns	Zusammen-setzung der Beschichtung	Dicke der Beschich-tung	Vol. Silber/Gesamt-Vol.	C_{sca} beim Wellenlän-gen-Maximum (cm^2)	Einfallende Wellenlän-ge am Streuma-ximum
<u>A</u>	10 nm	10 nm	--	0	--	$1,1 \times 10^{-14}$	~ 384 nm
	14 nm	10 nm	Gold	2 nm	0,36	$4,5 \times 10^{-15}$	~ 372 nm
	20 nm	10 nm	Gold	5 nm	0,125	$6,5 \times 10^{-15}$	~ 525 nm
<u>B</u>	10 nm	10 nm	--	0	1	$1,1 \times 10^{-14}$	~ 384 nm
	10 nm	9 nm	Gold	0,5 nm	0,73	$1,9 \times 10^{-15}$	~ 384 nm
	10 nm	7 nm	Gold	1,5 nm	0,34	$5,6 \times 10^{-16}$ $6,8 \times 10^{-16}$	~ 300 nm ~ 520 nm
<u>C</u>	(a) 10 nm PST	0	--	0	--	$1,3 \times 10^{17}$	~ 300 nm
	10 nm	10 nm	--	0	0	$1,1 \times 10^{-14}$	~ 384 nm
	(a) 20 nm PST	0	--	0	--	$8,3 \times 10^{-16}$	~ 300 nm
	20 nm	20 nm	--	0	1	7×10^{-13}	~ 382 nm
	40 nm	20 nm	PST	10 nm	0,125	$9,3 \times 10^{-13}$	~ 412 nm
	60 nm	20 nm	PST	20 nm	0,037	$1,25 \times 10^{-12}$	~ 418 nm
	20 nm	12 nm	PST	4 nm	0,216	4×10^{-14}	~ 408 nm
	20 nm	10 nm	PST	5 nm	0,125	$1,4 \times 10^{-14}$	~ 410 nm
	20 nm	8 nm	PST	6 nm	0,064	$4,3 \times 10^{-13}$	~ 414 nm

(a) Nur aus Polystyrol bestehendes Partikel

[0207] Tabelle 15 liefert zusätzliche Daten bezüglich der Lichtstreuereigenschaften kleiner Partikel, deren Größe durch metallographische oder verwandte Verfahren erhöht wurde. Die berechneten Daten zeigen, dass eine Erhöhung der Größe eines Partikels zu einem größeren Anstieg der Lichtstrekraft im Vergleich zu seinem Lichtabsorptionsvermögen führt. Beispielsweise wird durch einen Anstieg des Partikeldurchmessers um 20% die Lichtstrekraft eines kleinen Partikels um $(1,2)^6$ oder das etwa Dreifache erhöht. Eine Erhöhung des Durchmessers kleiner Partikel um das 2- und 10-fache führt zu einem Anstieg der Streukraft um das etwa 64-fache bzw. 1.000.000-fache, während das Lichtabsorptionsvermögen um nur das 8-fache bzw. 1000-fache erhöht wird.

[0208] Wenn somit das Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet wird, um Partikel zu quantifizieren oder ihre Anwesenheit zu detektieren, welche zuvor durch Metallographie vergrößert wurden (d. h., die Abscheidung einer Beschichtung aus metallartigem Material auf ein Partikel mit kleinem Durchmesser, bestehend aus metallartigen oder nicht-metallartigen Materialien), ist es möglich, kleinere Mengen derartiger Partikel nachzuweisen und kleinere Mengen derartiger Partikel spezifischer nachzuweisen als es bisher möglich war.

[0209] Oben wurde die Kombination metallographischer Vergrößerung metallartiger Partikelkerne durch Ab-

scheidung einer metallartigen Beschichtung auf dem Kern und anschließende Detektion der vergrößerten Partikel durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung veranschaulicht. Derartige Verfahren können zum Vergrößern von Partikeln verwendet werden, die frei in Lösung vorliegen und/oder von Partikeln, die an einer Oberfläche anhaften. Das vorangegangene Beispiel stellt lediglich eines der vielen verschiedenen Permutationen dieses Kombinationsverfahrens dar, welche die Verwendung vieler verschiedener hierin diskutierter Strategien und Verfahren zum Nachweis von Partikeln durch Lichtstreuung sowie verschiedene Kombinationen von Kern- und Beschichtzungszusammensetzungen und verschiedene Vergrößerungsgrade beinhalten. Diese verschiedenen Kombinationen sind für einen Fachmann auf dem Gebiet leicht ersichtlich. Ein derartiger Kombinationsansatz kann auf nahezu jede Situation angepasst/angewendet werden, in der es wünschenswert ist, ein Signalerzeugungs- und -detektionssystem zum Nachweis eines Analyten zu verwenden.

Tabelle 15

GOLD-TRACER-KERNPARTIKEL VON 2 NM DURCHMESSER – VERSCHIEDENE DICKEN EINER SILBERBESCHICHTUNG GLEICHMÄSSIGER DICKE – BERECHNETE LICHTSTREUEIGENSCHAFTEN

Durchmesser des Partikels	Dicke der Silberbeschichtung	Lichtstreu-kraft des Partikels (C_{sca}) (cm^2)	Wellenlänge, bei der ein Streumaximum auftritt	Relative Streulichtintensität der Partikel	Relativer dekadischer molarer Extinktions-Koeffizient des Partikels
2 nm	0 nm	$\sim 8 \times 10^{-20}$	$\sim 520 \text{ nm}$	1	1
10 nm	4 nm	$\sim 10^{-14}$	$\sim 382 \text{ nm}$	$\sim 1,25 \times 10^5$	$\sim 3 \times 10^2$ (a)
20 nm	9 nm	$\sim 6,5 \times 10^{-13}$	$\sim 384 \text{ nm}$	$\sim 8,1 \times 10^6$	$\sim 2,3 \times 10^3$
40 nm	19 nm	$\sim 2,8 \times 10^{-11}$	$\sim 400 \text{ nm}$	$\sim 3,5 \times 10^8$	$\sim 1,6 \times 10^4$
80 nm	39 nm	$\sim 2,9 \times 10^{-10}$	$\sim 447 \text{ nm}$	$3,6 \times 10^9$	$\sim 5,8 \times 10^4$
100 nm	49 nm	$\sim 4,3 \times 10^{-10}$	$\sim 481 \text{ nm}$	$\sim 5,4 \times 10^9$	$\sim 7,6 \times 10^4$
150 nm	74 nm	$\sim 7,9 \times 10^{-10}$	$\sim 432 \text{ nm}$	$\sim 9,9 \times 10^9$	$\sim 1,5 \times 10^5$
150 nm	74 nm	$7,6 \times 10^{-10}$	$\sim 600 \text{ nm}$	$\sim 9,5 \times 10^9$	$\sim 1,2 \times 10^5$

(a) Der molare dekadische Extinktions-Koeffizient, der C_{sca} -Wert und die einfallende Wellenlänge, bei der maximale Lichtstreuung auftritt, sind im Wesentlichen identisch zu denen eines reinen Silberpartikels mit 10 nm Durchmesser.

Verfahren zur Verstärkung des Brechungsindex

[0210] Die Anwendung von Brechungsindex-Angleichtechniken in der Lichtmikroskopie, dem Bereich der Telekommunikation und anderen verwandten Bereichen ist bestens bekannt. Diese Technik wird im Allgemeinen verwendet, um nichtspezifische Lichtstreuung und Reflexionen herabzusetzen, die auftreten, wenn ein Lichtstrahl von einem Medium oder einer Vorrichtung in ein anderes Medium oder eine andere Vorrichtung, beispielsweise von der Oberfläche eines Materials in die Oberfläche eines anderen Materials, eintritt.

[0211] Die Anmelder fanden heraus, dass die Lichtstreuung (C_{sca}) eines spezifischen Partikeltyps durch das Medium, in dem das Partikel vorliegt, beeinflusst wird. Eine Veränderung des Brechungsindex des Mediums führt zu einer Änderung der Lichtstreuereigenschaften des Partikels.

[0212] Tabelle 16 liefert ein illustratives Beispiel der Effekte des Brechungsindex des Mediums auf ausgewählte Partikel. Es sind die berechneten Effekte des Brechungsindex des Mediums für sphärische Gold-, Silber- und Polystyrolpartikel von 10 nm Durchmesser dargestellt.

[0213] Die Effekte des Brechungsindex des Mediums bei metallartigen Partikeln unterscheiden sich völlig von denen nicht-metallartiger Partikel, wie aus Tabelle 16 hervorgeht. Eine Erhöhung des Brechungsindex des Mediums bei metallartigen Partikeln, wie beispielsweise Gold, führt zu einem Anstieg der Intensität und des Wel-

Wellenlängenmaximums des Lichts, welches von dem Partikel gestreut wird, während, im Fall eines nicht-metallartigen Partikels, wie beispielsweise Polystyrol, die Lichtstreuraft herabgesetzt wird.

[0214] Die einzigartigen Lichtstreuereigenschaften von metallartigen Partikeln im Vergleich zu nicht-metallartigen Partikeln als Wirkung des Brechungsindex des Probenmediums können verwendet werden, um metallartige Partikel in Proben, einschließlich solcher, welche einen hohen nichtspezifischen Lichtbrechungshintergrund aufweisen, mit höherer Spezifität und größerer Sensitivität nachzuweisen. Dies ist für viele verschiedene Typen diagnostischer analytischer Assays von Bedeutung.

Tabelle 16

BERECHNETE BRECHUNGSSINDEX-EFFEKTE DES MEDIUMS FÜR PARTIKEL MIT 10 NM DURCHMesser VERSCHIEDENER ZUSAMMENSETZUNG WELLENLÄNGEN- UND INTENSITÄTSEFFEKTE

Gold			Silber		Polystyrol	
N ₁	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
1	1	520 nm	1	355 nm	1	400 nm
1,1	1,9	525 nm	1,6	360 nm	0,9	400 nm
1,2	3,9	525 nm	2,3	370 nm	0,75	400 nm
1,3	7,7	530 nm	2,9	380 nm	0,52	400 nm
1,4	15,1	535 nm	3,9	390 nm	0,27	400 nm
1,5	27,7	540 nm	5,3	400 nm	0,084	400 nm
1,6	45,4	550 nm	7,3	415 nm	~ 0	--
1,7	71,5	555 nm	9,7	425 nm	0,1	400 nm

(A) = Relative Streukraft bei verschiedenen Brechungsindices des Mediums

(B) = Wellenlänge, bei der ein Streumaximum auftritt

N₁ = Brechungsindex des Mediums

[0215] In vielen Probentypen und diagnostischen Assay-Formaten ist das Problem nichtspezifischen gestreuten, reflektierten oder anderen Hintergrundlichts von den Probenbehältnissen und Probenbestandteilen, bei denen es sich nicht um den Analyten handelt, bestens bekannt. Diese nichtspezifischen Lichthintergründe machen es schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, sensitive bis ultrasensitive Detektion von Analyten durch Detektion und/oder Messung der Streulichteigenschaften eines Partikels durchzuführen.

[0216] Der Anmelder fand heraus, dass unter Anwendung des Verfahrens der Brechungsindex-Verstärkung metallartige Partikel mit deutlich größerer Spezifität und Sensitivität im Vergleich zu nicht-metallartigen Partikeln detektiert werden können. Das Verfahren wird im Folgenden beschrieben. Die Wirkung des Brechungsindex des Partikels und des Mediums auf die Streulichtintensität kann unter Anwendung folgender Formel bewertet werden (RI ist der Brechungsindexfaktor)

$$RI = refmed^4 \left| \frac{m^1 - 1}{m^2 + 2} \right|^2 \quad (16)$$

wobei refmed der Brechungsindex des Mediums ist, und m gleich dem Brechungsindex des Partikels/refmed ist. m ist stark abhängig von der Wellenlänge; die exakte Abhängigkeit variiert jedoch mit der Partikelzusammensetzung und dem Medium. Der Brechungsindex der meisten Lösungsmittel, welche keine Farbe aufweisen, ist gewöhnlich unabhängig von der Wellenlänge, zumindest im sichtbaren Bereich des Spektrums.

[0217] Bei der Verwendung lichtstreuender Partikel in sensitiven Assays ist es von Interesse, zu bestimmen, welche Brechungsindexwerte zu höheren Lichtstreuintensitäten führen. Dies wird anhand des Brechungsindexfaktors (RI) der Gleichung (16) bestimmt. Dieser Faktor nimmt seinen höchsten Wert an, wenn der Nenner

von Gleichung (16) Null ist. Unter dieser Bedingung besitzt der Brechungsindexfaktor einen unendlichen Wert. Somit ist die Bedingung bei hoher Lichtstreuung

$$m^2 + 2 = 0 \quad (17)$$

[0218] Nach Auflösung der obigen Gleichung nach m erhält man

$$m = \sqrt{-2} \quad (18)$$

$$= 1,41i \quad (19)$$

wobei i gleich $\sqrt{-1}$ ist. Die obige Gleichung zeigt, dass der Brechungsindexfaktor seinen höchsten Wert annimmt, und die Lichtstreuung von dem Partikel ein Maximum erreicht, wenn der Brechungsindex eine rein imaginäre Zahl mit einem Wert von 1,41 ist. Die in Tabelle 16 dargestellten berechneten Daten zeigen diese erwartete Tendenz. Außerdem funktioniert das Verfahren der Brechungsindexverstärkung sehr gut bei einfallenden Wellenlängen, die weit entfernt liegen von der Einfallswellenlänge, bei der maximale Lichtstreuung für metallartige Partikel auftritt.

[0219] Im Folgenden wird ein illustratives Beispiel für die Anwendung des Verfahrens der Brechungsindexverstärkung gegeben. In hoch brechenden Proben, wie beispielsweise Proben, in denen ein hohes Niveau nichtspezifischer Hintergrundstreuung auftritt, werden metallartige Partikel und das Verfahren der Brechungsindexverstärkung folgendermaßen angewendet.

[0220] Der Fachmann auf dem Gebiet erhöht den Brechungsindex des Probenmediums beispielsweise durch Platzieren eines Films aus Wasser oder einer anderen Flüssigkeit auf einer trockenen oder nassen Probe. Dadurch wird der Brechungsindex des Mediums erhöht. In einem anderen Beispiel wird ein Serum oder ein anderer Typ einer stark streuenden Probe mit einer Flüssigkeit mit hohem Brechungsindex verdünnt, wodurch der Brechungsindex des Mediums wesentlich erhöht wird.

[0221] In den oben erwähnten Beispielen finden folgende Prozesse statt. Das spezifische Lichtstreuesignal der metallartigen Partikel erhöht sich, und die nicht-spezifische Hintergrundstreuung wird vermindert, wenn der Brechungsindex der Probe erhöht wird. Die stärksten Anstiege bezüglich des Verhältnisses von Partikellichtstreuung/nicht-spezifischer Hintergrundstreuung wird erreicht, wenn der Brechungsindex des Probenmediums sich dem Brechungsindex des metallartigen Partikels annähert, wie in Tabelle 16 gezeigt. Das bedeutet, dass bei geeigneten Brechungsindexwerten des Mediums die nichtspezifische Lichtstreuung von Serumproteinen oder ähnlichen Komponenten signifikant reduziert oder eliminiert werden kann, während die spezifische Lichtstreuintensität der Partikel erhöht wird. Dies führt zu einem verbesserten Analytdetektionssignal/Hintergrund-Verhältnis, wenn die Lichtstreueneigenschaften der metallartigen Partikel als analytischer Tracer verwendet werden. Diese Verfahren können auf Proben, wie beispielsweise trockene Oberflächen, mit Lösung bedeckte Oberflächen oder Lösungen, angewendet werden.

[0222] Diese Indexabgleichverfahren können ebenso bei längeren Wellenlängen bei metallartigen Partikeln angewendet werden, um das Verhältnis von spezifischem Streulichtsignal/nicht-spezifischer Hintergrundstreuung noch weiter zu erhöhen. Während in Tabelle 16 lediglich die Effekte für Gold- und Silberpartikel dargestellt sind, können ebenso Partikel, die aus anderen metallartigen Materialien bestehen, verwendet werden, um kleinere Partikelmengen unter Anwendung der beschriebenen Verfahren zu detektieren. Das hierin beschriebene Verfahren zur Brechungsindexverstärkung stellt lediglich eines der vielen möglichen Variationen zur Durchführung der Erfindung dar. Es sind viele weitere Variationen des Verfahrens möglich und für einen Fachmann auf dem Gebiet offensichtlich. Die eine oder andere dieser Variationen kann effektiv in den meisten diagnostischen Formaten verwendet werden, um das Vorliegen oder die Abwesenheit eines Analyten zu bestimmen. Dieser Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein Mittel zum Nachweis kleinerer Partikelmengen und zur spezifischeren Detektion kleinerer Partikelmengen und zur spezifischeren Detektion kleinerer und größerer Partikelmengen als es bisher möglich war, zur Verfügung.

[0223] Ein Verfahren der vorliegenden Erfindung, in dem die Brechungsindexverstärkung mit dem Schmalband-Durchgangsfilter-Ansatz, welcher zuvor beschrieben wurde, kombiniert ist, ist in hohem Maße geeignet zur Detektion kleinerer und größerer Mengen an Partikeln als es bisher möglich war. Diese Ansätze sind komplementär. Das Verfahren der Brechungsindexverstärkung wird verwendet, um nichtspezifische Hintergrundstreuung herabzusetzen, während der Schmalfilter verwendet wird, um andere Quellen nichtspezifischen Hintergrundlichts, wie beispielsweise Fluoreszenz und ähnliches, zu reduzieren und zu minimieren. Eine Kombi-

nation dieser Verfahren führt zu hoch optimierten Verhältnissen des spezifischen Partikelstreuesignals zu nicht-spezifischem Lichthintergrund und ermöglicht eine spezifischere und sensitivere Detektion von Partikeln.

[0224] Das obige Beispiel stellt lediglich eines der vielen möglichen Variationen dieses kombinierten Verfahrens dar. Andere Variationen sind für einen Fachmann auf dem Gebiet offensichtlich.

Detection of light-scattering particles in highly scattering and fluorescent samples – Serum

[0225] Säugetierserum enthält viele medizinisch wichtige Substanzen, deren Quantifizierung und/oder Bestimmung der Anwesenheit im klinischen Labor und an anderer Stelle durchgeführt wird. Es werden viele verschiedene Signalerzeugungs- und -detektionssysteme verwendet, um die Anwesenheit dieser Analyten im Serum zu bestimmen; dazu zählen Lichtsignalerzeugungsverfahren, wie beispielsweise Fluoreszenz, Lichtstreuung und Chemilumineszenz, sowie kolorimetrische Verfahren, welche in Formaten verwendet werden, die sowohl direkte Markierungs- als auch Signalamplifikationsverfahren beinhalten. Natürliches Serum enthält eine Vielzahl von Substanzen, die ein nicht-spezifisches Lichtsignal entweder durch fluoreszierende, chemilumineszierende oder lichtstreuende Mechanismen produzieren können. Des Weiteren enthält das Serum oftmals Substanzen, welche die Erzeugung und/oder Detektion dieser spezifischen Lichtsignale von der Tracer-Entität stören. Dadurch wird es schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, Analytdetektion in reinen oder nahezu reinen Serumproben durchzuführen.

[0226] Um die meisten, wenn nicht alle, der existierenden Testsysteme zum Nachweis von Serumanalyten effektiv anwenden zu können, ist es meistens notwendig, das Serum auf irgendeine Weise aufzuarbeiten, um es für einen Test geeignet zu machen. Es existieren viele derartiger Serumaufarbeitungsmethoden; die einfachste ist wahrscheinlich die Verdünnung des Serums zu einer geeigneten Lösung, die gewöhnlich wässriger Natur ist. Ein weiterer üblicherweise verwendeter Ansatz ist die Durchführung der tatsächlichen Tests derart, dass die unerwünschten Serumkomponenten entfernt werden, bevor die Anwesenheit des spezifischen lichtproduzierenden Tracers bestimmt wird. Im Hinblick auf die Kosten und den Aufwand ist es um so besser, je weniger Arbeitsschritte und Reagenzien zur Durchführung des Tests erforderlich sind. Es ist in hohem Maße wünschenswert, die Probe überhaupt nicht vorbereiten zu müssen. Dies könnte sich ebenso vorteilhaft auf die Leistung des Tests auswirken. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt ein Mittel zur Verfügung, um derartige Analyttests in nahezu reinem Serum durchzuführen, und stellt außerdem ein Mittel zur Verfügung, um kleinere oder größere Mengen an Partikeln spezifischer in hohen Serumkonzentrationen nachzuweisen als es bisher möglich war.

[0227] Beispielsweise ist es üblich, Serumproben bis zu einer Endkonzentration von ungefähr 5% Serum zu verdünnen, bevor es mit einem fluoreszierenden Tracer, wie beispielsweise Fluoreszin, analysiert wird. Die Serumprobe wird mit monochromatischem Licht bei 490 nm bestrahlt und optische Filter werden verwendet, um nichtspezifische Hintergrundstreuung zu minimieren. Das nichtspezifische Lichtsignal ist äquivalent zu einer hoch reinen Flüssigprobe von Fluoreszin, welche 10^{-8} M bis 10^{-9} M Fluoreszin enthält. Somit kann in der 5%igen Serumprobe 10^{-8} M bis 10^{-9} M Fluoreszin mit einem Störabstand („signal-to-noise-ratio“) von 2 detektiert werden. In einer 95%igen Serumprobe wäre die untere Detektionsgrenze von Fluoreszin ungefähr 19 mal höher oder etwa $1,9 \times 10^{-7}$ M bis $1,9 \times 10^{-8}$ M. Somit beträgt in 95%-igem Serum mit optischem Filtern die untere Detektionsgrenze von Fluoreszin ungefähr $1,9 \times 10^{-7}$ M bis $1,9 \times 10^{-8}$ M, und diese Menge an Fluoreszin-Lichtsignal führt zu einem Verhältnis von Gesamt-Lichtsignal zu nicht-spezifischem Lichtsignal von etwa 2 zu 1.

[0228] Tabelle 17 zeigt die experimentell messbaren Detektionsgrenzen von Fluoreszin bei einem Verhältnis von Gesamt-Lichtsignal zu nicht-spezifischem Lichtsignal von 2 zu 1 bei sehr hoher Serumkonzentration. Bei dieser hohen Serumkonzentration und in Abwesenheit optischen Filters zur Entfernung nichtspezifischer Lichtsignale auf Grund von gestreutem Einfallslicht beträgt die untere Nachweisgrenze von Fluoreszin ungefähr 6×10^{-7} M.

[0229] Tabelle 18 zeigt die untere Detektionsgrenze von Fluoreszin bei sehr hoher Serumkonzentration, wenn ein optischer Filter, welcher nicht-spezifische Lichtsignale auf Grund von Streuung des Einfallslichts eliminiert, zwischen der Probe und der Photoelektronenvervielfacher-Röhre platziert wird. In diesem Fall beträgt die untere Detektionsgrenze von Fluoreszin bei hoher Serumkonzentration ungefähr 2×10^{-8} M.

[0230] Im Gegensatz zu Fluoreszin zeigen die in Tabelle 17, Abschnitt B, und Tabelle 18 dargestellten Ergebnisse, dass bei Nichtdurchführung optischen Filters die Anwesenheit von Goldpartikeln mit einem Durchmesser von 59,6 nm in 95%igem Serum mit einem Verhältnis von Gesamt-Lichtsignal zu nicht-spezifischem Licht-

signal von 2 zu 1 bei einer Konzentration von ungefähr $1,8 \times 10^{-12}$ M detektiert werden kann. Das in dem Serum beobachtete nicht-spezifische Lichtsignal war äquivalent zu dem von ungefähr 5×10^{-7} M Fluoreszin. Unter diesen gleichen Bedingungen können Polystyrolpartikel von 60 nm Durchmesser in hohen Serumkonzentrationen nur mit einer unteren Grenze von etwa 6×10^{-9} M detektiert werden (Tabelle 18).

Tabelle 17

DETEKTION VON GOLDPARTIKELN MIT 59,6 NM DURCHMESSER BEI HOHER SERUMKONZENTRATION

	Prozent Serum	Goldpartikel-konzentration	Einfallende Wellenlänge	Fluoreszin-konzentration	Relative Lichtintensität
A	97,8 %	0	490 nm	0	102
	95,7 %	0	490 nm	$8,7 \times 10^{-6}$ M	15,8
	97,8 %	0	545 nm	0	0,52
	95,7 %	0	545 nm	$8,7 \times 10^{-6}$ M	0,56
B	97,8 %	0	490 nm	0	0 ^(c)
	95,8 %	$1,77 \times 10^{-12}$ M	40 nm	0	1,1
	97,8 %	0	543 nm	0	0,55
	95,8 %	$1,77 \times 10^{-12}$ M	543 nm	0	105

[0231] Fötales Kälberserum, bezogen von Biowhitaker, Walkerville, MD, Katalog Nummer 14-501F. Das Serum wurde vor dem Verkauf durch einen Mikronfilter passiert und war klar, aber strohgelb. Der pH-Wert des Serums wurde auf etwa pH 9 bis 9,5 eingestellt.

[0232] Es erfolgte keine Wellenlängenfiltration des emittierten Lichts.

(a) Das hier erhaltene Lichtsignal stellt einen Wert von 1 dar. Dieses Signal war äquivalent zu $3,7 \times 10^{-7}$ M Fluoreszin.

Tabelle 18

UNTERE DETEKTIONSGRENZE VON FLUORESZIN, GOLD- UND POLYSTYROLPARTIKELN BEI 92,8%IGER SERUMKONZENTRATION

Prozent Serum	Fluoreszin-konzentration	Typ und Konzentration der Partikel	Einfallen-de Wellen-länge	Filter zur Emission	Relative Signal-intensität
92,8	0	0	554 nm	nein	1 (~520 mv) ^(b)
92,8	0	Gold $1,8 \times 10^{-12}$ M	554 nm	nein	2,1 (~1100 mv)
92,8	0	0	496 nm	ja ^(a)	1 (~39 mv)
92,8	$2,3 \times 10^{-8}$	0	496 nm	ja	~2 (~79 mv)
92,8	0	0	554 nm	nein	1 (~468 mv)
92,8	0	PST 6×10^{-9} M	554 nm	nein	~2 (~960 mv)

[0233] Polystyrol (PST)- und Goldpartikel besaßen einen gemessenen Durchmesser von 60 nm bzw. 59,6 nm. Der pH-Wert der Fluoreszin-enthaltenden Lösungen wurde vor der Messung auf pH 9–10 eingestellt. Die maximale Lichtintensität in dem Serum wurde bei einer einfallenden Wellenlänge von ungefähr 496 nm für Flu-

oreszin und ungefähr 554 nm für die 59,6-nm-Goldpartikel beobachtet.

(a) Das von der Probe emittierte Lichtsignal wurde durch einen Wratten-Filter Nr. 16 geleitet, bevor es auf die Photoelektronenvervielfacher-Röhre traf.

(b) Die instrumentalen Messungen wurden jeweils mit identischen Instrumenteneinstellungen erhalten und sind direkt miteinander vergleichbar (mv = Millivolt).

(c) Die Lichtdetektionsvorrichtung detektiert die Fluoreszin-Emission leicht effizienter als das von Partikeln emittierte Licht. Außerdem ist das einfallende monochromatische Licht mit horizontal polarisiertem Licht angereichert, wodurch die Ergebnisse für die Partikel auf Grund eines geringeren Niveaus der von den Partikeln ausgehenden Lichtstreuung reduziert werden; die Fluoreszin-Lichtintensität wird jedoch nicht beeinflusst. Der Gesamtinstrumentfehler gegenüber dem Fluoreszin-Signal beträgt ungefähr das 1,5- bis 2-fache.

[0234] Die in Tabelle 19 dargestellten Ergebnisse zeigen einen Vergleich der relativen Detektionsgrenzen (bei einem Verhältnis des Gesamt-Lichtsignals zu nicht-spezifischem Lichtsignal von ungefähr 2 zu 1) von Goldpartikeln mit 100 nm Durchmesser, Polystyrolpartikeln mit 110 nm Durchmesser und Polystyrolpartikeln mit 110 nm Durchmesser, enthaltend 4.400 Moleküle einer hoch fluoreszierenden Verbindung pro Partikel, in 95,7%igem Serum. Diese Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Goldpartikel mit 100 nm Durchmesser in sehr viel geringeren Konzentrationen detektiert werden können als Partikel mit 110 nm Durchmesser, bestehend aus Polystyrol oder Polystyrol, welches eine große Anzahl an Molekülen einer hoch fluoreszierenden Verbindung enthält. Die Goldpartikel können in Serum mit etwa 230-fach geringerer Konzentration als die anderen nicht-metallartigen Partikel detektiert werden.

[0235] In Tabelle 20 ist die Menge an Streulicht, gemessen an identischen Konzentrationen von 59,6-nm-Goldpartikeln in einer Lösung, welche eine hohe Konzentration an Serum enthält, und einer Lösung, welche nur Wasser enthält, unter den gleichen Beleuchtungsbedingungen verglichen. Unter diesen Bedingungen war eine Goldpartikelkonzentration von $1,8 \times 10^{-12}$ M bei einem Signal/Hintergrundverhältnis von etwa 3 detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von Serum oder irgendeinem der üblichen Bestandteile anscheinend keine direkte Wirkung auf die Lichtstreuung der Goldpartikel hat. Diese Stabilität und Trägheit der Lichtstreuereigenschaften metallartiger Partikel machen sie extrem geeignet in Proben, wie beispielsweise Serum und anderen verwandten Proben, welche viele andere Komponenten enthalten.

[0236] Der Nachweis von sphärischen Polystyrol- oder Goldpartikeln von 100 nm Durchmesser in Serum liefert ein weiteres illustratives Beispiel.

[0237] Säugetierserum enthält ungefähr 3,7 Gramm-Prozent Protein, wovon etwa zwei Drittel Serumalbumin sind. Der Nachweis von Polystyrolpartikeln in Serum wird durch nichtspezifische Lichtstreuung, welche von Proteinen und anderen Substanzen im Serum sowie aus vielen anderen Quellen stammt, behindert. Die Ähnlichkeit der Profile von Lichtstreuintensität versus einfallende sichtbare Wellenlänge für Polystyrolpartikel und die Proteine und andere im Serum vorliegende Substanzen begrenzen in hohem Maße die Möglichkeit, die Polystyrolpartikel in Serum oder irgendeinem anderen hoch streuenden Medium nachzuweisen.

Tabelle 19

NACHWEIS VON GOLDPARTIKELN, POLYSTYROL(PST)-PARTIKELN UND POLYSTYROLPARTIKELN, WELCHE EINE FLUORESZIERENDE VERBINDUNG ENTHALTEN, BEI HOHER SERUMKONZENTRATION

Prozent Serum	Partikeldurchmesser und Zusammensetzung	Partikelmolarität	Einfallende Wellenlänge	Relative Lichtintensität
100 %	0	0	490 nm	1 ^(e)
			580 nm	0,27
95,7 %	110 nm PST ^(b)	$1,9 \times 10^{-11}$ M	490 nm	1,9
			580 nm	0,54
95,7 %	110 nm PST ^(a) + Fluor	$1,9 \times 10^{-11}$ M	490 nm	2,2
			580 nm	0,54
95,7 %	110 nm Gold ^(c)	$8,2 \times 10^{-14}$ M	496 nm	1,1
			580 nm	0,59

(a) Erhalten von Interfacial Dynamics Corp., Portland, Oregon. Jedes Partikel enthält im Durchschnitt etwa 4.400 fluoreszierende Moleküle. Die Erregungs- und Emissions-Maxima der fluoreszierenden Moleküle betragen 490 nm bzw. 515 nm. Die Konzentration der fluoreszierenden Verbindung in dem Partikel beträgt ungefähr 3×10^{-2} M.

(b) Erhalten von Interfacial Dynamics Corp.

(c) Hergestellt durch auf dem Gebiet bekannte Verfahren.

(d) Es wurde keine Wellenlängenfiltration des emittierten Lichts durchgeführt.

(e) Das beobachtete Lichtsignal stellt einen Wert von 1 dar. Alle anderen Werte beziehen sich auf diesen Wert. Das Signal ist äquivalent zu dem, welches von ungefähr 2×10^{-7} M Fluoreszin ausgeht.

Tabelle 20

SIGNALERZEUGUNG VON GOLDPARTIKELN MIT 59,6 NM DURCHMESSER BEI HOHER SERUMKONZENTRATION UND BEI NULL % SERUMKONZENTRATION

Prozent Serum	Goldpartikel-Konzentration	Einfallende Wellenlänge	Relative Gesamt-Signalgröße
0	$1,8 \times 10^{-12}$ M	543 nm	1
95,7 %	0	543 nm	0,58
95,7 %	$1,8 \times 10^{-12}$ M	543 nm	1,38

[0238] Die Goldpartikel besaßen einen gemessenen Durchmesser von jeweils 59,6 nm. 95,7%iges Serum ist strohgelb und besitzt eine optische Dichte bei 1 cm Weglänge und einer Wellenlänge von 543 nm von ungefähr 0,14. Die Grenzstreuungs-Messungen wurden in einer 6 mm × 50 mm Glasküvette mit einem inneren Durchmesser von etwa 5 mm durchgeführt. Es wird geschätzt, dass die Lichtabsorbanz durch das Serum das Streulichtsignal um ungefähr 15% reduziert.

[0239] Die Verwendung einer einfallenden Wellenlänge von 575 nm anstelle von 300 nm zur Beleuchtung des Serums führt zu einer etwa 13-fachen Reduzierung des nichtspezifischen Streulichtsignals, führt jedoch ebenso in etwa gleichem Umfang zu Reduzierung des spezifischen Streusignals, welches von den Polystyrolpartikeln ausgeht. Eine Erhöhung der Beleuchtungswellenlänge für Polystyrolpartikel oder andere nicht-metallartige Partikel scheint das spezifische Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, d. h., die Detektierbarkeit der Polystyrolpartikel in der Probe, nicht signifikant zu erhöhen.

[0240] Im Gegensatz dazu werden metallartige Partikel mit größeren Signal-zu-Hintergrund-Verhältnissen im Vergleich zu nicht-metallartigen Partikeln durch Erhöhen der sichtbaren Bestrahlungs- und/oder Detektionswellenlängen detektiert. Ein Goldpartikel von 100 nm Durchmesser streut maximal Licht mit Wellenlängen von ungefähr 575 nm in Wasser-ähnlichem wässrigen Medium. Die Bestrahlung der Probe mit monochromatischem Licht mit Wellenlängen um 575 nm führt zu der Erzeugung des maximalen Streulichtsignals der Goldpartikel und zur signifikanten Reduzierung des nichtspezifischen Streulichtsignals. Beispielsweise wird unter diesen Bedingungen die gesamte nicht-spezifische Lichtstreuung um das etwa 13-fache im Vergleich zu einer Beleuchtungswellenlänge von 300 nm, bezogen auf eine Einfallswellenlänge von 300 nm, reduziert.

[0241] Die Bestrahlung der Serumprobe mit einfallendem weißen Licht und geeignete optische Filter, welche die Lichtmenge außerhalb der interessierenden Wellenlängen (unterhalb oder oberhalb einer spezifischen Bande bei ungefähr 575 nm) minimieren, liefern ein weitere Mittel zum Nachweis kleinerer Mengen metallartiger Partikel in Serum. Unter diesen Umständen wird die einfallende sichtbare Wellenlänge, welche die maximale Lichtstreuintensität der Goldpartikel hervorruft, verwendet, und das nichtspezifische Streulichtsignal, welches von Serumprotein und anderen Substanzen sowie aus anderen Quellen herrührt, stark reduziert. Es sind eine Vielzahl von Typen verschiedener metallartiger Partikel in Serumproben detektierbar, wenn mit Weißlicht (oder mehreren verschiedenen Wellenlängen) bestrahlt und eine geeignete Anordnung optischer Filter verwendet wird. In diesem Verfahren wird jeder Partikeltyp mit verschiedenen Einfallswellenlängen, bei der maximale Lichtstreuung auftritt, verwendet.

[0242] Ein anderer Ansatz beinhaltet das Filtern des Gesamt-Lichtsignals der Probe durch einen geeigneten Polarisationsfilter und/oder einen Bandpassfilter. Die Verwendung des geeigneten Polarisationsfilters führt zum effektiven Entfernen unpolarisierten Fluoreszenz-Hintergrunds, hat jedoch nur geringe Wirkung auf die nichtspezifische Hintergrundstreuung, da er meistens polarisiert ist. Die Verwendung von Breitbandbestrahlung, beispielsweise Weißlichtbestrahlung, unter Verwendung optischer Bandpassfilter höherer Wellenlänge ermöglicht eine signifikante Reduzierung des nichtspezifischen Streulicht- und Fluoreszenz-Hintergrunds. Viele der metallartigen Partikel weisen hohe Lichtstreuintensitäten bei längeren Wellenlängen auf, und diese Eigenschaft kann in Kombination mit Bandpassfiltern und/oder Polarisationsfiltern ausgenutzt werden. Beispielsweise besitzt ein sphärisches Goldpartikel von 300 nm Durchmesser eine nahezu maximale Streueffizienz bei einer Wellenlänge von etwa 700 nm, und seine Streulichtintensität beträgt ungefähr das 6-fache gegenüber einem Goldpartikel von 100 nm Durchmesser. Bei Verwendung eines 300-nm-Partikels und eines Bandpassfilters, der bei 700 nm zentriert ist, wird das nichtspezifische Licht um die Hälfte herabgesetzt und die Streukraft des Goldpartikels um den Faktor 6 (im Vergleich zu dem 100-nm-Partikel) erhöht. Somit wird das Signal-Hintergrund-Verhältnis in diesem System um den Faktor 12 erhöht. Die Verwendung von Nicht-Metall-Partikeln, beispielsweise von Polystyrol vergleichbarer Größe, in diesem Ansatz führt zu keiner signifikanten Erhöhung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses, sondern kann dieses tatsächlich herabsetzen. Die Verwendung einer entspiegelten Beschichtung auf den optischen Komponenten der Vorrichtung und/oder der Probenkammer kann ebenso das Signal-Hintergrund-Verhältnis verbessern. Ebenso sind viele andere Anordnungen und Ansätze möglich; diese sind für einen Fachmann auf dem Gebiet ersichtlich.

[0243] Dieser Aspekt der Erfindung führt zu einer verbesserten Unterscheidung zwischen dem spezifischen Streulichtsignal und dem nichtspezifischen Lichtstreu-Hintergrundsignal eines diagnostischen Assay-Systems gegenüber dem, welches durch andere Verfahren, in denen die Detektion von Streulicht als Teil eines Testsystems-Formats verwendet wird, erreichbar ist. Außerdem ermöglicht die Verfügbarkeit verschiedener Typen metallartiger Partikel, welche verschiedene Farben aufweisen, wenn sie mit Weißlicht bestrahlt werden, die Detektion der Anwesenheit mehrerer Partikeltypen in einer Probe, was bei der Detektion mehrerer Analytentypen in einer Probe ausgenutzt werden kann.

[0244] Ein weiterer Vorteil der metallartigen Partikel ist die chemische Trägheit dieser Partikel im Vergleich zu fluoreszierenden Verbindungen. Derartige Partikel bleichen nicht durch Licht aus, und ihre Signalerzeugungsfähigkeit wird nicht durch einen derartigen Mechanismus beeinflusst.

[0245] Die obigen Ansätze stellen lediglich einige Beispiele der vielen möglichen Ansätze zur Verwendung von Partikeln, bestehend aus metallartigen Materialien, zur Verbesserung der Unterscheidung zwischen dem spezifischen Streulichtsignal des Partikels und dem nichtspezifischen Streulichtsignal, welches aus verschiedenen anderen Quellen herrühren kann, dar. Beispielsweise sind eine Vielzahl von Anordnungen möglich, in denen derartige Partikel spezifisch bei einer Wellenlänge detektiert werden, die sich von der Wellenlänge, bei der für das verwendete Partikel maximale Lichtstreuung auftritt, unterscheidet. Viele andere Anordnungen oder Ansätze sind ebenso möglich; diese sind für einen Fachmann auf dem Gebiet offensichtlich.

[0246] Im Folgenden wird der Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Festphasenprobe oder ähnlichen Probe durch Detektion eines oder mehrerer Lichtstreuereigenschaften des Partikels diskutiert.

Festphasen-Detektionsverfahren

[0247] In den vorhergehenden Abschnitten wurden verschiedene Aspekte der Erfindung, die sich auf bestimmte Lichtstreuereigenschaften metallartiger Partikel beziehen, und die Detektion dieser Partikel in einer Lösung beschrieben. Im Folgenden werden nun Verfahren zum Nachweis von Partikeln, die auf einer Oberfläche oder sehr nahe zu einer Oberfläche vorliegen, beschrieben.

[0248] Es stellte sich heraus, dass unter Verwendung von Gold-, Silber- und anderen metallartigen Partikeln mit den vorliegenden Verfahren der DLASLPD-Beleuchtung und -Detektion sehr kleine Mengen an Partikeln und Partikel-markierter Bindungsagenzien (beschichtete Partikel) pro Einheitsbereich detektiert werden können, wodurch einzelne Partikel und mit Bindungsagenzien beschichtete Partikel auf oder nahe einer Oberfläche unter Verwendung einfacher Beleuchtungs- und Detektionsmittel detektiert werden können. Diese Verfahren können entweder auf optisch durchlässigen oder optisch nicht-durchlässigen Oberflächen angewendet werden.

[0249] Es stellte sich heraus, dass durch Verwendung bestimmter Kombinationen von Partikeln und Beleuchtungs- und Detektionsverfahren ein weiter Bereich an Partikeldichten von ungefähr 0,001 bis 10^3 Partikeln pro Quadrat-Mikrometer (μm^2) in einer Probe nachgewiesen werden kann. Unter Verwendung eines geeigneten Partikeltyps oder geeigneter Partikeltypen können verschiedene Analyttypen in sehr geringen Niveaus und über sehr breite Konzentrationsbereiche in der gleichen Probe, beispielsweise in Mikroarrays, detektiert werden. Dies wird auf einer Vorrichtung unter Anwendung von sowohl Partikelzählung (bei geringen Partikeldichten) als auch integrierten Lichtintensitätsmessungen (bei hohen Dichten) auf der gleichen Probe erreicht. Wenn beispielsweise eine Probe hinsichtlich zwei oder mehr verschiedener Analyten unter Anwendung von Festphasen-Mitteln, wie beispielsweise Arrays-Chips oder anderer Festphasen-Verfahren, analysiert werden soll, liegen verschiedene Analyttypen in verschiedenen Konzentrationen in den Proben vor. Das heißt, einige Analyten können in höheren oder geringeren Konzentrationen – von einigen bis zu einigen Größenordnungen – im Vergleich zu anderen Analyten in der Probe vorliegen. Die Auswahl der geeigneten Partikeltypen ist extrem wichtig, um die gewünschte Analytdetektions-Sensitivität und den Konzentrationsbereich, in dem das Verfahren arbeitet, zu erreichen. Die hierin beschriebenen Verfahren ermöglichen den Nachweis von Analyten in derartigen Proben. Noch breitere Detektionsbereiche und höhere Sensitivitäten sind möglich, wenn leistungsschwächeren Lichtquellen, wie beispielsweise Laser, verwendet werden, und feinere Detektionsverfahren, wie beispielsweise konfokale Bilddarstellung, zusätzlich zu den grundlegenden Beleuchtungs- und Detektionsverfahren angewendet werden.

[0250] Auf diese Weise können hohe Dichten von Partikeln spezifischer und leichter, d. h., mit sehr guten Signal-Hintergrund-Verhältnissen, unter Anwendung einfacher Verfahren detektiert werden. In einigen Aspekten der vorliegenden Erfindung wird eine Sammellinse (Abbildungslinse, Spiegelvorrichtung oder ähnliche Vorrichtung) verwendet; in anderen Ausführungsformen wird keine Sammellinse verwendet.

[0251] Das von den Partikeln gestreute Licht wird durch einen Photodetektor, wie beispielsweise eine Photodiode oder eine Photodioden-Anordnung, eine Photoelektronenvervielfacher-Rohre, Kamera, Videokamera oder andere CCD-Vorrichtung, oder das menschliche Auge detektiert. Die Menge der Partikel wird durch Zählen der Anzahl von Partikeln pro Einheitsbereich und Messen der gesamten integrierten Lichtintensität pro Einheitsbereich bestimmt. Bei den detektierten und gemessenen spezifischen Streulichteigenschaften handelt es sich um eine oder mehrere der folgenden: die Streulichtintensität bei einer oder mehreren Wellenlängen, die Farbe, die Polarisation, die RIFSLIW und/oder die Winkelabhängigkeit des Partikelstreulichts pro Einheitsbereich. Dies wird dann mit der Anwesenheit, Abwesenheit und/oder Menge des/der Analyten in der Probe korreliert.

[0252] In einigen Assays, in denen ein oder mehrere Analyten bestimmt werden sollen, können Partikelzählung und/oder integrierte Lichtintensitäts-Messungen angewendet werden. Bei geeigneter Auswahl der Partikel und der Anwendung von DLASLPD-Beleuchtungs- und -Detektionsverfahren ist gewöhnlich eine so hohe optisch auflösbare und detektierbare Streulichtintensität verfügbar, dass verfeinerte Lichtquellen und räumliche und optische Filtertechniken nicht notwendig sind. Jedoch wird bei einigen Proben, bei denen signifikante Anteile eines nicht-spezifischen Lichthintergrunds vorliegen können, das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis verbessert, indem optische Filter, konfokale Bilddarstellung oder andere räumliche Filtertechniken vom Aperturtyp zur Erhöhung des Verhältnisses des Streulichtsignals oder der Streulichtsignale zu dem gesamten nicht-spez-

zifischen Lichthintergrund verwendet werden.

[0253] In einigen analytischen und diagnostischen Anwendungen kann die Streulichtintensität unter Anwendung der vorliegenden grundlegenden Verfahren ohne die Verwendung einer Sammellinse oder eines Spiegels detektiert und gemessen werden.

[0254] In diesen Proben werden eine oder mehrere Eigenschaften des Streulichts auf die gleiche Weise wie oben ohne die Anwendung einer Sammellinse detektiert und gemessen. Im Folgenden werden die Methoden detaillierter diskutiert.

Detektion des Streulichts von lichtstreuenden Partikeln unter Verwendung einer Sammellinse oder eines Spiegels

[0255] Es stellte sich heraus, dass verschiedene Typen optischer Lichtsammelvorrichtungen verwendet werden können, um das Streulicht der Partikel zu sammeln. Die Anmelder verwendeten sowohl Partikelzählung als auch Intensitätsmessungen (integrierte Intensität pro Oberflächeneinheitsbereich), um ein oder mehrere der spezifischen Lichtstreuereigenschaften der Partikel in einem bestimmten Bereich mit Hilfe ihrer Verfahren der DLASLPD-Beleuchtung und -Detektion nachzuweisen. Es stellte sich heraus, dass es in den meisten durchgeführten Experimenten im Allgemeinen von Nutzen ist, das Zählbestimmungsverfahren anzuwenden, wenn die Partikeldichten ungefähr 0,1 Partikel pro μm^2 betragen; wenn sie größer sind als ungefähr 0,1 Partikel pro μm^2 zeigte sich, dass das Messen der gesamten integrierten Lichtintensität ein geeignetes Messverfahren darstellt. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass Verfahren der Zählbestimmung oder integrierten Lichtintensitätsmessung bei Partikeldichten über oder unter ungefähr 0,1 Partikel pro μm^2 anwendbar sind.

[0256] Die Verwendung eines spezifischen Linsentyps oder spezifischer Linsentypen, die sich als nützlich erwiesen, um das Streulicht von der Probe zu sammeln und/oder darzustellen, ist abhängig von dem Feld oder dem Bereich der Oberfläche, die gemessen werden soll, dem Typ des Probenbehältnisses, welches gemessen werden soll, und der oberen Grenze der Partikeldichten, die durch Partikelzählung gemessen werden sollen. Beispielsweise kann, wenn das Messen größerer Bereiche zur Detektion des Streulichts durchgeführt werden soll, ein 10× oder noch kleineres Mikroskop-Objektiv oder eine Linse oder ein Spiegel verwendet werden, um das Streulicht von der Probe zu sammeln. Wenn kleinere Bereiche der Probe gemessen werden sollen, kann eine 20×, 40×, 100× oder größere Mikroskop-Objektivlinse oder ähnliche Linse oder Spiegel verwendet werden, um das Licht zu sammeln. Wenn das Verfahren der Partikelzählung bei höheren Partikeldichten angewendet werden soll, ermöglichen stärkere Objektivlinsen eine bessere Auflösung der Partikel bei hohen Dichten. Es sei darauf hingewiesen, dass bei Verwendung größerer Objektive zusätzliche Erfordernisse und Einschränkungen ins Spiel kommen. Beispielsweise wird der Arbeitsabstand sehr schmal, und es kann die Zugabe von Immersionsöl zu der Probe notwendig sein. Wenn ein Kamera, eine Videokamera oder ein ähnlicher Photodetektor vom CCD-Typ verwendet wird, wird das gesamte Streulicht von dem Probenbereich detektiert. Diese Information kann dann durch einfache Hardware- und/oder Software-Mittel verarbeitet werden, um die Streulichtmessungen zu analysieren. Dies stellt eine äußerst wirksame Möglichkeit dar, da viele verschiedene Analyten in einer Probe unter Verwendung eines Festphasen-Mikroarrays, eines Array-Chips oder ähnlichen Formats detektiert und quantifiziert werden können. In den Mikroarray-Formaten werden kleine Bereiche der Oberfläche jeweils mit einem anderen Typ eines Bindungssagens in einem räumlich verschiedenen Bereich, welcher spezifisch einen bestimmten Analyten bindet, bedeckt. Spezifische Anwendungen der vorliegenden Erfindung auf Festphasen-Multianalyt-Mikroarrays und Ähnliches werden später beschrieben.

[0257] Das Verfahren des Partikelzählens stellt gewöhnlich ein instrumental anspruchvoller Verfahren dar als das Verfahren der integrierten Lichtintensitätsmessung. Jedoch bestehen bei einer sehr sensitiven Detektion einer oder mehrerer der Lichtstreuereigenschaften eines Partikels viele Vorteile bei Verwendung der Zähltechnik. Beispielsweise beeinflussen Fluktuationen und Inhomogenitäten der Lichtquelle oder der Probenkammer nicht die Partikelzählung, während diese bei Anwendung der integrierten Lichtintensitätsmessung ernste Probleme verursachen können. Außerdem gibt es viele Software- und Hardware-Optionen, um die Qualität der Signal/Hintergrund-Verhältnisse der gemessenen Partikel durch Zähltechniken zu verstärken.

Detektion von lichtstreuenden Partikeln ohne Verwendung einer Sammellinse oder eines Spiegels

[0258] Die Anmelder entwickelten außerdem Verfahren, bei denen die Verwendung einer Sammellinse nicht notwendig ist, um das Streulicht der Partikel an oder in der Nähe einer Oberfläche zu detektieren. In dieser Anordnung wird gewöhnlich das Streulicht, welches aus dem interessierenden Bereich kommt, durch die integrierte Lichtintensität detektiert. Dies kann durch das bloße Auge erfolgen oder durch einen Photodetektor, wie

zuvor beschrieben. Es stellte sich heraus, dass bei Verwendung metallartiger Partikel mit einem Durchmesser von ungefähr 120 nm oder weniger das Verhältnis von Partikel-Streulichtsignal zu dem gesamten nicht-spezifischen Lichthintergrund signifikant erhöht werden kann, indem der Detektor (entweder das Auge oder der Photodetektor) in Winkeln außerhalb der Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts platziert wird.

Grundlegende Konzepte zur Erhöhung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses

[0259] Bevor die DLASLPD-Beleuchtungs- und Detektionsverfahren detailliert beschrieben werden, ist es hilfreich, die grundlegenden Konzepte zusammenzufassen, die, wenn sie in der ein oder anderen Form verwendet werden, die Grenzen der Signaldetection und des Signal/Hintergrund-Verhältnisses bei der Detektion der lichtstreuenden Partikel bestimmen. Diese Verfahren dienen außerdem dazu, verschiedene Vorrichtungskomponenten einzustellen oder zu verändern, wie beispielsweise eine leistungsstärkere Lichtquelle zu verwenden, eine stärker parallel gerichtete Lichtquelle zu verwenden, eine Lichtquelle mit engerer Wellenlängenbande zu verwenden, eine Lichtquelle mit anderer (unterschiedlicher) Wellenlänge zu verwenden, einen sensitiveren Photodetektor zu verwenden, optische und/oder räumliche Filter zwischen der Beleuchtungsquelle und der Probe und/oder zwischen der Probe und dem Detektor anzurufen und/oder konfokale oder ähnliche Abbildungstechniken zu verwenden. Diese Strategien und Verfahren werden im Folgenden ausgeführt.

(1) Durch die Verwendung metallartiger Partikel mit größerem Durchmesser kann die Lichtstreuraft des Partikels signifikant erhöht werden. Durch die Zunahme der Größe kann ebenso das Profil der Streulichtintensität versus einfallende Wellenlängen verändert werden. Diese Eigenschaften können eingestellt werden, um sie an das Erfordernis eines beliebigen bestimmten Assays derart anzupassen, dass ein oder mehrere der Streulichteigenschaften leicht detektiertbar sind. Beispielsweise ist bei der Messung von Analyten in Proben mit hohen nichtspezifischen Lichthintergründen ein größeres Goldpartikel, ungefähr 80–120 nm oder mehr im Durchmesser, geeignet. Die maximale Wellenlänge, bei der die maximale Lichtstreuung auftritt, verschiebt sich auf höhere Wellenlängen, und die Intensität des Streulichts nimmt ebenso zu im Vergleich zu einem Goldpartikel von 40 nm Durchmesser. Die Kombination dieser zwei Effekte erhöht signifikant das Signal/Hintergrund-Verhältnis im Vergleich zu dem Goldpartikel mit 40 nm Durchmesser.

(2) Durch Messen des Streulichts der Probe mit Winkeln außerhalb der Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts wird das Signal/Hintergrund-Verhältnis entweder in der Intensität oder in dem Zählmodus wesentlich erhöht. Es wurde beobachtet, dass der Detektor entweder oberhalb oder unterhalb der Oberflächenebene der Probe sowie auf der gleichen Seite oder gegenüberliegenden Seite der Probenebene, auf welcher der Beleuchtungsstrahl lokalisiert ist, platziert werden kann. In diesen verschiedenen Orientierungen werden die spezifischen Streulichtsignale von den Partikeln außerhalb der Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts detektiert, während das meiste nichtspezifische Streulicht von optischen Abweichungen in der Probenkammer und anderen Komponenten in der Probe innerhalb dieser Enveloppe der Vorwärtsrichtung des Streulichts liegen. Dadurch wird eine sensitivere und spezifischere Detektion des Partikelstreulichts ermöglicht.

(3) Die Menge des nicht-spezifisch reflektierten Lichts beeinflusst außerdem die Detektionssensitivität, wie zuvor beschrieben. Es stellte sich heraus, dass die Menge des reflektierten Lichts wesentlich reduziert werden kann, indem die Oberfläche des einfallenden Lichts so weit wie möglich entfernt von dem Sammelbereich, der detektiert wird, bewegt wird. Dies kann auf vielen verschiedenen Wegen erfolgen, einschließlich der geeigneten Konstruktion der Probenkammer (wie später diskutiert wird). Beispielsweise wurde beobachtet, dass, wenn eine dünne Schicht Immersionsöl auf den Boden eines Objektträgers gegeben wird, durch welches der Lichtstrahl die Partikel an der gegenüberliegenden Oberfläche beleuchtet, deutlich verbesserte Ergebnisse erhalten werden. In einer anderen Ausführungsform wurden, wenn ein kleiner Kunststoff-Lichtwellenleiter auf den Boden einer Kunststoff-Probenkammer mit einem Mikroarray gebundener Partikel auf der gegenüberliegenden Seite der Oberfläche geklebt wurde, ebenso deutlich verbesserte Ergebnisse erhalten. Ebenso wurden sehr viel größere optische Anordnungsmittel, wie beispielsweise ein äquilaterales Prisma und/oder andere Typen von Prismen oder optischen Lichtwellenleitern, verwendet und Immersionsöl an der Oberfläche platziert, an der das Probenbehältnis mit dem Prisma verbunden ist. Diese verbesserten Ergebnisse sind vermutlich ein Ergebnis (i) der Entfernung der Lichteinfallsoberfläche mit einem größeren Abstand von dem Detektionsbereich, welcher die lichtstreuenden Partikel enthält; (ii) des Vorliegens eines Einfallswinkels von 0° auf der Oberfläche des Lichtwellenleiters, wie beispielsweise einer Prismenoberfläche und Ähnlichem (mit Bezug auf die Senkrechte), und (iii) des Wegleitens des größten Anteils des reflektierten Lichts, welches in dem System auftritt, aus dem System heraus und weg vom Samelpunkt. Alle diese Verfahren tragen dazu bei, die Signal/Hintergrund-Verhältnisse zur Detektion lichtstreuender Partikel in verschiedenen Proben zu erhöhen. Es existieren verschiedene Lichtführungsstrategien, die angewendet werden können, um effektiv das reflektierte Licht aus dem System zu entfernen, um das Signal/Hintergrund-Verhältnis zu verbessern.

(4) Brechungsindex-Verstärkungsmethoden sind ebenso extrem geeignet zur Erhöhung der Signal/Hinter-

grund-Verhältnisse in vielen verschiedenen Typen von Proben. Es wurden verschiedene Methoden zur Erhöhung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses gefunden, von denen einige im Folgenden diskutiert werden. Die Verwendung von Flüssigkeit zur Bedeckung der Oberfläche, welche die Partikel enthält; je näher der Brechungsindex der Flüssigkeit an dem Brechungsindex der Oberfläche, welche die Partikel enthält, liegt, desto besser ist das Signal/Hintergrund-Verhältnis. Es stellte sich heraus, dass für den Nachweis von Analyten auf einer trockenen Festphase das Signal/Hintergrund-Verhältnis durch Platzieren einer Flüssigkeitschicht auf der Oberfläche verbessert wird. Beispielsweise wurden, wenn eine wässrige Pufferlösung mit einem Brechungsindex von ungefähr 1,33 zum Bedecken der Probenoberfläche verwendet wird, viel bessere Ergebnisse erhalten, als wenn die Partikel auf der gleichen Oberfläche in Luft vermessen wurden. Noch bessere Signal/Hintergrund-Verhältnisse wurden erhalten, wenn Flüssigkeiten verwendet wurden, die noch enger am Brechungsindex der Festphase liegen. Beispielsweise kann ein Assay durchgeführt werden, indem zunächst die Analyten mit lichtstreuenden Partikeln, beschichtet mit Bindungsgens, an die Festphase in dem Probenmedium oder einer anderen geeigneten Reaktionsmischung oder Puffer gebunden werden. Die Lösung in der Probe wird dann verdünnt oder durch eine Lösung mit ausgewähltem Brechungsindex ersetzt, welche die Festphase vor der Detektion der Partikel bedeckt. Auf diese Weise können hoch sensitive Ergebnisse erhalten werden.

[0260] Zusätzlich zu den obigen Verfahren wird durch die weitere Verwendung von optischen Schmalband-Durchlassfiltern, Kantenfiltern, räumlichem Filtern, wie beispielsweise Aperturen entweder zwischen dem Beleuchtungsstrahl und der Probe und/oder zwischen der Probe und dem Photodetektor oder Auge, ebenso das Signal/Hintergrund-Verhältnis verbessert. Die Anwendung konfokaler Bilddarstellungstechniken kann ebenso in bestimmten analytischen Assay-Anwendungen, bei denen die Kosten und Verfeinerung derartiger Techniken und Apparaturen keine Rolle spielen, geeignet sein. Diese Verwendung längerer Wellenlängen, die gegebenenfalls optisch gefiltert werden, stellt ebenso einen Weg dar, um das Signal/Hintergrund-Verhältnis zu erhöhen. Das Führen des Überschusses an nicht-spezifischem Licht aus dem System heraus unter Verwendung spezifisch konstruierter Probenkammern zur Entfernung des überschüssigen Lichts stellt ein weiteres geeignetes Verfahren dar. Allgemeine Probenkammer-Konstruktionen, die geeignet sind, werden später beschrieben. Alle diese Variationen an einer oder mehreren Ausführungsformen (Aspekten) der vorliegenden Erfindung liefern erhöhte Signal/Hintergrund-Verhältnisse und ermöglichen somit die spezifischere und sensivere Detektion eines oder mehrerer Analyten in einer Probe.

[0261] Es existieren viele verschiedene Wege der DLASLPD-Beleuchtungs- und -Detektionsverfahren, die spezifisch auf eine Probe angewendet werden können; diese sind in **Fig. 15** dargestellt. Das Diagramm von **Fig. 14** liefert eine Orientierung und Beschreibung der in **Fig. 15** dargestellten DLASLPD-Verfahren. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt die Möglichkeiten, die das Verfahren bietet, wenn es mit bestimmten metallartigen Partikeln zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Festphasen-Probe oder ähnlichen Probe verwendet wird.

[0262] Im Folgenden werden die Verfahren detailliert beschrieben.

Beleuchtungs- und Lichtsammel-Optiken

1. Allgemeine Konzepte

[0263] Die im Folgenden beschriebenen Festphasen-Methoden können zur Detektion lichtstreuender Partikel angewendet werden. Die Detektion und Messung einer oder mehrerer Lichtstreuereigenschaften wird dann mit der Anwesenheit, Abwesenheit oder Konzentration eines oder mehrerer Analyten in einer Probe korreliert. Diese Verfahren können mit den meisten, wenn nicht allen, bekannten analytischen Festphasen-Verfahren, einschließlich Mikroarray, Array-Chip oder ähnlichen Formaten, angewendet werden. Das Verfahren ist derart aufgebaut, dass es einen breiten Sensitivitätsbereich (von geringer Empfindlichkeit bis zum ultrasensitiven Bereich) aufweist. Dieser Sensitivitätsbereich wird mit einer einfach handhabbaren und kostengünstigen Vorrichtung erreicht.

[0264] In der Technologie wird die Anzahl oder relative Anzahl der Partikel auf einer Oberfläche durch Verfahren bestimmt, die von den Lichtstreuereigenschaften der Partikel abhängen. Das Detektionssystem besteht im Wesentlichen aus (1) einer Vergrößerungslinse (ebenso als Abbildungs- oder Sammellinse bezeichnet), welche ein vergrößertes Bild des lichtstreuenden Partikelflecks (Patch) oder eines Teils des Flecks bildet, und (2) einem Beleuchtungssystem, welches die Partikel als helle Objekte auf einem dunklen Hintergrund darstellt (das DLASLPD-Verfahren). Das Verfahren kann ebenso ohne das Erfordernis einer Sammellinse durchgeführt werden. Die Anzahl der Partikel in dem vergrößerten Bild kann durch Partikelzählung oder durch Messen der

Streulichtintensität (welche proportional zur Partikelzahl oder -dichte ist) quantifiziert werden. Die Partikelzählung kann erfolgen durch (a) das Auge (ohne Hilfe oder mit einer Okularlinse, in Abhängigkeit der Partikelgröße), (b) ein elektronisches Abbildungssystem (z. B. Videokamera, CCD-Kamera, Bildverstärker) oder (c) einen photosensitiven Detektor mit einer Feld-begrenzenden Apertur und einer Lichtstrahl-Abtast-Anordnung. Die Streulichtintensität kann mit einem elektronischen Abbildungssystem oder einem photosensitiven Detektor gemessen werden. Bei geringen Partikeloberflächendichten (weniger als etwa 0,1 Partikel pro μm^2), ist das Partikelzählverfahren bevorzugt, während bei höheren Oberflächendichten (insbesondere, wenn die einzelnen Partikel enger vorliegen als das räumliche Auflösungsvermögen der Vergrößerungslinse) ist die Messung der stetigen Lichtstrahlintensität bevorzugt. Die Technologie ist derart konstruiert, dass leicht zwischen diesen zwei Detektionsmethoden, das heißt, zwischen Partikelzählung und Intensitätsmessungen, gewechselt werden kann; sie kann bei Partikeldurchmessern herunter bis zu 20 nm, in Abhängigkeit der Lichtstreuikraft der Partikel und der spezifischen Hardware-Komponenten der Detektionsvorrichtung, angewendet werden.

Beleuchtungssysteme

[0265] Das Beleuchtungssystem ist ein Schlüsselement in der Technologie. Die Beleuchtungssysteme sind derart konstruiert, dass ein Partikelfleck (Patch) oder eine Gruppe von Partikelpunkten (Dots) mit hoher Lichtintensität derart bestrahlt wird, dass die individuellen Partikel als helle Objekte auf einem dunklen Hintergrund erscheinen. Dies ermöglicht die Visualisierung von Partikeln, die an einer Oberfläche anhaften oder frei in einem Flüssigkeitsfilm oberhalb der Oberfläche vorliegen. Freie Partikel werden von anhaftenden Partikeln durch ihre Brownsche Molekularbewegung, welche bei anhaftenden Partikeln nicht vorliegt, unterschieden. In den folgenden Abschnitten werden die Details und die Logik der Beleuchtungssysteme beschrieben.

[0266] Der Anmelder experimentierte mit vielen verschiedenen Beleuchtungssystemen, einschließlich eines teuren kommerziell erhältlichen Dunkelfeld-Illuminators, der als Ultrakondensor bezeichnet wird (Zeiss). Es können zwei grundlegende Methoden der Beleuchtung und verschiedene Versionen dieser zwei Methoden angewendet werden. Diese Methoden sind einfacher und scheinen höhere Beleuchtungslichtintensitäten hervorzubringen als beispielsweise der Ultrakondensor.

Allgemeine Beschreibung der grundlegenden Beleuchtungsmethoden

[0267] Die Beleuchtungssysteme sind derart konstruiert, dass sie (1) einen Lichtstrahl hoher Lichtintensität an einen Fleck (Patch) oder eine Gruppe von Punkten (Dots) lichtstreuender Partikel abgeben und (2) die Menge an Beleuchtungslicht, welches direkt oder durch Reflexionen in das Detektionssystem eintritt, minimiert wird. Dies wird durch Lenken/Drängen des Lichtstrahls und seiner Reflexionen in Winkel, die außerhalb der Lichtsammelwinkel des Detektionssystems liegen, erreicht. In einem Beleuchtungsverfahren befinden sich die Sammellinse und die Lichtquelle auf entgegengesetzten Seiten der Festphaseroberfläche (Beleuchtung von unten); in dem anderen Verfahren befinden sich die Beleuchtungslichtquelle und die Vergrößerungslinse auf der gleichen Seite der Oberfläche.

Direkte Beleuchtung von unterhalb der Vergrößerungslinse

[0268] In [Fig. 1](#) ist ein schematisches Diagramm einer der grundlegenden angewandten Beleuchtungsmethoden dargestellt. In diesem Verfahren trifft das Licht von unten auf die Oberfläche S der Festphase. Es wird angenommen, dass sie transparent ist (obwohl sie eine Farbe aufweisen kann). O ist ein Bereich auf der Oberfläche, welcher die lichtstreuenden Partikel enthält. Die Vergrößerungs- oder Lichtsammellinse L ist oberhalb von S angeordnet. Die Winkel, in denen L Licht sammelt, sind als schattierter Konus C (Lichtsammelkegel der Linse L) mit einem Scheitelpunkt an der Oberfläche S (auf der die lichtstreuenden Partikel S lokalisiert sind) und einer Basis, die durch den Durchmesser D der Linse bestimmt wird, dargestellt. Der Beleuchtungslichtstrahl (LB) ist derart gewinkelt, dass er nicht in den Lichtsammelkegel von L eintritt. Die Pfeile zeigen die Richtung des Verlaufs des Lichtstrahls.

[0269] Bei der Festphase kann es sich beispielsweise um einen Objektträger, eine Mikrotiterplatte oder andere Typen transparenter Festphasen, die in der klinischen Diagnostik verwendet werden, handeln. Die Lichtquelle kann eine beliebige Lichtquelle sein, wie beispielsweise eine Glühlampe, Entladungslampe, LED, Laser und Ähnliches. Das Licht wird von dem Beleuchtungslichtstrahl unter Verwendung optischer Lichtfasern und Lichtsammellinsen gesammelt und dann auf die streuenden Lichtpartikel unter Verwendung einer Kondensorlinse fokussiert. Der mittlere Winkel θ , welchen der Lichtstrahl mit der Oberfläche S bildet, wird derart eingestellt, dass der Lichtstrahl nicht in die Linse L eintritt, wie oben erläutert. Die Einstellung des Winkels θ kann leicht durch visuelle Beobachtung der lichtstreuenden Partikel durch die Vergrößerungslinse und das Okular

(zusammengesetzte Mikroskop-Anordnung) erfolgen, wobei der Winkel derart eingestellt wird, dass die Partikel als helle Objekte auf dunklem Hintergrund erscheinen. Dieser Winkel dient ebenso der Messung der Lichtintensität, obwohl bei hohen Partikeldichten das Erfordernis der Fokussierung nicht so stringent ist.

[0270] Die Magnitude des Winkels θ kann aus der numerischen Apertur der Vergrößerungslinse abgeleitet werden. Für eine ultrasensitive Detektion wird ein Mikroskop-Objektiv als vergrößernde oder darstellende Linse verwendet. Bei einem Mikroskop-Objektiv ist gewöhnlich die numerische Apertur auf dem Gehäuse angegeben. Die numerische Apertur kann anhand des Diagramms von [Fig. 2](#) definiert werden. Diese Figur zeigt eine Vergrößerungslinse (mit einer Brennweite f), welche auf einen Abschnitt lichtstreuender Partikel auf O fokussiert ist. Der Abstand zwischen der Linse und O entspricht f . Die Linse (L) sammelt das gesamte von O gestreute Licht in den Vollkonus, dessen Basis der Durchmesser D der Linse ist. Der Winkel θ_H ist definiert als der planare Halbwinkel dieses Vollkonus. Die numerisch Apertur (N. A.) des Konus verhält sich zu θ_H gemäß folgender Formel

$$N. A. = n \sin(\theta_H) \quad (36)$$

wobei n der Brechungsindex des Mediums zwischen der Linse und dem Punkt O ist. Das Medium kann beispielsweise Luft ($n = 1$), Wasser ($n = 1,33$) oder Immersionsöl ($n = 1,5$) sein. Für kleine Werte von θ_H ist die N. A. ungefähr gleich $D/2f$, wobei D der Durchmesser der Linse und f die Brennweite sind.

[0271] In der folgenden Tabelle sind typische Werte für numerische Aperturen und θ_H von Objektiven, die allgemein verwendet werden können, angegeben (für $n = 1$).

<u>Vergrößerung</u>	<u>N. A.</u>	<u>θ_H in Grad</u>
x 10	0,25	14,47
x 20	0,5	30
x 40	0,65	40,54
x 63	0,85	58,2

[0272] Wie bereits erwähnt, muss der Erregungslichtstrahl derart gewinkelt sein, dass er sich außerhalb des lichtsammelnden Vollkonus der Vergrößerungslinse befindet. Bei höheren Vergrößerungen muss der Winkel, in dem der erregende Strahl auf die Festphasenoberfläche auftrifft, groß sein. Beispielsweise muss bei einem 40×-Objektiv der Einfallswinkel größer als 40° sein. Da der Anteil an Licht, welches an der Oberfläche reflektiert wird, mit dem Einfallswinkel ansteigt, muss berücksichtigt werden, dass die Winkel, die in dem vorliegenden Beleuchtungssystem verwendet werden sollen, auf Grund von Reflexion zu einem großen Lichtverlust führen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass kritische Reflexionen (totale Innenreflexionen) bei hohen Einfallswinkeln auftreten. Im Folgenden wird eine kurze Diskussion der fundamentalen Gesetze von Brechung und Reflexion geführt, die in der anschließenden Diskussion der Effekte der Reflexionen in diesem Beleuchtungssystem erforderlich sind.

Snelliussches Brechungsgesetz

[0273] Das Snelliussche Brechungsgesetz wird anhand des Diagramms von [Fig. 3](#) beschrieben. Diese Figur zeigt einen Lichtstrahl, der entlang eines Mediums mit dem Brechungsindex n_i verläuft (i für einfallendes Medium) und auf die Oberfläche S eines Mediums mit dem Brechungsindex n_t trifft (t für Transmissionsmedium). Ein Teil des einfallenden Lichts wird in das Medium t überführt (der gebrochene Strahl) und ein Teil wird zurück in das Medium i reflektiert (der reflektierte Strahl). Wenn der Einfallswinkel θ_i ist, wird der Winkel des gebrochenen Strahls durch das Snelliussche Gesetz vorgegeben, welches ausgedrückt werden kann als

$$n_i \sin(\theta_i) = n_t \sin(\theta_t) \quad (37)$$

[0274] Wenn $n_i < n_t$, dann ist $\theta_i < \theta_t$. Wenn $n_i > n_t$ ist, dann ist $\theta_i > \theta_t$. Alle Winkel werden mit Bezug auf eine Linie gemessen, die senkrecht zu der Oberfläche S verläuft. Der reflektierte Strahl erzeugt einen Winkel $\theta_r = \theta_i$ (das heißt, der Reflexionswinkel und der Einfallswinkel sind gleich).

Reflexionsgesetze – Anteil des einfallenden Lichts, das an der Oberfläche reflektiert wird

[0275] Der Anteil R der einfallenden Lichtintensität, welcher bei verschiedenen Einfallswinkeln θ_i reflektiert wird, kann unter Verwendung der Fresnelschen Reflexionsgleichungen berechnet werden. (Es sei darauf hingewiesen, dass die Intensität hier als Energie pro Zeiteinheit pro Einheitsbereich definiert ist. Die Intensität wird ebenso als Strahlungsstärke bezeichnet.) Jedoch ist der Einfachheit halber die vorliegende Diskussion anhand von Plots geführt, in der R auf θ_i bezogen ist. Die exakte Abhängigkeit von R von θ_i wird durch die Werte von n_i und n_t und den Polarisationszustand des einfallenden Lichts bestimmt. Folgende Fakten sind wichtig in Bezug auf die Reflektanz.

- Reflektanz für den Fall, in dem der Lichtstrahl von einem Medium mit geringem Brechungsindex zu einem Medium mit hohem Brechungsindex verläuft ($n_i < n_t$)

[0276] In **Fig. 4** sind Plots von R vs. θ_i ($\omega = \theta_i$) für den Fall dargestellt, in dem $n_i = 1$ (Luft) ist, und $n_t = 1,5$ ist (der Letztere liegt nahe dem Brechungsindex von Glas oder Kunststoff), und für Licht, welches parallel (r_p) und senkrecht (r_s) zu der Einfallsebene polarisiert ist. Die Einfallsebene ist definiert als die Ebene, welche den einfallenden Lichtstrahl und die Linie senkrecht zu der Oberfläche enthält (siehe **Fig. 3**). Die Reflektanz R des unpolarisierten Lichts ist durch den Mittelwert der Graphen für parallel und senkrecht zur Einfallsebene polarisiertes Licht gegeben. In **Fig. 4** ist der Reflektanz-Graph für unpolarisiertes Licht mit Ord (für „ordinary“) markiert. Die Graphen von **Fig. 4** zeigen, dass

- r_s kontinuierlich mit zunehmendem ω ansteigt (ω in **Fig. 3** entspricht dem hierin verwendeten θ_i). Die Zunahme von r_s ist gering bis zu etwa 70° (wo die Reflektanz lediglich etwa 15% beträgt) und steigt dann sehr viel schneller an und erreicht 100% Reflektanz bei 90° . Somit beträgt der Anteil des Lichts, welcher reflektiert wird, bis zu Einfallwinkeln von 60° weniger als 20%.
- r_p mit zunehmendem ω bis etwa 57° abnimmt, wo r_p Null ist. Der Winkel, bei dem $r_p = 0$ ist, wird als Brewster-Winkel oder Polarisationswinkel bezeichnet. Der Brewster-Winkel θ_b kann anhand der Formel

$$\tan(\theta_b) = n_t \quad (38)$$

berechnet werden, unter der Annahme, dass $n_i = 1$ (Luft) ist. Bei $n_t = 1,5$ ergibt die obige Gleichung $\theta_b = 56,3^\circ$. Es sei darauf hingewiesen, dass bei dem Brewster-Winkel $\theta_i + \theta_t = 90^\circ$ sind. Somit ist bei $n_t = 1,5$, $\theta_b = 56,3^\circ$ und $\theta_t = 33,7^\circ$. Für Winkel größer als der Brewster-Winkel steigt r_p schnell mit zunehmendem ω an und erreicht bei 90° einen Wert von 100%.

c. bei unpolarisiertem (gewöhnlichem) Licht, die Reflektanz allmählich mit zunehmendem ω bis zu 70° ansteigt und dann schnell ansteigt und bei 90° 100% erreicht. Bei $\theta_i < 70^\circ$ wird weniger als 20% des einfallenden Lichts reflektiert.

d. die Intensitäten des reflektierten und transmittierten Lichts sich nicht zu der Intensität des einfallenden Lichts addieren. Dies scheint das Gesetz der Erhaltung von Energie zu verletzen. Diese offensichtliche Verletzung ist tatsächlich auf die Definition der Intensität als Energie pro Zeiteinheit pro Einheitsbereich zurückzuführen. Auf Grund der Brechung besitzen das einfallende und transmittierte Licht nicht den gleichen Querschnittsbereich. Unter Berücksichtigung der Differenzen in den Querschnittsbereichen kann gezeigt werden, dass sich die Energie pro Zeiteinheit in den reflektierten und transmittierten Strahlen zur Energie pro Zeiteinheit in dem einfallenden Strahl addiert.

- Reflektanz für den Fall, in dem der Lichtstrahl von einem Medium mit hohem Brechungsindex zu einem Medium mit niedrigem Brechungsindex verläuft ($n_i > n_t$)

[0277] **Fig. 5** zeigt Plots der Reflektanz von polarisiertem Licht vs. Einfallswinkel ($\omega = \theta_i$) für $n_i = 1,54$ und $n_t = 1$. Die Plots unterscheiden sich völlig von denen von **Fig. 4** für $n_i < n_t$. Der signifikanteste Unterschied ist, dass bei einem Einfallswinkel größer als ungefähr 41° das gesamte Licht reflektiert wird (100%ige Reflexion, Totalreflexion). Der kleinste Einfallswinkel, bei dem eine totale innere Reflexion auftritt, wird als kritischer Reflexionswinkel θ_c bezeichnet. Der Wert dieses Winkels ist abhängig von den Werten von n_i und n_t . Eine Formel zur Berechnung von θ_c aus den Werten n_i und n_t kann unter Berücksichtigung der Winkel der einfallenden transmittierten Lichtstrahlen beim kritischen Winkel abgeleitet werden. Am kritischen Winkel θ_c enthält der reflektierte Strahl das meiste einfallende Licht und erzeugt einen Winkel θ_c bezüglich einer Linie senkrecht zur Oberfläche, wie es bei den Gesetzen für regelmäßige oder gerichtete Reflexion (Spiegelung) erforderlich ist. Das transmittierte Licht besitzt geringe Intensität, und sein Winkel θ_t bezüglich der senkrechten Linie beträgt 90° . Das heißt, der transmittierte Lichtstrahl verläuft parallel zu der Oberfläche. Somit kann der Wert für θ_c durch Einsetzen von $\theta_t = 90^\circ$ in die Snelliussche Gleichung erhalten werden. Dieses Einsetzen ergibt

$$nt \sin(90) = ni \sin(\theta c) \quad (39)$$

Da $\sin(90) = 1$ ist, ergibt sich
 $\sin(\theta c) = ni/nt \quad (40)$

[0278] Für $nt = 1,54$ und $ni = 1$ (Luft) ergibt die obige Gleichung $\theta c = 40,5^\circ$. Es sei darauf hingewiesen, dass der kritische Winkel der gleiche ist für unpolarisiertes Licht und Licht, welches senkrecht oder parallel zu der Einfallsebene polarisiert ist. Das heißt, θc ist nicht abhängig davon, ob das Licht unpolarisiert oder linear polarisiert ist.

iii. Wirkungen der Reflektanz und Streuung auf die Beleuchtung eines Flecks (Patch) lichtstreuender Partikel

[0279] Zunächst wird der einfache Fall angenommen, in dem die Partikel auf der Oberfläche eines trockenen Objektträgers in Luft vorliegen. Das heißt, die Partikel sind trocken, und Luft ist das Medium auf beiden Seiten des Objektträgers. [Fig. 6](#) zeigt ein schematisches Diagramm der Reflexionen und Brechungen, die in diesem Fall eine Rolle spielen. Die erste Reflexion tritt an der Oberfläche S1 auf ($ni < nt$, $ni = 1$ und $nt = 1,5$). [Fig. 4](#) zeigt, dass bei Einfallswinkeln bis zu 70° der Anteil des reflektierten Lichts unter 20% liegt. Aus diesem Grund sind in diesem Beleuchtungsverfahren Reflexionen an S1 unproblematisch. Die Oberfläche 2 könnte ein Problem darstellen, da der Lichtstrahl von einem niedrigen Brechungsindex in einen hohen Brechungsindex tritt, und die Möglichkeit einer totalen Innenreflexion an dieser Oberfläche besteht. Der kritische Winkel für totale Innenreflexion an einer Oberfläche, wo $ni = 1,5$ und $nt = 1$ (Luft) sind, beträgt ungefähr 42° (berechnet mit der Gleichung (40)). Die Frage ist nun, ob dieser kritische Winkel erreicht wird, wenn der Einfallslichtstrahl an der Oberfläche 1 einen großen Winkel aufweist.

[0280] [Fig. 7](#) zeigt einen Plot von $\theta i_2 [\theta_{tj}]$ vs. $\theta i_1 [\theta_{ij}]$, berechnet anhand der Snelliusschen Gleichung (37) unter Verwendung von $\theta t_1 = \theta i_2$. Wie aus dem Plot hervorgeht, steigt θi_2 mit einem Anstieg von θi_1 schnell bis etwa $\theta i_1 = 70^\circ$ an. Der Anstieg von θi_2 flacht dann ab und erreicht den kritischen Winkel nicht, bis $\theta i_1 = 90^\circ$ ist. Jedoch wird bei $\theta i_1 = 90^\circ$ kein Licht durch S1 hindurch transmittiert. Daraus folgt, dass bei der Anordnung gemäß [Fig. 4](#) bei irgendeinem praktischen Winkel von θi_1 niemals die kritische Beleuchtung erreicht wird. Des Weiteren wird durch Reflexionen die Menge an Licht, die an die Partikel auf S2 angegeben wird, bei θi_1 -Werten von weniger als etwa 70° nicht signifikant vermindert.

[0281] Die obigen Schlussfolgerungen wurden experimentell bestätigt. Bei den Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass Licht, welches durch Flecken, Staub, Kratzer oder andere Unregelmäßigkeiten oder Artefakte auf den Oberflächen S1 und S2 gestreut wird (nicht-spezifische Lichtstreuung) vergleichbar mit dem Licht, welches durch die Partikel auf S2 gestreut wird, werden kann, wodurch das Hintergrundlicht signifikant erhöht und die Sensitivität der Partikeldetektion vermindert wird. Jedoch wird das durch Artefakte auf S1 und S2 gestreute nichtspezifische Licht in Vorwärtsrichtung des Beleuchtungslightstrahls konzentriert, während das durch die Partikel gestreute Licht (für schmale Partikel) in alle Richtungen gestreut wird. Diese Effekte sind in [Fig. 8](#) dargestellt.

[0282] In [Fig. 8](#) ist die Intensität des durch Oberflächen-Artefakte in eine beliebige Richtung θ gestreute nichtspezifische Licht durch die Länge der Linie (mit dem Winkel θ), die sich vom Ursprung O bis zur Intensitäts-Enveloppe erstreckt, vorgegeben. Das durch die Partikel gestreute Licht ist als gestrichelte Linie, welches von O in alle Richtungen ausgeht, dargestellt. Die Wirkungen der nichtspezifischen Lichtstreuung auf die Detektion der spezifischen Lichtstreuung kann experimentell unter Verwendung eines Objektträgers, welcher 60-nm-Goldpartikel auf der Oberfläche enthält, gezeigt werden. In Luft streuen diese Partikel grünes Licht, und in Abwesenheit nichtspezifischer Lichtstreuung erscheint ein beleuchteter Patch der Partikel als grüner Fleck auf dunklem Hintergrund. Oberflächen-Artefakte streuen weißes Licht, und wenn dieser Typ nicht-spezifischer Lichtstreuung über die spezifische Lichtstreuung der Partikel gelegt wird, weist das Licht, das von einem Partikel-Patch gestreut wird, eine grün-weiße Farbe anstelle einer rein grünen Farbe auf. Die Effekte einer bevorzugten Vorwärtsstreuung durch Oberflächen-Artefakte werden deutlich, indem das Streulicht mit dem Auge, welches in verschiedenen Winkeln θ_v positioniert ist, wie in [Fig. 8](#) dargestellt, beobachtet wird. Wenn das Auge mit einem Winkel $\theta_v = 0$ platziert ist, weist das Streulicht eine grünlich-weiße Farbe auf. Wenn der Beobachtungswinkel θ_v erhöht wird, nimmt die weiße Farbe zu, und, bei einem θ_v größer als 30° , ist nur noch die reine grüne Farbe der Goldpartikel sichtbar. Somit ist es in der vorliegenden Erfindung nützlich, die Beobachtung mit dem Auge oder die Detektion mit dem Photodetektormittel bei einem Winkel θ_v größer als 30° durchzuführen. Wie später gezeigt wird, kann nichtspezifische Lichtstreuung aufgrund von Oberflächen-Artefakten weiter reduziert werden, indem durch Lichtwellenleiter, wie beispielsweise eine Anordnung vom Prismentyp, beleuchtet wird.

[0283] Als nächstes wird der Fall betrachtet, in dem lichtstreuende Partikel in einem dünnen Wasserfilm, der sich auf sich auf einem Objekträger befindet, vorliegen und mit einem Deckglas, wie in [Fig. 9](#) dargestellt, bedeckt sind. Der beleuchtende Strahl trifft auf vier Oberflächen, an denen Änderungen des Brechungsindex auftreten, nämlich S1 (Luft zu Glas), S2 (Glas zu Wasser), S3 (Wasser zu Glas) und S4 (Glas zu Luft). Die Beleuchtung der Reflexion und Brechung an jeder Oberfläche, wie sie in den vorherigen Abschnitten durchgeführt wurde, führt zu der Schlussfolgerung, dass in dem System gemäß [Fig. 9](#) durch Reflexionen die Menge an Lichtenergie, die an die streuenden Lichtpartikel abgegeben wird, nicht signifikant reduziert wird, und dass an keiner der Oberflächen kritische Reflexion auftritt. Nicht-spezifische Lichtstreuung auf Grund von Oberflächen-Artefakten auf den Oberflächen S1 und S4 liegen wie in dem Fall von [Fig. 8](#) vor. Jedoch wird durch die Anwesenheit von Wasser nicht-spezifische Lichtstreuung für die Oberflächen S2 und S3 beträchtlich reduziert.

Direkte Beleuchtung von der gleichen Seite wie die Vergrößerungslinse

[0284] Dieses Beleuchtungsverfahren ist in [Fig. 10](#) dargestellt. Die Bedeutungen von S, L, C und LB sind die gleichen wie in [Fig. 2](#). In dieser Figur trifft der einfallende Lichtstrahl von oben auf die Oberfläche S. Die Lichtsammellinse befindet sich ebenfalls oberhalb von S. Der einfallende Lichtstrahl ist derart gewinkelt, dass weder das einfallende noch das reflektierte Licht in den Lichtsammelkegel C der Linse L eintreten. In diesem Beleuchtungsverfahren ist es notwendig, zu verhindern, dass das von den verschiedenen Oberflächen in dem Patch reflektierte Licht in den Lichtsammelkegel C der Vergrößerungs- oder Abbildungslinse L eintritt. Da an jeder Oberfläche der Reflexionswinkel der gleiche ist wie der Einfallswinkel, kann das Sammeln unerwünschten reflektierten Lichts durch L minimiert werden, indem der Beleuchtungslichtstrahl auf Winkel begrenzt wird, die außerhalb des Konus C liegen. Wie auch in dem vorherigen Abschnitt kann gezeigt werden, dass Reflexionen die Menge an Energie, die an die lichtstreuenden Partikel abgegeben wird, nicht signifikant herabsetzen, und dass in trockenen oder mit Wasser bedeckten Partikeln keine kritischen Reflexionen auftreten. Nichtspezifische Lichtstreuung auf Grund von Oberflächen-Artefakten ist die gleiche, die in dem vorhergehenden Abschnitt diskutiert wurde.

Beleuchtung durch eine Prismenanordnung

i. Beleuchtung von unten

[0285] In [Fig. 11](#) ist ein schematisches Diagramm einer Prismenanordnung dargestellt. In einer ihrer einfachsten Formen besteht sie aus einem Dreikantprisma, auf dem Kavitäten einer Mikrotiterplatte, Objekträger, Mikroarrays auf Kunststoff- oder Glassubstraten und Ähnliches, welche die zu detektierenden lichtstreuenden Partikel enthalten, angeordnet sein können. Die Probenkammer oder der Träger, welcher die lichtstreuenden Partikel enthält, ist auf der oberen Oberfläche S2 des Prismas angeordnet; die Oberfläche, welche die Partikel enthält, befindet sich am Brennpunkt der Linse L. Immersionsöl wird zwischen der Probenkammer oder dem Objekträger und dem Prisma platziert, um nicht-spezifisches Licht durch Angleichung des Brechungsindex zu minimieren. Die Partikel liegen trocken in Luft vor. Wenn die Indexangleichung an S2 exakt oder nahezu exakt ist, unterliegt der Lichtstrahl keiner signifikanten Brechung oder Reflexion an S2. Somit verläuft ein Beleuchtungslichtstrahl in einer ungefähr geraden Linie, wenn er das Prisma und die Oberfläche, welche die lichtstreuenden Partikel enthält, durchquert. Jedoch tritt an der Luft-Prisma-Grenzfläche S1 und an S3 Brechung auf. Es sei der Fall betrachtet, in dem der Beleuchtungslichtstrahl in das Prisma in einer Richtung senkrecht zu S1 eintritt (Einfallswinkel gleich 0°), wobei es sich bei dem Prisma um ein 45° -Prisma handelt (Winkel $\gamma = 45^\circ$). Da der Strahl in einer geraden Linie von S1 zum Punkt 0 auf S3 verläuft, trifft er auf die Oberfläche S1 mit einem Winkel von 45° . Der Strahl unterliegt dann totaler Innenreflexion, da der kritische Winkel für Glas zu Luft ungefähr 42° beträgt. Somit ermöglicht – im Gegensatz zur Beleuchtung von unten ohne Verwendung eines Prismas (siehe [Fig. 6](#)) – die Anordnung des Prismas kritische Reflexion. In Abwesenheit eines Prismas ([Fig. 6](#)) kann dagegen kritische Reflexion nicht erreicht werden, da an S1 Lichtbrechung, wie in [Fig. 6](#) dargestellt, auftritt (siehe ebenso [Fig. 7](#)). Um einen Lichtstrahl mit hoher Energie bei Verwendung eines Lichtwellenleiters, wie beispielsweise eines Prismas, abzugeben, muss der Beleuchtungslichtstrahl derart ausgerichtet werden, dass er auf S3 mit einem Winkel von weniger als 42° trifft (siehe [Fig. 11](#)). Die Frage ist nun, ob bei Einfallswinkeln von weniger als 42° an S3 ein Zustand erreicht werden kann, bei dem das Licht, welches S3 verlässt, außerhalb des Sammelkegels der Linse L liegt. Angenommen, der Einfallswinkel an S3 beträgt 35° . Aus dem Snelliusschen Gesetz (mit $n_1 = 1,5$ und $n_2 = 1$) ergibt sich, dass der Einfallswinkel 62° ist und sich außerhalb des Sammelkegels des anspruchsvollsten Objektivs, nämlich dem 40×-Objektiv mit $\theta_H = 41^\circ$, befindet. Daraus kann geschlossen werden, dass die Prismenanordnung von [Fig. 11](#) die Abgabe von Licht mit hoher Energie auf trockene lichtstreuende Partikel in Luft unter Aufrechterhaltung eines dunklen Hintergrunds ermöglicht.

[0286] Als Nächstes sei die Prismenanordnung von [Fig. 11](#), in der die lichtstreuenden Partikel mit Wasser und

einem Deckglas bedeckt sind, betrachtet. Wie zuvor beschrieben, verläuft ein Erregungslichtstrahl in einer geraden Linie von S1 zu O, wobei er auf die Glas-Wasser-Grenzfläche trifft. Er verläuft dann durch das Wasser und das Deckglas und trifft schließlich auf die Glas-Luft-Grenzfläche an der unteren Oberfläche des Deckglases. Es ist nun von Interesse, die Reflexionen zu betrachten, die an den Glas-Wasser- und Glas-Luft-Grenzflächen auftreten. Der Winkel für kritische Reflexion an der Luft-Wasser-Grenzfläche ist gleich $62,5^\circ$ (bei Einsetzen von $n_1 = 1,5$ und $n_2 = 1,33$ in Gleichung (40)). Die Einführung von Wasser an der Oberfläche S3 ermöglicht somit die Bestrahlung mit sehr viel höheren Winkeln als in Luft, ohne dass totale Innenreflexion auftritt. Außerdem ist bei Winkeln von weniger als $62,5^\circ$ die Reflektanz an der Glas-Wasser-Grenzfläche gering. Im Folgenden sei die Reflexion an der Deckglas-Luft-Grenzfläche betrachtet. Ein Lichtstrahl trifft senkrecht auf die Oberfläche bei S1. Wenn es sich bei dem Prisma um ein 45° -Prisma handelt, trifft der Strahl mit einem Winkel von 45° auf S3, wo er totaler Innenreflexion unterliegt. Die Brechung an S3 (Glas-zu-Wasser) verändert den Winkel des Strahls auf 55° . Jedoch biegt die Brechung an der Wasser-Deckglas-Grenzfläche den Strahl zurück zu 45° . Der Strahl trifft somit auf die Deckglas-Luft-Grenzfläche mit 45° . Die Prismenanordnung, bei der die Partikel in Wasser vorliegen und mit einem Deckglas bedeckt sind, ermöglicht somit die effiziente Abgabe von Lichtenergie an die lichtstreuenden Partikel (die an der Oberfläche S3 anhaften oder frei im Wasser vorliegen), das einfallende Licht wird jedoch vollständig an dem Deckglas reflektiert.

[0287] Aus der obigen Diskussion kann geschlossen werden, dass keine Reflexionen auftreten, die ernsthaft die Abgabe von Lichtenergie an die lichtstreuenden Partikel in einem Wasserfilm beeinflussen. An der Deckglas-Luft-Grenzfläche treten totale Reflexionen auf, diese Reflexionen beeinflussen jedoch nicht die Abgabe von Einfallslichtenergie an die streuenden Partikel.

[0288] Aus den obigen Diskussionen geht hervor, dass sowohl Prismenanordnungen als auch Anordnungen ohne Prisma eine effiziente Abgabe von Energie durch gewinkelte Bestrahlung von Partikeln, die an einer Oberfläche anhaften oder frei in Lösung vorliegen, ermöglichen. Unter effizienter Abgabe wird verstanden, dass der Lichtstrahl an keiner der vorliegenden Oberflächen totaler Innenreflexion unterliegt und die Sammlung nicht-spezifischen Lichts minimiert ist. Es stellte sich jedoch experimentell heraus, dass bei bestimmten Anwendungen verbesserte Detektionsmöglichkeiten mit der Prismenanordnung bestehen, da durch diese Anordnung Artefakte auf Grund von Streuung aus Unregelmäßigkeiten auf Glas- oder Kunststoff-Oberflächen in der Nähe der lichtstreuenden Partikel eliminiert oder beträchtlich reduziert werden. Durch das Immersionsöl, welches verwendet wird, um die Festphase an das Prisma zu koppeln, wird nicht-spezifische Lichtstreuung aus Unregelmäßigkeiten an S2 ([Fig. 11](#)) nahezu vollständig eliminiert. Diese Effekte sind anscheinend auf einen Indexangleichungs-Mechanismus zurückzuführen. Die nichtspezifische Lichtstreuung am Eintrittspunkts des Lichtstrahls an S1 wird von den spezifischen streuenden Partikeln an Punkt O entfernt gehalten (wenn das Prisma ausreichend groß ist), und trägt nicht zu dem Streulicht bei, welches durch die Vergrößerungslinse gesammelt wird. Wenn die spezifischen streuenden Partikel in Wasser vorliegen, wird außerdem durch die Indexangleichung durch den Wasserfilm nichtspezifische Streuung auf der Oberfläche S3 beträchtlich herabgesetzt. In Anwesenheit von Wasser und einem Deckglas unterliegt der Beleuchtungslichtstrahl zudem totaler Reflexion an der Deckglas-Luft-Grenzfläche. Durch diese Reflexion wird nicht-spezifische Streuung von Unregelmäßigkeiten an der Deckglas-Luft-Grenzfläche beträchtlich vermindert, da lediglich eine kleine Menge an Lichtenergie die Unregelmäßigkeiten auf dieser Oberfläche erreicht. Außerdem wird durch die totale Innenreflexion die Wahrscheinlichkeit, dass Beleuchtungslight direkt in den Lichtsammelkegel der Vergrößerungslinse eintreten kann, vermindert oder eliminiert. Es sei darauf hingewiesen, dass die totale Innenreflexion sich ebenso auf den Sammelwinkel der Linse L auswirken kann, da Partikelstreulicht, welches den Winkel an der Deckglas-Luft-Grenzfläche auf mehr als 42° vergrößert, vollständig reflektiert wird. Dieser Effekt wirkt sich jedoch nicht ernsthaft aus.

Mikroskopische Beobachtungen

[0289] Im vorhergehenden Abschnitt wurden die Beleuchtungs- und Detektionssysteme (Vergrößerungslinsen) diskutiert, mit Schwerpunkt auf die Faktoren (Reflexionen und Brechungen), die die effiziente Abgabe von Lichtenergie an die lichtstreuenden Partikel (welche anhaftend an einer Oberfläche oder frei über der Oberfläche vorliegen) bestimmen, während das nicht-spezifische Licht, welches gesammelt wird, minimiert wird. In diesem Abschnitt sind experimentelle Details dargestellt, die durch visuelle Beobachtung des durch die Vergrößerungslinse L erzeugten vergrößerten Bildes durch ein Okular erhalten werden.

a Details der Lichtquellen und optischen Fasern

[0290] Es wurden drei verschiedene Typen von Lichtquellen verwendet.

i. Leica-Mikroskop-Illuminator

[0291] Es handelt sich um einen kommerziell erhältlichen Standard-Mikroskop-Illuminator. Er verwendet eine Wolfram-Glühlampe und Linsen, die ein 5×7 mm großes fokussiertes Bild des Glühdrahts mit einem Abstand von ungefähr 22 mm von der Spitze des Illuminators erzeugen. Zur Erzeugung eines stärker fokussierten Lichtstrahls wurde eine 10×-Objektivlinse an dem Mikroskop befestigt. Die Linse befand sich ungefähr 6,5 cm von der Spitze des Illuminators entfernt. Das Objektiv erzeugte einen fokussierten Lichtpunkt von ungefähr 4 bis 5 mm Durchmesser in einem Abstand von etwa 7 mm von der Objektivlinse.

ii. Faser-Lite-Illuminator von Bausch und Lomb

[0292] Hierbei handelt es sich ebenso um einen kommerziell erhältlichen Illuminator. Er verwendet eine 150-Watt-Wolfram-Glühlampe, welche auf einem Parabolreflektor angebracht ist. Der Reflektor erzeugt einen Strahl nahezu parallelen Lichts mit einem Durchmesser von ungefähr 25 mm. Ein optischer Lichtwellenleiter mit 11 mm Durchmesser (bestehend aus vielen gebündelten optischen Fasern) wird in der Nähe der Glühlampe positioniert. Der optische Lichtwellenleiter wird dann in zwei gleiche Lichtwellenleiter geteilt, von denen jeder einen Durchmesser von ungefähr 5,3 mm und eine Länge von ungefähr 2 Fuß aufweist. Von diesen Lichtwellenleitern wurde einer verwendet. Zur Erzeugung eines fokussierten Lichtpunkts wurde das Licht von der optischen Faser unter Verwendung einer Linse mit 25 mm Brennweite (20 mm Durchmesser), die in einem Abstand von etwa 25 mm vom Ende der optischen Faser positioniert war, parallel gerichtet. Das parallel gerichtete Licht wurde dann zu einem Lichtpunkt mit 5 mm Durchmesser durch ein 10×-Objektiv, welches ungefähr 50 mm von der Kollimationslinse entfernt war, fokussiert. Die Kollimation- und Objektivlinsen befanden sich in einer kompakten Halterung, die starr an der optischen Faser befestigt war. Die Flexibilität der optischen Faser macht die Handhabung dieses Lichtquellsystemtyps sehr viel einfacher als die des starren Leica-Mikroskop-Illuminators.

iii. Maßgefertigter Illuminator

[0293] Hierbei handelt es sich um einen selbst konstruierten Illuminator. Er verwendet eine 12 V, 28 Watt Wolfram-Glühlampe, die auf einem Parabolreflektor angebracht ist. Der Reflektor erzeugt einen nahezu parallelen Lichtstrahl, welcher in einen Lichtwellenleiter mit einem Durchmesser von 0,125 Inch fokussiert wird. Der Lichtwellenleiter besitzt eine Länge von 36 Inch. Das Licht von dem Reflektor wird auf die optische Faser mit einer Linse (23 mm Brennweite, 9 mm Durchmesser), welche in der Nähe der Lampe positioniert ist, fokussiert. Der Lichtwellenleiter besitzt eine numerische Apertur von 0,55 und akzeptiert einen Lichtkegel mit einem planaren Halbwinkel von 60°. Das Licht, welches am anderen Ende des Lichtwellenleiters auftrifft, wird durch eine 12-mm-Brennlinse (Durchmesser 11 mm), welche mit einem Abstand von etwa 17 mm vom Ende der Faser positioniert ist, parallel gerichtet. Dieses parallel gerichtete Licht wird schließlich durch ein 10×-Objektiv in einen hellen Punkt von 5 mm Durchmesser fokussiert. Die Objektivlinse ist mit einem Abstand von etwa 26 mm von der Kollimationslinse positioniert. Der helle Punkt von 5 mm befindet sich in einem Abstand von etwa 12 mm von Ende der Fokussierlinse.

b. Prismen (Lichtwellenleiter)

[0294] Fig. 12 zeigt Diagramme einiger Lichtwellenleiter, wie beispielsweise Prismen, die sich als geeignet in den vorliegenden Beleuchtungssystemen herausstellten. Bei einigen handelt es sich nicht um Prismen im klassischen Sinn, sondern eher um Lichtwellenleiter. Der Lichtwellenleiter ermöglicht die effiziente Abgabe von Licht mit einem Winkel und gleichzeitig den Austritt des reflektierten Lichtstrahls an der Oberfläche, die der Einfallslicht-Oberfläche gegenüberliegt. Aus folgenden Gründen muss er bestimmte Mindestmaße aufweisen. Die Punkte, an denen der Lichtstrahl eintritt und das reflektierte Licht austritt, können signifikante nichtspezifische Lichtstreuung auf Grund von Oberflächenunregelmäßigkeiten erzeugen. Diese Punkte müssen ausreichend von dem Patch der spezifischen lichtstreuenden Partikel entfernt werden, um ihren Beitrag an der nicht-spezifischen Lichtstreuung zu minimieren. Die Lichtwellenleiter können in einem Stück mit der Probenkammer ausgebildet werden, wodurch das Erfordernis der Verwendung von Immersionsöl zwischen dem Lichtwellenleiter und dem Analysestück entfällt. Der Anmelder stellte den Prototyp einer solchen Vorrichtung her, indem ein kleiner Lichtwellenleiter auf den Boden einer Kunststoffkammer, welche einen Mikroarray aus Streptavidin-Spots, aufgetragen auf die innere Oberfläche der Probenkammerwand enthielt, geklebt wurde. Die Detektion und Messung der an die einzelnen Mikrospots des Mikroarrays gebundenen lichtstreuenden Partikel unter Verwendung dieser Vorrichtung war im Wesentlichen die gleiche wie bei den Messungen durch Partikelzählung und Intensitätsmessungen mit der Probenkammer, die auf einem Prisma platziert war und wo Immersionsöl zwischen den zwei Oberflächen vorlag.

c. Mikroskopische Beobachtungen

[0295] Unter Verwendung eines Okulars für visuelle mikroskopische Beobachtungen wurden verschiedene Beleuchtungsanordnungen mit spezifischem Augenmerk auf die Helligkeit der Partikel, die Dunkelheit des Hintergrunds und die Eignung in verschiedenen Typen klinischer Assay-Formate bewertet. Es wurden gute Ergebnisse mit mehreren verschiedenen Anordnungen erzielt. Im Folgenden wird die Diskussion auf eine der am einfachsten zu verwendenden und kostengünstigsten Anordnungen, welche ausgezeichnete Ergebnisse ergibt, beschränkt. Unter ausgezeichnete Ergebnisse werden helle Partikel auf einem dunklen Hintergrund unter Verwendung von 10×- und 40×-Objektiven als Vergrößerungslinsen verstanden.

[0296] Das Abbildungssystem ist ein kostengünstiges Mikroskop von Edmund Scientific. Das Mikroskop besteht aus einem Objektiv (10× oder 40×) und einem Okular in einer 160-mm-Standardröhre. Der Grund für die Verwendung eines Mikroskops anstelle der einfachen Verwendung eines Objektivs und eines Okulars ist die Bequemlichkeit, die durch den feinen/leichtgängigen Fokussierungsmechanismus des Mikroskops bereitgestellt wird. Jedoch wurde der Objekttisch des Mikroskops derart modifiziert, dass er auf das vorliegende Beleuchtungsverfahren angepasst ist, und der Mikroskopkondensor durch einen Lichtwellenleiter (Prismen Typ), wie in [Fig. 12\(d\)](#) dargestellt, ersetzt. Der unterhalb des Prismas angeordnete Zylinder passt in die Kondensorhalterung. Der modifizierte Objekttisch und der Illuminator ermöglichen die Arbeit mit Objektträgern, Mikrotiterplatten und anderen Kunststoffplatten. Jedoch kann auf Grund des kleinen Arbeitsabstands (ungefähr 0,45 mm) das 40×-Objektiv nicht mit dicken Kunststoffplatten verwendet werden. Es sind auch 40×-Objektive mit größerem Arbeitsabstand erhältlich. Der selbst konstruierte Illuminator wird zur Beleuchtung verwendet.

[0297] Zur Einstellung des Mikroskopsystems auf das DLASLPD-Verfahren wird ein Objektträger, welcher freie oder oberflächengebundene Goldpartikel (60-nm-Goldpartikel in einem dünnen Wasserfilm, bedeckt mit einem Deckglas) enthielt, auf dem Objekttisch des Mikroskops platziert. Das Prisma wird derart positioniert, dass seine Oberfläche nahezu in Kontakt mit dem Objektträger steht. Die Oberflächen des Objektträgers und des Prismas werden durch Immersionsöl verbunden. Das 10×-Fokussierobjektiv des Beleuchtungssystems wird derart positioniert, dass es nahezu in Kontakt mit der beleuchteten Seite des Prismas steht (siehe [Fig. 13](#)). Das Objektiv ist derart gewinkelt, dass das Licht senkrecht in die Beleuchtungsüberfläche eintritt und auf die Oberfläche S (Oberfläche in Kontakt mit dem Objektträger) in einem Winkel von etwa 45° trifft. Wenn der Goldpartikelfilm auf dem Objektträger eine ausreichend hohe Konzentration an Partikeln aufweist (ungefähr 6×10^9 Partikel/ml oder mehr) weist der Punkt, an dem das Licht den Partikelfilm durchquert, auf Grund der Lichtstreuung durch die Partikel eine stark gelbgrüne Farbe auf. Die Position des 10×-Fokussierobjektivs wird derart eingestellt, dass der gelb-grüne Punkt in Bezug auf das (vergrößernde) Mikroskop-Objektiv zentriert wird. Das Mikroskop wird dann auf den Punkt fokussiert, so dass die Partikel als scharfe Objekte erscheinen, wenn sie durch das Okular betrachtet werden. Die Position und der Winkel des 10×-Beleuchtungsobjektivs wird dann wieder in Position gebracht, um helle Objekte auf einem dunklen Hintergrund zu erzeugen. Diese Einstellung wird mit dem 40×-Objektiv des Mikroskops wiederholt. Es existiert ein enger Bereich von Positionen, bei denen helle Objekte auf einem dunklen Hintergrund sowohl für 10×- als auch für 40×-Objektive erzeugt werden.

[0298] Es sei darauf hingewiesen, dass kein Beleuchtungslicht in den Luftraum oberhalb des Objektträgers transmittiert wird, wenn der Beleuchtungslichtstrahl auf die Prismenoberfläche mit einem größeren Winkel als ungefähr 42° auftrifft (kritischer Winkel für totale Innenreflexion an der Kunststoff- oder Glas-Luft-Grenzfläche). In der vorliegenden Anordnung beträgt der Einfallswinkel 45°. Dies kann durch Platzieren eines weißen Stücks Papier über dem Objektträger verifiziert werden. Es fällt kein Beleuchtungslicht auf das Papier. Jedoch ist es von Interesse, den Beleuchtungsstrahl zu visualisieren, um seine Form oder sein Raumprofil zu bestimmen. Dies kann durch Platzieren eines Rhodamin-Kunststoffblocks oben auf dem Objektträger unter Verwendung von Immersionsöl zur Verbindung erfolgen. Bei dem Rhodamin-Block handelt es sich um einen transparenten Kunststoffblock, welcher das fluoreszierende Molekül Rhodamin enthält. Ein durch den Block verlaufender Strahl kann anhand der Rhodamin-Fluoreszenz, die er erzeugt, beobachtet werden. Durch das Immersionsöl wird der Luftraum eliminiert und es dem Beleuchtungsstrahl ermöglicht, in den Kunststoffblock einzutreten. Das durch Fluoreszenz innerhalb des Blocks sichtbar gemachte Profil des Beleuchtungsstrahls ist in [Fig. 13](#) dargestellt.

[0299] Bei geeigneter Positionierung des Beleuchtungssystems können Goldpartikel, die größer sind als ungefähr 30 nm, leicht auf Objektträgern, in Kunststoff-Kavitäten und Festphasen-Mikroarrays oder Array-Chips beobachtet werden. Das 10×-Objektiv ermöglicht die Detektion von Partikeldichten von weniger als 0,005 Partikeln pro μm^2 . Das 10×-Objektiv besitzt einen Arbeitsabstand von ungefähr 8,5 mm, so dass es mit Kunststoffstücken verwendet werden kann, die eine Dicke von ungefähr 8 mm aufweisen.

Verfahren der DLASLPD-Video-Kontrastverstärkung

[0300] Es wurde bestimmt, dass metallartige Partikel und nicht-metallartige Partikel unter Anwendung des Verfahrens der DLASLPD-Video-Kontrastverstärkung mit höheren Sensitivitäten in Proben detektiert werden können. Dieses Verfahren beinhaltet die elektronische Einstellung des abgebildeten nichtspezifischen Lichthintergrunds derart, dass er im Wesentlichen aus dem abgebildeten Feld entfernt wird, während die individuellen Partikel sichtbar bleiben. Das Verfahren arbeitet extrem gut mit den anderen hierin beschriebenen Verfahren. Unter Anwendung dieses Verfahrens wurden Ergebnisse mit verbesserter Spezifität und Sensitivität erhalten.

Verbesserungen der Probenkammer

[0301] Durch Anwendung bestimmter Aspekte der vorliegenden Erfindung und weiterer Verbesserung im Hinblick auf einfache Handhabung, Anpassung auf verschiedene Testumgebungen und -bedingungen stellte sich heraus, dass bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung in die Konstruktion von Probenkammern, die zur Durchführung des Assays und zur Detektion der Analyten verwendet werden, aufgenommen werden können.

[0302] Beispielsweise können, basierend auf diesseitigen Beobachtungen und Konzeptentwicklungen, die entwickelten Prinzipien auf die allgemeine Konstruktion der Probenkammer, das heißt, das Behältnis, welches die zu analysierende Probe enthält, angewendet werden. Diese Verbesserungen können die einfache Handhabung und Anwendbarkeit auf Testtypen und Testbedingungen, die oben kurz ausgeführt sind, erleichtern. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Erfindung, wie sie hierin beschrieben ist, gleichwohl ohne Verwendung der folgenden Verbesserungen bezüglich der Probenkammer praktiziert werden kann. Diese Verbesserungen stellen Mittel zur Erhöhung der praktischen Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung auf spezifische Testbedingungen und -umgebungen, wie sie an anderer Stelle hierin beschrieben sind, dar.

[0303] Es stellte sich heraus, dass bei Bewegen oder Verlagern der Oberfläche S1 (Einfallslicht-Oberfläche) so weit wie möglich weg von dem Bereich, der die zu messenden Partikel enthält, das Signal/Hintergrund-Verhältnis signifikant erhöht wird. Zuvor wurde die Verwendung von Mitteln zur optischen Ausrichtung, wie beispielsweise eines Prismas oder eines ähnlichen optischen Lichtwellenleiters, zur Unterstützung der Orientierung des Beleuchtungsstrahls auf die Oberfläche S1 beschrieben. Gewöhnlich wird zwischen der Oberfläche des Lichtwellenleiters (Prisma usw.) und einer Oberfläche der Probenkammer Immersionsöl verwendet. Es existieren verschiedene Bedingungen bei Analytmessungen, bei denen es vorteilhaft sein kann, kein Immersionsöl als Komponente in der analytischen Methodik zu verwenden. Der Anmelder fand heraus, dass durch Erhöhen der Dicke der Oberfläche, auf der sich die Partikel befinden oder in deren Nähe sich die Partikel aufhalten, das Niveau nicht-spezifischen Lichts, wie vorangehend beschrieben, signifikant reduziert wird.

[0304] Dies und andere Aspekte wurden auf die Konstruktion von Probenkammern zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe angewendet. Diese allgemeinen Probenkammer-Konstruktionen sind in den [Fig. 17](#), [Fig. 18](#) und [Fig. 19](#) schematisch dargestellt. [Fig. 17](#) zeigt eine Probenkammer mit abgeschrägten flachen Seiten. Der Winkelgrad der abgeschrägten Seiten stimmt mit dem Beleuchtungswinkel überein, so dass der Beleuchtungsstrahl auf die Oberfläche der abgeschrägten Seite mit einem Winkel auftrifft, der so nahe wie möglich an 0 Grad liegt (mit Bezug auf die Senkrechte). Auf diese Weise wird nicht-spezifisches reflektiertes und gestreutes Licht minimiert. [Fig. 18](#) zeigt eine Probenkammer, welche gebogene Seiten anstelle flach abgeschrägter Seiten, wie in [Fig. 17](#) dargestellt, aufweist. In dieser Probenkammer, bei der der austretende Strahl abgelenkt wird, ermöglicht die gebogene Oberfläche eine effizientere Beseitigung dieses nichtspezifischen Lichts. [Fig. 19](#) zeigt eine Probenkammer, in der beide Konzepte verwendet werden, indem die Einfallssoberfläche, auf welcher der Lichtstrahl auf die Probe trifft, weiter weg von dem zu messenden Bereich bewegt wird, und die gebogenen Seiten eine effizientere Entfernung nicht-spezifischen Lichts ermöglichen. Somit weist diese Probenkammer eine erhöhte Dicke des Materials unterhalb der unteren Oberfläche der Kavität, abgeschrägte flache Oberflächen unterhalb der Ebene der Oberfläche für die Beleuchtung und gebogene Seiten oberhalb der Oberflächenebene des Bodens der Kavität auf, um nicht-spezifisches Licht effizient zu entfernen. Die in den [Fig. 17](#), [Fig. 18](#) und [Fig. 19](#) dargestellten Kammern sind geeignet zur Messung immobilisierter Proben sowie Lösungsproben.

Anwendung der vorliegenden Erfindung auf analytische diagnostische Assays – Vorrichtungstypen und Testkits

[0305] Auf dem Gebiet sind eine Vielzahl von Analyttypen bekannt. Diese Analyten liegen in verschiedenen Probenumgebungen, wie beispielsweise Wasser, Urin, Blut, Sputum, Gewebe, Erde, Luft und Ähnlichem, vor. In Abhängigkeit der Anforderungen eines bestimmten analytischen Assay-Typs kann der Erhalt semi-quantita-

tiver oder quantitativer Information oder von beidem bezüglich der interessierenden Analyten gewünscht sein. Unter manchen Umständen ist es wünschenswert, die Analyse mit einer kleinen, kostengünstigen und leicht tragbaren Vorrichtung durchzuführen. Dazu zählen beispielsweise der Gebrauch „in the field“ außerhalb eines Labors oder am Krankenhausbett. Wünschenswert ist die Möglichkeit, auf schnelle Weise entweder halbquantitative und/oder quantitative Messungen bezüglich der fraglichen Analyten durchzuführen. Bei anderen Anwendungen ist es wünschenswert, eine kleine und kostengünstige Vorrichtung zur Analytdetektion in einem kleinen Labor, wo nur einige Proben am Tag getestet werden, zu haben, um quantitative Ergebnisse zu erhalten. Dazu zählen beispielsweise eine Arztpraxis, Klinik, Satteliten-Testlabors, Forschungslabore und Ähnliches. Ebenso gibt es Bedingungen, unter denen das Testen mehrerer 100 bis 1.000 Proben pro Tag gewünscht ist, wie beispielsweise bei Hochdurchsatztests. Jede der obigen Testbedingungen und -umgebungen erfordert somit einen anderen Vorrichtungstyp. Die Vorteile und Nachteile bezüglich der einfachen Handhabung und der Kosten einer derartigen Vorrichtung können nur detailliert bestimmt werden, wenn die exakten Testerfordernisse für den/die Analyten in einer Probe gut definiert sind.

[0306] Der Anmelder fand heraus, dass die Verwendung bestimmter metallartiger Partikel mit bestimmten Variationen der DLASLPD-Detektionsverfahren die Entwicklung spezifischer Testkits und Vorrichtungen für die oben erwähnten Testumgebungen und -anwendungen ermöglicht. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Kombinationen von Analyten, Testumgebungen, Probentypen, Assay-Formaten, Analyt-Detektionserfordernissen und Erfordernissen bezüglich der Vorrichtungskosten und -größe. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt die enorme Nützlichkeit der vorliegenden Erfindung derart, dass die Durchführung der vorliegenden Erfindung in der einen oder anderen Form zu leicht handhabbaren und kostengünstigen Vorrichtungen und Testkits führt, wodurch die meisten Erfordernisse bezüglich analytischer oder diagnostischer Tests erfüllt werden.

[0307] Es bestehen viele verschiedene Konfigurationen und Kombinationen der DLASLPD-Verfahren, Partikeltypen und Probentypen, die gemeinsam verwendet werden können, um eine spezifische Analytdetektion durchzuführen zu können. Bei spezifischen diagnostischen Assays sind der Probentyp oder die Probentypen und das Beleuchtungs- und Detektionsverfahren gewöhnlich festgelegt, wie beispielsweise das Assay-Format, der Probenkammertyp und die Detektionsvorrichtung. Die metallartigen Partikel weisen einzigartige Streulicht-eigenschaften auf, die in Abhängigkeit von der Größe, Form, Zusammensetzung und Homogenität der Partikel variieren. Die spezifischen Lichtstreu-eigenschaften der Partikel, die detektiert und/oder gemessen werden können, sind durch die zuvor erwähnten Partikeleigenschaften und das Verfahren und die Vorrichtung, die zur Detektion und Messung der Lichtstreu-eigenschaften verwendet werden, festgelegt. Somit wird die letztendliche Nützlichkeit und Durchführbarkeit der Erfindung in der einen oder anderen Form durch das Kombinieren verschiedener Aspekte/Ausführungsformen von Beleuchtungs- und Detektionsmitteln und des Probentyps mit einem geeigneten Typ oder geeigneten Typen lichtstreuender Partikel erreicht. Dies führt zu spezifischen Vorrichtungen und Testkits.

[0308] Ein Fachmann auf dem Gebiet kann verschiedene Aspekte/Ausgestaltungen dieser Erfindung verwirklichen, indem er verschiedene Partikeltypen, Assay-Formate und Vorrichtungen in vielen verschiedenen Konfigurationen verwendet, um viele verschiedene daraus resultierende Möglichkeiten diagnostischer analytischer Detektion zu erhalten. In [Fig. 22](#) sind verschiedene Aspekte/Ausgestaltungen der Erfindung schematisch dargestellt, die, wenn sie in einer bestimmten Kombination ausgeführt werden, Vorrichtungen und Testkits ergeben, die an ein spezifisches diagnostisches analytisches Testerfordernis angepasst sind. Die resultierenden Vorrichtungen und Testkits ergeben sich durch Auswahl der geeigneten Komponenten der Methodik-/Vorrichtungstyp-Konfiguration ([Fig. 23](#)) und der Partikeltyp-Konfiguration ([Fig. 24](#)). [Fig. 23](#) zeigt die Auswahl der Beleuchtungsquelle, des Verfahrens und anderer Vorrichtungskomponenten, des Assay- und Probentyps und des Detektionsverfahrens und der Vorrichtungskomponenten durch einen Fachmann. [Fig. 24](#) zeigt die Auswahl der geeigneten Partikelzusammensetzung, Partikelform, -größe und -homogenität durch einen Fachmann zum Nachweis der gewünschten Lichtstreu-eigenschaften des/der Partikel(s). Diese Verfahren, wie sie in den [Fig. 23](#) und [Fig. 24](#) dargestellt und in dem Diagramm von [Fig. 22](#) zusammengefasst sind, führen zu spezifischen Vorrichtungen und Kits. Das Diagramm in [Fig. 25](#) zeigt eines der allgemeinen Verfahren, das angewendet wird, um spezifische Vorrichtungen und Testkits für ein bestimmtes diagnostisches Testerfordernis zu entwickeln. Ein Fachmann auf dem Gebiet muss nicht das Verfahren in [Fig. 25](#) durchführen, um die vorliegende Erfindung in der einen oder anderen Form zu praktizieren.

[0309] Die bemerkenswerten Signalerzeugungs- und -detektionsmöglichkeiten bei der Kombination metallartiger Partikel mit den hierin beschriebenen DLASLPD-Beleuchtungs- und -Detektionsverfahren ermöglichen einen breiten Sensitivitätsbereich der Analytdetektion. Im Hinblick auf die allgemeinen Typen von Testumgebungen und die oben kurz beschriebenen [Fig. 22](#) bis [Fig. 25](#) kann ein Fachmann auf dem Gebiet leicht Vorrichtungen und Testkits entwickeln, wobei in einigen diagnostischen Testanwendungen lediglich das bloße Auge

zur Detektion/Messung erforderlich ist, und in anderen Fällen eine einfache Lichtquelle, wie beispielsweise eine LED (lichtemittierende Diode) oder eine Glühlampe mit geringer Stärke verwendet wird; es können eine Photodiode oder ein Photodioden-Array verwendet werden, um das Signal zu detektieren oder zu messen. In anderen analytischen Testanwendungen kann ein Laser, eine Laserdiode, eine Glühlampe oder Ähnliches zusammen mit einer Kamera, einer Videokamera oder anderen CCD-Vorrichtung (Ladungsgekoppelte Vorrichtung) verwendet werden, und das Streulicht von den Partikeln in einem Mikroarray-Format oder irgend einem anderen Format mit einfachen Bildverarbeitungsmitteln detektiert und gemessen werden. Diese Beispiele sollen nicht als einschränkend verstanden werden, sondern zeigen allgemein die Vielseitigkeit und breite Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten von Interesse in einer Probe.

[0310] Beispielsweise kann eine kleine handliche tragbare Vorrichtung, welche einen oder mehrere Analyten in einer Probe messen kann, unter Verwendung einer leistungsarmen Glühlampe, LED oder Laserdiode als Lichtquelle aufgebaut werden. Eine Photodiode oder ein Photodioden-Array wird als Detektor verwendet. In Abhängigkeit der erforderlichen Detektions-Sensitivität können bestimmte Typen metallartiger Partikel mit dieser Vorrichtung verwendet werden, um die Erfordernisse der Analytdetektion zu erfüllen. Testkits werden für Multi-Analyt- oder Einzel-Analytdetektion in flüssigen oder Festphasenproben konstruiert. Beispielsweise werden für Flüssigproben verschiedene Partikeltypen, die jeweils verschiedene leicht detektierbare Streulichtenschaften aufweisen, verwendet. In Festphasenproben und -formaten, wie beispielsweise einem Mikroarray, kann ein Partikeltyp für alle verschiedenen Analyten verwendet werden, oder es können verschiedene Kombinationen von Partikeltypen (in Abhängigkeit von den Konzentrationen der verschiedenen Analyten in der Probe) verwendet werden.

[0311] In einem anderen Beispiel kann eine kostengünstige Vorrichtung und Testkits, mit denen geringe Analytkonzentrationen gemessen werden können, folgendermaßen konstruiert werden. Eine leistungsarme oder leistungsstarke Lichtquelle wird mit einer Photoelektronenvervielfacher-Rohre, einem Photodioden-Array oder einer Videokamera verwendet. Eine Linse wird verwendet, um das gestreute Licht von der/den Oberfläche(n), welche die Partikel enthält/enthalten, zu sammeln. Ein Mikroprozessor oder externer Desktop-Computer wird verwendet, um die Streulichtdaten zu sammeln und zu analysieren. Testkits für Multi-Analyt-Festphasen-Analyse werden unter Verwendung eines geeigneten Partikeltyps oder geeigneter Partikeltypen mit geeigneten Mikroarray-Probenkammern bereitgestellt, um die erforderlichen Konzentrationsbereiche und Detektionsgrenzen zu erreichen. Diese Vorrichtungstypen und Testkits können in Forschungslaboren, Arztpraxen, Satellitenkliniken, Umwelttestlaboren und Hochdurchsatz-Testlaboren Anwendung finden.

[0312] Die obigen Beispiele für Vorrichtungen und Testkits stellen illustrative Beispiele dar und sind nicht als die einzigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt die breite Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung. Bei Durchführung eines oder mehrerer Aspekte/Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung zum Erreichen einer spezifischen Analyt(en)detektion erkennt der Fachmann auf dem Gebiet die große Anzahl an Vorrichtungen und Testkits, die bereitgestellt werden können.

Assays, welche die Assoziation oder Aggregation von zwei oder mehr Partikeln durch Interaktion des Analyten mit spezifischen Analyt-Erkennungsreagenzien beinhalten

[0313] Auf dem Gebiet ist bekannt, dass durch Verwendung eines geeigneten Bindungsgens oder geeigneter Bindungsagenzien und geeigneter Konzentrationen an Bindungsagenzien und Analyten Agglutination, Aggregation, Vernetzung und ähnliche Bindungsergebnisse auftreten können, und dass diese Ereignisse verwendet werden können, um einen oder mehrere Analyten in einer Probe nachzuweisen. In einigen Immunoassays werden sichtbare Niederschläge gebildet, wenn das Antigen löslich und mehrwertig ist, während agglutinierte oder verklumpte Partikel gebildet werden, wenn das Antigen partikelförmig und mehrwertig ist. In einigen Nukleinsäure-Assays kann eine spezifische einzelsträngige Sonde zwei oder mehr einzelsträngige Targets „vernetzen“ und die Vernetzungen verbreiten. Alternativ können zwei oder mehr verschiedene einzigartige einzelsträngige Nukleinsäuresonden verwendet werden, um an verschiedene Stellen auf dem gleichen einzelsträngigen Nukleinsäure-Target zu binden. In diesem Ansatz kann die Vernetzung von zwei oder mehr Targets erreicht werden oder, bei Bindung von nur zwei einzigartigen Sondensequenzen an das gleiche Target, die Detektion ermöglicht werden.

[0314] Die vorliegenden Erfindung ermöglicht eine einfach zu handhabende, sensitivere und vielseitigere Detektion von Analyten als es bisher möglich war. In spezifischen Assay-Formaten können die submikroskopischen Partikel dieser Erfindung verschiedene Aggregattypen bilden, die visuell oder durch Instrumente in ei-

nem Mikroskop oder durch makroskopische Beobachtung oder Messungen detektiert werden, ohne dass sie von den Analyt-gebundenen Partikeln getrennt werden müssen. Der gebildete Aggregattyp ist abhängig von der Größe des/der Quervernetzungsmittel(s) und ihrer Valenz und vom Typ des an das Partikel gebundene Bindungsagens. Die Aggregate können aus zwei oder vielen Partikeln bestehen.

[0315] Die in einem homogenen Flüssigphasen-Aggregations-Detektions-Assay verwendeten Partikel können direkt oder indirekt markiert sein. In einem direkten Markierungs-Assay wird ein Agens, welches direkt an den Analyten binden kann, an das Signal-erzeugende Partikel gebunden. Beispielsweise wird in einem direkten Nukleinsäure-Analyt-Markierungsassay die DNA-Sonde an das lichtstreuende Partikel gebunden. In einem indirekten Assay wird das Analyt-detektierende Agens mit einer chemischen Gruppe A markiert, und das Partikel mit einem Agens, welches die Gruppe A erkennen kann, markiert oder beschichtet. Unter Verwendung direkter oder indirekter Markierung kann ein Assay derart formatiert werden, dass die Interaktion des Analyt-Erkennungs-Bindungsagens mit dem Analyten (mit der Gruppe A im Fall indirekter Markierung) zur Aggregation der Partikel führt. Die Aggregate können aus zwei oder mehr Partikel bestehen.

[0316] Es stellte sich heraus, dass, wenn das oder die Aggregations- oder Vernetzungsmittel in einem Assay eine kleine Größe aufweisen, so dass die Partikel in dem Aggregat sehr eng beieinander liegen, die Aggregate, die zwei oder höchstens einige Partikel enthalten, als ein einziges Partikel (submikroskopisches Aggregat) im Mikroskop erscheinen. Jedoch weist dieses submikroskopische Aggregat auf Grund der Partikel-Partikel-Perturbation andere Lichtstreuereigenschaften auf als nicht aggregierte Partikel. In Abhängigkeit der Partikelzusammensetzung, -größe und -form wurden Änderungen in der Farbe, der Intensität, der PIFSLIW und Polarisation des Streulichts beobachtet. Diese Veränderungen können verwendet werden, um die Menge des Analyten zu bestimmen, ohne ihn von den an den Analyten gebundenen Partikeln trennen zu müssen. In einem Mikroskop können die Veränderungen verwendet werden, um zwischen submikroskopischen Aggregaten und nicht-aggregierten Partikeln zu unterscheiden, obwohl beide als einzelne Partikel erscheinen können. Wenn die Aggregations- oder Vernetzungsmittel eine große Größe aufweisen, wie beispielsweise eine lange DNA-Kette, wobei der Abstand zwischen den Partikeln in dem Aggregat größer ist als die Auflösung des Mikroskops, können die Partikel in dem Aggregat individuell beobachtet werden und von nicht-aggregierten Partikeln dadurch unterschieden werden, dass sie zusammen bleiben oder sich zusammen bewegen. Diese mikroskopischen Aggregate können leicht im Mikroskop beobachtet werden, wenn nur zwei Partikel in dem Aggregat vorliegen. Wenn der Abstand ausreichend groß ist, so dass die Partikel-Partikel-Perturbationen gering sind, behalten die Partikel in dem Aggregat ihre ursprünglichen Lichtstreuereigenschaften bei. Es existieren ebenso Partikel-Partikel-Trennungsabstände, die sich zwischen den zwei allgemeinen, oben diskutierten Fällen bewegen. In einigen spezifischen Fällen wurde beobachtet, dass die Partikel in einem submikroskopischen Aggregat nicht (gegenseitig) ihre Lichtstreuereigenschaften stören, vermutlich, da sie nicht eng genug beieinander liegen, damit Partikel-Partikel-Perturbation auftreten kann. Das Aggregat kann trotzdem von nicht-aggregierten Partikeln unterschieden werden, da die Intensität (der Partikel) das n-fache von der nicht-aggregierten Partikel beträgt, wobei n die Anzahl der Partikel in einem Aggregat ist, und/oder die Partikel in einer Position relativ zueinander "fixiert" sind.

[0317] Aus der obigen Diskussion wird deutlich, dass flüssige, Phasen-homogene Assays, auf der Grundlage makroskopischer Messungen oder visueller Beobachtungen leicht durchgeführt werden können, wenn die Aggregate, die durch die Anwesenheit eines Analyten erzeugt werden, andere Lichtstreuereigenschaften aufweisen als die freien, nicht-aggregierten Partikel. Wenn die Partikel-Partikel-Perturbationen in den Aggregaten gering sind, so dass die Lichtstreuereigenschaften der aggregierten und freien Partikel ähnlich sind, sind homogene Assays immer noch möglich unter Anwendung von Detektionsverfahren, welche die Visualisierung oder Messung der Lichtstreuintensitäten der einzelnen Partikel und Aggregate ermöglichen. In dem Fall, in dem die einzelnen Partikel in einem Aggregat sichtbar gemacht werden können, können die Aggregate leicht von freien Partikeln unterschieden und wie oben beschrieben durch visuelle Beobachtung oder Computer-unterstützte Bildanalyse quantifiziert werden. Aggregate können ebenso in einen Durchfluss-Zytometer oder einer ähnlichen Apparatur oder Vorrichtung von freien Partikel unterschieden und quantifiziert werden, da die Aggregate eine höhere Lichtintensität aufweisen als einzelne Partikel. In Fällen, in denen die einzelnen Partikel in einem Aggregat nicht im Mikroskop sichtbar gemacht werden können und keine Partikel-Partikel-Perturbationen auftreten, können die freien Partikel und die Aggregate durch ihre unterschiedlichen Intensitäten voneinander unterschieden und die Anzahl an Partikeln in einem Aggregat anhand der Streulichtintensität des Aggregats (unter der Annahme, dass sich die Intensitäten addieren) festgestellt werden. Dies kann durch Bildanalyse oder Durchfluss-Zytometrie erfolgen und beinhaltet die Entwicklung eines Bildes durch Laser-Scanning oder andere Methoden, welche einen Bereich oder ein Volumen der Probe räumlich analysieren können.

[0318] Wenn die Anzahl an Partikeln in einem submikroskopischen Aggregat ansteigt, kann das Aggregat als

vergrößertes Partikel oder großes Partikel, auch wenn die einzelnen submikroskopischen Partikel in dem Aggregat durch das Mikroskop nicht sichtbar sind, sichtbar gemacht werden. In dem Fall von mikroskopischen Aggregaten erzeugt ein Anstieg der Anzahl der Partikel in dem Aggregat sichtbare Netzwerke, und die Partikel in dem Netzwerk können gezählt werden. Große Netzwerke und Partikel-Aggregate erzeugen makroskopische Einheiten, die mit bloßem Auge beobachtet werden können und Präzipitate oder Agglutinate bilden können.

[0319] Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass die verschiedenen in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Aggregations-Phänomene ausgenutzt werden können, um viele verschiedene Typen homogener Assays zu entwickeln, von denen einige ein Mikroskop oder andere Bildanalysetechniken verwenden und andere makroskopische Beobachtungen oder Messungen beinhalten.

[0320] Es folgen ausgewählte illustrative Beispiele der Durchführung eines homogenen Assay-Typs und anderer Assay-Typen.

Beispiele von Assay-Formaten, welche lichtstreuende Partikel verwenden

[0321] Im Folgenden werden einige illustrative Beispiele gegeben, welche die große Vielseitigkeit und Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung in verschiedenen Assay-Formaten zeigt. Ein Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet erkennt, dass viele Variationen der vorliegenden Erfindung möglich sind, welche eine spezifischere, leichter handhabbare und sensitivere Detektion eines oder mehrerer Analyten in einer Probe ermöglichen, als es bisher möglich war.

i. Assay-Formate, welche die Assoziation von zwei oder mehr Partikeln durch Bindungsereignisse, basierend auf molekularer Erkennung, beinhalten – allgemeine Prinzipien

[0322] In einer Reihe von Experimenten wurde die Oberfläche einer Präparation von Goldpartikeln mit 40 nm Durchmesser unter Anwendung des Verfahrens der Molekülbinding an ein Ausgangsmaterial biotinyliert. Nach Aufreinigung durch Zentrifugation und Waschen wurde ein Tropfen dieses Materials auf einen Glasobjekträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt; dann wurde er mit dem Lichtmikroskop unter Anwendung des DLASLPD-Beleuchtungs- und Detektionsverfahrens beobachtet. Das Material erschien homogen; die Partikel bewegten sich sehr schnell durch Brownsche Molekularbewegung und wiesen grüne Farbe auf. Dann wurde das Deckglas entfernt und ein Tropfen einer Streptavidin-Lösung auf den Objekträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Nach einiger Zeit erschienen neue gelb-orange und orange und orange-weiß farbene Partikelstrukturen in Lösung, welche sehr viel größere Intensitäten aufwiesen und sich viel langsamer bewegten als die grünen Partikel. Einige dieser neuen Partikelstrukturen schienen außerdem asymmetrisch zu sein, da sie flackerten, wenn sie in Lösung rotierten. Nach einiger Zeit waren viele der grünen Partikel verschwunden, und es lagen eine Vielzahl dieser gelb-orangen und orangefarbenen Partikelaggregate vor. Bei Untersuchung der Deckglaskante unter dem Mikroskop stellte sich heraus, dass sie mit einer Schicht orangefarbener, gelb-oranger und weiß-oranger Partikelaggregate bedeckt war, die eine sehr helle Farbe aufwiesen. Ein ähnliches Phänomen wurde in einem Homopolymer-Nukleinsäuresystem beobachtet. Diese Beobachtungen zeigen, dass in verschiedenen Formen der vorliegenden Erfindung Änderungen der Streulichteigenschaften der Partikel verwendet werden können, um das Auftreten molekularer Bindungsereignisse entweder durch Visualisierung der Aggregate, eine Abnahme der Anzahl „freier“ einzelner Partikel oder in einer Bulklösung unter Verwendung anderer Verfahren nachzuweisen. Beispielsweise kann für eine Detektion in Bulklösung oder einem Durchflusssystem der Anstieg der Anzahl neuer Partikelformen mit einzigartigen Streulichteigenschaften und/oder die Abnahme der Menge an Partikeln mit den ursprünglichen Eigenschaften durch Bestrahlen eines Teils der Lösung unter geeigneten Bedingungen und Beobachten der Veränderungen des Streulichts, das von der Lösung ausstrahlt, festgestellt werden. Alternativ kann unter Verwendung eines Systems auf Durchflussbasis das Material in der Probe noch spezifischer analysiert werden. Beispielsweise wird eine Mikrokanal-, Kapillar- oder Durchfluszytometrie-Apparatur oder -Vorrichtung derart verwendet, dass ein Teil der gesamten Probenlösung Partikel für Partikel analysiert werden kann. Die Lösung fließt an (einer) Beleuchtungsquelle(n) und (einem) Detektor(en) vorbei oder wird alternativ in einem Mikrokanal oder einer Kapillarröhre gehalten und dann der gesamte Mikrokanal oder ein Teil davon oder die gesamte Röhre oder ein Teil davon analysiert, indem entweder das Probenbehältnis, die Lichtquelle oder der Detektor (oder eine Kombination davon) entlang der Länge der Probe bewegt wird.

[0323] Beispielsweise besteht ein bestimmter Nukleinsäure-Analyst aus ungefähr 100 Nukleinsäure-Basen und liegt in einer Probe vor. Die Probe wird derart hergestellt, dass die Nukleinsäure in einzelsträngiger Form vorliegt. Dann werden zwei oder mehr einzigartige einzelsträngige Nukleinsäuresequenz-„Sonden“ zu der Probe gegeben, wo diese verschiedenen Nukleinsäure-Sonden an verschiedene Bereiche des Target-Strangs bin-

den. An jede dieser Sonden-Nukleinsäuren sind durch indirekte oder direkte Markierungsmittel ein oder mehrere Partikel gebunden. Nach der Inkubation wird die Probe in einer Durchflusszytometer-Vorrichtung oder ähnlichen Durchflussvorrichtung, in der die Lösung, welche die Probe enthält, analysiert werden kann, platziert. Wenn die Target-Sequenz vorliegt, werden zwei oder mehrere Partikel vorliegen, die miteinander in enger Nachbarschaft „verbunden“ sind. In Abhängigkeit des Trennungsabstands der Partikel können Partikel-Partikel-Perturbationen auftreten oder nicht. Diese molekularen Strukturen, welche zwei oder mehr Partikel als Ergebnis der Hybridisierung der Sondenstränge an den Target-Strang enthalten können, können unter Verwendung geeigneter Mittel, wie zuvor beschrieben, detektiert werden.

ii. Assays, welche die Freisetzung molekularer Einheiten beinhalten

[0324] Bei einigen Assay-Formaten kann die vorliegende Erfindung verwendet werden, um die Gegenwart eines Analyten als Ergebnis eines molekularen, chemischen oder anderen Ereignisses nachzuweisen. Beispielsweise können intra- oder intermolekulare Bindungen, Verknüpfungen oder andere molekulare Strukturen derart verändert werden, dass sich die gesamte Molekular-Geometrie verändert oder ein oder mehrere molekulare Anteile als Ergebnis des Prozesses dissoziieren. Beispielsweise können Peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder pharmazeutische Agenzen und Ähnliches an die Oberfläche eines Probenbehältnisses durch verschiedene Mittel, die auf dem Gebiet bekannt sind, gebunden werden. In einigen dieser Substanzen liegen ein oder mehrere intramolekulare Verknüpfungs- oder Bindungsstellen vor, die durch chemische, biologische oder andere Prozesse gespalten oder auf andere Weise verändert werden können. Beispielsweise kann die Anwesenheit eines spezifischen Enzyms oder Ribozyms nachgewiesen werden, indem die Menge an Spaltungsprodukten, die als Ergebnis seiner Aktivität freigesetzt werden, beobachtet wird. Ein oder mehrere lichtstreuende Partikel werden direkt oder indirekt an Bereiche des molekularen Substrats derart gebunden, dass der Spaltungsprozess nur minimal beeinflusst wird. Die Anwesenheit und Menge freier Partikel in Lösung oder alternativ die Abnahme von an das Probenbehältnis oder an andere Partikel gebundenen Partikeln kann mit der Anwesenheit, Menge und Aktivität des Enzyms in Beziehung gesetzt werden. In einem anderen Beispiel werden lichtstreuende Partikel mit einer antigenen Substanz beschichtet und mit einem Antikörper gemischt, so dass alle Partikel durch die Antikörper-Antigen-Bindung mehrwertig miteinander verbunden sind. Dieses Netzwerk oder agglutiniertes Material wird in ein Probenbehältnis gegeben oder gegebenenfalls daran gebunden. Eine Probe wird in das Behältnis, welches den Analyten enthalten könnte (wobei es sich entweder um den gleichen Antikörper oder das gleiche Antigen oder einen konkurrierenden Antikörper oder konkurrierendes Antigen mit ähnlicher Struktur handeln kann) gegeben. In Abhängigkeit der Anwesenheit und Menge des Antigen- oder Antikörper-spezifischen Analyten in der Probe, wird ein Anteil der Antikörper und Partikel-beschichteten Antigene auf Grund der Kompetition von der Netzwerkstruktur dissoziieren. Die Menge an vorliegendem Analyten kann durch Messen der Menge an Partikeln in Lösung und/oder der Menge an Partikeln, die in dem agglutinierten Netzwerk verbleiben, bestimmt werden. Eine Variation des Verfahrens kann erfolgen, indem die Antikörper auf den Partikeln beschichtet werden, oder andere Bindungsagenzen, wie beispielsweise Nukleinsäuren, Peptide, Rezeptoren, pharmazeutische Agenzen, Hormone und Ähnliches, verwendet werden.

iii. Detektion und Charakterisierung molekularer Bindungseignisse

[0325] In einem anderen illustrativen Beispiel kann die Brownsche Molekularbewegung eines Partikels, welches mit einem Bindungsagens beschichtet ist, in einem Bildanalyse-Format verwendet werden, um die Anwesenheit und Menge eines vorliegenden Analyten zu detektieren. Dieses Verfahren kann ebenso dazu verwendet werden, molekulare Bindungseignisse und -eigenschaften in einem Bindungspaar, in dem ein Partner an das Partikel gebunden ist und der andere frei in Lösung vorliegt, zu untersuchen. Derartige Möglichkeiten sind extrem wichtig bei der Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Antikörpern, Antigenen, pharmazeutischen Agenzen, Rezeptoren und allen Substanzen, bei denen molekulare Bindungseigenschaften eine wichtige Rolle spielen. Beispielsweise wird eine Präparation von 40-nm-Goldpartikeln derart hergestellt, dass sie entweder ein Antigen, ein pharmazeutisches Agens oder einen Antikörper auf der Oberfläche aufweist. Diese Partikel-bindenden Agenzen werden dann auf einem Objekträger platziert und unter Anwendung der DLAS-LPD-Beleuchtungs- und -Detektionsverfahren auf einem Mikroskop beobachtet. Ihre Brownsche Molekurbewegung wird quantifiziert. Dann wird eine Probenlösung, welche einen Analyten enthalten könnte, der an das gebundene Bindungsagens auf dem Partikel binden kann, zugegeben. Wenn die zugegebene Lösung den Bindungsagens-Partner enthält, wird dieser an das gebundene Bindungsagens auf dem Partikel binden, und es kann eine Änderung der Brownschen Molekularbewegung beobachtet werden. Alternativ werden für Charakterisierungszwecke bekannte Konzentrationen der Substanz, deren molekulare Eigenschaften charakterisiert werden sollen, in bekannten Konzentrationen titriert, um ihre Bindungseigenschaften zu bestimmen. Auf diese Weise können die molekularen Bindungseignisse der meisten Bindungspaire, deren Bindung auf molakulärer Erkennung beruht, studiert werden.

iv. Amplifizierte Detektion von Analyten

[0326] In bestimmten analytischen und diagnostischen Assays kann es bevorzugt sein, die Detektierbarkeit der Lichtstreuereigenschaften der Partikel derart zu erhöhen, dass sehr vereinfachte oder keine Detektionsvorrichtungen erforderlich sind. Bei Verwendung der geeigneten Bindungspaare, deren Bindung auf molekularer Erkennung beruht, und Partikeln ist es möglich, das Niveau der Detektions-Sensitivität signifikant zu erhöhen. Einzelsträngige Homopolymer-Sequenzen, Avidin-Biotin, Streptavidin-Biotin und andere Bindungspaar-Systeme können verwendet werden, um viele Partikel „zusammenzuketten“ und „aufzubauen“. Als Beispiel wird ein Festphasen-Assay konstruiert, in dem eine Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich-Struktur ausgebildet ist. Ein Antikörper ist derart an eine Festphase gebunden, dass der Antigen-Analyt eingefangen wird. Dann wird ein weiterer Antikörper zugegeben, welcher eine Biotin-Gruppe enthält. Anschließend werden die Partikel mit Streptavidin beschichtet, und es wird freies Biotin zu der Lösung gegeben. Aus dem (Festphasen-Antikörper)-Antigen-(Antikörper-Biotin)-Komplex wächst eine(Streptavidin-Partikel)-Biotin-(Streptavidin-Partikel)...-Struktur, in der viele aneinander gebundene Partikel enthalten sind. Eine derartige Partikelaggregat- oder Netzwerkstruktur erzeugt ein hohes Intensitätsniveau, welches sehr einfacher detektiert werden kann als ein Partikel. In einem weiteren Beispiel können Polydesoxyadenylsäure (Poly dA) und Polythymidylsäure (Poly dT) oder andere homopolymere einzelsträngige Nukleinsäuren verwendet werden, in denen eine Poly-dA-Homopolymer-Sequenz in einen Bereich des einzelsträngigen „Sonden“-Moleküls eingefügt ist. Partikel werden mit der zu diesem Homopolymeren komplementären dT-Sequenz beschichtet und mit zusätzlichen „freien“ dA-Einzelsträngen zu der Probe gegeben, um Strukturen zu erzeugen, welche viele Partikel enthalten. Die obigen Beispiele dienen illustrativen Zwecken und ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass viele Variationen dieser Aspekte/Ausführungsformen der Erfindung möglich sind, in Abhängigkeit der analytischen und diagnostischen Bedingungen und Erfordernisse.

Verbesserte Partikel-Bindungsagens-Reagenzien

[0327] Die Bindung proteinartiger Bindungsagensien, wie beispielsweise Antikörper, an metallartige und nicht-metallartige Partikel und andere Oberflächen durch das Adsorptionsverfahren sind auf dem Gebiet bestens bekannt (siehe M. Horisberger, Scanning Electron Microscopy (1981), 2, p9–31). Das Adsorptionsverfahren kann beispielsweise bei Antikörpermolekülen angewendet werden, um Substanzen, die eine Bindungseigenschaft an das Partikel aufweisen, zu binden. Im Fall der Antikörper verleiht die Bindung der Antikörpermoleküle an das Partikel dem Partikel außerdem eine partielle chemische Stabilität. Wenn die Adsorptionsbedingungen sorgfältig reguliert werden, werden einige der Antikörpermoleküle immer noch Bindungsaktivität gegenüber ihrem jeweiligen Antigen aufweisen. Die Verwendung bestimmter synthetischer und biologischer Polymeren als chemische Stabilisatoren für Metallpartikel ist ebenso auf dem Gebiet bekannt (siehe Heller et al. (1960), Journal of Polymer Science, 47, p203–217). Die Verfahren der Adsorption von Substanzen an Partikel und andere Oberflächen werden durch Verweis hierin aufgenommen.

[0328] Die genauen Mechanismen und die Natur der Adsorption von Substanzen an Partikel und andere Oberflächen ist nicht vollständig verstanden. Wenn Antikörpermoleküle an Partikel oder andere Oberflächen adsorbiert werden, scheint die Dichte und Orientierung adsorbierter Antikörper mit dem Niveau der Bindungsaktivität in Zusammenhang zu stehen. Auf Grund der fehlenden Kontrolle des Adsorptionsprozesses ist es wahrscheinlich, dass viele der gebundenen Antikörpermoleküle derart gebunden werden, dass die molekulare Erkennungsregion der Molekülstruktur derart verändert wird, dass die Bindungsaktivität signifikant reduziert wird oder überhaupt keine Aktivität mehr vorliegt.

[0329] Während das Adsorptionsverfahren geeignet ist für die Bindung proteinartiger Bindungsagensien und anderer Substanzen, die gegebenenfalls in Analyt-Assays mit Partikeln geeignet sein können, ist es schwierig, einige Typen von Substanzen, die bei der Analyt-Untersuchung und in anderen Bereichen von Interesse sein könnten, zu binden. Beispielsweise können Nukleinsäuren, kleinere Proteine und proteinartige Substanzen, wie beispielsweise Peptide, und andere nicht-proteinartige Substanzen, wie beispielsweise antigene Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht, Hormone, pharmazeutische Agenzien und Ähnliches, durch den Adsorptionsprozess nicht effektiv an Partikel gebunden werden. Weitere Einschränkungen der Adsorptionstechnik ergeben sich daraus, dass einzigartige Adsorptionsbedingungen für jeden Substanztyp bestehen, welche sorgfältig reguliert werden müssen. Auch wenn derartige Verfahren streng eingehalten werden, können signifikante Variationen in der Proteinmenge und der Integrität- und Bindungseigenschaften des Substrats, welches an der Oberfläche adsorbiert wurde, bestehen. In vielen Fällen ist die Bindungsaktivität (Affinität und Spezifität) des adsorbierten Bindungsagens signifikant reduziert im Vergleich zu der nicht-adsorbierten Form.

[0330] Diesseitige Erfahrungen mit dem Binden verschiedener proteinartiger Bindungsagensien, wie bei-

spielsweise Antikörpern, an die Oberfläche von Partikeln unter Anwendung des Adsorptionsverfahrens zeigten, dass eine große Variabilität der Bindungseigenschaften und -stabilität der resultierenden Partikel-bindenden Agensmaterialien besteht. Die Bindungsaffinitäten der adsorbierten Antikörper oder anderer Bindungsagenzien sind hoch empfindlich gegenüber den Markierungsbindungen und können ebenso signifikant von Batch zu Batch variieren. Gewöhnlich tritt eine signifikante Abnahme der Bindungsaffinität von Antikörpern, Avidin, Streptavidin und anderen Bindungsagenzien, die an das Partikel adsorbiert wurden, auf. In einigen Präparationen scheint es, dass ein Anteil des adsorbierten Bindungsagens leicht Dissoziation von dem Partikel unterliegt. Dies kann schwerwiegende Probleme bereiten, da dieses dissozierte Material mit dem Partikel-Bindungsagens um den Analyten in einem analytischen oder diagnostischen Assay konkurriert.

[0331] Ein derartiger Kontrollverlust des Bindungsprozesses, die Variabilität der Bindungsaktivität und die Einschränkungen bezüglich der Substanztypen, die an Partikel durch Adsorptionsmethoden gebunden werden können, stellen viele Probleme bei der Herstellung und der Verwendung derartiger Materialien für analytische diagnostische Zwecke dar. Das Wichtigste ist vielleicht, dass Partikel-Bindungsagens-Konjugate, die durch die Adsorptionstechnik hergestellt wurden, für viele analytische Anwendungen, bei denen sehr geringe oder ultra-geringe Konzentrationen von Analyten detektiert werden sollen, unzureichende Qualität aufweisen können.

[0332] Auf dem Gebiet wäre es von großem Vorteil, ein Verfahren an die Hand zu bekommen, in dem jeglicher Substanztyp, einschließlich Bindungsagenzien variierender Größe und Zusammensetzung, spezifisch an ein Partikel oder eine Oberfläche gebunden werden können, wobei die Bindungsaktivität der gebundenen Substanz minimal beeinflusst wird. Es wäre ebenso von großem Nutzen auf dem Gebiet, ein Verfahren an die Hand zu bekommen, mit dem eine gewünschte Agensdichte pro Partikel (oder im Allgemeinen pro beliebiger Oberfläche) erreicht werden kann. Außerdem wäre es für diese Verfahren wünschenswert, die Bindung von mehr als einem Agenstyp zu ermöglichen. Im Hinblick auf die Herstellung und Kosten wäre es von großem Vorteil, wenn die Syntheseverfahren leicht und kostengünstig durchgeführt werden könnten, so dass eine große Anzahl verschiedener Typen von Substanzen unter Verwendung der gleichen grundlegenden Verfahren an Partikel gebunden werden können.

[0333] Die Anmelder entwickelten neue Verfahren, die eine spezifische Bindung von Bindungsagenzien und den meisten anderen Substanzen an metallartige Partikel und andere Oberflächen ermöglichen. Die Partikelreagenzien, die durch diese neuen Verfahren erzeugt werden, sind höchst stabil und weisen hohe Bindungsaffinitäten und geringe nichtspezifische Bindungseigenschaften auf. Diese neuen Verfahren beseitigen viele der Einschränkungen der Adsorptionsverfahren aus dem Stand der Technik und besitzen den zusätzlichen Vorteil, dass sie leicht und mit geringen Kosten durchzuführen sind. In einigen Ausführungsformen ermöglichen diese neuen Verfahren eine universelle Plattform der Linker-Chemie, auf der nahezu jeder Substanztyp schnell und einfach an ein Partikel oder eine Oberfläche unter Verwendung vieler gleicher Materialien und Verfahren gebunden werden kann. Dies ist bei der täglich wechselnden Herstellung derartiger Partikel-Bindungsagens-Reagenzien zur Verwendung in Analytuntersuchungen extrem wichtig.

[0334] Die folgenden Verfahren beziehen sich auf eine beliebige Substanz, wozu Bindungsagenzien oder andere Substanzen, wie beispielsweise Antigene, Antikörper, Lektine, Kohlehydrate, Biotin, Avidin, Streptavidin, Nukleinsäuren, Peptide und Proteine, Rezeptoren, pharmazeutische Agenzien und Ähnliches, gehören. Die Verfahren können verwendet werden, um die meisten Substanzen an Metall, metallartige und einige nicht-metallartige Partikel und makroskopische Oberflächen zu binden. Beispielsweise zählen zu nicht-metallartigen Oberflächen und Partikeln Materialien, die aus organischem oder anorganischem Material, wie beispielsweise Glas, Kunststoff und Ähnlichem, bestehen.

Verfahren zur Bindung von Substanzen an Partikel und andere Oberflächen

i. Ausgangsmaterialmolekül-Verfahren

[0335] Dieses Verfahren zum Binden von Substanzen an Partikel und andere Oberflächen beinhaltet einen Zwei-Schritt-Ansatz, welcher die Verwendung eines Ausgangsmaterialmoleküls umfasst. Geeignete Ausgangsmaterialmoleküle sind jegliche Substanzen, die sich der Oberfläche nahen und mit dieser durch Adsorption oder andere chemische Prozesse interagieren können und zugängliche funktionelle Gruppen aufweisen, an die weitere Substanzen, wie beispielsweise Bindungsagenzien, gebunden werden können. Das Ausgangsmaterialmolekül kann ebenso zusätzlich die Eigenschaft aufweisen, dem Partikel chemische Stabilität zu verleihen. Im Allgemeinen liegt das Ausgangsmaterialmolekül in makromolekularer Form vor (Größe > 1000 MW), es kann jedoch auch kleiner oder viel größer sein. Bevorzugte Ausgangsmaterialmoleküle sind solche, die an das Partikel mit hoher Affinität binden, dem Partikel bis zu einem bestimmten Grad physikalische Stabilität ver-

leihen und zugängliche chemische Gruppen aufweisen, an welche die meisten beliebigen Substanzen leicht konjugiert werden können. Die chemischen Gruppen ermöglichen den Bindungsagenzien oder anderen Substanzen entweder durch chemische, kovalente oder nicht-kovalente Bindung verbunden zu werden. Beispielsweise kann kovalente Bindung photochemische oder chemische Bindung beinhalten. Nicht-kovalente Bindung kann Vernetzung mit Molekülen, wie beispielsweise Streptavidin, oder Adsorption durch hydrophobe Bindung, Wasserstoffbindung oder elektrostatische Wechselwirkungen beinhalten. Das Ausgangsmaterialmolekül kann ebenso ein oder mehrere chemische Gruppen enthalten, die verwendet werden können, um mehrere Ausgangseinheitsmoleküle über die Oberfläche des Partikels unter Verwendung geeigneter chemischer Agenzien oder Vernetzungsmittel zu vernetzen.

[0336] Es folgen ausgewählte Beispiele dafür, wie das Verfahren der Ausgangsmaterialmolekül-Bindung verwendet werden kann, um Partikel-Bindungsagens-Reagenzien zu erzeugen, die äußerst stabil sind, hohe Bindungsaffinitäten für das/die Objekt(e), an das/die sie binden, aufweisen und ein hoch flexibles, leicht zu handhabendes und kostengünstiges Verfahren zum Binden der meisten Substanzen an Partikel oder andere Oberflächen bereitstellen. Ein Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet erkennt, dass viele Variationen der allgemeinen Technik zur Synthese von Partikel-Bindungsagens-Reagenzien für die meisten Anwendungen vorgenommen werden können. Unter Anwendung dieses neuen Verfahrens können Antikörper, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, pharmazeutische Agenzien und die meisten anderen Substanzen an ein Partikel auf hoch regulierbare und vorhersagbare Weise gebunden werden.

[0337] Beispielsweise wurde ein Derivat einer Polyethylenglycol-Verbindung mit einem MW von ungefähr 20.000 verwendet. Die Eigenschaften dieses Moleküls (Bis(polyoxyethylenbis[3-amino-2-hydroxypropyl])) ermöglichen seine Verwendung als Ausgangsmaterialmolekül. Jedes Molekül dieser Polymeren besitzt vier Amingruppen, die als Bindungsstellen für die Konjugation weiterer Substanzen dienen können. Das hydrophobe Rückgrat des Polyethylenderivats interagiert mit dem Partikel und wird durch Adsorption oder einen anderen Prozess an die Partikeloberfläche gebunden. Diese Interaktion ist sehr stark; es wurde keinerlei Dissoziation dieses Materials von der Partikeloberfläche nach der Markierung und Verwendung in analytischen und diagnostischen Assays beobachtet. Die Amingruppen scheinen nicht mit der Partikeloberfläche zu interagieren und sind als Konjugationsstellen für die Bindung weiterer Substanzen, wie beispielsweise Bindungsagenzien, zugänglich. Unter Verwendung dieses Polymeren als Ausgangsmolekül wurden zwei verschiedene Typen von Partikel-Bindungsagens-Reagenzien hergestellt. Ein Reagens enthält Biotingruppen als Bindungsagenzien, und das andere Partikel-Bindungsagens-Reagens wurde derart hergestellt, dass es einzelsträngige Nukleinsäuren als Bindungsagenzien enthält. Das für die Bindung verwendete Biotin lag in chemisch modifizierter Form vor, in der es kovalent an Amingruppen bindet. Die 5'-Enden der Nukleinsäuren waren chemisch modifiziert, so dass sie chemisch mit den Amingruppen reagieren. Bei der Verwendung dieser Reagenzien in verschiedenen Assay-Formaten wurde beobachtet, dass beide dieser Partikel-Bindungsagens-Reagenzien einen hohen Stabilitätsgrad in wässrigen Niedrig- und Hochsalzlösungen mit außergewöhnlichen Bindungsaktivitäten zeigen. In Experimenten, in denen das Partikel-Biotin-Reagens verwendet wurde, wurde keine Wirkung auf die Bindungsaffinitäten nachgewiesen.

[0338] Dies wurde durch Bringen des Partikel-Biotin-Reagens mit einer Konzentration von 6×10^{-14} M in Suspension und Eintauchen einer Kunststoff-Festphase, die mit Avidin beschichtet war, in diese Lösung bestimmt. Nach einigen Stunden der Inkubation wurde die Festphase entfernt und gewaschen. Bei Untersuchung unter dem Lichtmikroskop unter Verwendung der DLASLPD-Beleuchtungs- und -Detektionsverfahren wurden die Partikel detektiert, die spezifisch an die Avidin-beschichtete Festphase gebunden waren, während die Kontroll-Festphase (welche kein Avidin enthielt) keine Partikelbindung zeigte. Bei diesen Arbeitskonzentrationen des Partikel-Biotin-Reagens ist, wenn die Bindungseigenschaften des an die Partikel gebundenen Biotins wesentlich herabgesetzt sind, keine Bindung sichtbar.

[0339] In einem anderen Beispiel wurde Gelatine als Ausgangsmaterial verwendet; die Gelatine kann auf der Partikeloberfläche durch Verwendung von Chromat-Ionen oder anderen Vernetzungsmitteln vernetzt werden, um die Möglichkeit der Desorption zu minimieren. Bindungsagenzien oder andere Substanzen werden dann unter Anwendung geeigneter Konjugations-Chemien zur Bindung dieser Substanzen an zugängliche Amin-, Carboxyl- oder andere chemische Gruppen, an die Bindung erfolgen kann, an das Partikel gebunden.

[0340] In einem weiteren Beispiel können Streptavidin oder Avidin als Ausgangsmaterial verwendet werden. Substanzen, wie beispielsweise Bindungsagenzien und Ähnliches, werden an das Partikel unter Verwendung einer chemisch modifizierten Version des Moleküls, welche wenigstens eine Biotingruppe enthält, gebunden.

[0341] In einem weiteren Beispiel können polymerartige Materialien und andere Materialien, welche polymer-

artige Eigenschaften aufweisen, beispielsweise Kohlehydrate, Polyaminosäuren, Proteine und Ähnliches, ebenso aus Co-Polymer-Einheiten in Lösung genau auf der Oberfläche des Partikels unter geeigneten Bedingungen polymerisiert werden.

[0342] In allen obigen Beispielen können ebenso zunächst die Bindungsagenzien oder andere Substanzen an das Ausgangsmaterial konjugiert werden, und dann dieses Material mit oder ohne chemisches Vernetzen der Ausgangsmaterialien auf die Partikeloberfläche aufgetragen werden. Des weiteren können zwei oder mehr verschiedene Typen an Ausgangsmaterialmolekülen oder ein oder mehrere Ausgangsmaterialmoleküle mit anderen chemischen Stabilisatormolekülen verwendet werden, so dass die Menge an chemisch reaktiven Gruppen, die für eine Konjugation zur Verfügung steht, und die chemische Stabilität des Partikelbindungsagens-Konjugats auf die meisten analytischen Erfordernisse eingestellt werden können.

[0343] In den obigen Beispielen wurden verfügbare Materialien verwendet und zur Verwendung als Ausgangsmaterialmoleküle ausgewählt. Ein Fachmann auf dem Gebiet kann neue Typen von Ausgangsmaterialmolekülen synthetisieren, um ihre Verwendung zur Bindung von Substanzen an Partikel und andere Oberflächen weiter zu optimieren. Die folgenden Verbesserungen ermöglichen chemisch stabilere Partikel-Bindungsagens-Reagenzien und die Optimierung des Konjugationsprozesses mit verstärkter Leistung im Hinblick auf die Bindungsaffinitäten der gebundenen Bindungsagenzien oder anderer Substanzen. Beispielsweise können zusätzliche chemische Gruppen an die Rückgratstruktur des Polymeren angefügt werden, welche die Stabilität der Bindung des Ausgangsmaterialmoleküls an die Oberfläche des Partikels erhöhen. Linker-Arme verschiedener Länge mit geeigneten reaktiven chemischen Gruppen am Ende oder in der Nähe des Endes können angefügt werden, um den Abstand von dem Partikel, an das das Bindungsagens oder eine andere Substanz gebunden ist und schließlich bleibt, zu erhöhen. Verschiedene Typen reaktiver chemischer Gruppen können an das Ausgangsmaterial angefügt werden, um die Möglichkeit, einzelne Ausgangsmaterialmoleküle über der Oberfläche des Partikels zu vernetzen oder auf andere Weise miteinander zu verbinden, weiter zu verbessern.

ii. Direkte Bindung von Substanzen an Partikel oder andere Oberflächen mittels chemischer Gruppen, die an Metallocberflächen adsorbieren

[0344] Der Anmelder entwickelte weitere Verfahren, welche die direkte Bindung vieler verschiedener Typen von Substanzen, einschließlich Bindungsagenzien, an Metall und metallartige Partikel und Oberflächen ermöglichen. Auf dem Gebiet der Materialforschung und verwandten Gebieten ist bekannt, dass bestimmte Typen kleinerer Moleküle (< 1.000 MW) an Metallocberflächen und Ähnliches gebunden werden können. Bei den meisten dieser kleinen Moleküle gibt es bestimmte Typen chemischer Gruppen an spezifischen Stellen innerhalb des Moleküls, welche es einem Teil des kleinen Moleküls ermöglichen, an die Metallocberfläche zu binden, während andere Teile nicht an die Oberfläche gebunden werden. Beispielsweise ist die Adsorption von Thiol- und Disulfid-enthaltenden Substanzen und amphiphilen Substanzen, wie beispielsweise n-Akonsäuren und bestimmten Detergenzmolekülen, auf Metallocberflächen auf dem Gebiet der Materialforschung bekannt (siehe Nuzzo et al. (1983), Journal of the American Chemical Society, 105, p4481–4483; Allara et al. (1984), Langmuir, 1, p45–52; und Bain et al. (1989), Journal of the American Chemical Society, 111, p321–335). Die Methoden der Adsorption von Substanzen an Metallocberflächen werden hiermit durch Verweis hierin aufgenommen. Somit können die Eigenschaften, welche eine Bindung der obigen Substanzen ermöglichen, auf die Bindungsagenzien und andere Substanzen übertragen werden, indem die geeignete chemische Verbindung in (eine) bestimmte Stelle(n) innerhalb der Molekülstruktur der Substanz, die gebunden werden soll, eingebaut wird. Bestimmte Substanztypen sind mit dieser Methode leichter zu binden als andere. Beispielsweise sind Substanzen, deren Molekülstruktur geladen oder ionisch ist oder derart polarisiert ist, dass ein Ende der Molekülstruktur hydrophob ist, während das andere Ende hydrophil ist, im Allgemeinen in dieser bestimmten Variation des Verfahrens geeignet.

[0345] Beispielsweise enthalten Nukleinsäuren ein Phosphatrückgrat, welches eine stark negative Ladung enthält. Eine einzelsträngige Nukleinsäure ist am 3'- oder 5'-Ende mit einem Thiol oder Disulfid endmarkiert, wobei gegebenenfalls zusätzliche hydrophobe Gruppen in den gleichen Bereich des Moleküls eingebaut sein können. Diese modifizierte Nukleinsäure bindet an die Metallocberfläche oder das Partikel an dem Ende, das mit diesen Gruppen markiert ist. Der ionische Teil der Nukleinsäure hält die Hauptkette der Molekülstruktur der Nukleinsäure entfernt von der Oberfläche, so dass sie für molekulare Interaktionen mit nahezu jeder beliebigen Substanz, die spezifisch an sie binden kann, zugänglich ist.

[0346] Andere Substanzen, wie beispielsweise Biotin, Peptide, pharmazeutische Agenzien, Polymere und Ähnliches, können unter Anwendung dieses Verfahrens an das Partikel gebunden werden. Das Verfahren ist im Allgemeinen geeignet für die meisten Substanzen, die nicht signifikant mit dem Partikel oder der Oberfläche

in ihrer nativen Form interagieren. Für Substanzen, die mit dem Partikel oder der Oberfläche interagieren könnten, sind zusätzliche Verfahren erforderlich. Beispielsweise können bestimmte kleine Moleküle, Proteine und Ähnliches mit dem Partikel oder der Oberfläche derart interagieren, dass ihre Bindungsaktivität herabgesetzt wird. In einer Variation des Verfahrens wird das Partikel zunächst beispielsweise mit einem Polymer-Stabilisierungsagens markiert. Nach dieser Markierung liegen gewöhnlich offene Bereiche auf der Oberfläche des Partikels vor, an die kleine Moleküleinheiten binden können. Die auf geeignete Weise modifizierte Substanz wird dann zu dem chemisch stabilisierten Partikel gegeben, um ihm eine gewünschte Bindungsaktivität oder andere Eigenschaft zu verleihen. Alternativ können der chemische Stabilisator und die chemisch modifizierten Bindungsagenzen in einem gewünschten Verhältnis zusammengemischt werden, bevor sie mit dem Partikel oder der Oberfläche gemischt werden. Unter Anwendung dieser Verfahren können die Mengen und Typen von Substanzen, die an das Partikel oder die Oberfläche binden, reguliert werden, so dass eine beschichtete Oberfläche oder ein beschichtetes Partikel mit der gewünschten chemischen Stabilität und Bindungsaktivität erhalten wird.

[0347] Linker-Arme verschiedener Längen und Zusammensetzung können ebenso in die Molekülstruktur eingearbeitet sein. Beispielsweise kann ein Ausgangsmaterialmolekül mit geringem Molekulargewicht verwendet werden, wobei seine Molekülstruktur für die Bindung an das Partikel oder die Oberfläche, die Bindung irgendeiner Substanz mit einer beliebigen gewünschten Orientierung und mit einem hohen Niveau an Bindungsaktivität optimiert ist. Beispielsweise wird ein lineares Polypeptid mit einer Länge von 20 Aminosäuren an einem Terminus durch die Addition von chemischen Disulfid- oder Thiolgruppen chemisch modifiziert. Das native Polypeptid besteht aus Aminosäuren, so dass die Polypetidkette nicht mit der Oberfläche – außer durch das chemisch modifizierte Ende – interagiert. Am anderen Terminus liegt eine freie Aminogruppe vor; alternativ wurde es chemisch modifiziert für einen gewünschten Konjugationsprozess, so dass eine beliebige Substanz an diese Position gebunden werden kann. Dieses Ausgangsmaterialmolekül mit geringem Molekulargewicht wird dann in einer oder mehreren Variationen der hierin beschriebenen Verfahren verwendet.

[0348] Das Verfahren der Ausgangsmaterialmolekül-Konjugation und das Verfahren der direkten Bindung, wie hierin beschrieben, ermöglichen eine spezifischere Regulierung der Mengen, Typen und Orientierungen von Substanzen, die an Partikel und andere Oberflächen gebunden werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass diese Methoden die Synthese von Partikel-Bindungsagens-Reagenzien ermöglichen, wobei die Bindungsaaffinität des gebundenen Bindungsagens auf einem hohen Niveau bleibt.

[0349] Ein wichtiges Merkmal des Ausgangsmaterialmolekül-Verfahrens, welches Ausgangsmaterialmoleküle mit geringem Molekulargewicht oder höherem Molekulargewicht verwendet, ist, dass durch die geeignete Auswahl und Verwendung von Ausgangsmaterialmolekülen das Ausgangsmaterialmolekül als universelle Linker-Plattform dienen kann, an die nahezu jede Substanz an ein Partikel oder eine Oberfläche gebunden werden kann. Diese Möglichkeit wird äußerst wichtig bei der täglich wechselnden Herstellung von Reagenzien auf Partikelbasis zum Testen von Analyten. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt die vielen verschiedenen Variationen dieser neuen Bindungsmethoden, die durch Variieren der chemischen Gruppen, der Molekulargewichte, der Molekülstruktur, der Bedingungen bei der Markierungsreaktion und des Typs der Konjugations-Chemie (das heißt, Vernetzung, kovalente Bindung usw.), die verwendet werden, entstehen.

Mikroarray- oder Mikropattern-Assays mit lichtstreuenden Partikeln

[0350] Das Mikroarray- oder Mikropattern-Analyseverfahren verwendet diskrete räumlich adressierbare Bereiche einer Festphase zum Nachweis verschiedener Analyttypen. Beispielsweise kann jeder räumlich adressierbare Bereich oder Mikrospot einen verschiedenen Antikörper-, Rezeptor-, Nukleinsäuretyp oder Ähnliches enthalten. Die Anordnung der räumlich adressierbaren Bereiche auf der Festphase wird durch die Größe der Festphase, die Anzahl an Analyten oder die verschiedenen Bereiche, die verwendet werden, und das Detektionsverfahren bestimmt. Jeder der räumlich adressierbaren Mikrosspots, welcher einen bestimmten Typ eines Bindungsagens enthält, kann als Quadrat, Kreis oder anderes beliebiges Muster, in Abhängigkeit der zur Erzeugung des Mikroarrays verwendeten Verfahren, ausgebildet sein. Die Dimensionen können von einigen Quadratmikrometern bis Quadratmillimetern betragen oder noch größer sein. Das Mikroarray-Verfahren kann durch Verwendung eines der vielen Festphasen-Formate, die für Einzelanalyt-Detektion verwendet werden, und in denen die letztendliche Quantifizierung durch Messen eines Festphasen-Signals erfolgt, welches zu der Menge des an die Festphase gebundenen Analyten in Beziehung gesetzt wird, ergänzt werden. In der Praxis sind die allgemeinen analytischen Schritte bei dem Mikroarray-Verfahren die folgenden. Der Mikroarray wird einer Analytprobe, zum Beispiel Serum, ausgesetzt; nach einer geeigneten Inkubationsdauer wird der Array gewaschen und einer zweiten Analytbindungseinheit ausgesetzt. In einem Format ist die zweite Analytbindungseinheit an lichtstreuende Partikel gebunden, deren Lichtstreuereigenschaften detektiert werden. Die An-

zahl der lichtstreuenden Partikel, die an jeden Mikrospot gebunden sind, stellt dann ein Maß für die Menge des in jedem Mikrospot vorliegenden Analyten dar und kann mit der Konzentration des Analyten in der Probe korreliert werden. In einem anderen Format ist die zweite spezifische Analytbindungsseinheit nicht an lichtstreuende Partikel gebunden. In diesem letzteren Format ist eine dritte Einheit, die spezifisch an die zweite spezifische Bindungseinheit bindet, an lichtstreuende Partikel gebunden. Bei dieser dritten Einheit kann es sich beispielsweise um Streptavidin handeln, welches spezifisch an Biotin bindet, das kovalent an die zweite Einheit gebunden ist. Es gibt viele andere Assay-Verfahren, die zum Detektieren der zweiten Einheit verwendet werden können, wobei die dritte Einheit an die lichtstreuenden Partikel gebunden ist. In jedem dieser Formate wird die Menge an Analyt, die an jeden Mikrospot gebunden ist, durch Messen eines Streulichtsignals festgestellt, welches zu der Anzahl der lichtstreuenden Partikel, die an jeden Mikrospot gebunden wird, in Beziehung gesetzt wird.

[0351] Es können verschiedene Methoden angewendet werden, um die Anzahl lichtstreuender Partikel auf jedem Mikrospot in einem Mikroarray zu detektieren. Die Menge an Analyt, die an jeden Spot gebunden ist, wird anhand der Anzahl lichtstreuender Partikel, die an jeden Spot gebunden sind, in dem letzten Assay-Schritt festgestellt. Im Allgemeinen ist ein bestimmter Typ eines Abbildungssystems erforderlich, um die Streulichtsignale von den verschiedenen Bereichen in dem Array zu trennen. Viele verschiedene Typen von Formaten können für die Abbildung und Partikelquantifizierung verwendet werden. Das Verfahren der Wahl ist abhängig von der erforderlichen Präzision und der Anzahl der Proben, die pro Tag analysiert werden sollen. Die erforderliche Präzision kann von gering, wie beispielsweise in Fällen, in denen nur eine positive oder negative Antwort erforderlich ist, bis sehr hoch, in Fällen, in denen die Menge des Analyten mit einer Genauigkeit einiger weniger Prozente bestimmt werden muss, reichen. Im Folgenden werden Beispiele für verschiedene Bilddarstellungs- und Partikelquantifizierungs-Formate beschrieben.

[0352] Es können bestimmte Merkmale in den Mikroarray für ein beliebiges Abbildungsverfahren eingeführt werden; die Chemie einiger der Mikrosots in dem Array kann derart formuliert sein, dass sich ein Hintergrundsignal ergibt; oder die Chemie einiger Mikrosots in dem Array kann derart formuliert sein, dass sie als Kalibrierungsspots, welche bekannte Mengen an Analyten enthalten, dienen. Die Signale von diesen Spots können verwendet werden, um Variationen in der Einfallslichtintensität, der Lichttransmission zwischen den Multi-Mikrospot-Array-Trägern, der Lichtsammeleffizienz und der Photodetektor-Sensitivität von einer Probe zur nächsten zu korrigieren.

[0353] Im Folgenden sind einige spezifische Abbildungsverfahren und Quantifizierungsverfahren für lichtstreuende Partikel für die Anwendung auf Mikroarrays und Array-Chips beschrieben.

a. Das DLSALPD-Verfahren mit einem einfachen Lichtmikroskop

1. Geringe Partikeloberflächendichte (weniger als 0,1 Partikel pro μm^2) auf einem Spot

[0354] Wenn die Anzahl an zu untersuchenden Proben nicht hoch ist, kann die Anzahl der Partikel in jedem Spot durch visuelle oder andere Zählverfahren bestimmt werden. Ebenso wird eine Hintergrundzählung durchgeführt. Das Zählen kann auf mit Flüssigkeit bedeckten oder trockenen Mikroarrays durchgeführt werden. Die Anzahl der Partikel pro Mikrospot, welche als positiv betrachtet wird, wird durch vorhergehende Testexperimente definiert. Wenn viele Proben untersucht werden sollen, kann das Zählen automatisch unter Verwendung eines einfachen Videodetektors und einer Software zur Objektzählung erfolgen.

ii. Hohe Partikeloberflächendichte (mehr als 0,1 Partikel pro μm^2) auf einem Spot

[0355] Bei positiven oder negativen Analysetypen kann die Intensität von jedem Spot durch visuelle Beobachtung oder Photodetektion detektiert werden. Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Intensität höher ist als die des Hintergrunds. Wenn ein quantitatives Ergebnis erforderlich ist und nicht zu viele Proben untersucht werden sollen (beispielsweise am Krankenbett, außerhalb eines Labors, in einer kleinen Klinik oder bei einer Untersuchung im Forschungslabor), kann eine manuelle Technik mit einem Mikroskop mit zwei Beobachtungsöffnungen folgendermaßen angewendet werden. Ein einzelner Mikrospot wird mit einem engen Lichtstrahl beleuchtet. Der Strahl wird auf dem Spot durch visuelle Beobachtung durch eine Beobachtungsöffnung positioniert und die Intensität quantitativ durch eine photosensitive Vorrichtung mit oder ohne räumliche Filterapertur – in Abhängigkeit davon, ob Stör- oder Nebenlichtsignale vorliegen – gemessen. Die Streulichtintensität von jedem Spot wird durch manuelles Abtasten jedes Spots durch den Strahl gemessen. Alternativ kann der Strahl manuell bewegt und das Licht von jedem Spot durch einen Großflächen-Photodetektor oder einen Kleinflächen-Detektor, in dem der Detektorbereich konfokal mit dem Beleuchtungsspot gehalten wird, detektiert wer-

den. Dies kann ebenso automatisch erfolgen. Wenn viele Proben analysiert werden sollen, kann der Mikroarray mit einem breiten Lichtstrahl beleuchtet werden und ein Bild des Mikroskop-Arrays durch eine Videokamera und einen Framegrabber digitalisiert werden. Die Intensität jedes Mikrosports wird dann durch Software-Bildanalyse bestimmt. Der Anmelder fand heraus, dass diese Methoden einen sehr sensitiven Nachweis in einem breiten Konzentrationsbereich eines oder mehrerer in einer Probe zu detektierenden Analyten ermöglicht. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass viele andere Variationen des Verfahrens möglich sind.

Verwendung bestimmter Typen metallartiger Partikel bei der Mikroarray- und Array-Chip-Detektion von Analyten

[0356] Bei der diesseitigen Arbeit mit Mikroarrays stellte sich heraus, dass metallartige Partikel bevorzugt lichtstreuende Partikel sind. Die Größe, Form, Zusammensetzung und Homogenität des/der in einer spezifischen Mikroarray-Anwendung verwendeten Partikeltyps oder -typen ist abhängig von der Menge an nicht-spezifischem Lichthintergrund in der Probe; davon, ob der Mikroarray trocken oder mit einer Flüssigkeit bedeckt ist; den Dimensionen der einzelnen Festphasen-Bindungsbereiche; der Menge und den Konzentrationsbereichen des/der Analyten, die detektiert werden; davon, ob mit dem Auge oder durch einen Photodetektor detektiert wird, und ob die Messung durch Partikelzählung und/oder Intensitätsmessung erfolgt.

[0357] Beispielsweise konnte ohne Weiteres die Bindung einzelner, mit BSA-Biotin beschichteter Goldpartikel mit 60 nm Durchmesser an Spots mit 80 Mikrometer Durchmesser, welche Streptavidin auf einer Kunststoff-Festphase in einem Mikroarray-Format, bedeckt mit Pufferlösung, enthielten, detektiert werden. Die Anmelder verwendeten ihren maßgefertigten Illuminator unter DLASLPD-Bedingungen und das selbst entwickelte kostengünstige Mikroskopssystem. In den Mikroarray-Streptavidin-Mikrosports mit geringeren Dichten gebundener, mit BSA-Biotin beschichteter Goldpartikel mit 60 nm Durchmesser wurde die Anzahl der gebundenen Partikel gezählt. Bei höheren Dichten wurde die Intensität des Streulichts, das von den an die einzelnen Streptavidin-Mikrosports gebundenen Partikeln ausging, gemessen. Es wurden Partikeldichten bis hinunter zu etwa 0,06 Partikel pro μm^2 bei einem Signal/Hintergrund-Verhältnis von 13 detektiert. Das bedeutet, dass für diesen Assaytyp Dichten hinunter bis etwa 0,015 Partikel pro μm^2 mit einem Signal/Hintergrund-Verhältnis von ungefähr 3 detektiert werden können. Sehr hohe Dichten gebundener Partikel wurden ebenso detektiert (Sättigung verfügbarer Bindungsstellen pro einzelnen Mikrosport von 80 Mikrometer Durchmesser). Zur Durchführung des gleichen Mikroarray-Assaytyps in einer trockenen Form (nicht mit Flüssigkeit bedeckt) könnte die Verwendung von Goldpartikeln mit größerem Durchmesser oder von anderen metallartigen Partikeln mit größerer Lichtstreuung erforderlich sein, um die gleiche Sensitivität zu erreichen. Ebenso könnten die Verwendung einer Lichtquelle mit längerer Wellenlänge, wie beispielsweise eines HeNe-Lasers mit einer Beleuchtung oberhalb von 600 nm, und räumliches Filtern nützlich sein.

[0358] Zum Nachweis von Proben unter Verwendung einer kleinen handlichen Vorrichtung oder eines anderen Typs einer tragbaren Vorrichtung könnte die Verwendung noch größerer Partikel erforderlich sein, in Abhängigkeit des erforderlichen Sensitivitätsniveaus, da typischerweise ein Fachmann auf dem Gebiet leistungsschwache Lichtquellen in einer derartigen Vorrichtung verwenden muss.

[0359] Für eine Multianalyt-Detektion in den Mikroarray-Formaten können die Konzentrationen verschiedener Analyten in sehr unterschiedlichen Niveaus mit Konzentrationsunterschieden von 1.000 bis 1.000.000 oder noch größer vorliegen. In derartigen Situationen werden die Lichtstreuung und die relative Größe der Partikel sehr wichtig. Beispielsweise ist, wenn mehrere Analyten auf einem Array-Chip oder Mikroarray analysiert werden, wobei die individuellen diskreten Bindungsbereiche ungefähr $100 \mu\text{m}^2$ groß sind, die Anzahl der Partikel, die an diesen $100-\mu\text{m}^2$ -Bereich gebunden werden kann, in hohem Maße abhängig von der Größe des verwendeten Partikels. Wenn beispielsweise ein 40-nm-Partikel verwendet wird, können bei Bindungssättigung ungefähr 79.600 Partikel an diesen Bereich gebunden werden. Wenn jedoch ein Partikel von 120 nm verwendet wird, können lediglich etwa 8.800 Partikel an diesen Bereich gebunden werden. In Abhängigkeit von der Menge an nicht-spezifischem Lichthintergrund und nicht-spezifischer Bindung der Partikel kann die minimale Anzahl der Partikel, die für eine zuverlässige Messung an den Bereich gebunden sein müssen, sehr variabel sein. Beispielsweise können in bestimmten Situationen die Bindung einiger Tausend oder mehr Partikel an den Bindungsstellenbereich auf dem Mikroarray erforderlich sein, um ein positives Detektionsergebnis zu erzielen. Die Verwendung größerer Partikel begrenzt somit die Detektierbarkeit des Analyten. In Bindungsstellenbereichen mit kleinen Dimensionen sollte das kleinste mögliche Partikel, welches einen angemessenen Signal-Hintergrund ergibt, verwendet werden. Zudem können optisches und räumliches Filtern, konfokale Bilddarstellung, leistungsstärkere Lichtquellen und andere instrumentale Komponenten optimiert werden, um die Detektionsgrenze zu erhöhen. Wenn zwei oder mehr der Analyten in sehr verschiedenen Konzentrationen vorliegen, kann es außerdem erforderlich sein, verschiedene Partikeltypen mit geeigneter Größe und Lichtstreuung zu ver-

wenden.

[0360] Diese Beispiele zeigen, wie in verschiedenen Anwendungen die Auswahl bestimmter Typen metallartiger Partikel zu spezifischen Testkits für Mikroarray-Analyse und Detektion von mehreren Analyten führt; die vorliegende Erfindung wird dadurch nicht eingeschränkt. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass viele andere Variationen des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich sind, um mehrere Analyten auf Array-Chips und Mikroarrays zu detektieren.

Verwendung bestimmter Aspekte/Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung mit anderen Beleuchtungs- und Detektionsverfahren

[0361] Es können verschiedene Aspekte/Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung in bereits existierenden diagnostischen Detektionsverfahren und -vorrichtungen verwendet werden, ohne die optimalen Beleuchtungs- und Detektionsverfahren und -systeme, wie sie in der vorliegenden Erfindung offenbart sind, zu verwenden. Beispielsweise können konfokale Laser-Mikroskopieverfahren, Hellfeld- und Auflicht-Mikroskopieverfahren und die Methoden der Reflexionskontrast- und Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie mit bestimmten Typen metallartiger Partikel zur Messung mehrerer Analyten auf Mikroarray-Chips und Ähnlichem verwendet werden.

[0362] Beispielsweise kann ein konfokales Mikroskop, wie von Ekins in dem US-Patent 5,432,099 (welches hiermit durch Verweis aufgenommen ist) beschrieben, verwendet werden. Im Allgemeinen beruht derartige konfokale Mikroskopie auf Punktbeleuchtung anstelle von Feldbeleuchtung und arbeitet üblicherweise in einem Fluoreszenz-Modus mit Auflichtbeleuchtung. Üblicherweise handelt es sich bei dem Detektor um einen Photoelektronenvervielfacher, da das zu detektierende Signal sehr schwach ist. Bei der Lichtquelle handelt es sich häufig um einen Laser. Obwohl in der vorliegenden Erfindung das Signal extrem hoch ist (verglichen zu normaler konfokaler Mikroskopie) und die Lichtquelle kein Laser sein muss, kann dennoch eine so komplexe Apparatur wie das konfokale Mikroskop verwendet werden. Die Verwendung einer solchen Vorrichtung ermöglicht eine noch sensitivere Detektion von Partikeln und minimiert die Probleme des Stör- bzw. Nebenlichts.

[0363] Somit kann beispielsweise auch die Methodik von Fodor et al., beschrieben in 364 Nature 555, 1993, zum Nachweis von Target-Molekülen unter Verwendung biologischer Chips verwendet werden.

[0364] Diese Verfahren können, wenn sie mit der Anwendung einer oder mehrerer Aspekte/Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kombiniert werden, in bestimmten Mikroarray-Analysen, bei denen die Kosten und die einfache Handhabung des Verfahrens und der Vorrichtung keine Rolle spielen, Anwendung finden. Dem Anmelder sind keinerlei Anwendungen dieser oben erwähnten, im Stand der Technik existierenden Techniken mit metallartigen Partikeln und/oder dem Verfahren der Brechungsindex-Verstärkung und/oder Autometallographie und/oder irgendwelchen anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung bekannt. Somit wird die Verwendung dieser zuvor beschriebenen im Stand der Technik existierenden Detektionsverfahren und -vorrichtungen mit einer oder mehreren Aspekten/Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beansprucht.

Weitere Anpassungen der Erfindung auf Mikroarray-Anwendungen

[0365] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung stellen ein ausgezeichnetes Mittel zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten unter Verwendung eines Mikroarray-Formats zur Verfügung. Die folgenden Verfahren stellen zusätzliche Variationen dar, welche bei bestimmten analytischen Anwendungen zweckdienlich sind.

[0366] Die Beleuchtungs- und Detektionsverfahren können derart verkleinert werden, dass eine Vorrichtung auf Basis eines Einfach- oder Mehrmode-Lichtwellenleiters konstruiert wird. Dies stellt eine Alternative zur Verwendung von Abbildungsverfahren zur Detektion dar.

[0367] Ein Problem bei der Verwendung eines zweidimensionalen Arrays oder eines anderen Typs eines räumlich adressierbaren Festphasen-Systems ist das Problem der Signal-Kreuzkopplung zwischen verschiedenen Bereichen des Mikroarrays. Kreuzkopplung, Blendlicht oder andere ähnliche Probleme können verschiedene Ursachen haben, beispielsweise (1) liegen die einzelnen Bereiche, welche das/die lichtstreuende(n) oder fluoreszierende(n) Material(ien) enthalten, so nahe beieinander, dass sie als ein Bereich erscheinen, oder (2) enthält ein Bereich eine große Menge lichtstreuender oder fluoreszierender Partikel, während andere angrenzende Bereiche sehr geringe Mengen an lichtstreuenden Partikeln oder fluoreszierenden Materialien enthalten. In Abhängigkeit der Nähe der Bereiche zueinander, werden einige Anteile des Lichts, welche von den intensiven Bereichen ausgehen, durch den Detektor in den Bereichen, von denen geringere Lichtintensitäten

ausgehen, aufgenommen.

[0368] Eine mögliche Lösung im Stand der Technik ist, jede räumlich adressierbare Festphasenstelle durch Verwendung eines Abtastverfahrens separat zu bestrahlen und die Lichtsignale, die von jeder räumlich adressierbaren Stelle ausgehen, wenn sie beleuchtet wird, separat aufzuzeichnen. Dies kann durch Abtasten der verschiedenen Bereiche nacheinander (nur einen zu einer bestimmten Zeit) durch Bewegen des Beleuchtungsstrahls oder der Probe erfolgen. Jedoch sind diese Abtastmechanismen gewöhnlich kompliziert und bedeuten zusätzliche enorme Kosten und komplizierte Verfahren für das analytische Verfahren und könnten zu kostspielig und nicht robust genug für die täglich wechselnden Anforderungen eines klinischen Testlabors oder eines aktiven Forschungslabors sein.

[0369] Im Folgenden wird ein Beispiel für eine weitere Variation der vorliegenden Erfindung beschrieben. Eine optische Faser wird an einem Ende zu einem geeigneten Winkel abgeschrägt und als diskrete Beleuchtungsquelle verwendet, so dass, wenn sie nahe an den zu messenden Bereich herangebracht wird, die von dem Bereich emittierte Fluoreszenz oder das gestreute Licht von der anderen Seite der Probenoberfläche detektiert wird. Diese Konfiguration ermöglicht die spezifische Beleuchtung eines Bereichs und beseitigt die oben erwähnten Probleme der Kreuzkopplung. Ebenso entfällt das Erfordernis eines Detektors vom Abbildungstyp, wie beispielsweise einer Videokamera, und es kann ein beliebiger Typ eines Photodetektors verwendet werden. Beispielsweise werden für einen Array aus 24 Mikrospots oder getrennt zu messenden Bereichen 24 einzelne Beleuchtungsfasern – eine für jeden Spot – verwendet. Dazu ist lediglich erforderlich, dass die einzelnen Spots jeweils zu verschiedenen Zeiten bestrahlt werden. Auf diese Weise können verschiedene kleine räumlich adressierbare Bereiche hinunter bis zu etwa der Hälfte des Durchmessers der optischen Faser vermessen werden.

[0370] In einer anderen Ausführungsform des Verfahrens, in der die Verwendung von Auflichtbeleuchtung oder ähnliche Verfahren gewünscht sind, wie beispielsweise für konfokale Bilddarstellung, kann das System verkleinert werden, indem am Ende einer optischen Faser eine sehr kleine Abbildungslinse platziert wird und dadurch konfokale Bedingungen erreicht werden, unter denen das Streu- oder Fluoreszenzlicht von dem gewünschten Bereich des Mikroarrayas gemessen werden kann. Für jeden zu messenden Bereich auf der Mikroarray-Oberfläche wird eine einzelne optische Faser mit einer Mikrolinse verwendet, um das Einfallslicht abzugeben und die emittierte Fluoreszenz oder das emittierte Streulicht, welche(s) detektiert werden soll, zu sammeln. Es können mehrere optische Fasern, wie oben beschrieben, verwendet werden, wenn mehr als ein Bereich zu einem bestimmten Zeitpunkt auf der Oberfläche detektiert werden soll.

[0371] Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass die vorangegangenen illustrativen Beispiele nur einige der vielen möglichen Variationen der vorliegenden Erfindung darstellen.

Screening kombinatorischer synthetisierter Molekül-Bibliotheken

[0372] Ein ernstes Problem, das derzeit auf dem wachsenden Feld der kombinatorischen Synthese wichtiger Moleküle besteht, ist der Mangel an hoch sensitiver, praktischer und leicht handhabbarer Signal- und Detektionstechnologie und an Assay-Formaten zum Nachweis einiger Kopien eines oder mehrerer neu synthetisierter kombinatorischer Moleküle.

[0373] Der Anmelder fand heraus, dass die vorliegende Signal- und Detektionstechnologie leicht an Festphasen angewendet werden kann, welche räumlich adressierbare Stellen, wie beispielsweise zweidimensionale Arrays, oder eine andere beliebige räumlich adressierbare Festphase enthalten. Somit sind die vorliegenden Methoden in der einen oder anderen Form direkt auf das Screenen und die Detektion einer oder mehrerer Klassen kombinatorischer oder biokombinatorischer Moleküle in diesem Formattyp anwendbar. Bei dem Assay-Verfahren kann es sich um irgendeines der im Stand der Technik bekannten Verfahren handeln.

[0374] Die hierin beschriebene Erfindung kann ebenso verwendet werden, um ein oder mehrere spezifische kombinatorische, biokombinatorische oder auf andere Weise synthetisierte Moleküle auf einer räumlich adressierbaren Festphase zu detektieren und zu quantifizieren. Beispielsweise ist auf dem Gebiet bestens bekannt, dass viele verschiedene biokombinatorische und kombinatorische Moleküle unter Anwendung der Verfahren der „Spaltsynthese“, „Parallelsynthese“ und verwandter Verfahren (die sämtlich hierin mit aufgenommen sind) synthetisiert werden können. Typischerweise werden viele verschiedene kombinatorische Moleküle auf kleinen Partikeln oder anderen Teilen eines festen Substrats synthetisiert, wobei jedes Partikel oder Substratteil einen einzigartigen Satz kombinatorisch synthetisierter Moleküle enthält. Es bestehen Probleme hinsichtlich der Identifizierung und Aufreinigung solcher Teile oder Partikel, welche die „aktiven“ Gruppen synthetisierter Mo-

leküle enthalten.

[0375] Es gibt verschiedene Wege, das vorliegende Signal- und Detektionssystem zum Nachweis dieser spezifischen und gewünschten kombinatorischen Produkte zu verwenden. In einem Assay-Verfahren wird ein Bindungsgagens (welches spezifisch für den gewünschten Analyten ist), auf einen ausgewählten Typ eines metallartigen Partikels aufgetragen. Wenn dieses beschichtete Partikel zu der Probe gegeben wird, bindet es an den Analyten. Alternativ wird in einem indirekten Verfahren, welches die Verwendung von Biotin-markiertem Bindungsgagens beinhaltet, zunächst der Analyt gebunden, welcher dann durch Zugabe von Streptavidin-beschichteten metallartigen Partikeln vor der Detektion detektiert wird. Das lichtstreuende Partikel wird in der einen oder anderen Form an den gewünschten interessierenden Analyten, der auf der synthetischen Festphase vorliegt, gebunden. Auf diese Weise werden die gewünschten Moleküle identifiziert, isoliert und von der Probe durch Filtration, Zentrifugation, Dialyse oder eine beliebige andere bekannte Technik gereinigt. Alternativ können Bindungsagenzen, die mit Partikeln markiert sind, die mit Bindungsagenzen beschichtet sind, zugegeben werden, so dass sich Aggregate oder Netzwerke zwischen den spezifischen Molekül-enthaltenden synthetischen Partikeln und den metallartigen Partikeln ausbilden. Ähnliche Mittel wie oben beschrieben werden zur Identifizierung und Reinigung der gewünschten Moleküle verwendet.

[0376] Die Multi-Analyt-Analyse verschiedener kombinatorisch synthetisierter Moleküle wird durch Verwendung von zwei oder mehr Typen metallartiger Partikel, von denen jedes mit einem anderen Typ eines Bindungsgagens beschichtet ist, erreicht. Ebenso können Verfahren zur Brechungsindex-Verstärkung und Video-verstärkte DLASLPD-Kontrastverfahren angewendet werden.

[0377] In einem anderen Assay-Verfahren enthalten die metallartigen Partikel außerdem eine Zusammensetzung aus einer ferro-elektrischen oder magnetischen Zusammensetzung, so dass diese Partikel im dreidimensionalen Raum unter Verwendung eines an die Reaktionskammer angelegten EMF manipuliert werden können. Auf diese Weise können die Substratpartikel, welche die „aktiven“ kombinatorischen Moleküle enthalten, leicht gereinigt und von allen anderen Materialien unterschieden (detektiert) werden. Es sei darauf hingewiesen, dass eine gemischte Zusammensetzung spezifischer Partikel aus ferro-elektrischen oder magnetischen und anderen metallartigen Materialien ebenso sehr nützlich in vielen anderen Bereichen ist, einschließlich diagnostischer Assays und zur Isolierung und Aufreinigung der gewünschten Moleküle. Diese Anwendung der Brechungsindex-Verstärkungsverfahren in Kombination mit den obigen Verfahren erhöht die Sensitivität der Detektion.

Metallartige Partikel, die als synthetische Festphasen-Träger verwendet werden

[0378] Metallartige Partikel stellen ausgezeichnete Substrate zum Durchführen chemischer oder biochemischer Synthesen, wie beispielsweise kombinatorischer Synthese dar, wenn sie mit geeigneten Substanzen beschichtet sind. Die spezifische Beschichtung metallartiger Partikel kann beispielsweise aus Polymeren, Antikörpern, Proteinen, Nukleinsäure, Aminosäuren, reaktiven chemischen Gruppen und Ähnlichem bestehen. Beispielsweise werden metallartige Partikel mit einer Polyethylenglycol-Verbindung, welche chemisch reaktive Amingruppen enthält, beschichtet. Die Synthese wird dann auf diesen Amingruppen, welche in großer Zahl auf der Oberfläche des metallartigen beschichteten Partikels vorliegen, initiiert. Es können andere reaktive chemische Gruppen oder Gruppen, die spezifisch aktiviert werden können, anstelle der Amingruppe verwendet werden. In einem anderen Beispiel werden Aminosäuren oder kleine Peptide direkt auf die Oberfläche des Metallpartikels oder metallartigen Partikels aufgetragen oder chemisch an das Polymere oder einen anderen Makromolekültyp, der auf die Oberfläche des metallartigen Partikels aufgetragen wurde, gebunden. Die Synthese wird dann auf den metallartigen beschichteten Partikeln initiiert. In einem weiteren Beispiel werden die reaktiven Gruppen an die Oberfläche des metallartigen Partikels gebunden, so dass Protein-, Nukleinsäure-, chemische oder biochemische Synthese durchgeführt werden können. Die Anzahl der reaktiven Gruppen auf der Oberfläche des Partikels kann ebenso folgendermaßen modifiziert werden. Es wird eine Mischung aus Polyethylenglycol-Verbindungen (MW 20.000) mit oder ohne reaktive Amingruppen (oder anderen reaktiven Gruppen) in einem geeigneten Verhältnis hergestellt, um eine gewünschte Anzahl reaktiver Gruppen auf der Oberfläche pro Partikel zu erhalten. Auf diese Weise wird das metallartige Partikel mit einer spezifischen Menge chemischer synthetischer Stellen oder Bindungsstellen (pro metallartiges Partikel) beschichtet. Die spezifische Anzahl der Stellen und der Typ der reaktiven Gruppen kann variiert werden, um einem bestimmten Erfordernis, wie beispielsweise weiterer chemischer Synthese oder diagnostischen Zwecken, zu entsprechen. Beispielsweise kann bei diagnostischen Anwendungen die Zugabe einer bestimmten Anzahl spezifischer Bindungsgagens-Moleküle pro metallartigem Partikel wichtig sein, um die gewünschte Assay-Leistung zu erreichen. Außerdem können zwei oder mehr verschiedene Typen reaktiver synthetischer Stellen oder Bindungsstellen unter Verwendung des gleichen Ansatzes, wie er oben für die Polyethylen-Verbindung beschrieben wurde, in

spezifischen Mengen auf dem gleichen metallartigen Partikel platziert werden, indem die gewünschten Substanzen (dass heißt, verschiedene Bindungsagenzien oder chemische Gruppen usw.) in geeigneten Verhältnissen gemischt werden. Diese Typen beschichteter Partikel können beispielsweise verwendet werden, um zwei oder mehr verschiedene Moleküle unter Verwendung der gleichen Partikel zu isolieren, zu reinigen und zu detektieren. Die hohen Dichten (g/cm^3) vieler Typen metallartiger Partikel bringen ebenso viele Vorteile bei der Aufreinigung, Isolierung und Identifizierung der interessierenden Moleküle mit sich. Partikel vom MLSP-Typ haben den weiteren Vorteil, dass sie innerhalb des Mediums leichter manipuliert werden können. Die obigen Beispiele stellen lediglich einige der vielen möglichen Variationen dieses Verfahrens dar. Andere Variationen sind für einen Fachmann auf dem Gebiet offensichtlich.

Durchführung verschiedener Aspekte/Ausführungsformen der Erfindung außerhalb des Bereichs der analytischen Diagnostik

[0379] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe durch Detektion der Streulichteigenschaften eines Partikels. Es sei darauf hingewiesen, dass verschiedene Aspekte der Erfindung, wie hierin offenbart, direkt auf viele andere spezifische Anwendungen außerhalb des diagnostischen Bereichs anwendbar sind. Ein Fachmann auf dem Gebiet oder auf anderen Gebieten, wie beispielsweise der optischen Information und Speicherung, der Bildeinrichtung und -bearbeitung, elektrisch-optischen Signalübertragung und Schaltungen, Telekommunikation, Informationsübertragung und anderen verwandten Anwendungen, wird durch diese Offenbarung dazu in die Lage versetzt, verschiedene Aspekte/Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung durchzuführen, insbesondere um Probleme zu lösen und neue Produkte in Bereichen außerhalb der analytischen diagnostischen Assays zu kreieren.

[0380] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung, welcher sehr nützlich für Anwendungen in anderen Bereichen ist, ist die Möglichkeit, spezifische metallartige Partikel bestimmter Größe, Form, Zusammensetzung und Homogenität durch eine einzigartige optische Signatur, welche charakteristisch für diesen Partikeltyp ist, zu identifizieren. Die Verwendung derartiger spezifischer optischer Signaturen in sehr kleinen Strukturen ermöglicht die Verwendung dieser Partikel-Signal-Agenzien in verschiedenen Bereichen. Beispielsweise können sie in industrieller Qualitätskontrolle, als Markierungen oder Label zur Identifizierung oder Markierung eines beliebigen Produkts, eines Materials, einer Substanz oder eines Gegenstands, welcher das Partikel enthält, verwendet werden. Die Partikel können in der einen oder anderen Form, z. B. als Identifizierungsmittel, ähnlich zu der auf dem Gebiet bekannten Methode der „Strichkodierung“, verwendet werden. Beispielsweise kann eine Beschichtung, welche einen oder mehrere Typen von Partikeln enthält, auf Verbraucherprodukte aufgetragen werden, um die Authentizität, das Datum oder andere relevante Information zu identifizieren. Auf ähnliche Weise können Papierwährung, Aktien und Wertpapierzertifikate und Ähnliches auf der Oberfläche mit bestimmten Partikeltypen beschichtet sein oder bestimmte Partikel in das Papiermaterial eingebettet sein, wobei die Partikel zur Bestimmung der Authentizität des Gegenstands detektiert werden können. Zu weiteren Beispielen zählen das Platzieren kleiner Mengen eines spezifischen Partikeltyps innerhalb rezeptpflichtiger oder rezeptfrei erhältlicher Medikamente, um ein Arzneimittel zu authentifizieren oder zu verfolgen. Des Weiteren können die Partikel als Umwelt-, industrielle, pharmazeutische oder biologische Tracer verwendet werden, um die physikalischen Eigenschaften eines Systems, wie beispielsweise den Zustand von Flüssigkeiten, Materialien und Ähnlichem, zu untersuchen. Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt, dass dies lediglich einige der vielen Möglichkeiten sind.

[0381] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung, welcher direkt auf andere Bereiche anwendbar ist, ist die Verwendung lichtstreuender Partikel, die physikalisch durch elektrische, magnetische oder ähnliche Felder manipuliert werden können. Diese Partikel werden als manipulierbare lichtstreuende Partikel (MLSP) bezeichnet und später detailliert beschrieben. Derartige MLSP-Partikel können in verschiedenen Anordnungen im ein-, zwei- oder dreidimensionalen Raum unter Anlegen eines magnetischen, elektrischen oder verwandten elektromagnetischen Felds (EMF) orientiert werden. Auf diese Weise können die einzigartigen Lichtstreueneigenschaften der Partikel ausgenutzt werden, um bestimmte Muster, Bilder oder Farben zu bilden. Die spezifischen Orientierungen eines oder mehrerer MLSP-Partikel werden verwendet, um Information über die Lichtstreueneigenschaften eines individuellen Partikels oder die resultierende Lichtstreuinformation, dass heißt, die optische Signatur zweier oder mehrerer Partikel, die in einer bestimmten Orientierung angeordnet sind, zu speichern oder zu übertragen. Beispielsweise werden drei verschiedene Partikeltypen, welche blaues, rotes und grünes Licht streuen, innerhalb eines kleinen Bereichs oder Volumens, wie beispielsweise ein „Pixel“ in einem Raster (Screen), welcher eine spezifische Anzahl von Pixeln in einem zweidimensionalen Array enthält, platziert. Das Raster bildet ein farbiges oder schwarz-weißes Bild oder ein bewegliches Bild, welches eine ähnliche Erscheinungsform aufweist wie ein Fernsehbild, Videobild, Filmbild und Ähnliches, wenn der Schirm mit weißem Licht bestrahlt wird. Jedes Pixel oder jede Gruppe von Pixeln ist räumlich durch ein elektrisches oder magnetisches

Feld (EMF) adressierbar, so dass bei Anlegen des geeigneten EMF die einzelnen Partikel, die blaues, rotes und grünes Licht streuen, orientiert werden, wodurch sie bei geeigneter Beleuchtung eine spezifische Farbe mit einem bestimmten Farbton und einer bestimmten Intensität produzieren. Beispielsweise werden bei einem angelegten EMF die roten und grünen Partikel zu einem winzigen Spot konzentriert, während die blau-streuenden Partikel frei dispergiert innerhalb des inneren Volumens des Pixels vorliegen. Dieses Pixel wird dann blau erscheinen. Ein anderes EMF kann dann angelegt werden, wodurch der gleiche Effekt bei den Partikel hervorgerufen wird, die rotes Licht oder grünes Licht streuen. Auf diese Weise wird durch spezifische Orientierung der verschiedenen Partikel in jedem Pixel das gewünschte Farbbild erzeugt. Dieses Verfahren und diese Vorrichtung bringen viele attraktive Vorteile gegenüber der derzeitigen Bilderzeugungstechnologie auf Kathoden-Strahlrohren-Basis und Ähnlichem.

[0382] In einem weiteren Beispiel werden die MLSP-Partikel durch geeignetes Einstellen des EMF von einer spezifischen Orientierung in eine andere gebracht. Beispielsweise werden asymmetrische Silberpartikel, welche grünes oder rotes Streulicht erzeugen und/oder ebenso zwei verschiedene Intensitätsniveaus des Streulichts aufweisen, folgendermaßen verwendet. Ein oder mehrere Partikel werden an einem bestimmten Ort entweder in einem flüssigen oder festen Material, in dem das Partikel rotieren kann, dass heißt, sich bei Anlegen eines EMF-Feldes an das Material oder die Vorrichtung, welche die Partikel enthält, selbst re-orientieren kann, platziert. In Abhängigkeit von der verwendeten Menge der Partikel und der gewünschten Funktion der Vorrichtung bedeuten die verschiedenen Orientierungen der Partikel verschiedene Informationstypen. Beispielsweise zeigen in einer Orientierung die Lichtstreueneigenschaften des/der asymmetrischen MLSP-Partikel(s) das „Off“ oder die Zahl 0 in einem binären Codesystem an, während in einer anderen Position oder Orientierung die Lichtstreueneigenschaften das „On“ oder die Zahl 1 in einem binärem Zahlensystem anzeigen. Die Orientierung der asymmetrischen MLSP-Partikel wird durch Variieren des EMF geändert, wodurch die gewünschte Orientierung der Partikel in dem Material oder der Vorrichtung erreicht wird. Wenn Licht mit den Partikeln in einer spezifischen Orientierung interagiert, bedeuten die Eigenschaften des Streulichts einen spezifischen Informationstyp, wie oben beschrieben. Auf diese Weise können einfache und aus mehreren Komponenten zusammengesetzte optische Schalter hergestellt werden, die im Bereich der Telekommunikation und verwandten Bereichen Anwendung finden können. Ebenso kann eine Reihe dieser Schalter in Reihe oder parallel zusammengesetzt werden, um eine komplexere Informationsspeicherung und -verarbeitung zu erhalten.

[0383] Neue Typen von Informationsspeicher-Vorrichtungen können hergestellt werden, indem die Information unter Verwendung vieler verschiedener Typen und/oder Orientierungen der lichtstreuenden Partikel und MLSP-Partikel verschlüsselt (kodiert) oder gespeichert wird. Beispielsweise kann eine optische Speicherplatte hergestellt werden, die z. B. der ähnelt, die auf dem Gebiet als „Compakt-Disk“ oder „CD-ROM“ bekannt ist. Anstelle der Verwendung von Bumps, welche über die Oberfläche hinausragen, um die Information zu kodieren, werden lichtstreuende Partikel verwendet. Die Partikel können auf oder in jeglichem Material, von dem die Lichtstreueneigenschaften der Partikel detektiert werden können, platziert werden. Auf diese Weise sind sehr viel spezifischere Informationen und die Speicherung höherer Informationsdichten möglich.

[0384] Ein Fachmann auf dem Gebiet erkennt die vielen verschiedenen Vorrichtungstypen, die unter Verwendung verschiedener lichtstreuender Partikel in einer bestimmten Anwendung aufgebaut werden können. Die obigen Beispiele stellen lediglich einige der vielen Wege dar, auf denen metallartige und MLSP-Partikel außerhalb des Bereichs der analytischen und diagnostischen Detektion verwendet werden können. Diese Anwendungen werden durch die vorliegende Offenbarung ermöglicht; der Anmelder beansprucht das Recht zur Anwendung verschiedener Teile der Erfindung, wie hierin beschrieben, in Bereichen außerhalb des Bereichs der diagnostischen analytischen Assays.

Beschreibung der SpectraMetrix-Spektrophotometer-Vorrichtung für Flüssigproben und theoretische Arbeitsweise

[0385] Das SpectraMetrix-Photometer ist ein Rechtwinkel-Photometer, welches die Intensität des Lichts misst, welches in rechten Winkeln zu dem Erregungslichtstrahl gestreut oder emittiert wird. Eine schematische Darstellung des Instruments ist in [Fig. 21](#) gegeben. Die Lichtquelle ist ein Mikroskop-Illuminator oder irgendein anderer Typ einer Lichtquelle. Das Instrument kann mit oder ohne Monochromator verwendet werden. Adapter zum Anschluss verschiedener Lichtquellen werden mit dem Photometer bereitgestellt. Das gestreute oder emittierte Licht wird durch eine Photoelektronenvervielfacher(PM)-Röhre detektiert. Das Photometer besitzt eine manuelle Lichtblende, um zu verhindern, dass während des Wechsels der Proben Licht die PM-Röhre erreicht. Optische Filter oder Polarisatoren werden gegebenenfalls in den Weg des einfallenden oder emittierten Lichts eingeführt. Zylindrische Küvetten (z. B. Teströhrchen) mit verschiedenen Durchmessern werden als Probenküvetten verwendet. Jedoch kann jeglicher Typ eines optisch durchlässigen Probenbehältnisses mit ei-

ner geeigneten Halterung ebenso verwendet werden. Es wurden Teströhrchen mit einem Durchmesser von 6 mm × 50 mm verwendet; ein Mikroskop-Illuminator mit einem Infrarot(Wärme)-Filter wurde verwendet, um die hierin beschriebenen Daten zu erhalten.

[0386] Der Illuminator kann direkt oder durch einen Monochromator mit dem Spektrophotometer verbunden sein. Bei dem für die hierin beschriebenen Messungen verwendeten Monochromator handelt es sich um einen Beugungsgitter-Monochromator. Der Illuminator wird durch eine regulierte DC-Stromquelle mit 6 V und 3 Ampera versorgt.

[0387] In diesem Abschnitt wird die Optik der verwendeten Vorrichtung ohne Monochromatorbetrieb beschrieben. Ein 10×-Objektiv fokussiert das von dem Illuminator auf die Probenkammer abgegebenen Licht. Eine Lichtsammellinse (23 mm Brennweite, 19 mm Durchmesser), welche im rechten Winkel zu dem einfallenden Lichtstrahl positioniert ist (ungefähr 1,5 Inch vom Zentrum der Probenküvette), fokussiert ein Bild der Probenkammer mit einem Abstand von ungefähr 106 mm vom Zentrum der Probenkammer. Dieser Abstand ermöglicht die Platzierung einer Lichtblende und einer Filterhalterung zwischen der Sammellinse und der PM-Rohre. Eine Blende mit einer Öffnung von 3,25 mm Durchmesser (erzeugt mit einem #20-Holzspiralbohrer) wird an der Bildebene platziert. Die PM-Rohre wird hinter der Blende platziert. Die Blende schirmt das Licht, das von den Wänden der Küvette reflektiert wird, ab, wodurch nur das aus dem Zentrum des Probenvolumens gestreute Licht die PM-Rohre erreicht. Während die Blende die Menge an Streulicht, welches die PM-Röhre erreicht, reduziert, maximiert sie das Signal/Hintergrund-Verhältnis. Um die Detektion von Licht, welches von der Probenkammer reflektiert wird, weiter zu minimieren, wird die Kammer mit einem Winkel von ungefähr 40–50 Grad bezüglich der vertikalen Richtung positioniert, so dass reflektiertes Licht nicht die Sammellinse erreicht. Auf Grund dieses Winkels und der Effekte des Brechungsindex verläuft das Licht, welches aus der Kammer heraustritt, nicht entlang der Mittelachse der Sammellinse, und der Streulichtstrahl an der Bildebene wird von der Mittelachse der Sammellinse nach unten verlagert. Dies erfordert die Verlagerung der 3,25-mm-Apertur und der PM-Röhre nach unten in Bezug auf die Sammellinsenachse. Das Instrument ist derart aufgebaut, dass die Abwärts-Verlagerung bei den meisten effizienten Streulichtdetektionen manuell eingestellt werden kann.

[0388] Bei Verwendung des Monochromators ist die Optik die gleiche wie oben, mit dem Unterschied, dass eine zusätzliche Linse (23 mm Brennweite, 19 mm Durchmesser) zwischen dem 10×-Objektiv und dem Monochromator-Ausgangsschlitz positioniert ist. Die Linse befindet sich 4 Inch von der Mitte der Probenküvette entfernt. Der Ausgangsschlitz des Monochromators befindet sich 5,6 Inch vom Zentrum der Probenküvette entfernt. Der Illuminator wird am Eingangsschlitz des Monochromators mit dem Adapter verbunden.

Einstellung der Photometer-Optik

- Ein 4×10^{-12} M 60-nm-Goldsol wird in einem 6 × 50 mm Kulturröhrchen in der Probenhalterung des Spektrometers platziert. Der Winkel des Röhrchens mit Bezug auf die Vertikale wird derart eingestellt, dass er zwischen 40 und 50 Grad liegt. Das "abgewinkelte" Röhrchen wird derart positioniert, dass der fokussierte Erregungslichtstrahl durch das Zentrum der Küvette verläuft. Das Erregungslicht darf nicht auf die vordere Oberfläche des Röhrchens (der Sammellinse zugewandte Oberfläche) treffen, da dies die Lichtmenge, die in Richtung Detektionssystem reflektiert wird, erhöhte.
- Der Abstand der Sammellinse vom Zentrum des Probenröhrchens wird derart eingestellt, dass ein scharfes Bild der Wände des Röhrchens mit einem Abstand von 106 mm vom Zentrum des Röhrchens gebildet wird. Das Bild des Streulichtstrahls und die Wände des Probenröhrchens können klar auf einem weißen Blatt Papier, welches mit einer Distanz von etwa 106 mm vom Röhrchenzentrum platziert ist, dargestellt werden. Das Röhrenbild besitzt einen Durchmesser von etwa 8 bis 10 mm an der Bildebene. Die Linse sollte derart positioniert sein, dass ein scharfes Bild der Wände der Küvette erhalten wird. Der Streulichtstrahl erscheint ein wenig unscharf an der Bildebene auf Grund seiner begrenzten Breite. Die beste Position der Linse ist etwa 1,5 Inch vom Zentrum der Probenküvette entfernt. Der Erregungsstrahl kann deutlich beobachtet werden, wenn er eine streuende Lösung durchquert.
- Die obigen Einstellungen der Sammellinsenposition werden vorgenommen, wenn die Struktur, welche die Blende, die Filterhalterung und die Blendenhalterung umfasst, aus der Vorrichtung entfernt wurde. Nachdem die Linse korrekt positioniert ist, wird die letztere Struktur wieder eingesetzt und die lichtabschirmende Blende mit einer Öffnung von 3,25 mm eingesetzt. Die PM-Röhre wird an entsprechender Stelle eingesetzt.
- Nach den Schritten a, b und c wird die Position der Apertur bezüglich der Sammellinsen-Optik folgendermaßen eingestellt. Ein Stück weißes Papier wird dort platziert, wo die Ebene der PM-Photokathode beim Einsetzen der PM positioniert wird. Wenn lichtstreuende Goldpartikel in der Probenkammer vorliegen, wird die Position der Apertur eingestellt, bis die maximale Lichtmenge auf der PM-Röhre sichtbar wird. Wenn die Apertur richtig positioniert ist, erscheint das Licht auf dem Papier als Punkt mit einem Durchmesser von 0,32

Inch (8 mm).

Beispiele

[0389] Die Beispiele 1 bis 10 beinhalten die Messung von Licht, welches von Partikeln gestreut oder von fluoreszierenden Molekülen emittiert wird, oder beides. Das zur Messung des Lichtsignals verwendete Instrument war ein Photometer, das, wie zuvor beschrieben, von SpectraMetrix gebaut wurde.

[0390] In den Beispielen 1 bis 3 handelte es sich bei den für die Messungen verwendeten Polystyrolpartikeln um NIST-aufspürbare zertifizierte Nanosphären, erhältlich von Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA. Die Goldpartikel wurden von Goldmark Biologicals, Phillipsburg, N. J., einem Vertreiber für British Biocell Intl., Cardiff UK.

[0391] In den Beispielen 4 bis 10 wurde das Fluoreszin von Molecular Probes Inc., Eugene Oregon, bezogen; die Goldpartikel wurden von Goldmark Biologicals, Phillipsburg, N. J., einem Vertreiber für British Biocell Intl., Cardiff UK., bezogen; und die Polystyrolpartikel wurden von Interfacial Dynamics Inc., Portland, Oregon, bezogen.

[0392] Die relativen Lichtstreukräfte der Partikel gleicher Größe und Form jedoch verschiedener Zusammensetzung können direkt verglichen werden, indem die Lichtstreuintensitäten in rechten Winkeln zu dem Weg des einfallenden Lichts verglichen werden. Wenn die Messung der Lichtstreuintensität für eine bekannte Konzentration jedes interessierenden Partikels mit einem rechten Beobachtungswinkel durchgeführt wird, können die Lichtstreuintensitäten für identische Konzentrationen von Partikeln gleicher Größe und Form jedoch unterschiedlicher Zusammensetzung direkt verglichen und die relativen Gesamt-Lichtstreukräfte der verschiedenen Partikel bestimmt werden.

Beispiele 1, 2 und 3 – Berechnete und gemesse relative Streukräfte vergleichbarer Polystyrol- und Goldpartikel

[0393] Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6, 7 und 8 dargestellt. Die Berechnungen wurden unter Verwendung bekannter Lichtstreubeziehungen und der diesseitig neu definierten Beziehungen, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Die experimentellen Messungen wurden für Partikel in Wasser durch Detektion des von den frei in Lösung vorliegenden Partikeln gestreuten Lichts bei einer gegebenen Beleuchtungsintensität und Wellenlänge unter Verwendung des SpectraMetrix-Photometers durchgeführt. Es wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

- Bestrahlung der Kontroll- und Partikelproben vergleichbarer Größe mit der gleichen Einfallslicht-Zusammensetzung und -Intensität.
- Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollrörchen, welches Wasser jedoch keine Partikel enthält, emittiert wird.
- Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Röhrchen emittiert wird, welches Partikel in bekannter Konzentration enthält.
- Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (b) von dem Lichtsignalwert von (c).
- Vergleichen der Lichtsignale, die von gleichen Konzentrationen von Gold- und Polystyrolpartikeln ausgehen.

Beispiel 4 – Gemessene relative Signalerzeugungsvermögen von Fluoreszin und Goldpartikeln – Bestrahlung mit weißem Licht

[0394] Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Es wurde das gleiche Verfahren der Lichtdetektion angewendet, um das von allen Proben in einem 6 mm × 50 mm Glasröhrchen emittierte Lichtsignal zu bestimmen. Bei diesen Messungen des Lichtsignals von Goldpartikeln oder Fluoreszin wurden keine optischen Filter verwendet.

[0395] Alle Messungen wurden in Wasser durchgeführt. Die Fluoreszin-enthaltende Lösung besaß einen pH-Wert von 8–9. Der Lichtsignalwert eines Röhrchens, welches lediglich Wasser enthielt, wurde von den Goldpartikel- oder Fluoreszin-Werten subtrahiert, um das Lichtsignal zu erhalten, welches lediglich von dem Fluoreszin oder den Goldpartikeln herrührt.

[0396] Zur Messung des Lichtsignals von den Partikeln wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Bestrahlung aller Proben mit der gleichen Einfallslicht-Zusammensetzung und -Intensität.
- Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollrörchen ausgeht, welches Wasser jedoch

keine Partikel enthält.

- (c) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Röhrchen emittiert wird, welches Partikel in bekannter Konzentration enthält.
- (d) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalswerts (b) vom Lichtsignalwert von (c).

[0397] Die folgenden Schritte wurden für die Messung des Lichtsignals von Fluoreszin durchgeführt:

- B. (a) Bestrahlung der Proben mit Einfallslicht der gleichen Intensität und Zusammensetzung wie oben.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollröhrenchen emittiert wird.
- (c) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einer bekannten Fluoreszin-Konzentration in einem Röhrchen emittiert wird.
- (d) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalswerts (b) von dem Lichtsignalwert von (c).
- C. (a) Vergleichen der Lichtsignale, die von bekannten Konzentrationen an Partikeln und Fluoreszin-Molekülen erhalten wurden.

Beispiel 5 – Messung des relativen Signalerzeugungsvermögens von Fluoreszin und Goldpartikeln – monochromatische Bestrahlung

[0398] Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Diese Ergebnisse wurden nicht hinsichtlich der Unterschiede der Einfallslichtintensität korrigiert. Es wurde monochromatisches Licht mit Wellenlängen, bei denen eine maximale Lichtemission von Fluoreszin (490 nm) und eine maximale Lichtstreuung von den Goldpartikeln auftritt, verwendet. Die Einfallslichtintensität bei 490 nm war leicht geringer als die Intensitäten, die für die Goldpartikel verwendet wurden, und lagen in einem Bereich von etwa 86% der Intensität bei 520 nm bis 80% der verwendeten Intensität von 565 nm. Andererseits lag die Quantenausbeute der Photoelektronenvervielfacher-Röhre im Bereich von 0,34 bei der primären Emissionswellenlänge des Fluoreszins (520 nm), während sie bei 560 nm ungefähr 0,18 betrug.

[0399] Mit Ausnahme der Einfallswellenlänge wurde das gleiche Verfahren der Lichtdetektion bei allen Proben in einer 6 mm × 50 mm Glasröhre durchgeführt. Es wurden keine optischen Filter bei der Messung des Lichtsignals der Goldpartikel oder des Fluoreszins verwendet.

[0400] Alle Messungen wurden in Wasser durchgeführt. Die Fluoreszin-enthaltende Lösung besaß einen pH-Wert von 8–9. Der Lichtsignalwert eines Röhrchens, welches lediglich Wasser enthielt, wurde von den mit Goldpartikeln oder Fluoreszin erhaltenen Werten subtrahiert, um das Lichtsignal zu erhalten, was ausschließlich auf das Fluoreszin oder die Goldpartikel zurückzuführen ist.

[0401] Die folgenden Schritte wurden bei der Messung des Lichtsignals von Partikeln durchgeführt:

- A. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches aus einem Kontrollröhrenchen, welches Wasser jedoch keine Partikel enthält, emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Röhrchen emittiert wird, welches Partikel mit einer bekannten Konzentration enthält.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).

[0402] Die folgenden Schritte wurden zur Messung des Lichtsignals von Fluoreszin durchgeführt:

- B. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von dem Kontrollröhrenchen emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einer bekannten Konzentration von Fluoreszin in einem Röhrchen emittiert wird.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalswerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).
- C. (a) Vergleich der Lichtsignale, die von bekannten Konzentrationen an Partikeln und Fluoreszin-Molekülen erhalten wurden.

Beispiel 6 – Messung des relativen Signalerzeugungsvermögens von Fluoreszin, Polystyrol, einer fluoreszierenden Polystyrolverbindung und Goldpartikeln

[0403] Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Diese Ergebnisse wurden nicht hinsichtlich der Unterschiede in der Einfallslichtintensität korrigiert.

[0404] Alle Proben wurden mit monochromatischem Einfallslicht bestrahlt. Die Goldpartikel von 100 nm Durchmesser wurden mit einfallendem monochromatischem Licht einer Wellenlänge in der Nähe der Wellenlänge, bei der maximale Lichtstreuung von diesen Partikel auftritt, bestrahlt. Die Probe einer fluoreszierenden Polystyrolverbindung wurde mit monochromatischem Einfallslicht einer Wellenlänge, bei der maximale Flu-

reszenz-Erregung auftritt (490 nm), bestrahlt. Die maximale Fluoreszenz-Emission dieser fluoreszierenden Verbindung trat bei 515 nm auf. Die Einfallssichtintensität bei 490 nm betrug etwa 80% der Intensität bei 555 nm. Die Quantenausbeute der Photoelektronenvervielfacher-Röhre bei 555 nm betrug etwa 60% der Ausbeute bei 515 nm.

[0405] Mit Ausnahme der Einfallswellenlänge wurde das gleiche Verfahren der Lichtdetektion bei allen Proben in 6 mm × 50 mm Glasröhrchen angewendet. Bei der Messung des Lichtsignals der Goldpartikel oder der fluoreszierenden Partikel wurden keine optischen Filter verwendet. Alle Messungen wurden in Wasser durchgeführt. Der Lichtsignalwert eines Röhrchens, welches lediglich Wasser enthielt, wurde von dem Wert des Goldpartikels oder des Polystyrolpartikels subtrahiert, um das Lichtsignal zu erhalten, das lediglich auf die Polystyrol- oder Goldpartikel zurückzuführen ist.

[0406] Die folgenden Schritte wurden bei der Messung des Lichtsignals von den Partikeln durchgeführt:

- A. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollröhrchen, das Wasser aber keine Partikel enthält, emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Röhrchen, welches Partikel in bekannter Konzentration enthält, emittiert wird.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).

[0407] Die folgenden Schritte wurden bei der Messung des Lichtsignals von den fluoreszierenden Partikeln durchgeführt:

- B. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von dem Kontrollröhrchen emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einer bekannten Konzentration fluoreszierender Partikel in einem Röhrchen emittiert wird.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).
- C. (a) Vergleichen der Lichtsignale, die von bekannten Partikelkonzentrationen erhalten werden.

Beispiel 7 – Detektion von Goldpartikeln mit 59,6 nm Durchmesser und Fluoreszin bei hoher Serumkonzentration

[0408] Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 wiedergegeben. Das Serum wurde von Biowhittaker Inc., Walkerville, MD, bezogen. Vor dem Verkauf wurde das Serum durch einen Ein-Mikron-Filter gefiltert; es war klar und wies eine strohgelbe Farbe auf. Für die Fluoreszin-Messungen wurde das Serum auf einen pH-Wert von 9 bis 9,5 eingestellt. Die Lösung, welche die Goldpartikel enthielt, wurde mit monochromatischem Einfalllicht mit einer Wellenlänge von 543 nm bestrahlt; diese Wellenlänge liegt in der Nähe der Wellenlänge, bei der maximale Lichtstreuung von dem Partikel auftritt. Die Fluoreszin-enthaltende Lösung wurde mit 490 nm bestrahlt; hier tritt die maximale Fluoreszenz-Erregung auf.

[0409] Mit Ausnahme der Einfallswellenlänge wurde das gleiche Lichtdetektionsverfahren für alle Proben in einem 6 mm × 50 mm Glasröhrchen durchgeführt. Bei den Messungen des Lichtsignals von den Goldpartikeln oder dem Fluoreszin wurden keine optischen Filter verwendet.

[0410] Die Messungen wurden in der angegebenen Serumkonzentration durchgeführt. Der Lichtsignalwert eines Röhrchens, welches lediglich Serum in geeigneter Konzentration enthielt, wurde von dem Wert, der für das Goldpartikel oder Fluoreszin erhalten wurde, subtrahiert, um das Lichtsignal zu erhalten, das lediglich auf das Fluoreszin oder die Goldpartikel zurückzuführen ist.

[0411] Die folgenden Schritte wurden für die Messung des Lichtsignals von Partikeln durchgeführt:

- A. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollröhrchen, das Serum in geeigneter Konzentration aber keine Partikel enthält, emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Röhrchen emittiert wird, welches Partikel in bekannter Konzentration enthält.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).

[0412] Die folgenden Schritte wurden zur Messung des Lichtsignals von der fluoreszierenden Lösung durchgeführt:

- B. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von dem Kontrollröhrchen emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einer bekannten Konzentration an Fluoreszin in einem Röhrchen emittiert wird.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).

C. (a) Vergleich der Lichtsignale, die von bekannten Partikelkonzentrationen erhalten wurden.

Beispiel 8 – Untere Detektionsgrenze von Fluoreszin, Gold- und Polystyrolpartikeln bei 92,8%iger Serumkonzentration

[0413] Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 wiedergegeben. Für die Fluoreszin-Messung wurde das Lichtsignal, welches von der Fluoreszin-enthaltenden Probe emittiert wurde, durch einen Wratten-Filter Nr. 16 von Kodak geleitet, bevor es auf die Photoelektronenvervielfacher-Röhre traf. Die maximale Lichtintensität von der Fluoreszin-Lösung wurde bei einer monochromatischen Einfallswellenlänge von 498 nm beobachtet, während die maximale Lichtstreuung von den Goldpartikeln bei 554 nm beobachtet wurde. Bei den Messungen der Lichtsignale von den Gold- oder Polystyrolpartikeln wurden keine optischen Filter verwendet. Für die Fluoreszenzmessungen wurde der pH-Wert des Serums auf ungefähr pH 9 eingestellt.

[0414] Mit Ausnahme der Einfallswellenlänge wurde das gleiche Lichtdetektionsverfahren für alle Proben in 6 mm × 50 mm Glasrörchen durchgeführt. Das Serum ist in Beispiel 7 beschrieben.

[0415] Die Messungen wurden in der angegebenen Serumkonzentration durchgeführt. Der Lichtsignalwert eines Röhrchens, welches lediglich Serum in geeigneter Konzentration enthielt, wurde von dem Goldpartikel- oder Fluoreszin-Wert subtrahiert, um das Lichtsignal zu erhalten, welches lediglich auf das Fluoreszin oder die Goldpartikel zurückzuführen ist.

[0416] Die folgenden Schritte wurden bei der Messung des Lichtsignals von Partikeln durchgeführt:

- A. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollrörchen, das Serum in geeigneter Konzentration aber keine Partikel enthält, emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Röhrchen emittiert wird, das Partikel in bekannter Konzentration enthält.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).

[0417] Die folgenden Schritte wurden zur Messung des Lichtsignals von der fluoreszierenden Lösung durchgeführt:

- B. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von dem Kontrollrörchen emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einer bekannten Konzentration an Fluoreszin in einem Röhrchen emittiert wird.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).
- C. (a) Vergleichen der Lichtsignale, die von bekannten Partikelkonzentrationen erhalten wurden.

Beispiel 9 – Detektionsgrenzen für Polystyrol, eine fluoreszierende Polystyrolverbindung und Goldpartikel bei hoher Serumkonzentration

[0418] Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 wiedergegeben. Die Messungen wurden in der angegebenen Serumkonzentration durchgeführt. Der Lichtsignalwert eines Röhrchens, welches lediglich Serum in geeigneter Konzentration enthielt, wurde von dem Wert des Goldpartikels oder Polystyrolpartikels subtrahiert, um das Lichtsignal zu erhalten, das lediglich auf die Polystyrol- oder Goldpartikel zurückzuführen ist. Es wurde kein optisches Filtern durchgeführt.

[0419] Die folgenden Schritte wurden zur Messung des Lichtsignals von Partikeln durchgeführt:

- A. (a) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollrörchen, das Serum in geeigneter Konzentration aber keine Partikel enthält, emittiert wird.
- (b) Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Röhrchen emittiert wird, das Partikel in bekannter Konzentration enthält.
- (c) Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (a) von dem Lichtsignalwert von (b).
- (d) Vergleichen der Lichtsignale von bekannten Partikelkonzentrationen.

[0420] Mit Ausnahme der Einfallswellenlänge wurde das gleiche Lichtdetektionsverfahren für alle Proben in 6 mm × 50 mm Glasrörchen durchgeführt. Das Serum ist in Beispiel 7 beschrieben.

Beispiel 10 – Bei geringen Goldpartikel-Konzentrationen hat das Serum keine Wirkung auf die Lichtstreueneigenschaften der Goldpartikel

[0421] Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt. Das Serum mit 95,7%iger Konzentration ist klar und strohgelb gefärbt und besitzt bei einer Weglänge von 1 cm und einer Einfallssichtwellenlänge von 543 nm eine Absorbanz von 0,14. Die Lichtstreuungsmessungen wurden in 6 mm × 50 mm Glasrörchen mit einem inneren Durchmesser von ungefähr 5 mm durchgeführt. Auf der Grundlage der Differenz der Absorption von Einfallssicht und Streulicht einer Wellenlänge von 543 nm sollte das Streulichtsignal von den in der Serumprobe vorliegenden Goldpartikeln ungefähr 80% des Signals, das von der gleichen Konzentration an Goldpartikeln in Wasser ausgeht, betragen. In diesem Beispiel wurden keine optischen Filter verwendet.

[0422] Es wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Bestrahlung aller Proben mit der gleichen Einfallssichtzusammensetzung und -intensität.
- Bestimmung des Lichtsignals, welches von einem Kontrollrörchen, das Wasser oder eine geeignete Serumkonzentration jedoch keine Partikel enthält, emittiert wird.
- Bestimmung des Lichtsignals, das von einem Röhrchen emittiert wird, welches Partikel in bekannter Konzentration enthält.
- Subtrahieren des Kontrolllichtsignalwerts (b) von dem Lichtsignalwert von (c).
- Vergleichen der Lichtsignale, die von gleichen Goldkonzentrationen in Serum und Wasser erhalten wurden.

Beispiel 11 – Herstellung einer 16-nm-Goldpartikel-Suspension

[0423] Es wurden 2,5 ml steriles Wasser zu 0,1 g HAuCl₄·3H₂O gegeben, um eine 4%ige HAuCl₄·3H₂O-Lösung herzustellen. Die Lösung wurde zentrifugiert, um Feststoffe zu entfernen. In einem separaten Kolben wurden 10 ml steriles Wasser zu 0,1 g Natriumzitrat gegeben, um eine 1%ige Natriumzitratlösung zu bilden. Die Zitratlösung wurde durch einen 0,4-µm-Polycarbonat-Membranfilter filtriert, um Feststoffe zu entfernen. In einen sehr sauberen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben wurden 100 ml steriles Wasser und 0,25 ml des 4%igen HAuCl₄·3H₂O gegeben. Die Flasche wurde auf einer Rührheizplatte bei einer Einstellung von 4 platziert und mit einem 100-ml-Becherglas bedeckt. Als die Mischung anfing zu Kochen, wurden 2 ml des 1%igen Natriumzitrats zugegeben. Die Lösung nahm innerhalb einer Minute nach Zugabe des Zitrats eine schwarze Farbe an. Anschließend wurde sie purpurfarben und schließlich dunkelrot. Die rote Farbe wurde etwa 2 Minuten nach Zugabe der Zitratlösung erhalten. Die Mischungslösung wurde 30 weitere Minuten gekocht und dann auf Raumtemperatur abgekühlt; es wurde steriles Wasser zugegeben, um das Ganze auf ein Gesamtvolumen von 100 ml zu bringen. Die Goldendkonzentration betrug etwa 0,005%; die Partikelkonzentration betrug $1,2 \times 10^{12}$ Partikel/ml unter der Annahme, dass sämtliches Goldsalz in Goldpartikel überführt wurde.

Beispiel 12 – Stabilisierung der Metallpartikel mit einer Polyethylenverbindung

[0424] 1 g einer PEG-Verbindung (MW 20.000) wurde zu 100 ml sterilem Wasser gegeben, um eine 1%ige Lösung der PEG-Verbindung zu bilden; die Lösung wurde unter Verwendung einer 50-ml-Spritze durch einen 0,4-µm-Polycarbonatfilter gefiltert.

[0425] Zur Stabilisierung eines gegebenen Partikelvolumens wurde das Volumen der Partikellösung zu einem Volumen der 1%igen Lösung der PEG-Verbindung gegeben, wodurch eine PEG-Endkonzentration von 0,1% erhalten wurde.

Beispiel 13 – Herstellung von silberbeschichteten 30-nm-Partikeln aus Goldpartikeln mit 5 nm Durchmesser

[0426] 10 ml steriles Wasser wurden in einem 30-ml-Becherglas zum Kochen gebracht. Dann wurden 2 mg Gelatine langsam zugegeben; die Lösung wurde unter Rühren weitergekocht, bis die gesamte Gelatine gelöst war. Die Lösung wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden 2 ml eines 47%igen Zitratpuffers, pH 5, zugegeben. Es wurden 0,18 ml einer Lösung, enthaltend 5-nm-Goldpartikel (mit einer Konzentration von etwa 0,005% Gold, $3,8 \times 10^{13}$ Goldpartikel/ml), zugegeben; anschließend wurden 3 ml einer 5,7%igen Hydroquinonlösung zugegeben. Die Mischung wurde gut gemischt; anschließend wurde steriles Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 ml zugegeben. Es wurden 50 µl einer 4%igen Silberlaktatlösung in 10-µl-Portionen zugegeben; die Mischung wurde schnell manuell gerührt. Die Silberendkonzentration betrug etwa 0,005%; die Endkonzentration an silberbeschichteten Partikeln betrug etwa $3,4 \times 10^{11}$ Partikel/ml. Unter der Annahme, dass das gesamte zugegebene Silber sich gleichmäßig auf jedem Goldpartikel abgeschieden hat, wurde die Partikelgröße mit 30 nm berechnet. Nach der letzten Zugabe erschien das Sol bei Raumlicht hellgelb. In Bulklösung

war das Licht, das von einem verdünnten Volumen des Sols in einer 6×50 mm Glasröhre gestreut wurde, blau, wenn mit einem schmalen Strahl weißen Lichts bestrahlt wurde. Bei einer mikroskopischen Untersuchung einer Verdünnung des Silbersols mit dem SpectraMetrix-Mikroskop unter DLASLPD-Bedingungen mit einem $10\times$ -Objektiv und einem $12,5\times$ -Okular konnte eine Mischung heller Partikel verschiedener Farben leicht beobachtet werden. Die überwiegende Anzahl der Partikel bestand aus purpur-blauen Partikeln. Ebenso lagen gelbe, grüne und rote Partikel vor. Durch Einstellen der Konzentration der Goldpartikel mit 5 nm Durchmesser, die in dem hierin beschriebenen Verfahren verwendet wurden, wurden silberbeschichtete Partikel mit Durchmessern im Bereich von 20 bis 100 nm hergestellt.

Beispiel 14 – Streulichteigenschaften nicht-sphärischer Silberpartikel, die auf einem Glasobjekträger gebildet und untersucht wurden

[0427] Ein kleiner Tropfen eines verdünnten Silberpartikelsols, das wie in Beispiel 13 beschrieben hergestellt worden war, wurde auf einem Objekträger platziert und mit einem Deckglas bedeckt, wodurch ein sehr dünner Solfilm zwischen dem Deckglas und dem Objekträger ausgebildet wurde. Wenn ein Punkt (Spot) des dünnen Silbersolfilms durch einen sehr engen Lichtstrahl bestrahlt wurde und mit nacktem Auge in einem Winkel beobachtet wurde, welcher den Eintritt des einfallenden Lichts in das Auge verhinderte, erschien der beleuchtete Spot in blauem Streulicht. Der Silbersolfilm wurde dann mikroskopisch mit einem Lichtmikroskop unter DLASLPD-Bedingungen mit einem $10\times$ -Objektiv und einem $12,5\times$ -Okular untersucht. Es wurde beobachtet, dass innerhalb einiger Minuten die meisten Partikel an der Oberfläche des Objekträgers und des Deckglases anhafteten und daran immobilisiert wurden. Am häufigsten traten blau gefärbte Partikel auf. Es wurde beobachtet, dass bei Drücken eines Punkts des Deckglases mit der Spitze einer feinen Nadelsonde die Partikel in dem zusammengedrückten Bereich permanent ihre Farbe von ihrem ursprünglichen Blau änderten (Streulichtdetektion). Im Zentrum des eingedrückten Bereichs waren die Partikel rot. Dieser zentrale Punkt war von konzentrischen Kreisen verschiedener Farben umgeben. Vom Zentrum nach außen änderten sich die Farben von Rot zu Grün zu Gelb und zu Blau. Die roten, grünen und gelben Partikel waren sehr hell. Theoretische Berechnungen zeigten, dass kleine Silberpartikel eine blaue Farbe aufweisen. Die Wirkung des Zusammendrückens scheint auf eine Änderung der Form der Partikel zurückzuführen zu sein. Die Ergebnisse zeigen somit, dass kleine Silberpartikel mit ursprünglicher blauer Streulichtfarbe in Partikel mit anderen Streulichtfarben überführt werden können, indem ihre Form geändert wird. Bei Bewegen des Deckglases stellte sich heraus, dass die verschiedenfarbigen Partikel in dem eingedrückten Bereich in der Flüssigphase dispergiert werden konnten. In dieser Phase unterliegen die Partikel Brownscher Molekularbewegung, und das von grünen und roten Partikeln gestreute Licht flackerte, was bei nicht sphärischen Partikeln erwartet wird.

Beispiel 15 – Herstellung von Goldpartikeln mit größerem Durchmesser aus Partikeln mit 16 nm Durchmesser

[0428] Eine 2,4%ige Hydroxylamin-Hydrochlorid-Lösung wurde durch Zugabe von 24 mg Hydroxylamin-Hydrochlorid zu 1 ml sterilem Wasser, Mischen und anschließendes Filtrieren durch einen 4-µm-Polycarbonat-Membranfilter, befestigt an einer 10-ml-Spritze, hergestellt. Eine 4%ige $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Lösung wurde durch Zugabe von 2,5 ml steriles Wasser zu 0,1 g $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in einem Reagenzglas, Mischen und anschließendes Zentrifugieren zur Entfernung von Feststoffen hergestellt. 25 ml steriles Wasser wurden in einen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben gegeben; anschließend wurde das in Tabelle 1 angegebene Volumen an 16-nm-Goldpartikeln, in Abhängigkeit von der gewünschten Partikelgröße, zugegeben. Als Nächstes wurde das in Tabelle 1 angegebene Volumen der 4%igen $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -Lösung zugegeben. Schließlich wurde steriles Wasser zugegeben, um das Ganze auf ein Gesamtvolumen von 100 ml zu bringen. Dann wurde das in Tabelle 1 spezifizierte Volumen der Hydroxylamin-Hydrochlorid-Lösung unter schnellem manuellem Rühren zugegeben und es der Mischung ermöglicht, sich 30 Minuten lang zu setzen. Innerhalb von Sekunden nach der Zugabe der Hydroxylamin-Hydrochlorid-Lösung änderte die Lösung ihre Farbe von einer klaren, leicht rosa Farbe zu einer klaren roten oder trüben braunen Lösung, in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Die kleineren Größen ergaben rot gefärbte Lösungen.

Tabelle 1

Gewünschter Goldpartikeldurchmesser, nm	16-nm-Goldsol, ml	HAuCl ₄ · 3H ₂ O-Lösung, ml	Hydroxylamin-Lösung, ml
40	6,4	0,234	1,25
60	1,9	0,245	1,25
80	0,8	0,248	1,25
100	0,41	0,249	1,25

[0429] Partikel mit größerem Durchmesser wurden auf die gleiche Weise wie oben beschrieben hergestellt, mit dem Unterschied, dass die in Tabelle 2 spezifizierten Volumen der Lösungen und eine Lösung von Goldpartikeln mit 100 nm Durchmesser anstelle der 16-nm-Goldlösung verwendet wurde.

Tabelle 2

Gewünschter Goldpartikeldurchmesser, nm	16-nm-Goldsol, ml	4%ige HAuCl ₄ · 3H ₂ O-Lösung, ml	Hydroxylamin-Lösung, ml
200	12,5	0,219	1,25
400	1,56	0,246	1,25
600	0,436	0,249	1,25
800	0,195	0,25	1,25
1000	0,1	0,25	1,25
2000	0,012	0,25	1,25

Beispiel 16 – Herstellung eines silberbeschichteten Partikels aus 16-nm-Goldpartikeln

[0430] 25 ml steriles Wasser wurden in einen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben gegeben; anschließend wurden 6,4 ml eines 0,005%igen Sols aus 16-nm-Goldpartikeln zugegeben; die resultierende Lösung wurde gemischt. Dann wurden 0,234 ml einer 40 mg/ml L(+)-Milchsäure-Silbersalzlösung zugegeben. Unmittelbar danach wurde eine tief purpurrote Farbe beobachtet. Dann wurde genug steriles Wasser zugegeben, um das Gesamtvolumen auf 100 ml zu bringen. Unter schnellem manuellem Rühren wurden 1,2 ml einer 24 mg/ml Lösung von Hydroxylamin-Hydrochlorid zugegeben; das resultierende Sol erschien in einer lavendel-silbernen Farbe. Ein kleiner Tropfen des Sols wurde auf einem Objektträger platziert, mit einem Deckglas bedeckt und mit einem Lichtmikroskop unter DLASLPD-Bedingungen untersucht. Es waren rote, grüne, purpurfarbene und gelbe Partikel sichtbar. Die Farbe des Streulichts einer verdünnten Lösung dieser Partikel in einem Teströhrchen unter Weißlichtbestrahlung war eisblau.

Beispiel 17 – Herstellung BSA-beschichteter Objektträger

[0431] Es wurde ein Modellsystem erstellt, um die Signal- und Detektionsparameter für verschiedene Kombinationen von Partikeln und Beleuchtungs- und Detektionsverfahren zum Nachweis von Partikeln auf einer Festphase, wie beispielsweise in einem Festphasen-Assay, zu untersuchen.

[0432] Dieses System beinhaltet zunächst das Beschichten von Objektträgern mit Rinderserum Albumin (BSA) und das anschließende Abscheiden verschiedener Mengen an Goldpartikeln in spezifischen Bereichen, um die Parameter zu untersuchen. Im Folgenden wird das zur Beschichtung der Objektträger mit BSA verwendete Verfahren diskutiert.

[0433] Eine 10%ige Lösung von BSA in Wasser wurde durch Zugabe von 1,5 g BSA zu 15 ml sterilem ultra-

reinem Wasser, Mischen und Filtern der Lösung mit einer 0,44-mm-Polycarbonat-Membran hergestellt. Eine 0,02%ige BSA-Lösung (200 µg BSA/ml) wurde durch Zugabe von 20 µl der 10%igen BSA-Lösung zu 10 ml sterilem Wasser und Filtern der BSA-Lösung durch eine 0,4-mm-Polycarbonat-Membran hergestellt.

[0434] Gewöhnliche Objektträger wurden durch Schrubben mit einer in Methanol getauchten Bürste gereinigt. Nach dem Schrubben wurde der Objektträger durch Abspritzen des Objektträgers mit steriles Wasser unter Verwendung einer Kunststoff-Spritzflasche gereinigt. Ein Objektträger wurde mit BSA beschichtet, indem der Objektträger in ein Becherglas, enthaltend 0,02% BSA in steriles Wasser, getaucht und für 1 Stunde inkubiert wurde. Der Objektträger wurde dann aus dem Becherglas entnommen und durch Abspritzen mit steriles Wasser aus einer Spritzflasche abgespült. Es wurden beide Seiten des Objektträgers gespült. Der Objektträger wurde dann für ungefähr 10 Minuten in ein 150-ml-Becherglas, gefüllt mit steriles Wasser, getaucht. Er wurde wiederum mit Spritzwasser abgespült. Es ist höchst wichtig, freies BSA von dem Objektträger zu entfernen, da freies BSA die Bindung von Metallpartikeln an den beschichteten Objektträger verhindert. Der BSA-beschichtete Glasobjektträger wurde dann getrocknet und trocken in einer sauberen Kunststoffbox gelagert.

Beispiel 18 – Abscheidung von Goldpartikeln auf einem BSA-Objektträger

[0435] Auf den BSA-beschichteten Objektträgern wurden unter Verwendung eines Diamant-Schneidwerkzeugs kleine Kreise (etwa 8 mm Durchmesser) vorgezeichnet, um die Bereiche zu markieren, in denen Goldpartikel aufgebracht werden sollen. 3 µl einer ungeschützten Goldpartikellösung mit der gewünschten Goldpartikelkonzentration wurden auf einen der markierten Bereiche auf dem Objektträger aufgetragen. Die Goldpartikellösung wurde auf der entgegen gesetzten Seite der eigentlichen Markierung aufgetragen, um eine Interaktion der Goldpartikellösung mit den vorgezeichneten Markierungen zu verhindern.

[0436] Zur Herstellung einer Reihe von Goldpartikelflecken (Patches) auf einem Glasobjektträger, in denen die Goldpartikeldichte systematisch abnimmt, ist es wünschenswert, die Reihe der Patches auf einer Linie im Zentrum des Objektträgers anzuordnen. Um diese Anordnung zu erreichen, wurde der Objektträger auf einer selbstgefertigten Halterung befestigt, wodurch das Aufbringen der Gold-Patches in der korrekten Anordnung ermöglicht wurde. Es sei darauf hingewiesen, dass die Patches nicht bei Raumlicht sichtbar sind (die Partikeldichte ist so gering, dass die Partikel keine Farbe bei Raumlicht aufweisen). Aus diesem Grund wurden Markierungen an der Seite des Objektträgers vorgenommen, um die Position der Patches zu identifizieren. Die Markierungen wurden gleichzeitig mit dem Auftragen der Partikel vorgenommen. Zur Bildung eines Patches aus Goldpartikeln wurden 3 µl der ungeschützten Goldlösung, verdünnt auf die gewünschte Goldpartikelkonzentration, aufgetragen. Der Objektträger wurde dann für einen spezifischen Zeitraum in einer geschlossenen Kunststoffbox inkubiert. Die inneren Wände und der Boden der Box waren mit nassem Papierhandtuch ausgelegt, um die Verdampfung des Goldsols auf dem Objektträger zu verhindern. Der Objektträger wurde dann entnommen und durch Aufspritzen von steriles Wasser mit einer Pasteurpipette gespült. Es stellte sich heraus, dass für die effizienteste Bindung von Goldpartikeln an das BSA auf dem Objektträger der pH-Wert der Goldpartikellösung auf den pl-Wert von BSA eingestellt werden sollte (pl = 4,58–5,45).

Beispiel 19 – Analytischer Mikroarray-Assay – Bindung von Goldpartikeln mit 60 nm Durchmesser, beschichtet mit BSA-Biotin, an diskrete einzelne Streptavidin-Patches von 80 nm Durchmesser auf einem Kunststoff-Substrat

[0437] Es wurden die folgenden Lösungen hergestellt. Eine 1 mg/ml BSA-Biotinlösung wurde durch Zugabe von 2 mg BSA-Biotin zu 2 ml steriles Wasser und Dialysieren gegen destilliertes Wasser in einem 500-ml-Erlenmeyer-Kolben für mehrere Stunden bei Raumtemperatur hergestellt. Das Wasser wurde viermal ausgetauscht. Der letzte Wasseraustausch wurde mit steriles Wasser durchgeführt. Außerdem wurde eine 20 mM Tris-Salzlösung, 0,1% PEG-Verbindung, 0,2% Na-Azid-Puffer, pH 7,4, hergestellt. Alle Lösungen wurden durch einen 0,4-µm-Polycarbonat-Membranfilter filtriert. Die Polystyrol-Teströhren wurden unter Verwendung einer Spritzflasche sehr sorgfältig mit steriles Wasser gewaschen und mit 4 ml der Lösung von Goldpartikeln mit 60 nm Durchmesser gefüllt und in einer klinischen Zentrifuge für eine halbe Stunde zentrifugiert.

[0438] Die Partikel wurden dann wie an anderer Stelle beschrieben gewaschen. Die weichen Pellets wurden in 10 ml sterilem Wasser resuspendiert.

[0439] Der pH-Wert der Goldpartikellösung wurde folgendermaßen eingestellt: 100 µl der 1%igen Lösung der PEG-Verbindung wurden in ein sauberes Polycarbonat-Teströhren gegeben. Dazu wurde 1 ml des 60-nm-Goldsols gegeben und für 2 Minuten inkubiert. Zu dem Goldsol wurde 0,02 M K₂CO₃ in 2-µl-Schritten gegeben, bis ein pH-Wert von 6,6 erreicht war. Die Anzahl der µl des 0,02 M K₂CO₃, die erforderlich waren, um

den pH-Wert einzustellen, wurde dann berechnet und zu den verbleibenden ml des Goldsols gegeben; in diesem Fall waren es 80 µl. Dann wurden 9,5 ml des Goldsols mit pH 6,6 zu 1,15 ml einer 1 mg/ml BSA-Biotinlösung in einem Polycarbonat-Röhrchen gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für eine halbe Stunde in einer klinischen Zentrifuge zentrifugiert; der Überstand wurde dann dekantiert. Das zurückbleibende weiche Pellet wurde in 3 ml sterilem Wasser resuspendiert und dann, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert; der Überstand wurde dekantiert und dann in 0,1%iger Lösung der PEG-Verbindung resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 20 mM Tris-Salzlösung, 0,1 % Lösung der PEG-Verbindung, resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde dann dekantiert, wodurch etwa 200 µl weicher Niederschlag zurückblieben. 50 µl dieser Lösung wurden in die Kunststoff-Kavitäten, welche die Streptavidin-Spots von 80 µm Durchmesser enthielten, gegeben, und die Kavitäten über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Kavitäten wurden dann mehrere Male unter Verwendung einer Pasteurpipette zum Einbringen in und Entfernen des Wassers aus der Kavität gewaschen. Zur Detektion mit dem Mikroskop wurden die Kavitäten mit 60 µl steriles Wasser gefüllt.

Beispiel 20 – Detektion von mit BSA-Biotin beschichteten Goldpartikeln mit 60 nm Durchmesser, gebundenen an einen Mikroarray Streptavidin-beschichteter Bindungsstellen-Spots von 80 µm Durchmesser

[0440] Eine Suspension des BSA-Biotin-Au-Bindungssagens (Goldpartikel mit 60 nm Durchmesser) wurde zu den Kunststoff-Kavitäten, welche den Mikroarray aus Streptavidin-Spots mit 80 µm Durchmesser auf der Bodenoberfläche der Kavität enthielten, gegeben. Nach einer angemessenen Inkubationszeit wurden die Kavitäten gewaschen und mit dem diesseits entwickelten Lichtmikroskopssystem unter DLASLPD-Bedingungen betrachtet. Es wurden BSA-Biotin-Au-markierte Partikel, gebunden an die einzelnen 80-µm-Spots, beobachtet. Die 80-µm-Streptavidin-Spots, die vor der Zugabe der Partikel nicht sichtbar waren, erschienen als helle nahezu zirkuläre Punkte. Einzelne Spots, welche verschiedene Oberflächendichten der BSA-Biotin-Au-Partikel enthielten, wurden durch Inkubieren für verschiedene Zeiträume oder durch Verwendung verschiedener BSA-Biotin-Au-Konzentrationen erhalten. Mit dem Mikroskop konnten bei etwa 200-facher Vergrößerung mit dem Auge leicht einzelne Partikel, gebunden an die Streptavidin-Spots mit geringen Bindungsdichten, detektiert werden. Um die Zählungsmessungen und integrierten Lichtintensitäts-Messungen der einzelnen 80-µm-Spots zu automatisieren, wurde Video-Bildverarbeitungs-Software getestet, welche für 24 Stunden von einem Unternehmen in San Diego geliehen war. Es wurden Videobilder unter Verwendung einer kostengünstigen Schwarz-Weiß-Videokamera, eines Video-Framegrabbers und eines einfachen Desktop-Computers aufgefangen, welche die 25 einzelnen Spots, die sich in der Kavität der Array-Vorrichtung befanden, enthielten. Mit Hilfe der Software konnte die integrierte Lichtintensität jedes Spots sowie die Anzahl der Partikel pro einzelnen Spot bestimmt werden. Beispielsweise wurde ein Streptavidin-Spot, der mit einer geringen Dichte eines BSA-Biotin-Au-Bindungssagens gelabelt war, mit dem Video-Abbildungssystem unter Verwendung eines Partikelzählmodus analysiert. Um das Signal/Hintergrundverhältnis zu bestimmen, wurde ein Spot von 80 µm Durchmesser des Festphasenbereichs, welcher nicht mit Streptavidin beschichtet war, analysiert, um den Hintergrund zu bestimmen. In diesem vorläufigen Modellsystem betrug das Signal/Hintergrundverhältnis 317/25~13 mit einer Markierungsdichte auf dem Spot von ungefähr 0,06 Partikeln/µm² unter nicht-optimierten Beleuchtungs- und Detektionsbedingungen. Diese nicht-optimierten vorläufigen Daten weisen darauf hin, dass bei einem Signal/Hintergrundverhältnis von 3/1 Partikeldichten von 0,015 Partikeln/µm² detektierbar sind. Unter optimierteren Bedingungen könnte das untere Sensitivitätsniveau noch niedriger liegen.

Beispiel 21 – Detektionsempfindlichkeit von Goldpartikeln in Dünnsfilmen

[0441] Ein 60-nm-Goldsol wurde um den Faktor 10 verdünnt; 20 µl jeder Verdünnung wurden als Spots auf einem BSA-beschichteten Objekträger aufgetragen. Der Objekträger wurde dann ohne Deckglas auf einem Porro-Prisma mit Immersionsöl platziert. Jeder Goldsol-Spot besaß einen Durchmesser von etwa 4 mm. In der folgenden Tabelle sind die relevanten Informationen bezüglich jedes Spots angegeben.

Au-Sol M	Partikel/ml	Spot-Durchmesser (mm)	Anzahl der Partikel	Beobachtung*
3×10^{-11}	$2,3 \times 10^{10}$	12,4	$4,6 \times 10^8$	Sehr kräftiges Gelb
1×10^{-12}	$2,3 \times 10^9$	12,8	$4,6 \times 10^7$	Kräftiges Gelb-Gün
$3,8 \times 10^{-13} \text{ M}$	$2,3 \times 10^8$	11,4	$4,6 \times 10^6$	Schwaches, aber detektierbares Grün

* wie mit dem Auge wahrgenommen

[0442] In der unten folgenden Tabelle sind die obigen Daten in Einheiten ausgedrückt, die in klinischen Assay-Anwendungen größere Bedeutung haben. Die Höhe der Flüssigkeit in dem Spot kann mit folgender Formel errechnet werden

$$h = V/A$$

wobei V das Volumen der Flüssigkeit in dem Spot ist ($20 \text{ ml} = 0,02 \text{ cm}^3$) und A der Bereich (in cm^2) des Spots ist. Unter Verwendung von $A = 1,2 \text{ cm}^2$ wird $h = 0,016 \text{ cm} = 160 (\mu\text{m})$ erhalten. Diese Höhe ist sehr viel geringer als die Schärfentiefe des Auges oder der vorliegenden elektronischen und optischen Detektionsverfahren; somit verhält sich jeder Spot (in geometrischer Hinsicht), als ob alle Partikel auf der Oberfläche des Objekträgers vorliegen; die in der Tabelle angegebene Sensitivität ist somit ähnlich zu den Sensitivitäten, die für Partikel erwartet werden, die auf der Oberfläche aufgebracht sind.

Au M	Spot-Bereich, cm^2	Spot-Bereich, μm^2	Partikel pro Spot	# Partikel pro μm^2	* Intensität des Spots
$3,8 \times 10^{-11}$	1,2	$1,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	3,83	Sehr kräftiges Gelb
$3,8 \times 10^{-12}$	1,3	$1,3 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$	0,35	Kräftiges Gelb-Gün
$3,8 \times 10^{-11}$	1,2	$1,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^6$	0,038	Schwaches, aber detektierbares Grün

* Wie durch das Auge wahrgenommen

Die Werte dieser Spalte wurden durch Teilen der Anzahl der Partikel pro Spot durch den Bereich des Spots berechnet.

Beispiel 22 – 60-nm-Goldpartikel, aufgebracht auf die Oberfläche eines BSA-beschichteten Glasobjekträgers

[0443] Es wurden eine Reihe von Verdünnungen einer 60-nm-Goldpartikellösung hergestellt; $3 \mu\text{l}$ jeder Verdünnung wurden als kleiner Spot auf einen BSA-beschichteten Objekträger aufgebracht. Die Spots waren auf dem Objekträger in einer Reihe angeordnet. Der Objekträger wurde in einer Feuchtkammer für 6,5 Stunden inkubiert und dann mit sterilem Wasser gespült. Die Partikeldichte auf jedem Spot wurde durch Partikelzählung unter DLASLPD-Bedingungen in einem Lichtmikroskop, welches ein Okular mit einer markierten Strichplatte aufwies, bestimmt. In der folgenden Tabelle sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

Bereich Nummer	Konzentration* der Ablagerung Partikel/ml	Gesamtzahl der abgelagerten Partikel	# Partikel pro 100 µm ²
1	$2,3 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^8$	460
2	$2,1 \times 10^9$	$2,1 \times 10^7$	41,8
3	7×10^8	7×10^6	13,9
4	$3,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$	7
5	$1,75 \times 10^8$	$1,75 \times 10^6$	3,48
6	$8,75 \times 10^7$	$8,75 \times 10^5$	1,74

* Die Konzentration der Ablagerung ist die Konzentration an nicht-geschützter Goldsol-Lösung, die oben auf einen Spot aufgebracht wurde.

Partikel pro µm² – Dieser Wert gibt die Anzahl der Partikel pro 100 µm² an, wenn alle Partikel in der Lösung, die auf einen spezifischen Bereich aufgebracht wurde, an den Objekträger gebunden wurden. Der durch die Lösung bedeckte Bereich besitzt einen Durchmesser von etwa 8 mm. Der Bereich ist $A = 3,1416 \cdot (4)^2 \text{ cm}^2 = 0,5 \text{ cm}^2 = 0,5 \times 10^8 \mu\text{m}^2$.

[0444] Nach 6,5 Stunden wurde der Objekträger durch vorsichtiges Aufspritzen von sterilem Wasser auf jeden Gold-enthaltenden Bereich auf dem Objekträger gewaschen. Der Objekträger wurde mit einem Fön bei kalter Einstellung getrocknet. Der getrocknete Objekträger wurde unter DLASLPD-Bedingungen mit einem Lichtmikroskop betrachtet und die Partikeldichte in jedem Bereich unter Verwendung der kalibrierten Strichplatte in dem Mikroskop-Okular, wobei Partikel/Strichplatten-Quadrate gezählt wurden, bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Probe	Auge*	Abgelagerte Partikel/100 µm ²	Unter Verwendung der Strichplatte gezählte Partikel (Bereich, µm ²) [#]	Gezählte Partikel pro 100 µm ²
1	Sehr kräftiges Gelb-Grün	460	20** (39)	51,2
2	Kräftiges Gelb-Grün	41,8	7 (39)	18
3	Recht kräftiges Gelb-Grün	13,9	13 (100)	13
4	Keine wahrgenommene Intensität	7	0	0
5	Keine wahrgenommene Intensität	3,48	0	0
6	Keine wahrgenommene Intensität	1,74	0	0

* Auge – Hierbei handelt es sich um die durch den Mikroskop-Illuminator unter DLASLPD-Bedingungen hervorgerufene Lichtintensität, die mit dem Auge von dem Gold auf dem spezifischen Bereich des Objekträgers beobachtet wird.

** Die Partikel in diesem Bereich waren zu viele, um gezählt werden zu können; die angegebene Zahl kann einen Fehler mit einem Faktor von 2 aufweisen.

Der in Klammern angegebene Bereich ist der Bereich eines Strichplatten-Quadrats für das Objektiv und die Optovar-Einstellung, die zur Zählung der Partikel verwendet wurde.

Probe	Partikel pro μm^2	Auge*
1	0,512	Sehr kräftiges Gelb-Grün
2	0,18	Kräftiges Gelb-Grün
3	0,13	Mäßig kräftiges Gelb-Grün
4	0	Keine detektierte Intensität
5	0	Keine detektierte Intensität
6	0	Keine detektierte Intensität

Beispiel 23 – Sensitivität der visuellen Detektion der Intensität von einem kleinen Flüssig-Spot aus 60-nm-Goldpartikeln

[0445] Es wurden zwei Verdünnungen von $3,4 \times 10^{-12}$ M (0,005% Gold) 60-nm-Goldsolen hergestellt; 2 ml jeder Verdünnung wurden in einem separaten Spot auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Jeder Spot besaß einen Durchmesser von ungefähr 4 mm (Bereich = $6,28 \times 10^6 \text{ m}^2$). Die verschiedenen Spots befanden sich in einer Reihe in der Mitte des gleichen Objektträgers. Die Partikelkonzentrationen und Dichten in jedem Spot sind in folgender Tabelle wiedergegeben.

Goldsol M	Partikel/ml	Partikel/ μl	Partikel/ μm^2
$3,4 \times 10^{-12}$ M	$2,1 \times 10^9$	$2,1 \times 10^6$	0,31
$1,05 \times 10^{-12}$ M	$1,05 \times 10^9$	$1,05 \times 10^6$	0,155
$0,5 \times 10^{-12}$ M	$0,5 \times 10^9$	$0,5 \times 10^6$	0,077
$0,25 \times 10^{-12}$ M	$0,25 \times 10^9$	$0,25 \times 10^6$	0,0385

[0446] Um die niedrigste Partikeldichte anhand der Streulichtintensität zu bestimmen, die ohne Hilfe mit bloßem Auge detektiert werden kann, wurde der Objektträger mit Hilfe von Immersionsöl auf einem Porro-Prisma platziert. Jeder Spot, der immer noch in flüssiger Form vorlag, wurde sequenziell mit Licht von dem Bausch-und-Lomb-Illuminator mit einem 10×-Objektiv am Ende der Faser bestrahlt. Der durch den Illuminator erzeugte Spot besaß einen Durchmesser von etwa 4 mm. Im Dunkelraum und bei Nacht konnte hinunter bis zu 0,0385 (Partikel/ μm^2) beobachtet werden, wobei dies gerade noch wahrgenommen werden konnte.

Beispiel 24 – Sensitivität der Photodioden-Detektion von 60-nm-Goldpartikeln (in Suspension) bei verschiedenen Konzentrationen in Immulon-Kunststoff-Mikrotiter-Kavitäten

[0447] Es wurden verschiedene Verdünnungen eines 60-nm-Goldsols in verschiedenen Immulon-Kavitäten platziert (200 μl in jeder Kavität). Zur Messung der Streulichtintensität wurde der Boden einer Kavität mit Weißlicht von einem Leica-Mikroskop-Illuminator, der mit einem 10×-Objektiv ausgestattet war, bestrahlt. Der Boden der Kavität befand sich einige mm vom Objektiv entfernt. Das Licht von dem Objektiv erzeugte einen Strahl, der auf das Zentrum der Kavität fokussiert wurde. Der Strahldurchmesser am Brennpunkt betrug etwa 5 mm. Das Streulicht wurde durch eine Photodiode detektiert, die derart positioniert war, dass sie Licht durch die Seitenwand der Kavität detektierte (Detektion im rechten Winkel). Das Streulicht wurde durch eine kleine Öffnung (Durchmesser etwa 1 mm), die vor der Photodiode positioniert war, um die Hintergrundlicht-Detektion zu begrenzen, detektiert. Die Kavitäten, welche die verschiedenen Goldsol-Verdünnungen enthielten, waren miteinander verbunden; jede Kavität konnte sequenziell innerhalb der Beleuchtungs- und Detektionswege positioniert werden. Der Output der Photodiode wurde mit einem Operationsverstärker, welcher mit Strom betrieben wurde, gemessen. Der Rückkopplungswiderstand des Operationsverstärkers bestimmte die Sensitivität des Verstärkers. Die Photodiode wurde im Photovoltaik-Modus betrieben. Es wurden zwei Reihen von 60-nm-Gold-Verdünnungen hergestellt und die Intensitäten mit der Photodiode gemessen.

a. Erste Verdünnungsreihe

[0448] Die Ausgangslösung ($3,8 \times 10^{-11}$ M) wurde um Faktoren von zwei verdünnt. Es wurden die folgenden

Ablesungen erhalten. Die Ablesungen wurden mit einem 5-Megaohm-Widerstand in der Rückkopplungsschleife des Operationsverstärkers vorgenommen.

Goldpartikel-Konzentration	Intensität (Volt)
$1,9 \times 10^{-11} \text{ M}$	3,27
$0,95 \times 10^{-11} \text{ M}$	1,6
$4,75 \times 10^{-12} \text{ M}$	0,89
$2,38 \times 10^{-12} \text{ M}$	0,44
$1,2 \times 10^{-12} \text{ M}$	0,24
0	0,075

b. Zweite Verdünnungsreihe

[0449] Eine 11-fach verdünnte Lösung ($3,4 \times 10^{-12} \text{ M}$) wurde um Faktoren von 2 verdünnt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten.

Goldpartikel-Konzentration	Intensität (Volt)
$3,4 \times 10^{-12} \text{ M}$	0,614
$1,7 \times 10^{-12} \text{ M}$	0,378
$8,5 \times 10^{-13} \text{ M}$	0,198
$4,25 \times 10^{-13} \text{ M}$	0,147
$2,13 \times 10^{-13} \text{ M}$	0,100
$1,06 \times 10^{-13} \text{ M}$	0,086
0	0,075

[0450] Die obigen Ergebnisse zeigen, dass in den Kavitäten Goldpartikel mit einem Durchmesser von 60 nm im Bereich von $1,9 \times 10^{-11} \text{ M}$ bis $1 \times 10^{-13} \text{ M}$ nachgewiesen werden können. Der obere Bereich kann noch weiter ausgedehnt werden.

Beispiel 25 – Reproduzierbarkeit der Ablagerung und visuellen Detektion (integrierte Streulichtintensität) von 60-nm-Goldpartikeln, aufgebracht auf einen BSA-beschichteten Glasobjekträger

[0451] 3 µl einer 2-fachen Verdünnung einer 0,05%igen Goldlösung (60 nm) wurden auf jeden von 5 Punkten auf einem BSA-beschichteten Objekträger aufgebracht. Der Objekträger wurde 5 Minuten inkubiert und dann in ein Becherglas gegeben, welches 150 ml destilliertes Wasser enthielt. Durch das Wasser wurde das nicht-gebundene Gold vom Objekträger abgewaschen. Die Spots wurden dann mit dem Illuminator des Anmelders (Weißlicht-SpectraMetrix-Illuminator) bestrahlt. Die Goldpartikel in jedem Spot lagen in Form eines Rings vor (das heißt, die Partikel waren nicht homogen in dem Spot verteilt, sondern auf einen Ring beschränkt), welcher grünes Licht streute und in einem Dunkelraum mit bloßem Auge klar erkennbar war.

[0452] Das Experiment wurde mit einem neu mit BSA beschichteten Objekträger wiederholt, mit dem Unterschied, dass während der Inkubation der Goldpunkte mit dem Finger vorsichtig gegen die Seite des Objekträgers geklopft wurde, so dass die Flüssigkeit in den Goldpartikel-Spots bewegt wurde. Nach 5 Minuten wurde der Objekträger in 150 ml steriles Wasser in einem Becherglas gegeben und das Licht, welches von jedem Spot gestreut wurde, alternativ unter Verwendung des Weißlicht-SpectraMetrix-Illuminators betrachtet. Der Illuminator erzeugte einen Lichtpunkt von ungefähr 5 mm Durchmesser auf dem Objekträger. Die Goldpunkte waren durch das Streulicht, in den Bereichen, in denen das Goldsol abgelagert war, deutlich sichtbar. Die Spots wurden beobachtet, während der Objekträger in Wasser getaucht war, wodurch die Streuung durch Defekte auf dem Objekträger reduziert wurde. Alle Spots streuten grünes Licht und wiesen etwa die gleiche Intensität auf, die bei visueller Detektion bestimmt wurde. In der Mitte jedes Spots erschien ein kleiner nicht-lichtstreuender Spot (dunkler Punkt).

Beispiel 26 – Farbe des von 60-nm-Goldsolen mit verschiedenen Goldpartikelkonzentrationen gestreuten Lichts

[0453] Sechs 8 × 50 mm (1,6 ml) Polystyrol-Röhrchen wurden durch Spülen mit sterilem Wasser aus einer Spritzflasche gewaschen. Das überschüssige Wasser wurde aus jedem Röhrchen durch Schütteln entfernt, die Röhrchen wurden jedoch nicht getrocknet. Eine Goldpartikellösung (60 nm, 0,005%) wurde dann seriell um Faktoren von 1, 2, 4, 8, 16 und 32 verdünnt. Jedes Röhrchen enthielt 500 µl der Goldpartikellösung. Das verdünnte Goldsol lag stabil (das Streulicht veränderte in Ruhe nicht seine Farbe) in den Polystyrol-Röhrchen vor. Es wurde keine Aggregation beobachtet. Das Licht, das von den verschiedenen Verdünnungen gestreut wur-

de, besaß folgende Farben. Das bei diesen Beobachtungen verwendete Goldsol war mehrere Male mit steriles Wasser gewaschen worden, um Salze zu entfernen (die zur Bildung des Goldsols verwendet wurden), welche die Goldpartikel zu destabilisieren schienen.

Verdünnung	Farbe
1	gelb-grün
2	gelb-grün
4	hellgrün
8	hellgrün
16	hellgrün
32	hellgrün

Beispiel 27 – Stabilisierung von Goldpartikeln mit BSA

[0454] Es stellte sich heraus, dass 900 mg BSA pro ml des 0,005%igen 60-nm-Goldsols erforderlich waren, um das Goldsol gegen Agglutination durch 1% NaCl zu stabilisieren.

Beispiel 28 – Aufbringen von 60-nm-Goldpartikeln mit hohen Partikeldichten auf BSA-beschichtete Glasobjektträger

[0455] Dieses Beispiel zeigt, wie Goldpartikel mit verschiedenen Oberflächendichten (25 bis 100 Partikel/ μm^2) auf einen Objekträger aufgebracht werden können. Diese Spots werden in den Beispielen 30 und 31 verwendet, um die Intensität, die Farbe und die Homogenität des Lichts zu bestimmen, das von diesen Spots (unter Weißlicht-Bestrahlung) gestreut wird, wie es mit bloßem Auge und in einem Lichtmikroskop unter Verwendung der DLASLPD-Verfahren beobachtet wird.

[0456] 4 ml des 60-nm-Goldsols (0,005%, 3×10^{10} Partikel pro ml) wurden in einer klinischen Zentrifuge mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, bis alle Goldpartikel auf den Boden des Röhrchens sedimentiert waren (etwa 30 Minuten). Der Überstand wurde entfernt und das weiche Pellet um Faktoren von 1, 2 und 4 verdünnt. Schätzungsweise besaß das weiche Pellet eine Partikelkonzentration von etwa 3×10^{11} Partikeln pro ml. 4 ml jeder Verdünnung wurden auf einzelne Spots auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger aufgebracht; die Flüssigkeit in jedem Spot wurde bei Raumtemperatur verdampft. Die Anzahl der in jedem Spot abgelagerten Partikel (unter Annahme, dass das 1×-Goldsol eine Konzentration von 3×10^{11} Partikeln pro ml aufwies) ist in folgender Tabelle wiedergegeben. Es sei darauf hingewiesen, dass die maximale Partikeldichte, die mit 60-nm-Partikeln erreicht werden kann (gesättigte Monolage von Partikeln) 354 Partikel/ μm^2 entspricht.

Verdünnung	Abgelagerte Partikel [#]	Partikel/ μm^2 *
1	$1,2 \times 10^9$	100
2	6×10^8	50
4	3×10^8	25

* Die Partikeldichte in Partikeln/ μm^2 wird für einen Spot mit einem Durchmesser von 4 mm ($4 \times 10^3 \mu\text{m}$) und einen Bereich von $12,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ berechnet.

Berechnet für eine Ablagerung von 4 μl von 3×10^{11} Partikeln pro ml 60-nm-Goldsol.

[0457] Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde jeder Spot bezüglich seines Erscheinungsbildes bei Raumlicht und unter DLASLPD-Beleuchtung (Beobachtung mit bloßem Auge) untersucht. Die DLASLPD-Beleuchtung wurde mit einem Leica-Mikroskop-Illuminator durchgeführt, welcher eine Fokussierungslinse mit 10×-Objektiv aufwies und einen engen Lichtstrahl erzeugte, welcher auf einen kleinen Punkt mit einem Abstand von etwa 10 mm von dem Objektiv entfernt fokussierte. Die Spots wurden ebenso durch Lichtmikroskopie unter Anwendung der DLASLPD-Verfahren mit 2,5×-, 10×-, 25×- und 40×-Objektiven plus zusätzlicher 1,25-facher, 1,6-facher und 2-facher Vergrößerung untersucht. Mit den 10×- und 20×-Objektiven konnte nur ein kleiner Bereich des Spots beobachtet werden. Jedoch konnte der gesamte Spot mit dem 2,5×-Objektiv be-

trachtet werden. Zur Bestimmung der Partikeoberflächendichte auf jedem Spot wurden die durch das Mikroskop auf einem bestimmten Bereich vorliegenden Partikel gezählt und diese Zahl durch den Bereich geteilt. Der Bereich wurde mit einer in dem Okular des Mikroskops positionierten Strichplatte bestimmt, welche mit einem Mikrometerschieber kalibriert worden war. Wenn beispielsweise die Partikelzählung mit einem 40×-Objektiv und einer zusätzlichen 1,25-fachen und 2-fachen Vergrößerung (vor der Okular) durchgeführt wurde, besaß das Einheitsquadrat in der Okular-Strichplatte, welche zur Partikelzählung verwendet wurde, $6,25 \mu\text{m} \times 6,25 \mu\text{m}$ (Fläche des Quadrat = $39,1 \mu\text{m}^2$) bzw. $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (Fläche = $100 \mu\text{m}^2$). Dies sind die Flächen in der Objektebene.

Beispiel 29 – Beobachtungen hoher Oberflächendichte der Goldpartikel-Spots in Luft

[0458] In diesem Beispiel wurden die Goldpartikel-Spots, die wie in Beispiel 29 beschrieben hergestellt wurden waren, visuell und mikroskopisch unter Verwendung von DLASLPD-Beleuchtung untersucht. Die Spots waren trocken, und die Goldpartikel lagen somit in Luft vor.

a. Spot mit 1×-Verdünnung

[0459] Bei Raumlicht erschien der Spot dunkel purpurfarben, wobei ein hellerer Punkt von weniger als 1 mm Durchmesser im Zentrum des Spots vorlag. Unter DLASLPD-Beleuchtung wies der Spot ein eher gleichmäßiges weiß-oranges Erscheinungsbild auf. Der Spot war sehr intensiv. Unter DLASLPD-Bedingungen im Mikroskop (10×-Objektiv, zusätzliche 2-fache Vergrößerung, 12,5 Okular) wies der Spot, betrachtet durch das Okular, eine sehr intensive orange Farbe auf. Individuelle Partikel konnten leicht erkannt werden. Es wurden einige sehr nahe aneinander liegende oder sogar überlappende Partikel beobachtet. Die Mehrheit der Partikel war orange, einige waren jedoch grün. Zwei oder mehr Partikel, die weniger als etwa die räumliche Auflösung des Mikroskops voneinander getrennt waren, erschienen als ein einziges Partikel. Wenn der Raum zwischen den Partikeln eng genug war, dass ihre Lichtstreuereigenschaften gestört wurden, erschien die Partikelgruppe als einziges Partikel mit einer Farbe, die sich von der Einzelpartikel unterschied. Auf Grund theoretischer Berechnungen wird bei hohen Partikeldichten erwartet, dass viele Partikel durch Abstände voneinander getrennt sind, die kleiner sind als die Auflösung des Mikroskops. Das Erscheinungsbild des Spots änderte sich nicht sehr, wenn er mit einem 10×- oder 20×-Objektiv beobachtet wurde. Der Bereich auf dem Objekträger, welcher außerhalb des Spots lag (Hintergrund), war sehr dunkel im Vergleich zu dem intensiven Spot. Mit dem 2,5×-Objektiv konnte der gesamte Spot beobachtet werden. Er besaß eine intensive orange Farbe mit einem kleinen grünen Ring an der Peripherie. Die Farbe schien ziemlich gleichmäßig im Orange-Bereich zu liegen, obwohl einige Patches heller zu sein schienen als andere. Die Oberflächendichte der Partikel in dem grünen Ring war viel geringer als die in dem orangefarbenen Bereich.

b. Spot mit 2×-Verdünnung

[0460] Bei Raumlicht wies der Spot einen äußeren Ring mit mittlerer Purpurfarbe und einen dunklen purpurfarbenen Punkt von ungefähr 2 mm im Zentrum auf. Unter DLASLPD-Beleuchtung besaß der Spot ein eher gleichmäßiges weißlich-gelbes Erscheinungsbild. Der Spot war sehr intensiv. Unter DLASLPD-Bedingungen im Lichtmikroskop (10×- und 20×-Objektive, zusätzliche 2-fache Vergrößerung, 12,5 Okular) wies der durch das Okular betrachtete Spot eine stark intensive orange Farbe auf, die Farbe war jedoch nicht so gleichmäßig wie bei der 1×-Verdünnung. Es konnten sehr eng benachbarte Partikel erkannt werden. Die Mehrzahl der Partikel war orangefarben. Es lagen jedoch einige grüne vor, die in hoher Anzahl in den grünen Patches auftraten. Das Erscheinungsbild des Spots änderte sich nicht sehr, wenn er mit einem 10×- oder 20×-Objektiv beobachtet wurde. Der Bereich außerhalb des Spots war sehr dunkel im Vergleich zu dem intensiven Spot. Mit dem 2,5×-Objektiv konnte der gesamte Spot beobachtet werden. Er wies eine intensive orange Farbe auf mit einem schmalen grünen Ring an der Peripherie. Die Farbe schien ziemlich gleichmäßig im Orange-Bereich zu sein, obwohl einige Patches heller zu sein schienen als andere. Diese Ungleichmäßigkeit ist teilweise auf Inhomogenitäten in dem Beleuchtungssystem, welches nicht optimiert wurde, zurückzuführen.

c. Spot mit 4×-Verdünnung

[0461] Bei Raumlicht besaß der Spot eine sehr helle purpurne Farbe mit einem kleinen dunklen Punkt (ungefähr 1 mm Durchmesser), der auf eine Seite des Kreises verlagert war. Unter DLASLPD-Beleuchtung besaß der Spot ein eher gleichmäßiges weißlich-grünes Erscheinungsbild. Der Spot war sehr intensiv. Unter DLASLPD-Bedingungen im Lichtmikroskop (10×-Objektiv, zusätzliche 2-fache Vergrößerung, 2,5×-Okular) erschien der Spot in hohem Maße ungleichmäßig, wahrscheinlich auf Grund der ungleichmäßigen Verdampfung des Lösungsmittels. Das Zentrum des Spots war intensiv orangefarben oder lavendelfarben. Die Partikel lagen sehr

eng beieinander oder überlappten sich sogar in diesem zentralen Bereich, wobei die meisten Partikel eine orange Farbe und einige eine grüne Farbe aufwiesen. Vom Zentrum entfernt besaß der Spot ein grünliches Erscheinungsbild, wobei grüne Partikel dominierten und einige orangefarbene Partikel vorlagen. Vom Zentrum des Spots zur Peripherie traten alternierende Ringe grüner und gelber Farbe auf. Der Bereich außerhalb des Spots (Hintergrund) war sehr dunkel im Vergleich zu dem intensiven Spot. Der gesamte Spot konnte mit einem 2,5x-Objektiv betrachtet werden. Der Spot besaß ein ovales Erscheinungsbild mit einem orangefarbenen oder lavendelfarbenen Punkt (etwa 1,5 mm Durchmesser) in Richtung Zentrum. Dieser wurde von intensiven Kreisen alternierender gelb-grüner und grüner Bereiche umgeben. Ein kleiner Ring an der Peripherie besaß eine weniger intensive (aber noch intensive) deutliche grüne Farbe. In diesem Randbereich waren nahezu alle Partikel grüne Partikel und konnten mit einem 40x-Objektiv und einer 2-fachen Vergrößerung gezählt werden. Die Oberflächendichte der Partikel im Bereich der grünen Partikel betrug ungefähr 20 Partikel/39,1 μm^2 oder 0,5 Partikel pro μm^2 . An der äußersten Peripherie nahm die Partikelzahl rapide ab, und es wurden ungefähr 7 Partikel pro 100 μm^2 bzw. 0,07 Partikel/ μm^2 gezählt. Der Partikelgradient auf diesem Spot ermöglichte die Zählung der Partikel bis zu einer Zählbarkeitsgrenze von etwa 1 Partikel/ μm^2 .

Schlussfolgerungen für immobilisierte Partikel in Luft

- a. Das oben beschriebene Verfahren ermöglicht das Aufbringen von Goldpartikeln mit hohen Oberflächendichten auf kleine (4 mm große) Spots. Die Ablagerungen sind nicht vollständig gleichmäßig, wenn sie bei Raumlicht betrachtet werden, wie es bei dem Verdampfungsverfahren, welches zur Bildung der Spots verwendet wurde, zu erwarten war.
- b. Unter DLASLPD-Bedingungen im Lichtmikroskop waren die Spots mit 1x- und 2x-Verdünnung ziemlich gleichmäßig. Bei der 4x-Verdünnung wies der Spot eine höhere Ungleichmäßigkeit auf.
- c. Die Partikeldichte des Spots schien zu hoch, um aussagekräftige Partikelzählung durchzuführen (die Partikel waren zu nahe beieinander, um als einzelne Partikel aufgelöst zu werden). Jedoch konnten an der Peripherie des Spots mit 4x-Verdünnung die Partikel gezählt werden; die Dichte betrug hier ungefähr 0,5 Partikel/ μm^2 . Diese Partikeldichte ist nahe an der maximalen Partikeldichte, die mit der Auflösung des vorliegenden Mikroskops gezählt werden kann.

Beispiel 30 – Betrachtungen von Goldpartikel-Spots mit hoher Oberflächendichte in Wasser

[0462] Der in Beispiel 30 verwendete Objekträger wurde in 150 ml steriles Wasser in einem Becherglas getaucht. Die Partikel schienen sich nicht vom Objekträger abzulösen. Unter Verwendung des Mikroskop-Illuminators mit 10x-Objektiv konnten die Goldspots in dem eingetauchten Objekträger jeweils separat mit einem engen Lichtstrahl bestrahlt werden. Die Farbe der Spots (Beobachtung mit bloßem Auge) schien sich beim Übergang von Luft zu Wasser nicht zu verändern. Der Glasobjekträger wurde aus dem Becherglas mit Wasser entfernt und mit einem Deckglas bedeckt.

[0463] Ein dünner Wasserfilm umgab die Goldpartikel. Es wurden die folgenden mikroskopischen Beobachtungen gemacht.

a. Spot mit 1x-Verdünnung

[0464] Bei Betrachtung unter DLASLPD-Bedingungen mit einem Lichtmikroskop mit 2,5x-Objektiv, zusätzlicher 1,25-facher Vergrößerung und 12,5x-Okular wies der Spot eine ziemlich gleichmäßige orange-lavendelfarbene Erscheinung auf. Die Peripherie des Spots enthielt helle gelbgrüne Partikel. Die Partikel an der Peripherie konnten leicht mit 10x- bis 40x-Objektiven sichtbar gemacht werden. Die Oberflächendichte der Partikel war durchweg sehr hoch, auch an der Peripherie des Spots mit Ausnahme eines sehr dünnen Rings an der äußersten Peripherie, wo die einzelnen Partikel leicht als helle Objekte wahrgenommen werden konnten.

b. Spot mit 2x-Verdünnung

[0465] Der gesamte Spot konnte durch das 12,5x-Okular unter Verwendung des 2,5x-Objektivs und 1,5-facher zusätzlicher Vergrößerung betrachtet werden. Der Spot wies überall eine sehr intensive gelbe Farbe auf und schien ziemlich gleichmäßig zu sein. Der Großteil des Spots war gelb, in Richtung der Peripherie besaß der Spot jedoch eine gelbgrüne Farbe. Mit einem 40x-Objektiv und 1,25-facher zusätzlicher Vergrößerung konnten die Partikel mit sehr hoher Oberflächendichte wahrgenommen werden. Die meisten Partikel wiesen eine gelb-grüne Farbe auf. Einige wenige wiesen grüne oder rote Farbe auf. Der Spot wies eine sehr hohe gleichmäßige Intensität auf, mit Ausnahme der Peripherie, wo die Partikeldichte sehr schnell gegen Null ging (dunkler Hintergrund). Einzelne Partikel, zwischen denen dunkle Zwischenräume vorlagen, konnten an der Pe-

ripherie, wo die Partikeloberflächendichte gering ist, leicht wahrgenommen und gezählt werden.

c. Spot mit 4×-Verdünnung

[0466] Der gesamte Spot konnte mit dem 2,5×-Objektiv und 1,25-facher zusätzlicher Vergrößerung betrachtet werden. Der Spot wies eine sehr intensive gelbgrüne Farbe auf, und die Farbe war im Gegensatz zu den Beobachtungen in Luft, wo der Spot viele grüne Flecken aufwies, sehr gleichmäßig. Individuelle Partikel konnten leicht mit dem 40×-Objektiv und 1,25-facher zusätzlicher Vergrößerung beobachtet werden. Die Partikel in Wasser waren sehr viel intensiver oder leuchtender als in Luft. Die Partikel an der Peripherie waren nicht vorwiegend grün; in Wasser waren jedoch die meisten Partikel gelb-grün, wobei einige rote und orangefarbene Partikel auftraten. Der Großteil des Spots wies eine sehr intensive gelbe Farbe auf. Einzelne Partikel konnten mit dem 40×-Objektiv betrachtet werden; die Partikel waren jedoch sehr dicht und überlappten. In den intensivsten Bereichen des Spots lagen die mit dem 40×-Objektiv und 2-facher zusätzlicher Vergrößerung beobachteten Partikel mit einer Dichte von etwa 25 Partikel/39,1 μm^2 bzw. etwa 0,6 Partikel/ μm^2 vor. Auf Grund der eingeschränkten Auflösung durch das Mikroskop könnte diese Zahl nicht die tatsächliche Partikeloberflächendichte angeben.

Schlussfolgerungen für mit Wasser bedeckte immobilisierte Partikel

[0467] Das Platzieren der Goldspots in Wasser scheint ihnen ein gleichmäßigeres Erscheinungsbild zu verleihen. Die Spots der 2×- und 4×-Verdünnungen schienen beide jeweils eine gelbe Farbe aufzuweisen, wenn sie mit bloßem Auge unter Beleuchtung des Lichtmikroskops unter DLASLPD-Bedingungen betrachtet wurden (Objekträger sitzt auf dem Prisma und ist an das Prisma mit Immersionsöl gekoppelt). Der Spot mit 1×-Verdünnung erschien dem Auge orangefarben.

Beispiel 31 – Bindung von 60-nm-Gold-BSA-Biotin-Reagens an magnetische Beads

[0468] In diesem Beispiel wird die Möglichkeit gezeigt, die spezifische Bindung von Goldpartikeln an magnetische Beads durch Messungen der Lichtstreuintensität in Suspension zu detektieren und zu quantifizieren und einzelne, an magnetische Beads gebundene Goldpartikel durch Lichtmikroskopie unter DLASLPD-Bedingungen zu detektieren.

[0469] 60-nm-Goldpartikel wurden mit BSA, welches kovalent mit Biotin markiert worden war (BSA-Biotin-Au), beschichtet. 500 ml einer Phosphat-gepufferten Salzlösung, pH 7,4, enthaltend 0,1% BSA-Lösung, wurden in jedes von 5 Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden mit 0, 1, 2, 3 und 4 gekennzeichnet. Eine Lösung von BSA-Biotin-Au mit einer Goldpartikel-Konzentration von $3,8 \times 10^{-11}$ M wurde in jedes Röhrchen gegeben; die Röhrchen wurden geschüttelt. Es wurden zusätzliche Mengen der BSA-Biotin-Au-Lösung zugegeben, um die Konzentration der Gold-BSA-Biotin-Partikel in jedem Röhrchen auf 8×10^{-13} M zu bringen. Die folgenden Mengen (in μl) an Dyna-Beads-M280-Streptavidin (Beads mit 2,8 μm Durchmesser; an die Oberfläche der Beads ist Streptavidin kovalent gebunden) – Suspension, enthaltend $6,7 \times 10^8$ Dyna-Beads/ml (10 mg/ml) oder etwa 1×10^{-12} M molare Bead-Konzentration, gelöst in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,4, enthaltend 0,1% BSA und 0,02% NaN_3 , wurden zu jedem Röhrchen gegeben:

Röhrchen #	μl	Konz. der mag. Beads	Konz. von Biotin	Gold-BSA-Biotin-Konz.
0	0	0	0	
1	5	1×10^{-14} M	3×10^{-8} M	8×10^{-13} M
2	10	2×10^{-14} M	6×10^{-8} M	8×10^{-13} M
3	15	3×10^{-14} M	9×10^{-8} M	8×10^{-13} M
4	20	4×10^{-14} M	12×10^{-8} M	8×10^{-13} M

[0470] Die Röhrchen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann eines nach dem anderen, beginnend mit dem Röhrchen 0, in einem MPC-E/E-1 magnetischen Partikelkonzentrator platziert, um die magnetischen Beads von der Lösung zu trennen. Nach 2 Minuten wurde die Überstandslösung vorsichtig entfernt, wobei das Röhrchen sich immer noch in dem magnetischen Separator befand. Der Überstand wurde in ein 1-ml-Mikrokultur-Röhrchen gegeben. Das Röhrchen 5 wurde für 5 Minuten in dem magnetischen Konzentrator belassen, während die anderen Röhrchen darin 2 Minuten belassen wurden. Die Streulichtintensität der Überstände wurde in dem SpectraMetrix-Photometer mit folgenden Einstellungen gemessen: Widerstand PM

out = 0,1 Megaohm, Filter auf der Erregungsseite = Orangefilter CS 3-67, 10× neutraler Dichten-Attenuator = out.

[0471] Es wurden folgende Streulichtintensitäten gemessen:

Röhrchen#	Intensität
0	1,21 Volt
1	1,04 Volt
2	0,644 Volt
3	0,49 Volt
4	0,362 Volt

[0472] Die Überstände wurden in ihre jeweiligen Röhrchen, welche die magnetischen Beads enthielten, zurückgegeben und für weitere 2 Stunden inkubiert. Nach 2 Stunden wurden die Röhrchen wie zuvor beschrieben bearbeitet; es wurden die folgenden Streulichtintensitäten für die Überstände erhalten:

Röhrchen #	Intensität (Volt)	Normalisierte Intensität	Anteil der gebundenen Goldpartikel
0	0,855	1,21	0
1	0,604	0,85	0,3
2	0,382	0,54	0,55
3	0,326	0,46	0,61
4	0,206	0,29	0,76

[0473] Die zusätzliche 2-stündige Inkubation führte nicht zu einer größeren Bindung des Gold-BSA-Biotins an die magnetischen Beads.

[0474] Ein Tropfen der magnetischen Beads mit den gebundenen Goldpartikeln wurde auf einen Mikroskop-Glasobjekträger aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Der Objekträger wurde dann unter DLAS-LPD-Bedingungen mit einem Lichtmikroskop untersucht. Die magnetischen Beads waren leicht als stark streuende Objekte sichtbar; die Goldpartikel auf den Beads waren jedoch auf Grund der starken Streuung durch die großen magnetischen Beads schwerer zu erkennen. Wenn jedoch das Wassermedium durch ein Badmedium mit einem Brechungsindex von ungefähr 1,4 bis 1,5 ersetzt wurde, waren die Partikel deutlicher sichtbar. Ebenso waren die Goldpartikel deutlicher sichtbar, wenn der Beleuchtungslichtstrahl mit einem höheren Winkel in Bezug auf eine Linie senkrecht zum Objekträger geneigt wurde.

Beispiel 32 – Detektion von Nukleinsäure-Hybridisierung mit Nukleinsäure-markierten Gold(Au)-Partikeln von 40 nm Durchmesser

1. Herstellung von chemisch aktivierte Polyethylenglycol-Amin-beschichteten Au-Partikeln

[0475] Die reaktiven Amingruppen zur Konjugation der Nukleinsäuren an die Au-Partikel wurden folgendermaßen bereitgestellt. 40-nm-Au-Partikel wurden mit Bis-(Polyoxyethylenbis[3-Amino-2-Hydroxypropyl])-Polyethylen-Verbindung unter Verwendung des in Beispiel 12 beschriebenen Verfahrens beschichtet. Dies führte zu Au-Partikeln mit 40 nm Durchmesser mit einer dünnen Beschichtung der Polyethylen-Verbindung, welche mehrere chemisch reaktive Amingruppen zur Konjugation der Nukleinsäuren an die Partikel aufwies.

2. Herstellung der Nukleinsäuren zur Konjugation an die Au-Partikel mit 40 nm Durchmesser

[0476] Homopolymere von Polycytidylsäure (Poly(C)) und Polyinosinsäure (Poly(I)) wurden folgendermaßen chemisch modifiziert. 0,8 mg und 1,3 mg Poly(I) und Poly(C) wurden in getrennte Röhrchen gegeben. Zu jedem der Röhrchen wurde 1,0 ml einer 0,1 M Lösung von 1-Ethyl-3,3-Dimethylamino-Propylcarbodiimid (CDI) in Imidizol-Puffer, pH 8,5, gegeben und für eine Stunde inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden dann durch Ethanol-Präzipitation ausgefällt und in Hybridisierungspuffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,6) resuspendiert.

3. Konjugation der aktivierte Nukleinsäuren an aktivierte Au-Partikel

[0477] Es wurde das gleiche Protokoll für die Poly(I)- und Poly(C)-Präparationen angewendet. Zu 50 µl Nukleinsäurelösung wurden 20 µl aktivierte 40-nm-Au-PEG-Partikellösung und 100 µl 0,2 M Hepes, pH 8,0, gegeben, und für 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Poly(C)- und Poly(I)-40-nm-Au-Nukleinsäure-Konjugate durch Zentrifugation gesammelt, gewaschen und in Hybridisierungspuffer resuspendiert.

4. Hybridisierungs-Experimente

[0478] Die Hybridisierungs-Eigenschaften der Nukleinsäure-40-nm-Au-Partikel-Konjugate (Goldpartikel mit 40 nm Durchmesser, wobei an die Polymer-beschichtete Oberfläche der Partikel Nukleinsäuren kovalent gebunden sind) wurde folgendermaßen untersucht. Es wurde ein Lichtmikroskop unter Anwendung von DLAS-LPD-Verfahren verwendet. Es wurde die in [Fig. 9](#) dargestellte experimentelle Glasobjektträger-Flüssigkeit-Deckglas-Anordnung verwendet. Ein Tropfen der Poly(C)-Au-Partikel-Konjugat-Präparation wurde auf dem Objektträger platziert und mit einem Deckglas bedeckt. Ein Tropfen Immersionsöl wurde auf den Mikroskopkondensor gegeben und der Objektträger dann oben auf dem Kondensor platziert. Es wurde das 10×-Objektiv verwendet. Die Lösung erschien ziemlich homogen, und die Poly(C)-Au-Partikel-Konjugate konnten schwimmend durch das Feld hindurch beobachtet werden. Ihre Brownsche Molekularbewegung schien geringer zu sein als die, die zuvor bei 40-nm-Au-Partikeln beobachtet wurde, die nicht mit Nukleinsäuren markiert waren. Einige Poly(C)-Au-Partikel schienen an der Oberfläche des Glasobjektträgers festzusitzen. Es traten einige wenige Aggregate von Poly(C)-Au-Partikeln auf; diese bestanden meistens aus zwei bis vier Poly(C)-Au-Partikeln. Diese Aggregat-Strukturen bewegten sich als eine Einheit, wenn sie durch das Gesichtsfeld hindurch schwammen. Es wurde festgestellt, dass die Partikeldichte der Poly(C)-Au-Partikel, die an der Oberfläche des Objektträgers anhafteten, sich erhöhte, wenn der Objektträger einige Minuten beobachtet wurde. Die Farbe des Streulichts, welches von den Poly(C)-Au-Partikeln ausging, war grün. Das Deckglas wurde entfernt und ein Tropfen der Poly(I)-Au-Präparation in unmittelbarer Nähe des benetzten Bereichs des Objektträgers, welcher den Poly(C)-Au-Tropfen enthielt, platziert. Der Kontakt zwischen den zwei Spots wurde durch Verwendung einer Metallsonde, mit der eine Flüssigkeitslinie von dem Poly(I)-Au-Tropfen zu dem benetzten Teil des Objektträgers, enthaltend das Poly(C)-Au gezogen wurde, bewirkt. Dann wurde ein Deckglas aufgelegt und der Objektträger wieder auf das Mikroskop gelegt und betrachtet. Es wurde die Bildung einer ansteigenden Anzahl mehrerer Poly(I)-Au-Poly(C)-Au-Partikel-Aggregate im Verlauf der Zeit beobachtet. Nach etwa 20 Minuten wurde der Objektträger abgetastet, wobei festgestellt wurde, dass sehr wenige einzelne Partikel vorlagen; die meisten der Partikel lagen in Aggregaten aus mehreren Partikeln vor, von denen viele an dem Glasobjektträger festsäßen. Die Aggregate schienen definierte Formen zu haben, das heißt, die Partikel-Aggregate schienen auf eine bestimmte Weise zusammengesetzt zu sein, wobei einige als Spule aus zufällig aufgewundenen Schnüren und andere als verzweigt-kettige Netzwerke erschienen. Das Erscheinungsbild dieser vielen Aggregate unterschied sich wesentlich von den wenigen Aggregaten, die auf dem Kontroll-Poly(C)-Au-Objektträger beobachtet wurden. Es wurde zum 40×-Objektiv gewechselt, wodurch in einigen Aggregaten einige Partikel eher gelb als grün erschienen. Dann wurde das Deckglas des Objektträgers, welcher die Poly(Au)-Poly(I)-Au-Reaktion enthielt, entfernt und ein Tropfen 10⁻⁵ M Ethiumbromid auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Es wurde eine schwache Orangefärbung beobachtet, die von den Partikel-Aggregaten auf den Objektträgern herrührte; es schien, als ob die grüne und gelb-grüne Farbe der Partikel auf einem Hintergrund mit schwacher Orangefärbung platziert wäre. In den von den Aggregaten entfernt liegenden Bereichen wurde keine Orangefärbung beobachtet. Diese schwache Orangefärbung zeigte, dass doppelsträngige Strukturen von Nukleinsäuren in der Nähe und innerhalb der Partikel-Aggregate vorlagen. Dieses wurde als Hybridisierung der Poly(C)-Au-Konjugate an Poly(I)-Au-Konjugate interpretiert. Der Objektträger wurde entfernt und ein Kontroll-Objektträger, enthaltend einen Tropfen Poly(I)-Au, unter dem Mikroskop beobachtet. Es wurden ähnliche Beobachtungen wie bei dem Kontroll-Poly(C)-Au-Objektträger gemacht, die Poly(I)-Au-Präparation schien jedoch ungefähr zweimal mehr kleine Aggregate aufzuweisen als der Poly(C)-Au-Kontroll-Objektträger. Die Farbe des Streulichts erschien grün, wobei einige Aggregate gelbgrün erschienen.

[0479] In diesem speziellen Format wurden beide komplementären Stränge mit Goldpartikeln markiert. Bei der Hybridisierung der komplementären Stränge erschienen mehr Partikelaggregate. Das Binden der Nukleinsäuren kann durch Detektieren des Streulichts von Goldpartikeln oder ähnlichen Partikeln nachgewiesen werden. Außerdem scheint sich die Farbe des Streulichts ändern zu können, wenn zwei oder mehr Au-Partikel in enger Nachbarschaft zueinander vorliegen. Diese Farbänderung des Streulichts kann ebenso als Mittel verwendet werden, um ein Bindungseignis nachzuweisen. Es sei darauf hingewiesen, dass die Au-Partikel oder irgendwelche anderen Partikel, welche ausreichende Lichtstreuung aufweisen, in zahlreichen Formaten verwendet werden können, um das Binden von Nukleinsäuren oder einem beliebigen anderen Ligand-Rezeptor zu erkennen.

tor-Paar in einem Separations- oder Nicht-Separations-Assay-Format nachzuweisen.

Beispiel 33 – Detektion von Goldpartikeln, die an an große Polystyrol-Beads gebunden sind

[0480] Ein Tropfen einer Lösung von sphärischen Polystyrolpartikeln von etwa 2 µm Durchmesser, beschichtet mit Biotin, wurde auf einen Glasobjektträger gegeben und im Lichtmikroskop unter DLASLPD-Bedingungen betrachtet. Die Polystyrolpartikel waren leicht als helle weiße Lichtpunktquellen sichtbar. Dann wurde ein Tropfen einer Präparation von 60-nm-Goldpartikeln, beschichtet mit Streptavidin, auf den Tropfen aus Polystyrolpartikeln gegeben und diese Präparation im Mikroskop betrachtet. Die hellen weißen Polystyrolpartikel waren sichtbar und ein schwacher Halo mit gelbgrüner Farbe wurde um die Polystyrolpartikel herum beobachtet. Die Lösung wurde von dem Objektträger verdampft und dann ein Tropfen Mikroskop-Immersionsöl auf die Präparation gegeben; das Ganze wurde dann unter dem Mikroskop betrachtet. Einzelne Goldpartikel und größere zirkuläre Ringbereiche gelbgrüner Goldpartikel waren leicht sichtbar. Die Polystyrolpartikel erschienen als dunkle oder nahezu schwarze Punkte, umgeben von einer Halo oder einem Ring gelb-grüner Farbe. Dieses Verfahren kann angewendet werden, um die Bindung von Goldpartikeln oder anderen metallartigen Partikeln an die Oberfläche von Feststoffen und kleinen Festphasen, wie beispielsweise von Glasbeads oder anderen Beads, und biologische Zellen und Ähnliches nachzuweisen.

Beispiel 34 – Lichtstreuereigenschaften von Goldpartikeln, die mit einer Polyethylen-Verbindung beschichtet sind

[0481] Es wurden Goldpartikel von ungefähr 100 nm Durchmesser, die durch das Zitratverfahren hergestellt worden waren, verwendet. Ein Teil dieser Lösung wurde in ein separates Behältnis gegeben; die Partikel wurden mit einer Polyethylenglycol-Verbindung (MW = 20.000) unter Verwendung des an anderer Stelle beschriebenen Verfahrens beschichtet.

[0482] Zum Vergleich des Streulichts der beschichteten und unbeschichteten Partikel wurden die Proben in Wasser verdünnt, bis jede Lösung einen leichten Stich ins Pink-Rote hatte. Die Profile der Streulichtintensität versus Einfallswellenlängen wurden für die Proben unter Verwendung des SpectraMetrix-Photometers gesammelt.

[0483] Für diese Messungen wurde ein Monochromator zwischen der Lichtquelle und der Probe platziert; die Streulichtdaten der Proben wurden in 10-nm-Schritten von 400 nm bis 700 nm durch Einstellen der Monochromator-Einstellungen gesammelt. Die Daten wurden hinsichtlich der Wellenlängenabhängigen Monochromator- und Photodetektor-Variation als Funktion der Wellenlänge unter Verwendung einer Kalibrierungskurve, die unter Verwendung von 12-nm-Silika-Partikeln erstellt worden war, korrigiert. Die Daten wurden unter Verwendung der Kalibrierungskurve analysiert. Die Daten sind in [Fig. 16](#) dargestellt.

[0484] Die Daten zeigen, dass die beschichteten und unbeschichteten 100-nm-Goldpartikel sehr ähnliche Profile der Streulichtintensität vs. Einfallswellenlänge aufweisen. Somit können viele verschiedene Typen makromolekularer Substanzen, wie beispielsweise Antikörper, Nukleinsäuren, Rezeptoren oder Ähnliches, auf die Oberfläche der Partikel aufgetragen werden, ohne dass dadurch die Streulichteigenschaften signifikant verändert werden.

[0485] Weitere Ausführungsformen liegen im Umfang der folgenden Ansprüche.

Patentansprüche

1. Verfahren zur spezifischen Detektion eines oder mehrerer Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte
 - (a) spezifisches Binden des einen oder der mehreren Analyten in der Probe an ein durch Streulicht detektierbares Gold- oder Silberpartikel mit einem Durchmesser von 1 bis (einschließlich) 500 nm;
 - (b) Beleuchten der an die Analyten gebundenen Partikel mit nicht-evaneszentem Licht unter Bedingungen, bei denen Streulicht von dem/den Partikeln erzeugt wird, und unter denen Licht, welches von einem oder mehreren der Partikel gestreut wird, durch das menschliche Auge mit weniger als 500-facher Vergrößerung und ohne Amplifikation detektiert werden kann; und
 - (c) Detektieren des von dem/den Partikel(n) unter diesen Bedingungen gestreuten Lichts als Maß der Anwesenheit des einen oder der mehreren Analyten, wobei das Beleuchten und die Detektion auf entgegengesetzten Seiten einer Festphasen-Oberfläche erfolgen.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Partikel eine Größe aufweist, die bei Beleuchtung mit polychro-

matischem Licht und Beobachtung durch das menschliche Auge ein spezifisches farbiges Licht erzeugt.

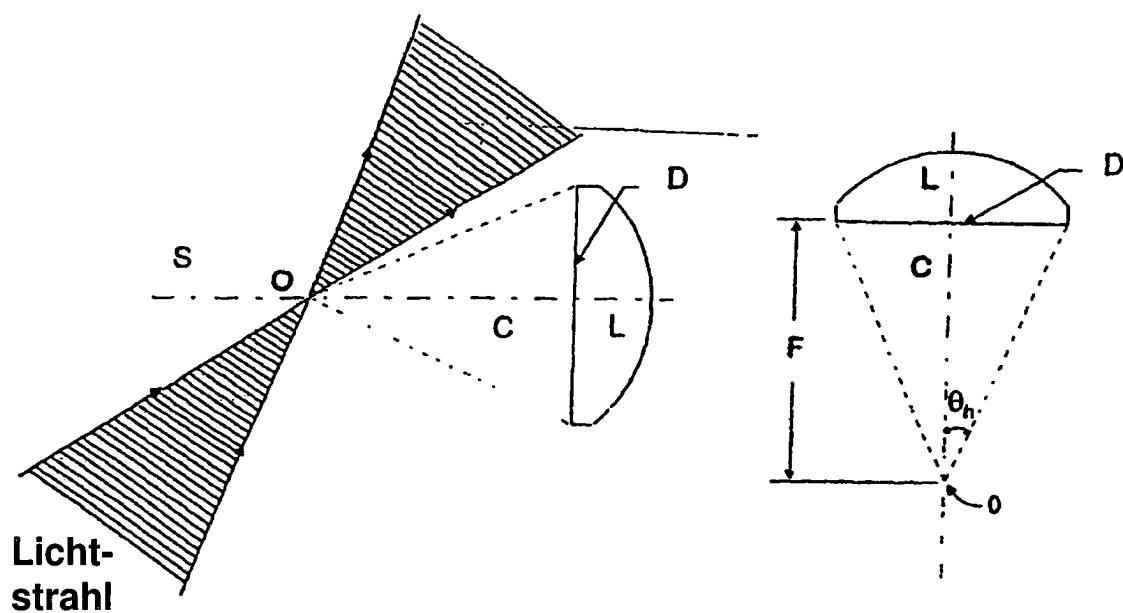
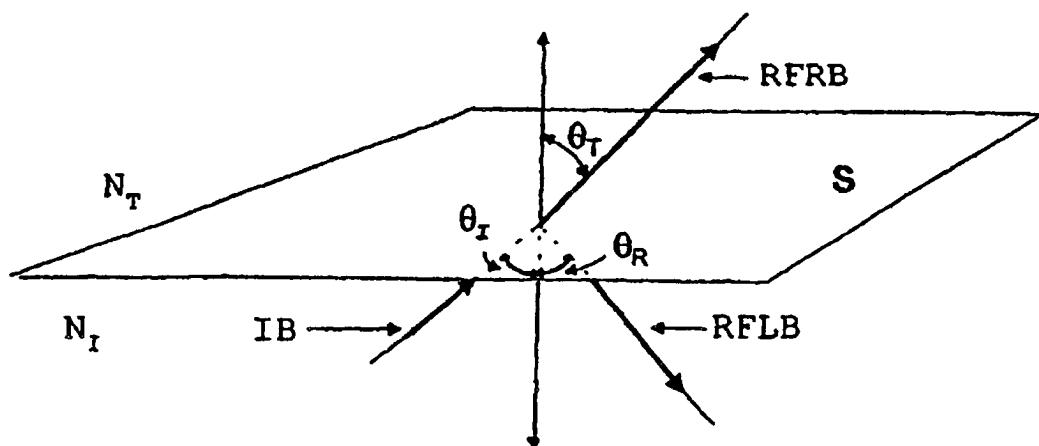
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei die Farbe des spezifischen farbigen Lichts ein Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten bereitstellt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Detektieren das Messen der Streulichtintensität als Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten umfasst.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Detektieren das Messen der Farbe des Streulichts als Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten umfasst.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Partikel eine Zusammensetzung aufweist, welche bei Beleuchtung mit polychromatischem Licht und Beobachtung durch das menschliche Auge ein spezifisches farbiges Licht erzeugt.
7. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Partikel an einen Festphasen-Analyten gebunden sind.
8. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Partikel während des Detektions schritts in Flüssigphase vorliegen.
9. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Analyt an einen festen Träger gebunden ist.
10. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Analyt frei in flüssiger Lösung vorliegt.
11. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 9, wobei der eine oder die mehreren Analyten spezifisch auf einem Mikroarray oder Array-Chip gebunden sind, welcher einzelne (diskrete) Bereiche umfasst, die jeweils einen oder mehrere der Analyten enthalten können.
12. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei eine monochromatisches Licht abgebende Beleuchtungsquelle verwendet wird, um das Licht bereitzustellen.
13. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Verfahren das Bereitstellen einer Vielzahl verschiedener Partikel umfasst, die bei Beobachtung durch das menschliche Auge jeweils unterschiedliche visuelle Erscheinungsbilder aufweisen.
14. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 9, wobei die Partikel in einem homogenen Assay verwendet werden, und wobei zwei oder mehr Partikel, die an den einen oder die mehreren Analyten gebunden sind, ausreichend eng zusammengebracht werden, so dass die Lichtstreueigenschaft wenigstens eines Partikels durch Partikel-Partikel-Perturbationen verändert wird, wobei diese Veränderung ein Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten ist.
15. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 9, wobei die Partikel in einem Assay verwendet werden, und wobei zwei oder mehr Partikel, die an den einen oder die mehreren Analyten gebunden sind, ausreichend eng zusammengebracht werden, so dass die Lichtstreueigenschaft der zwei oder mehr Partikel von der einzelner Partikel aufgelöst (unterschieden) werden kann, wobei diese Lichtstreuung ein Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten ist.
16. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 9, wobei die Partikel in einem homogenen Assay verwendet werden, und wobei zwei oder mehr Partikel, die an den einen oder die mehreren Analyten gebunden sind, ausreichend eng zusammengebracht werden, so dass die Lichtstreueigenschaft der zwei oder mehr Partikel von der einzelner Partikel aufgelöst (unterschieden) werden kann, wobei diese Lichtstreuung ein Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten ist.
17. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Partikel in einen homogenen Assay verwendet werden, und wobei zwei oder mehr Partikel, die in enger Nachbarschaft zueinander gehalten werden, getrennt werden, so dass die Lichtstreueigenschaft irgendeines Partikels geändert wird, wobei die Veränderung ein Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten ist.

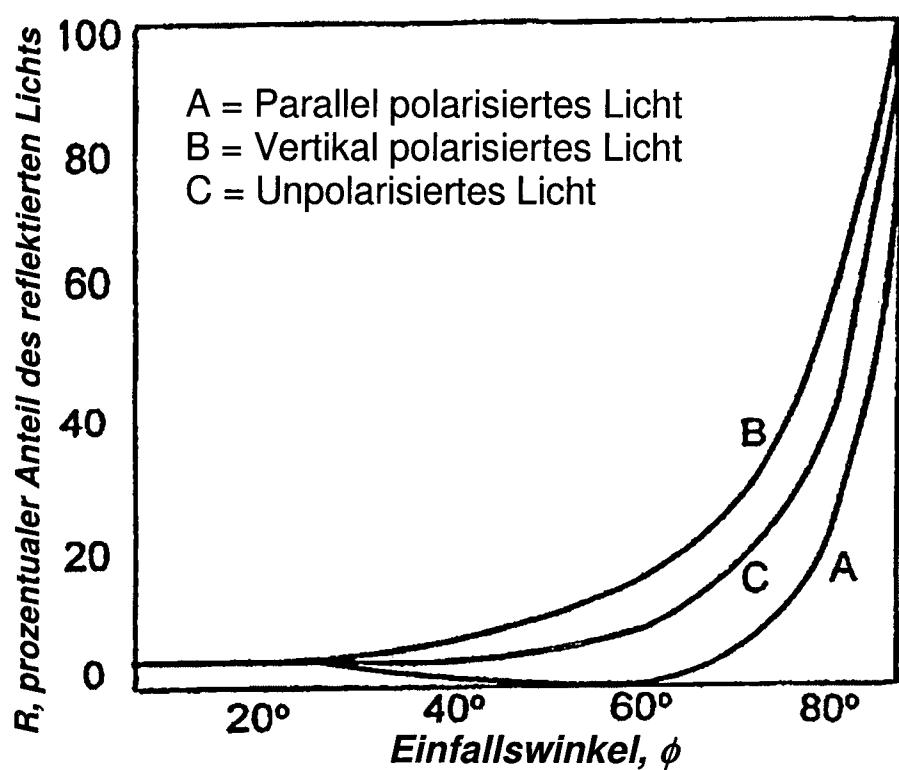
18. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Partikel in einen homogenen Asay verwendet werden, und wobei zwei oder mehr Partikel durch eine oder mehrere molekulare Interaktionen miteinander verbunden sind, wobei die molekulare Interaktion, welche die Partikel zusammenhält, gestört wird, so dass ein oder mehrere Partikel aus der molekularen Interaktion freigesetzt wird/werden, wobei diese(s) freigesetzte(n) Partikel ein Maß für die Anwesenheit oder Menge des einen oder der mehreren Analyten ist/sind.

19. Verfahren gemäß wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das Licht auf das Partikel durch ein Prisma oder ein anderes Lichtwellenleiter-System gerichtet wird.

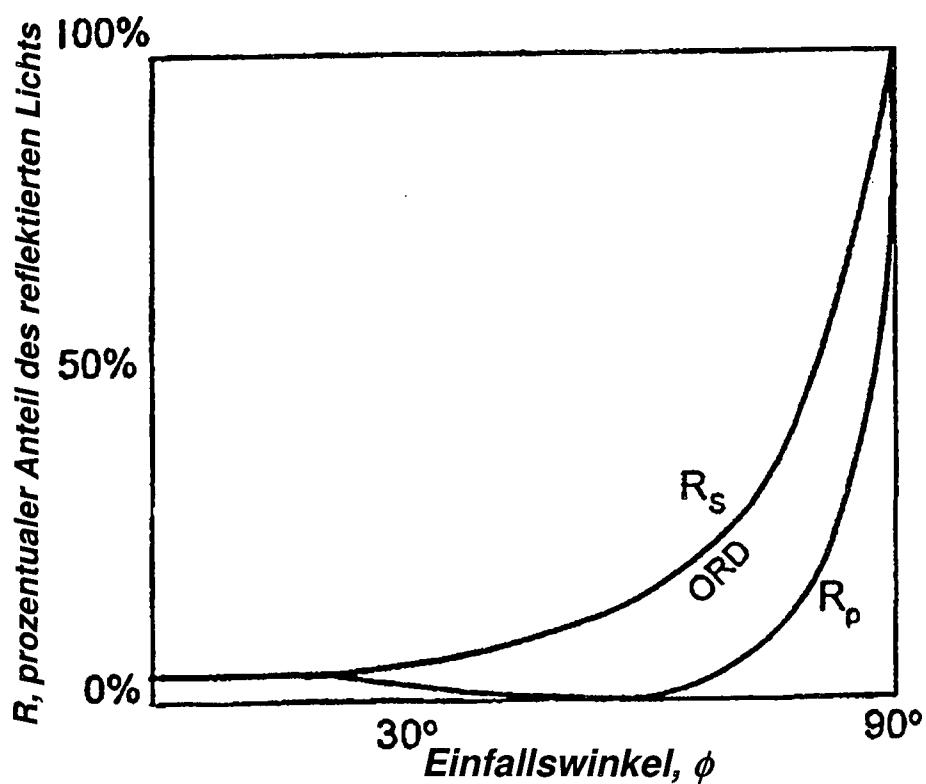
Es folgen 27 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

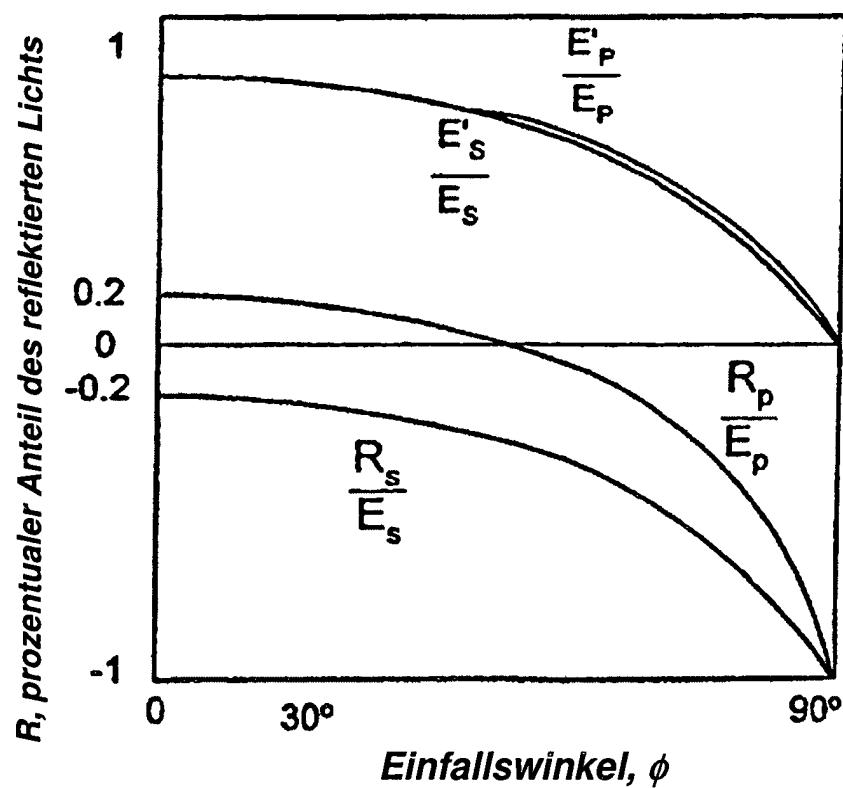
**Figur 1****Figur 2****Figur 3**



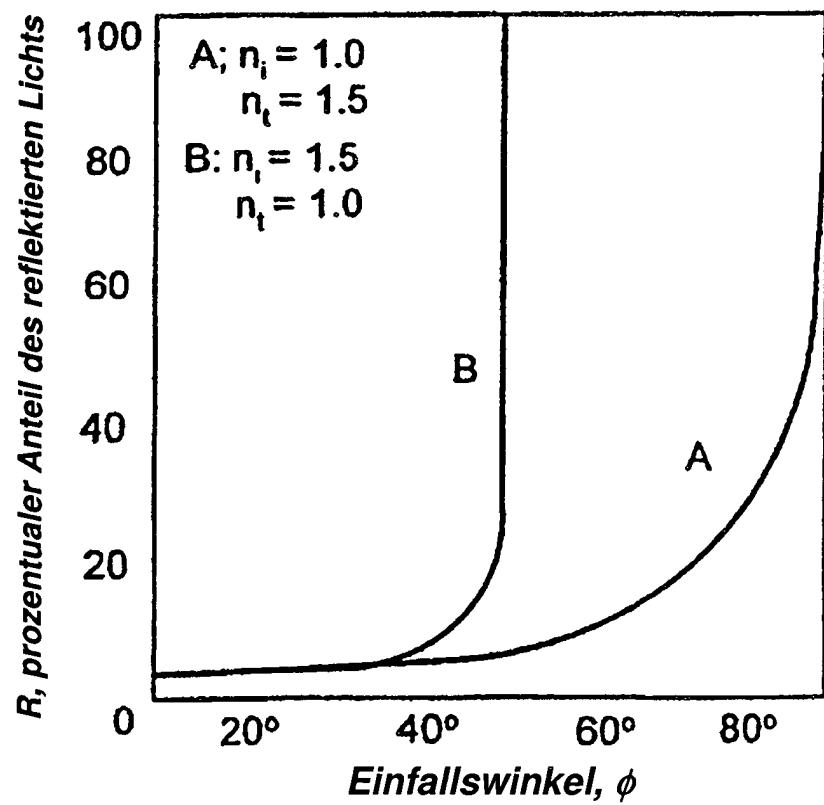
Figur 4A



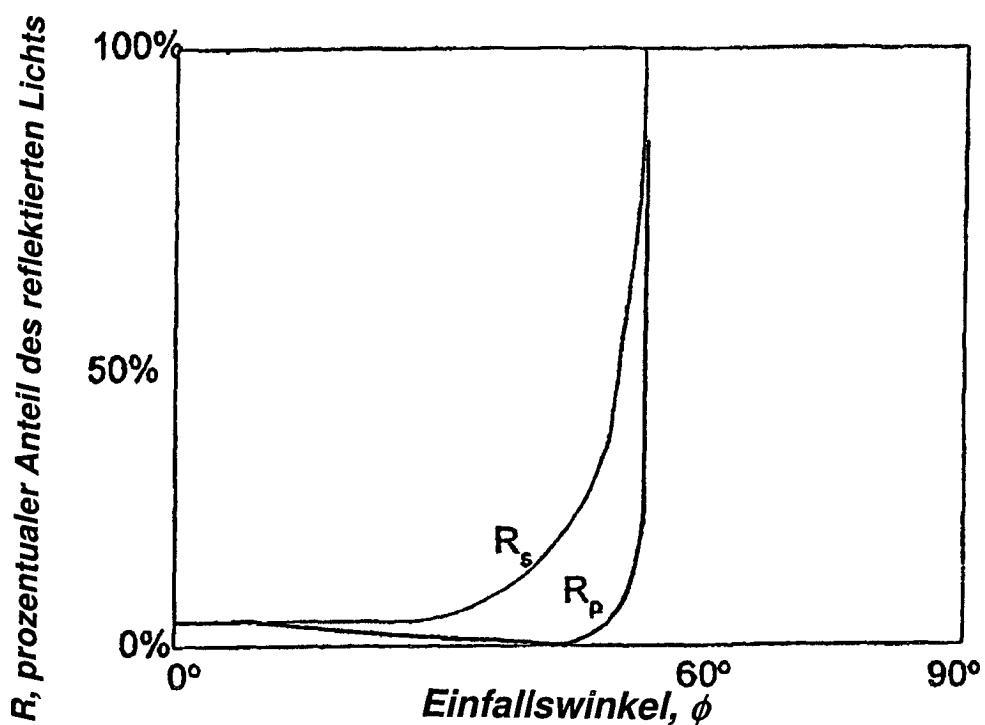
Figur 4B



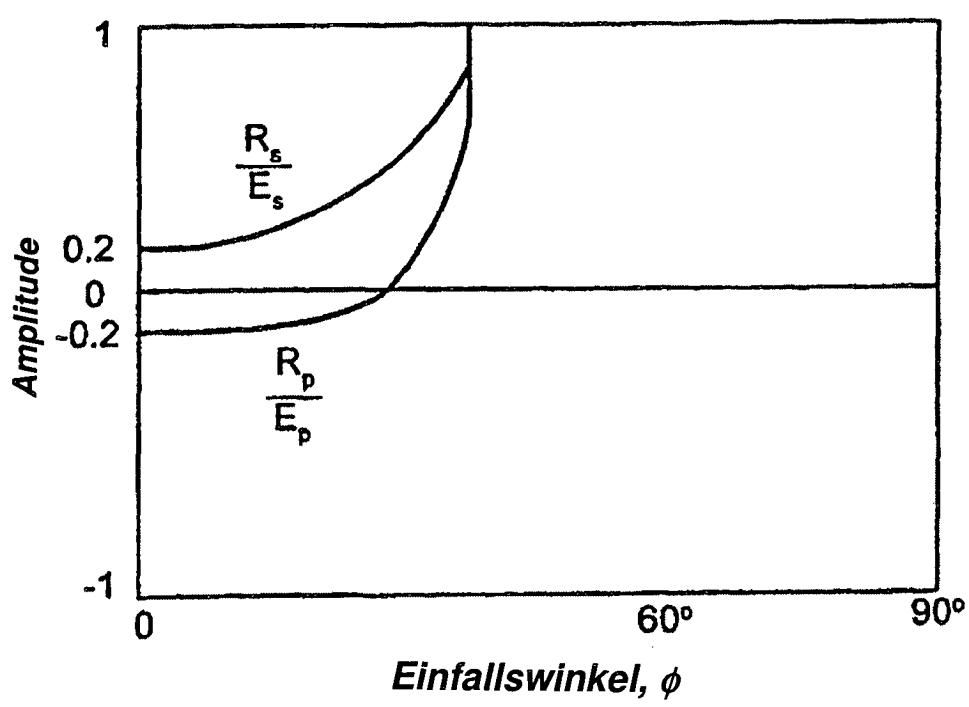
Figur 4C



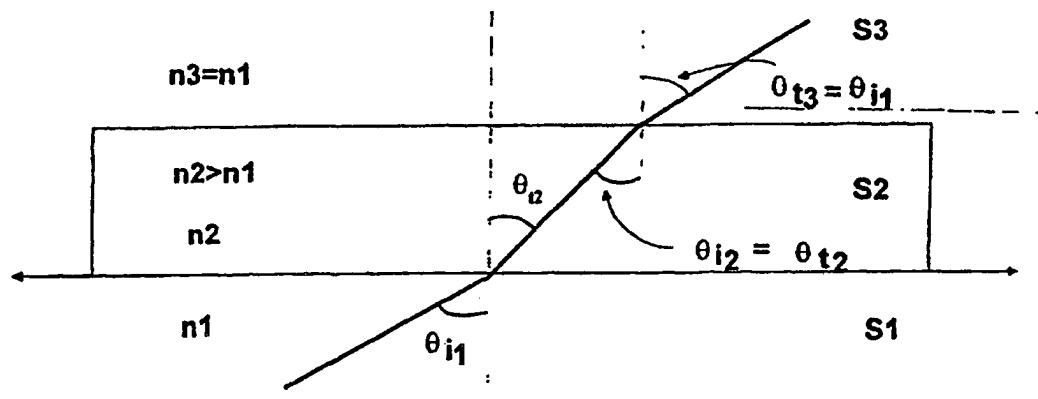
Figur 5A



Figur 5B

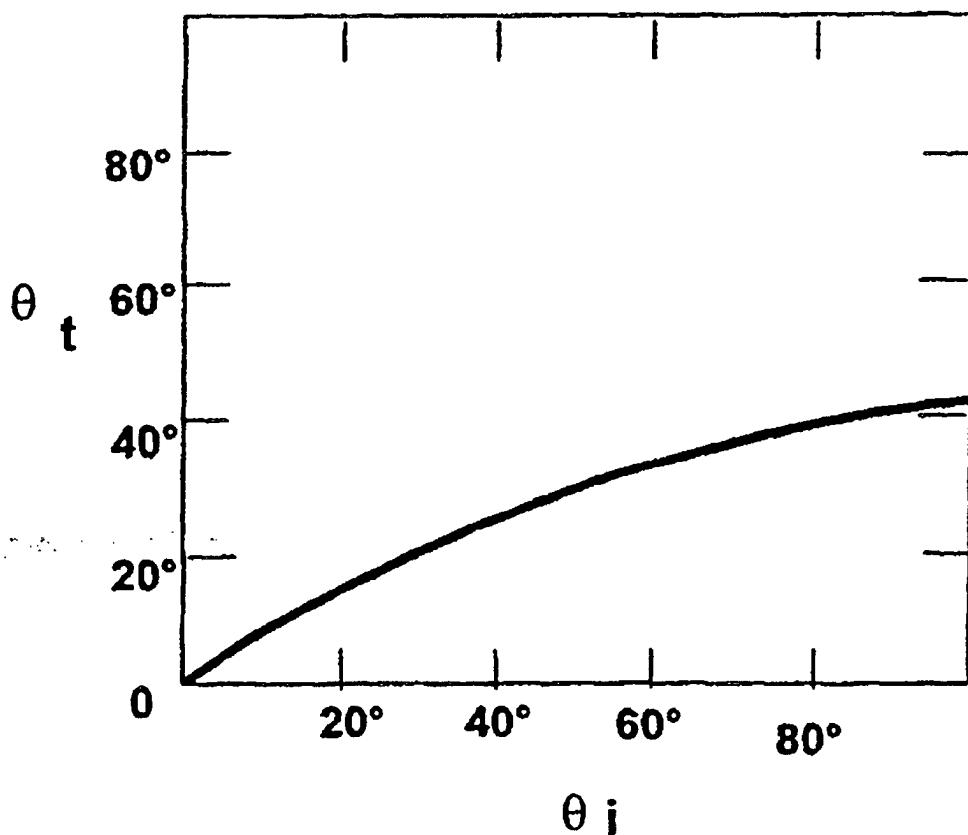


Figur 5C

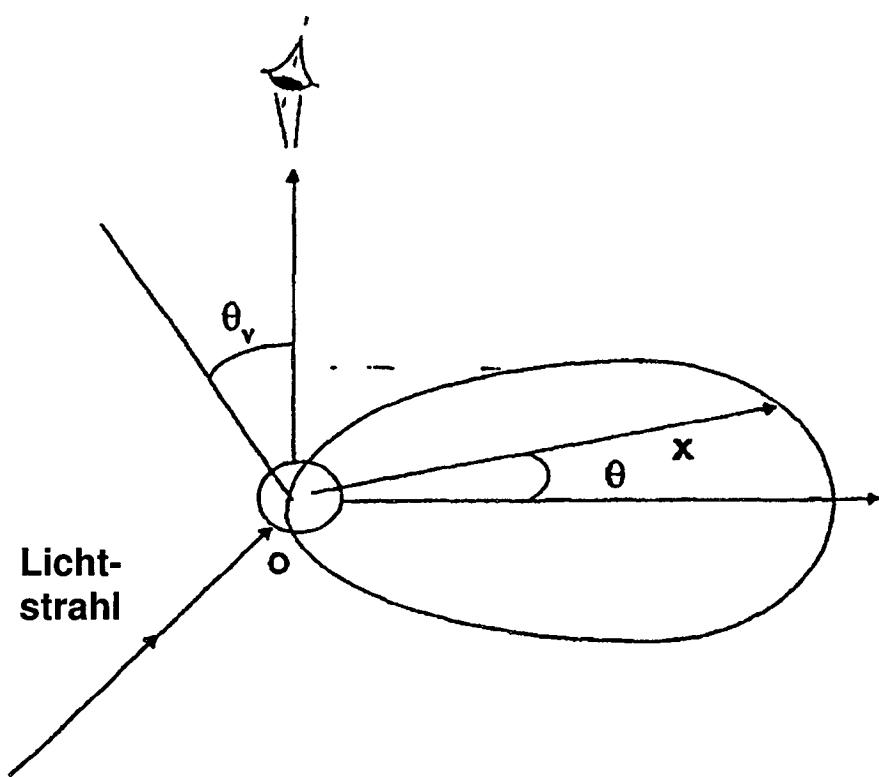


Figur 6

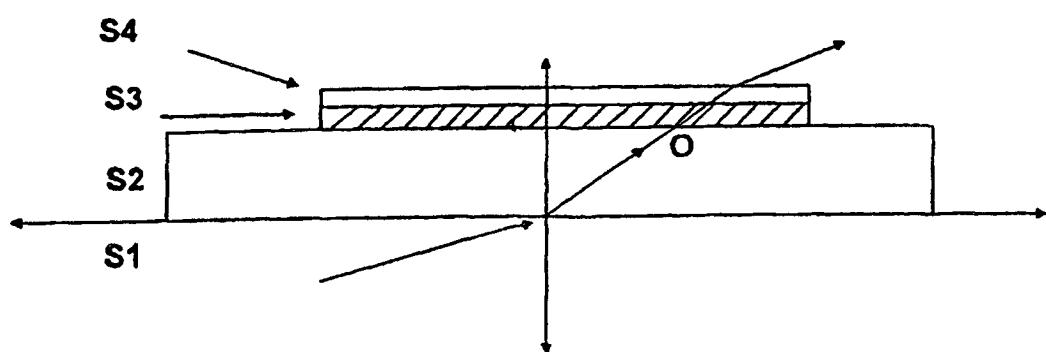
$$n_j = 1 \quad n_t = 1.5$$



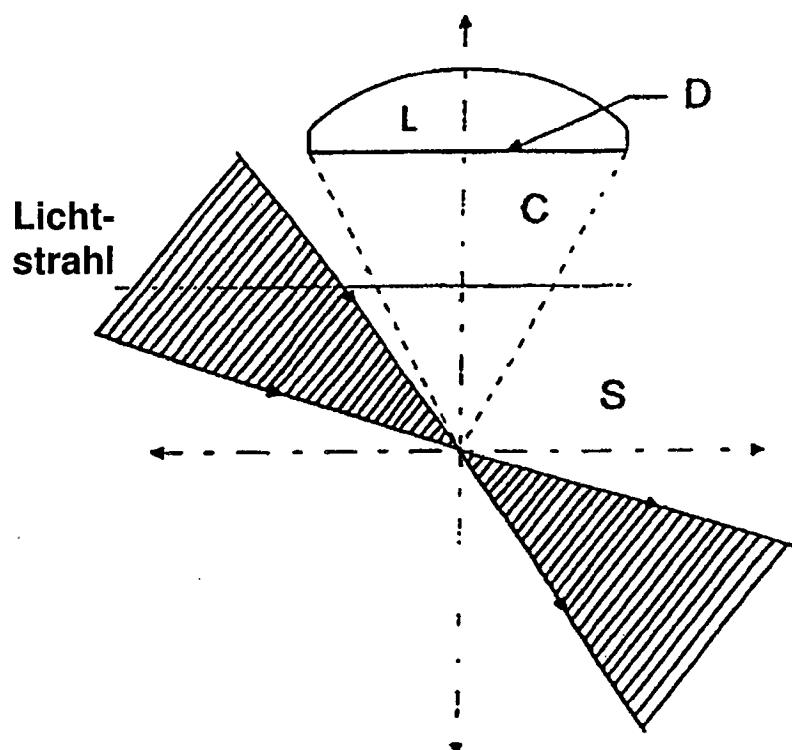
Figur 7



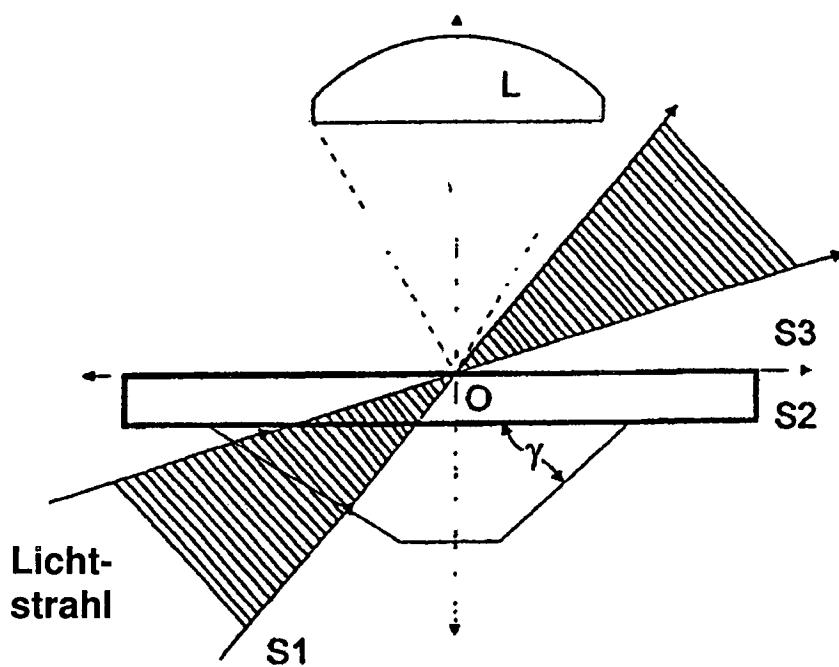
Figur 8



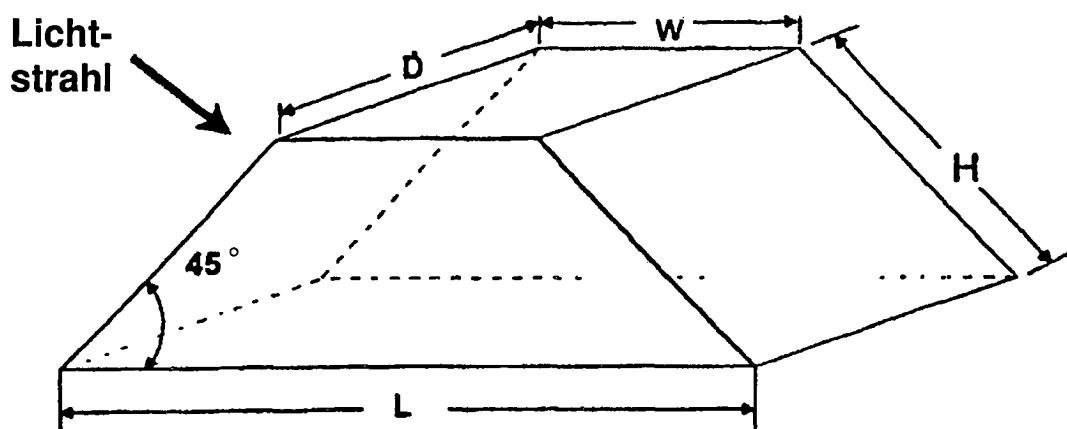
Figur 9



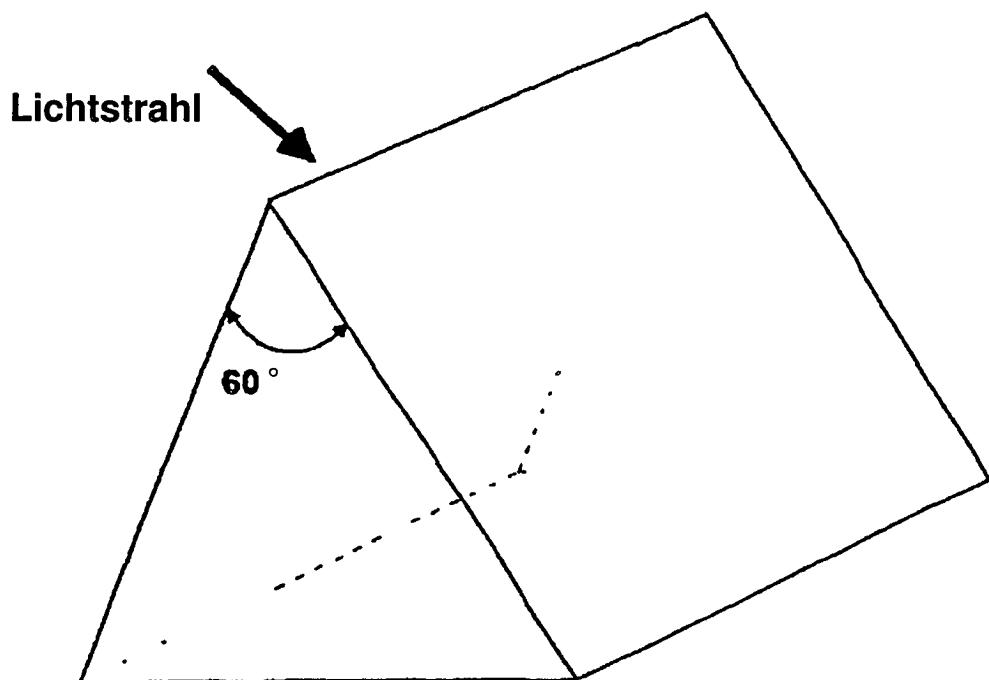
Figur 10



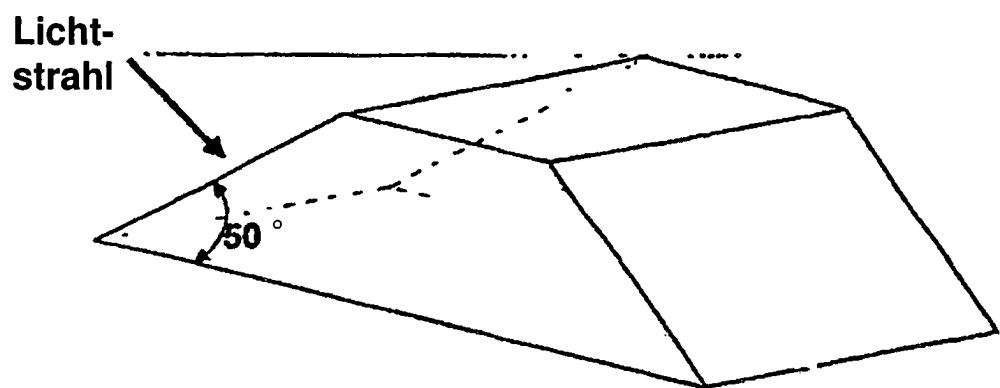
Figur 11



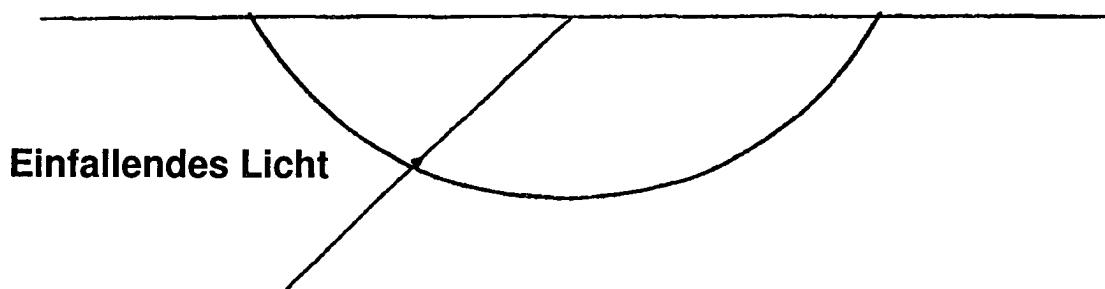
Figur 12A



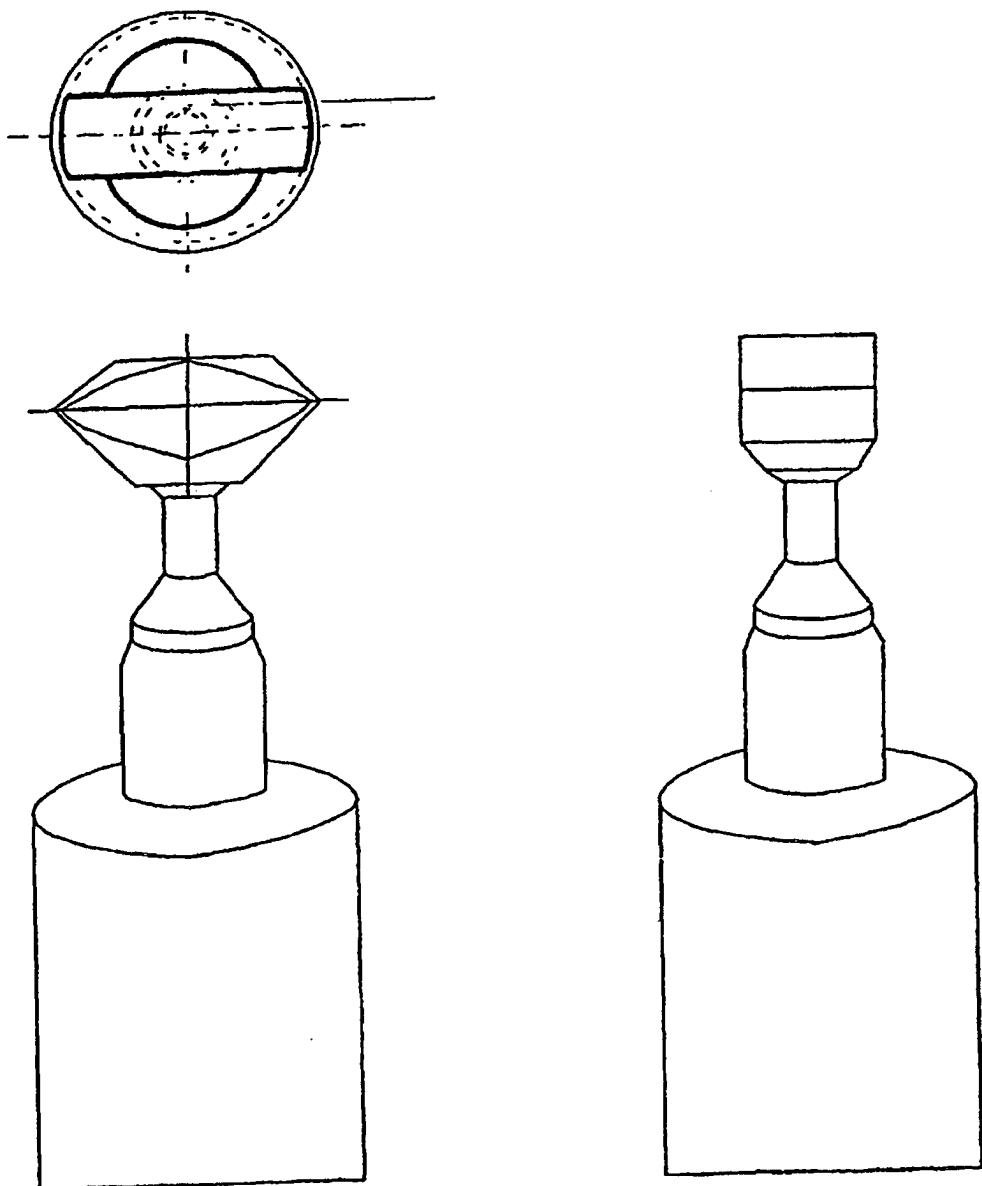
Figur 12B



Figur 12C

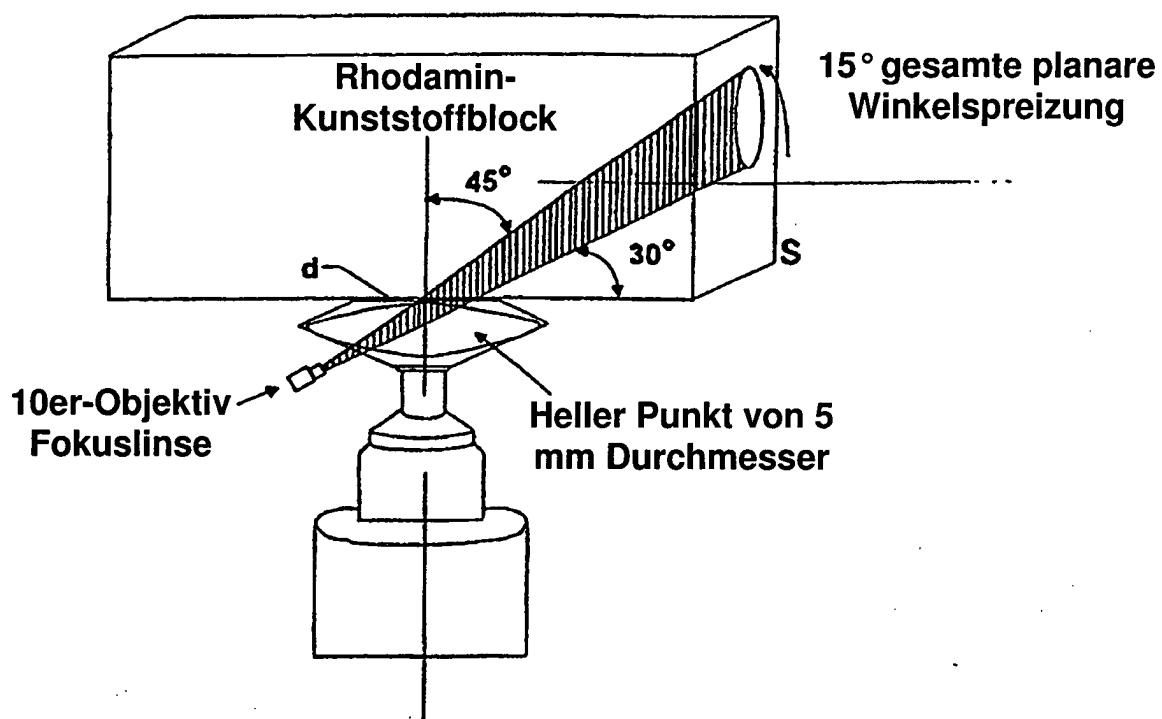


Figur 12D

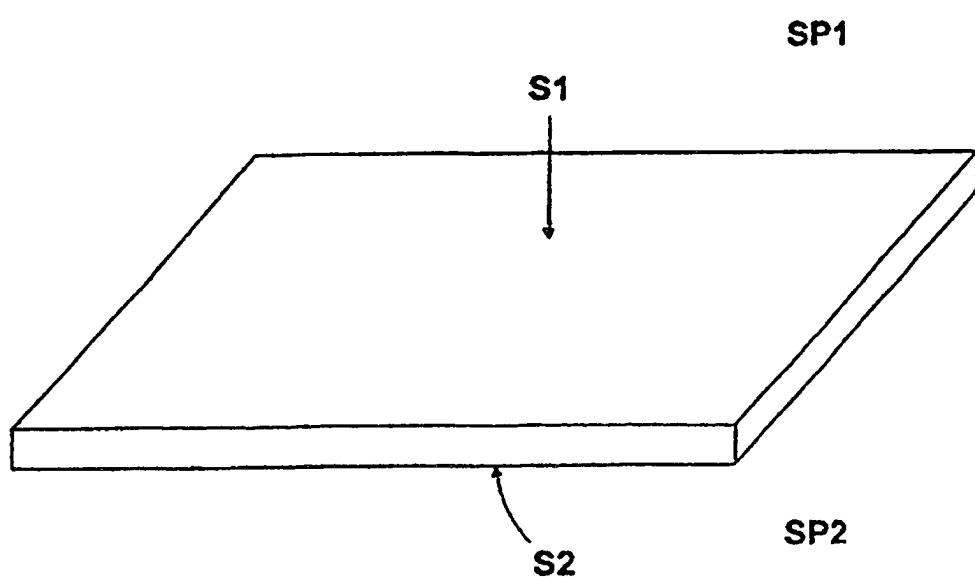


Nicht im Maßstab

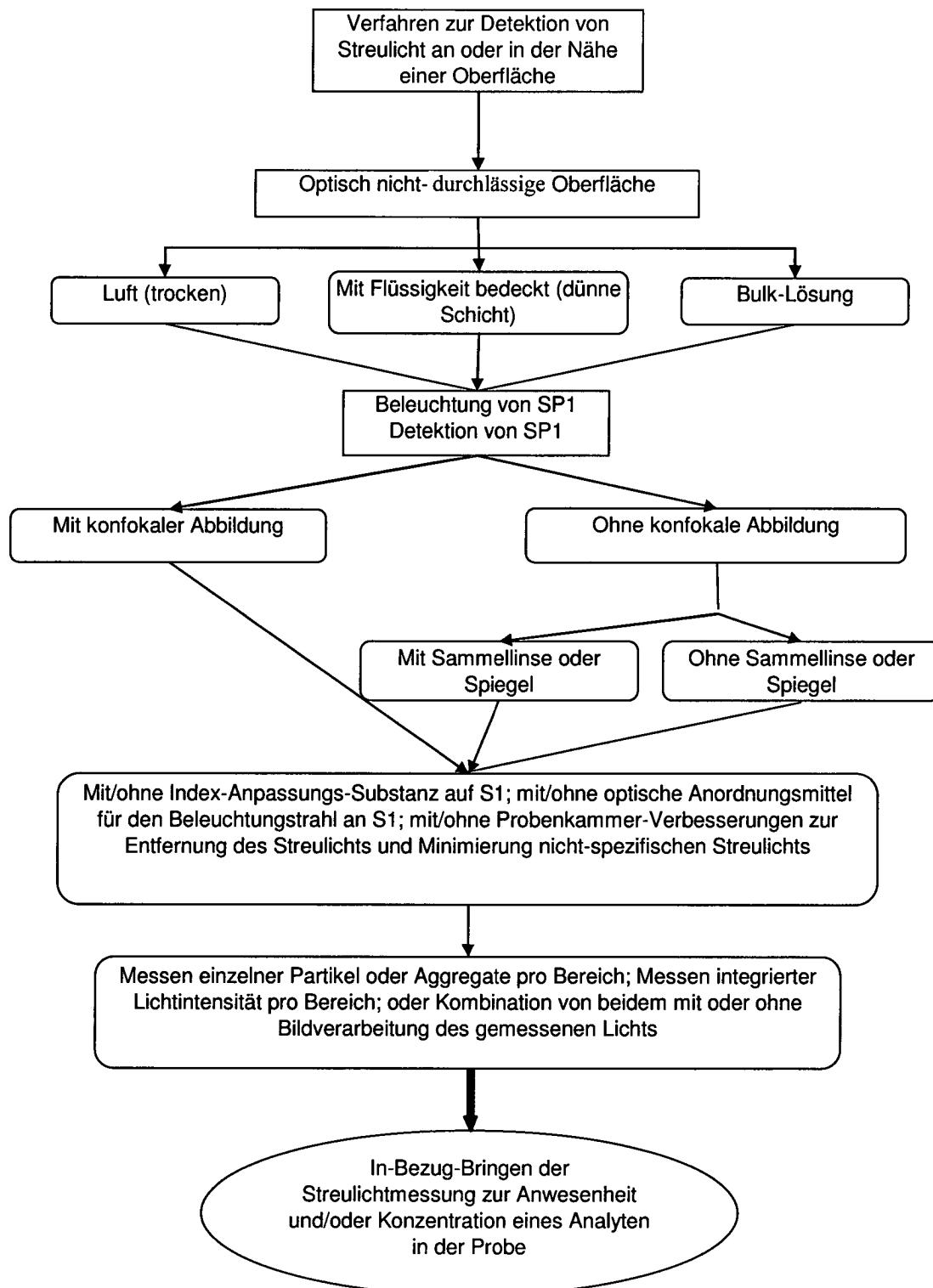
Figur 12E

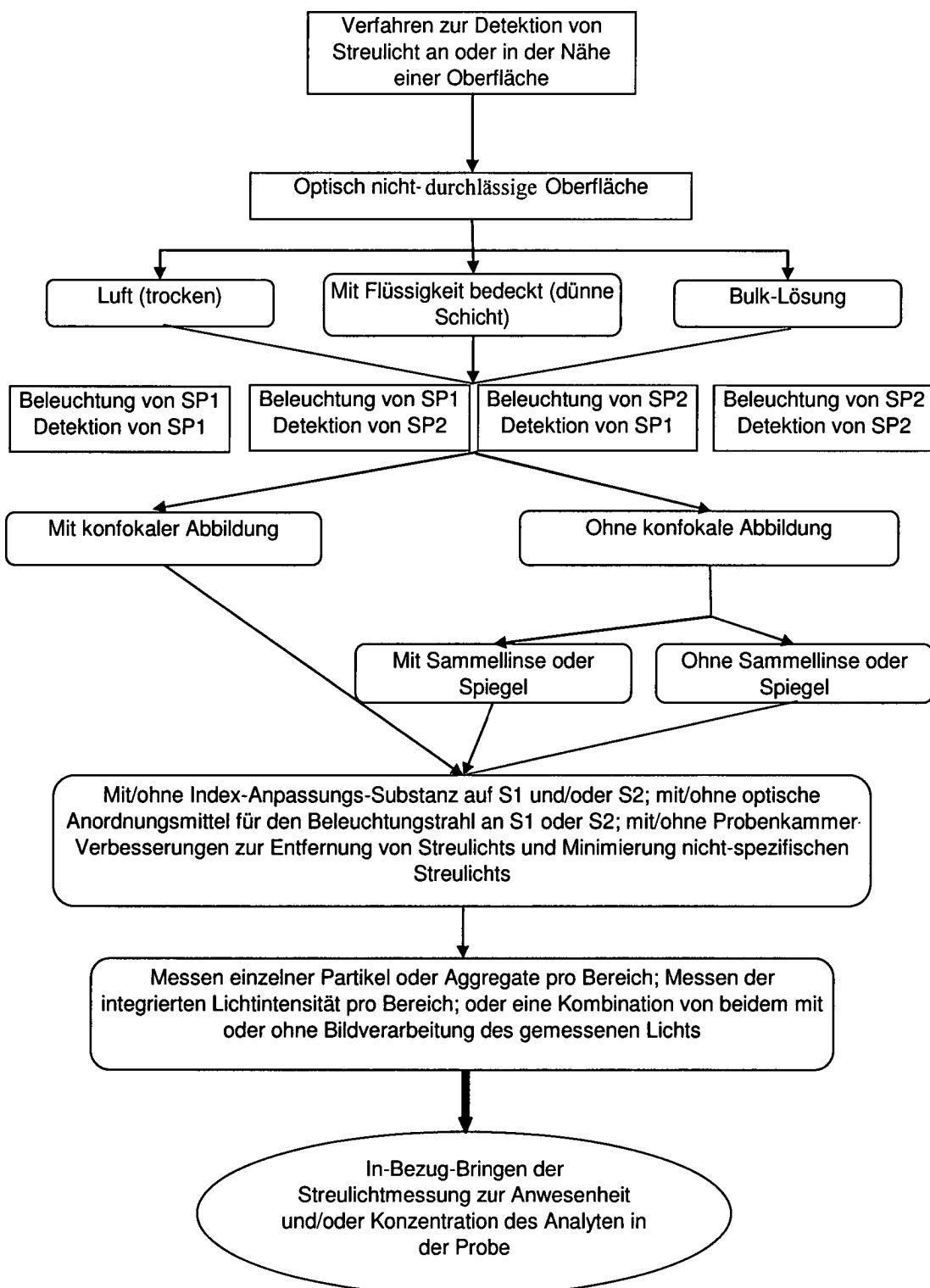


Figur 13

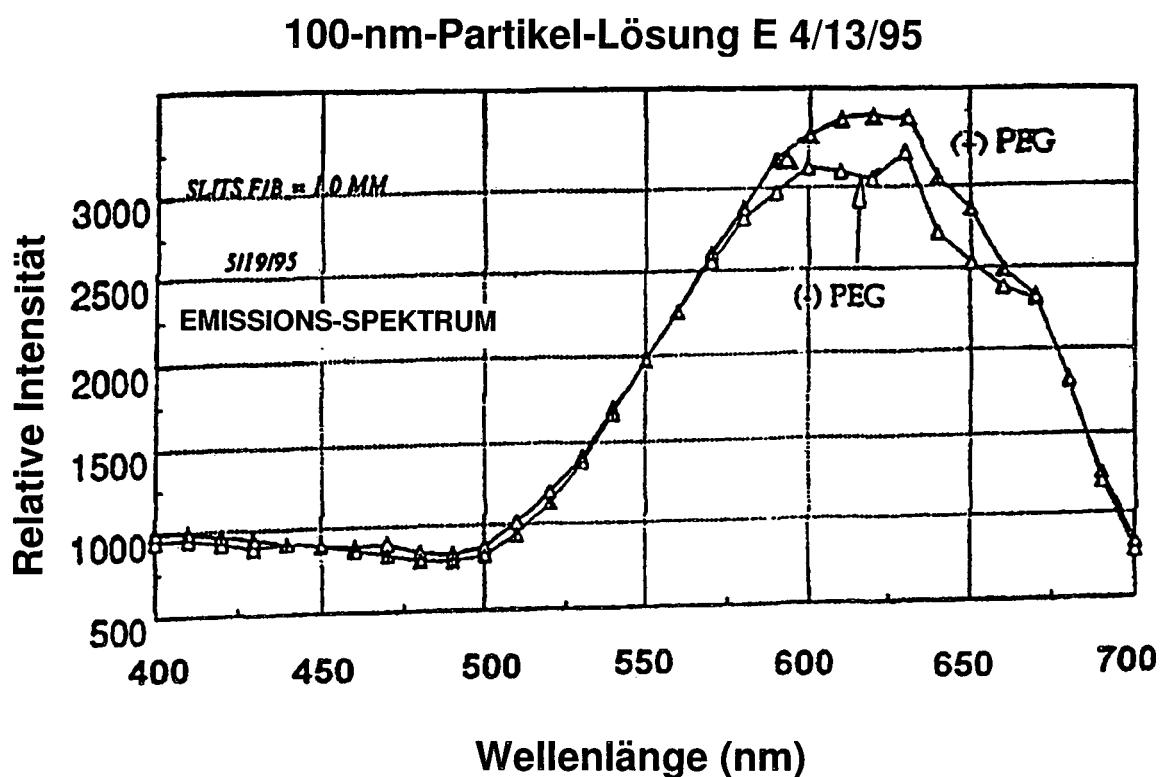


Figur 14

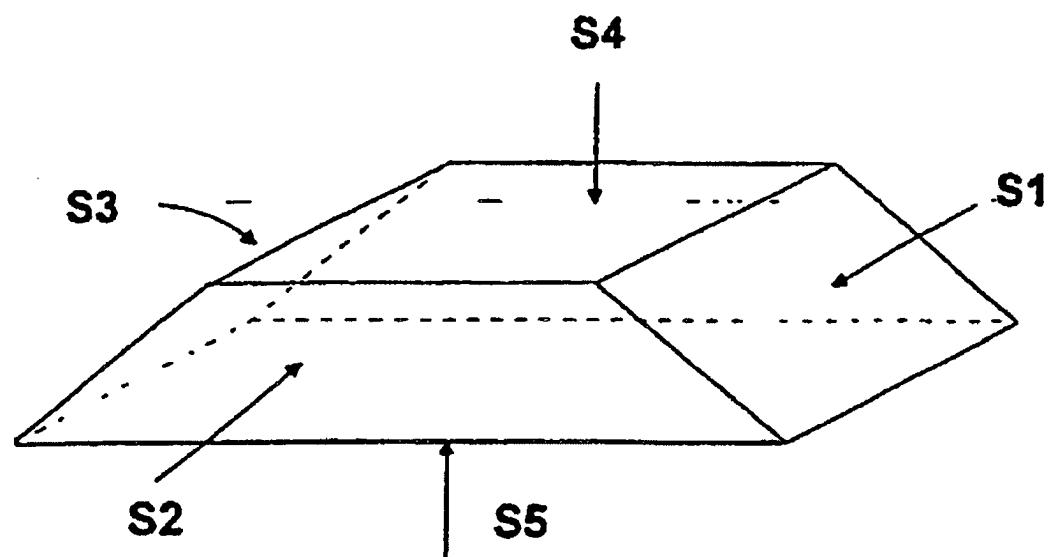
**Figur 15A**



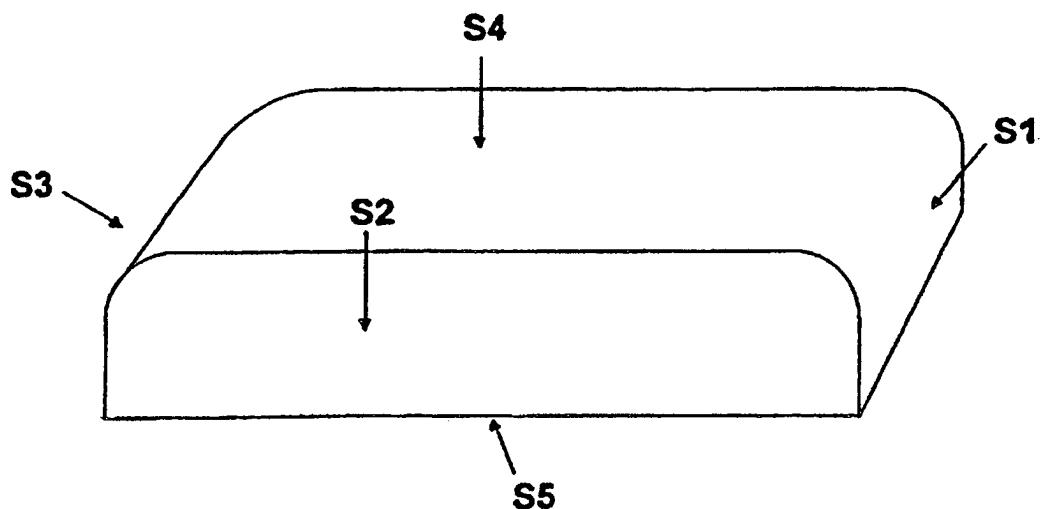
Figur 15B



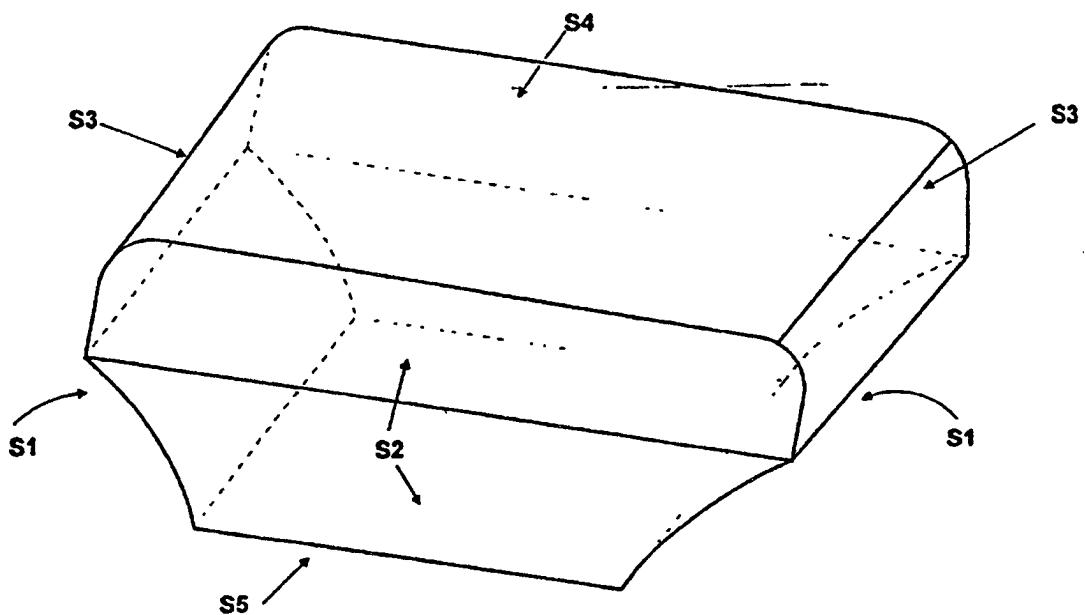
Figur 16



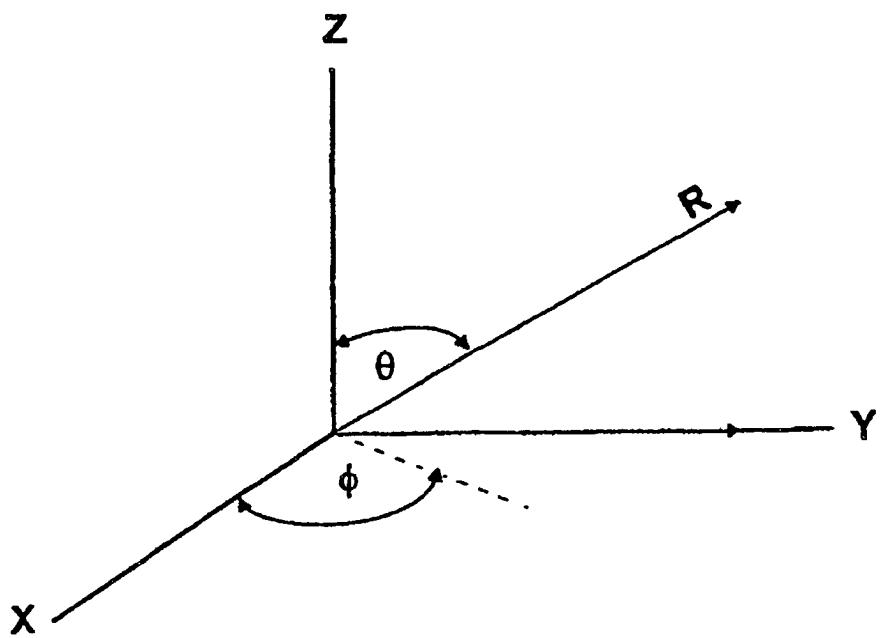
Figur 17



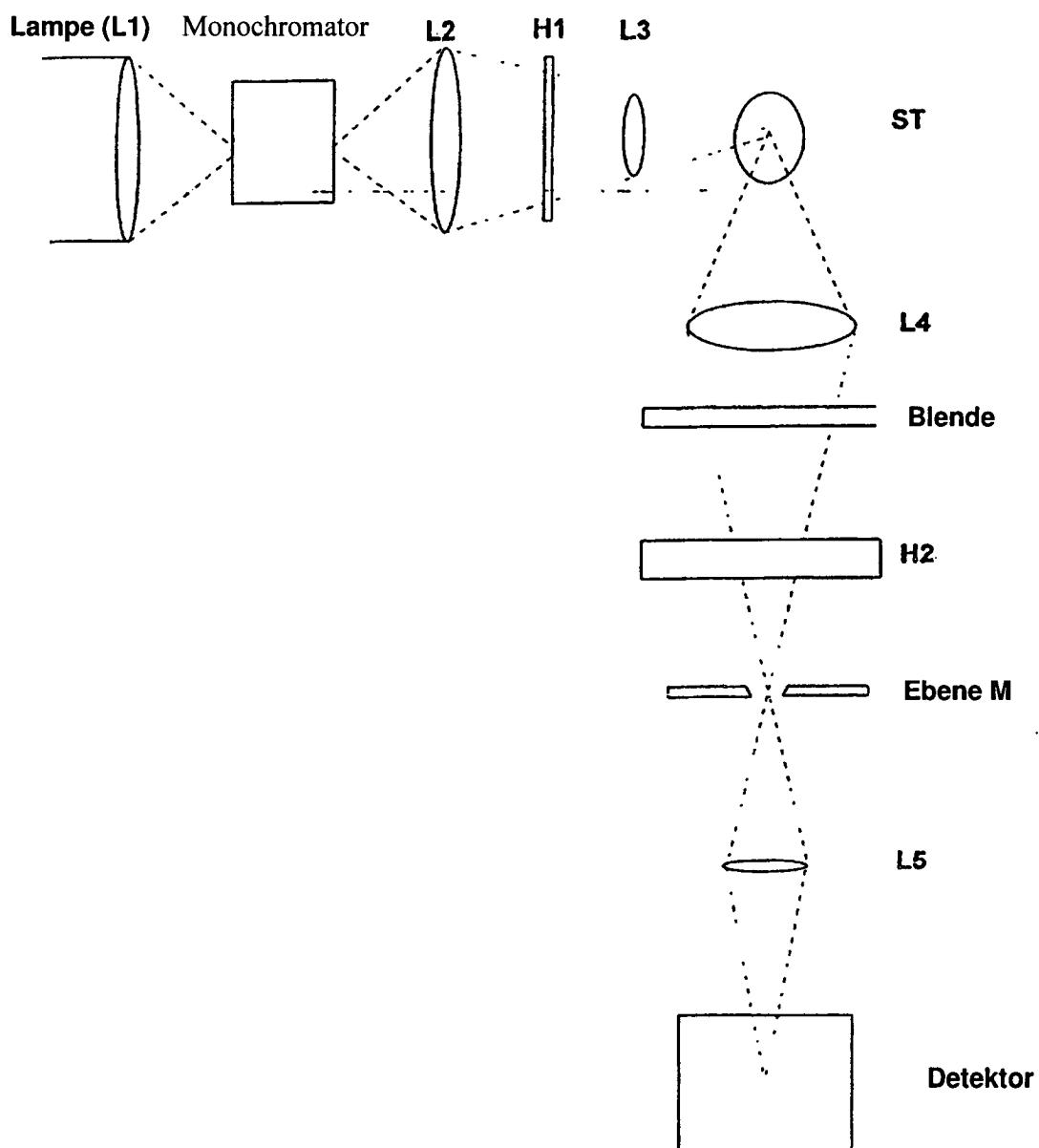
Figur 18



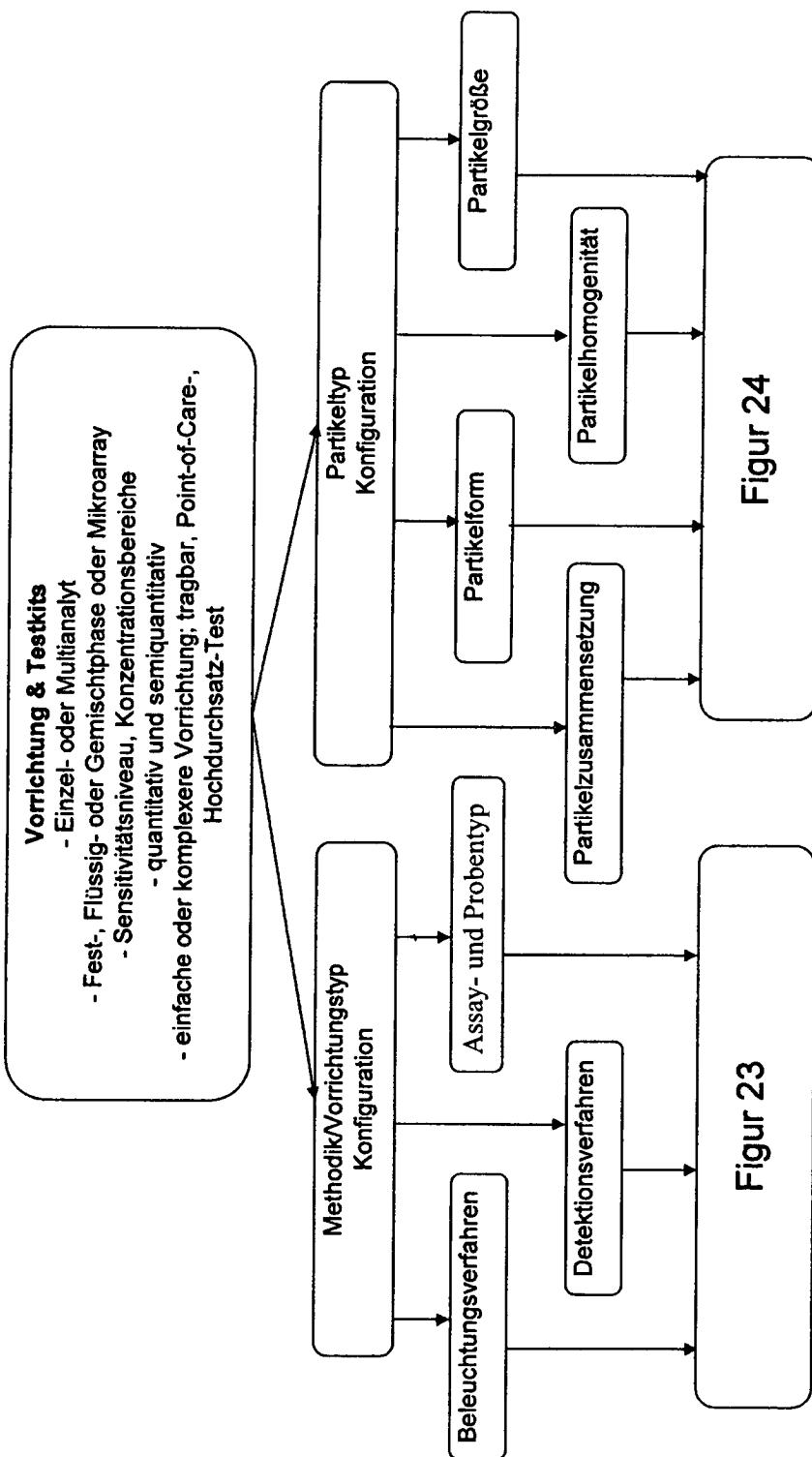
Figur 19



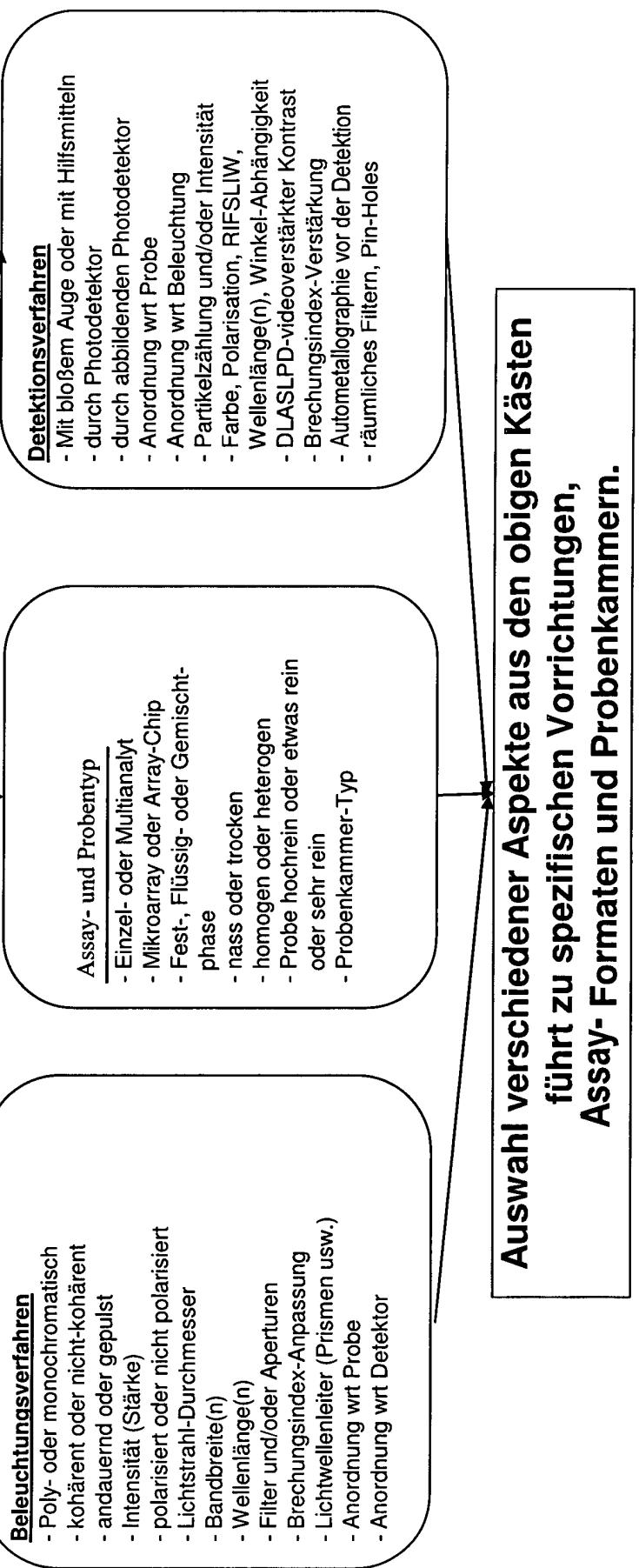
Figur 20



Figur 21

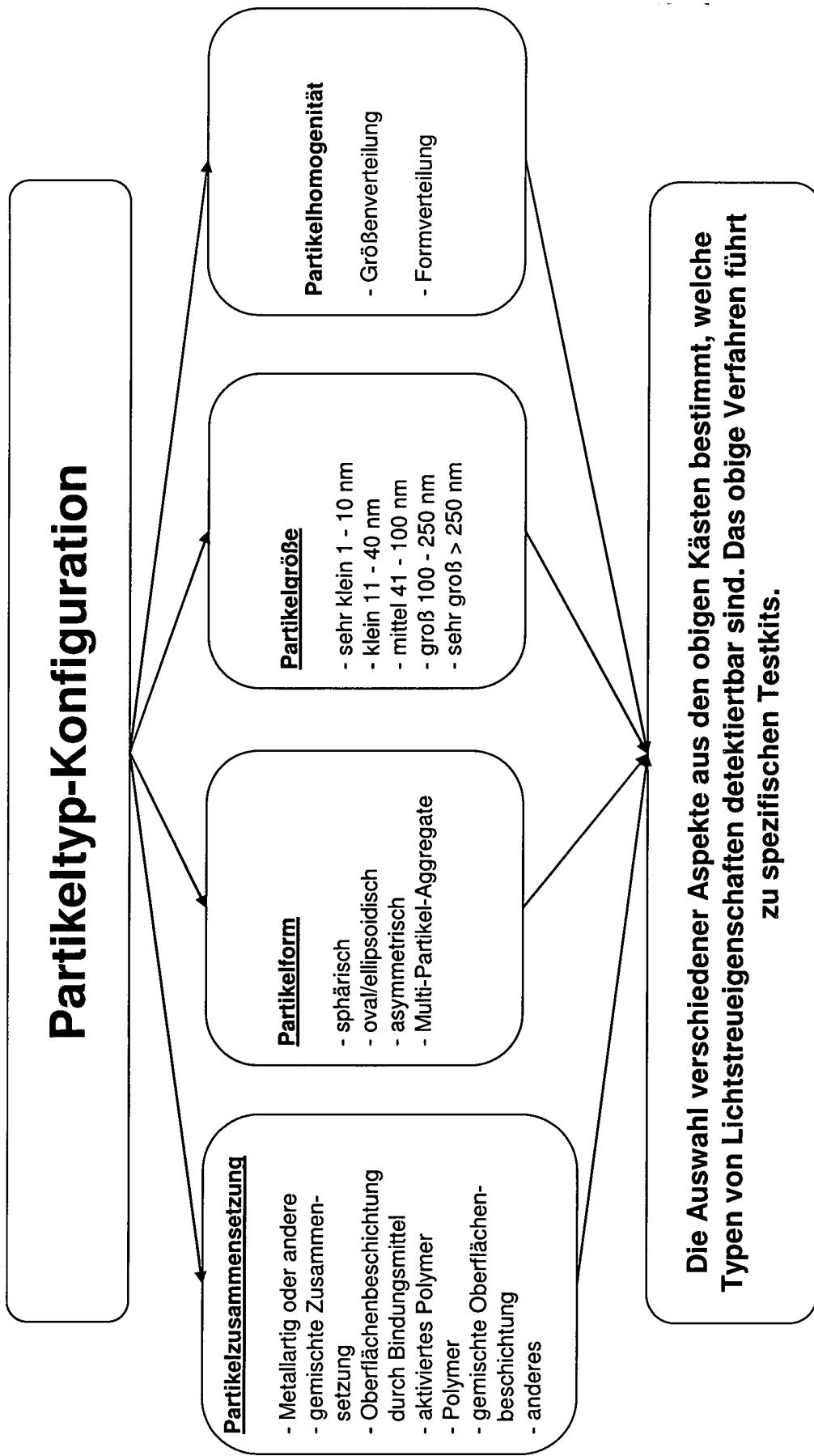
**Figur 22**

Methodik / Vorrichtungstyp-Konfiguration

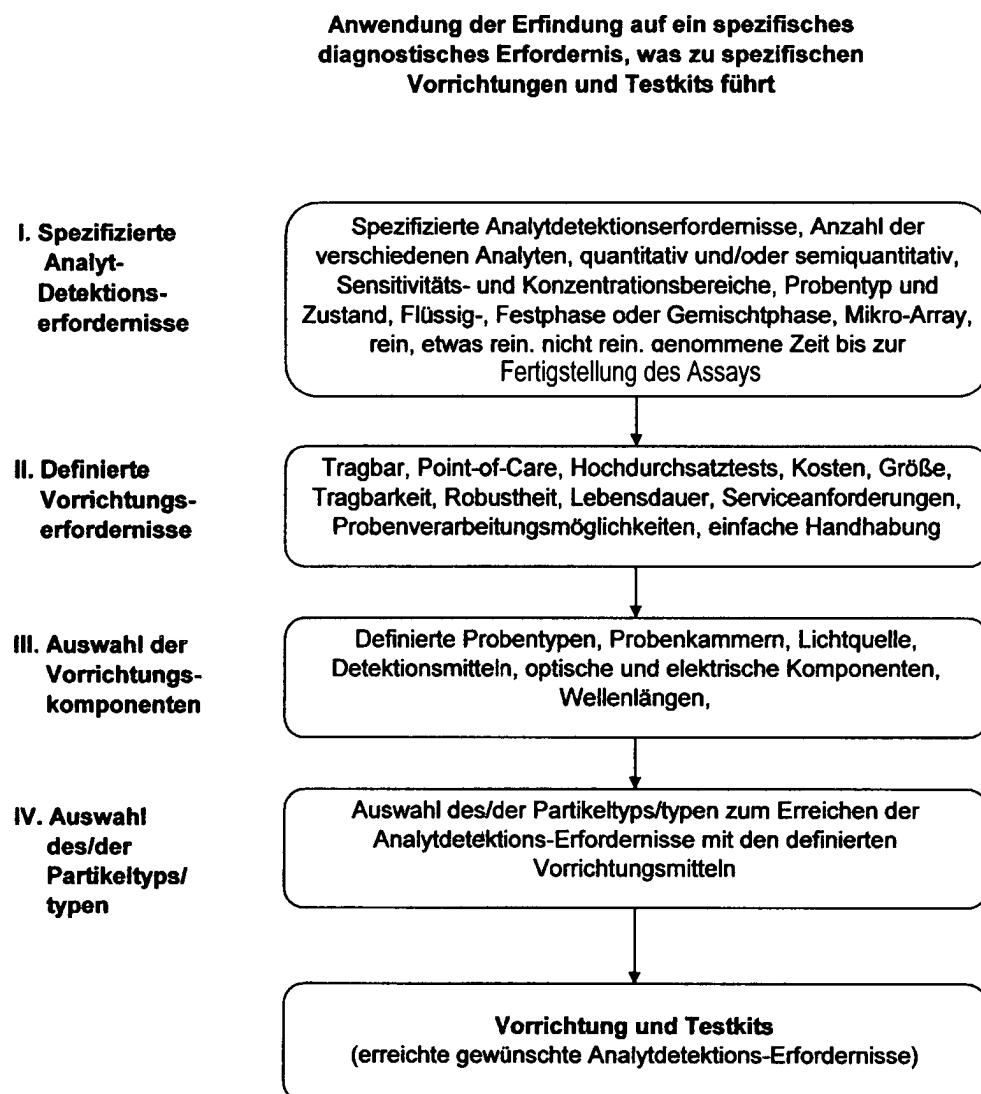


Auswahl verschiedener Aspekte aus den obigen Kästen führt zu spezifischen Vorrichtungen, Assay-Formaten und Probenkammern.

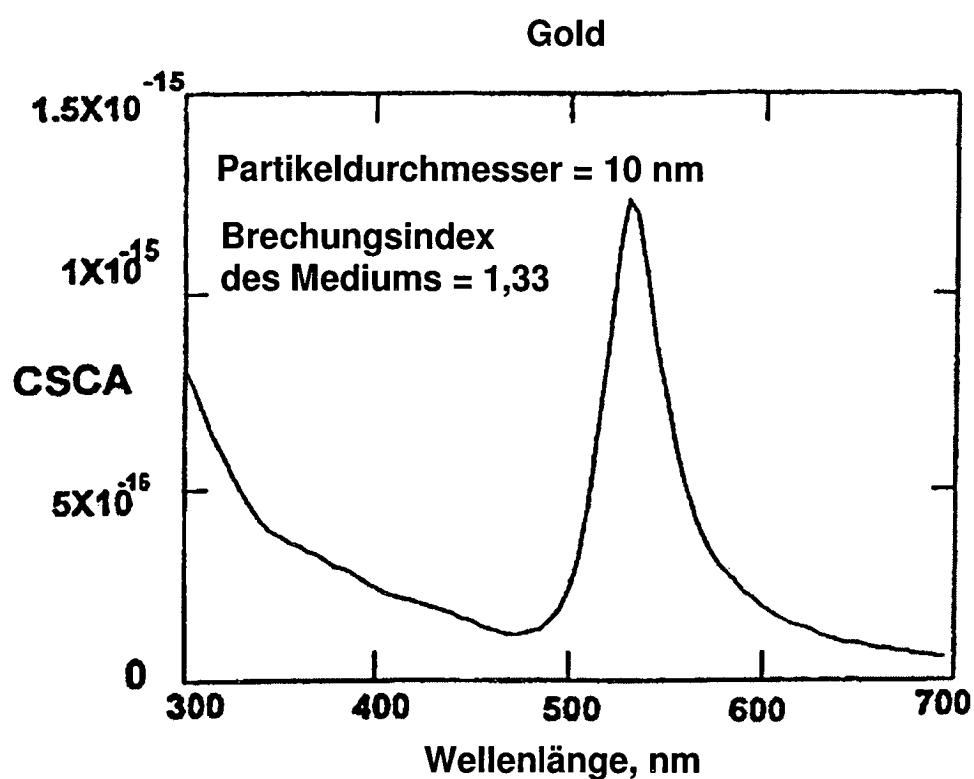
Figur 23



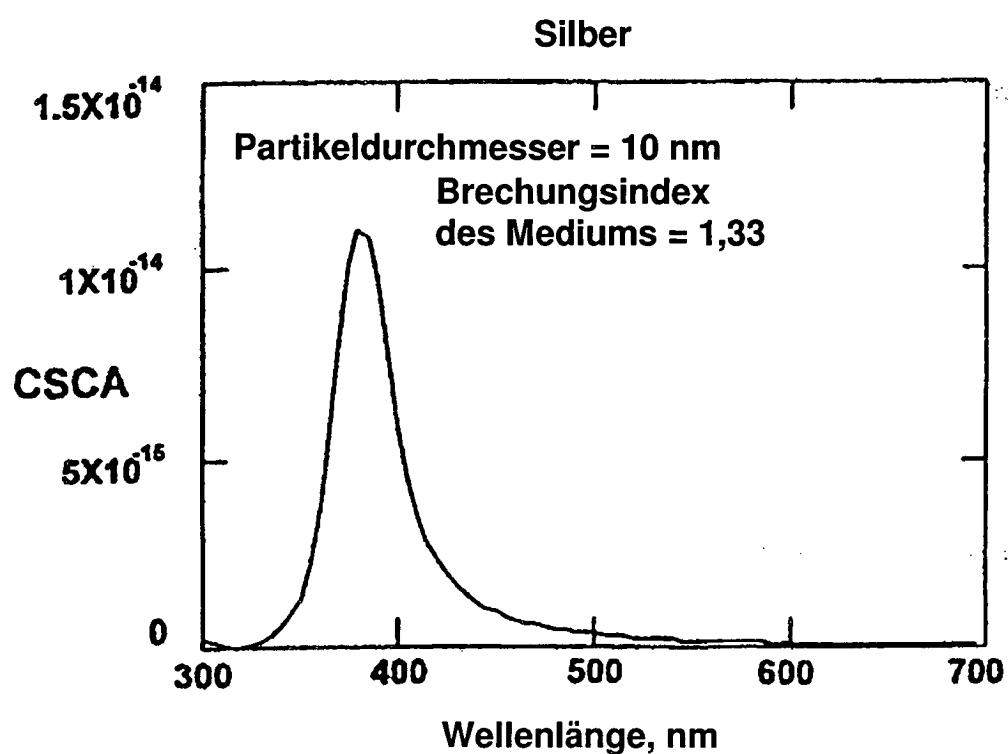
Figur 24



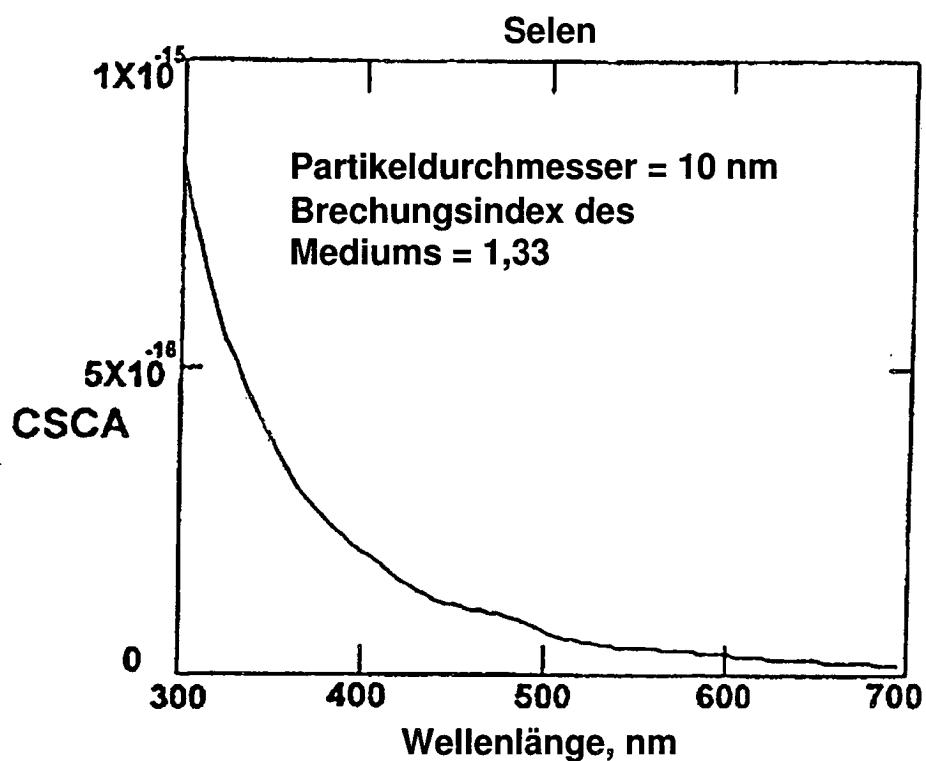
Figur 25



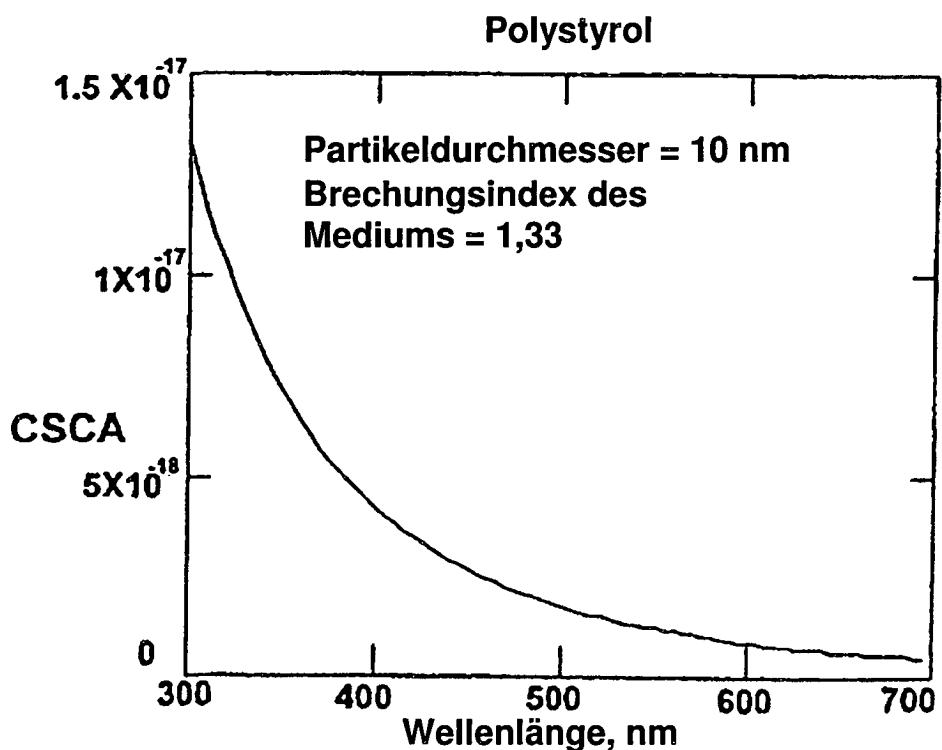
Figur 26A



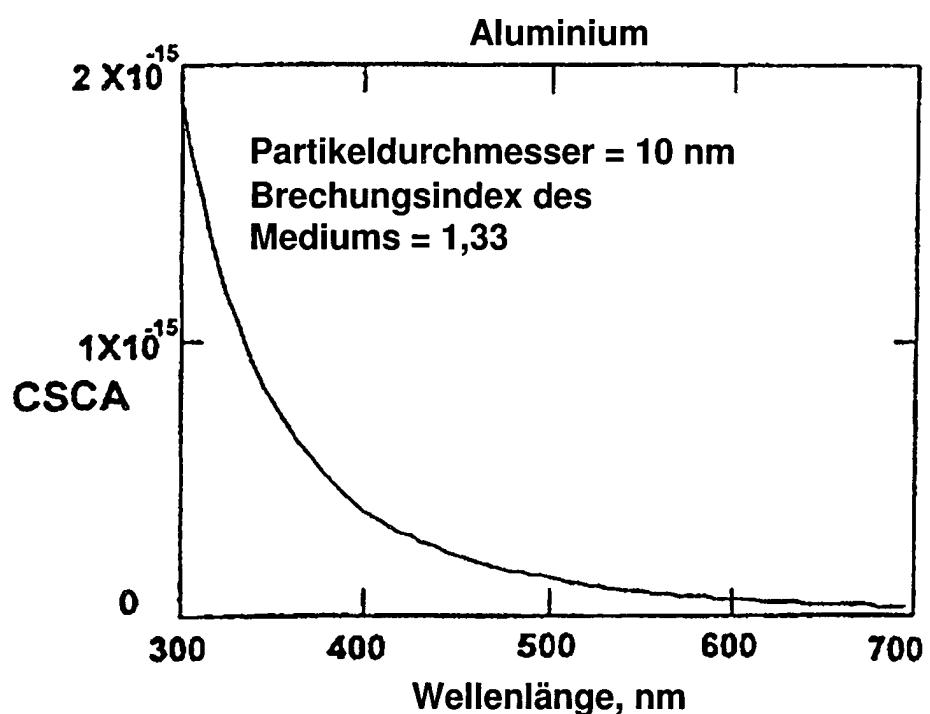
Figur 26B



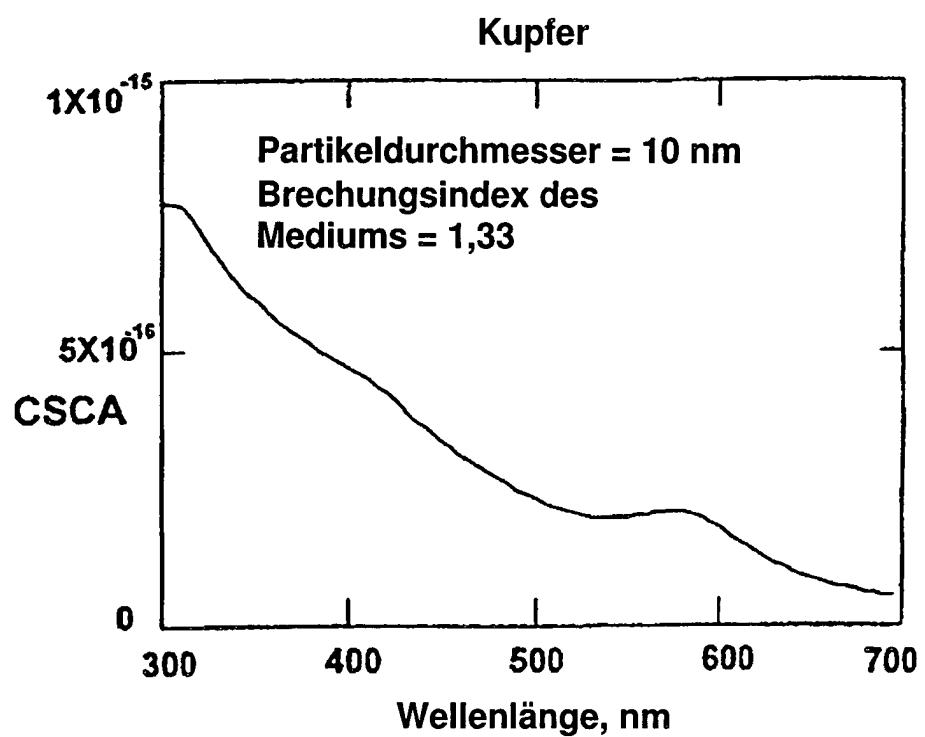
Figur 26C



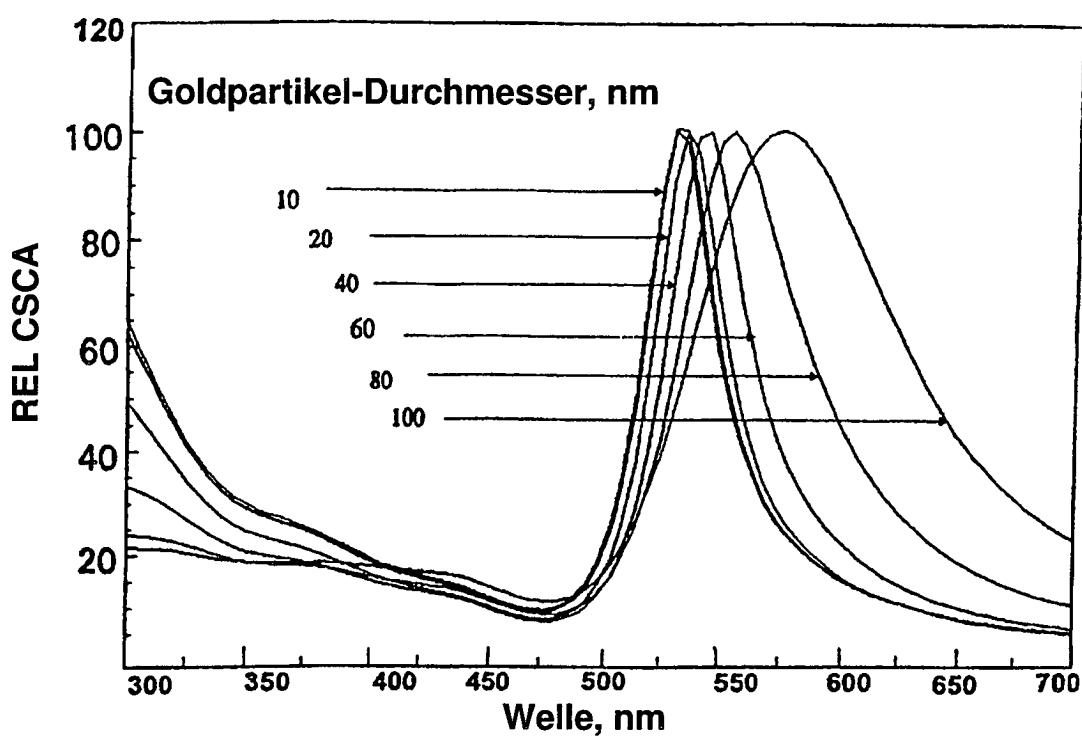
Figur 26D



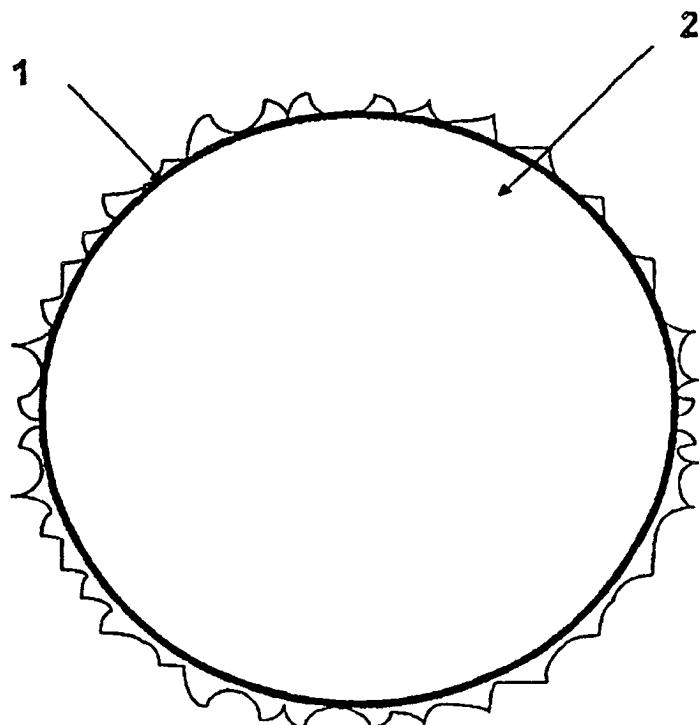
Figur 26E



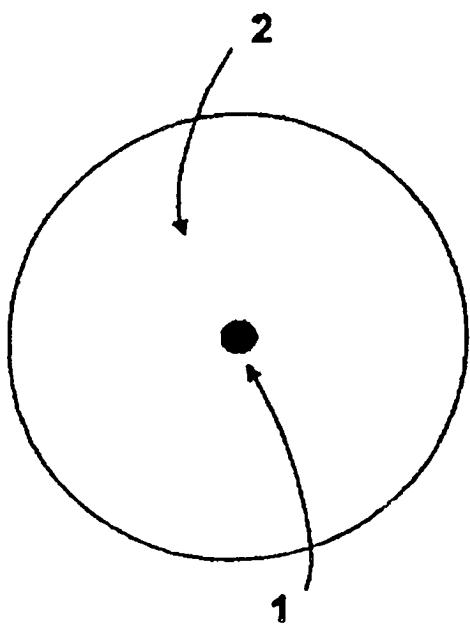
Figur 26F



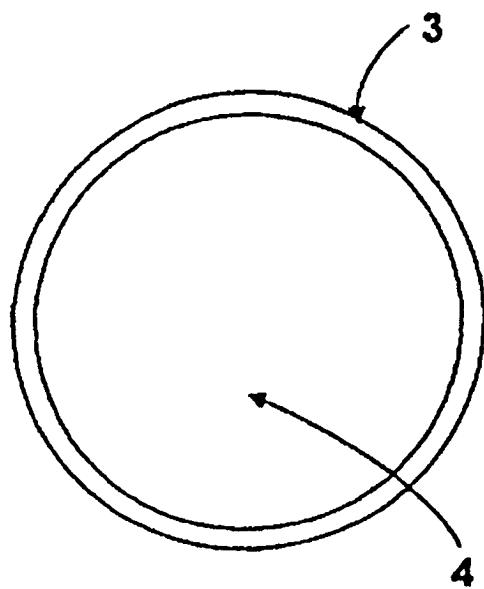
Figur 27



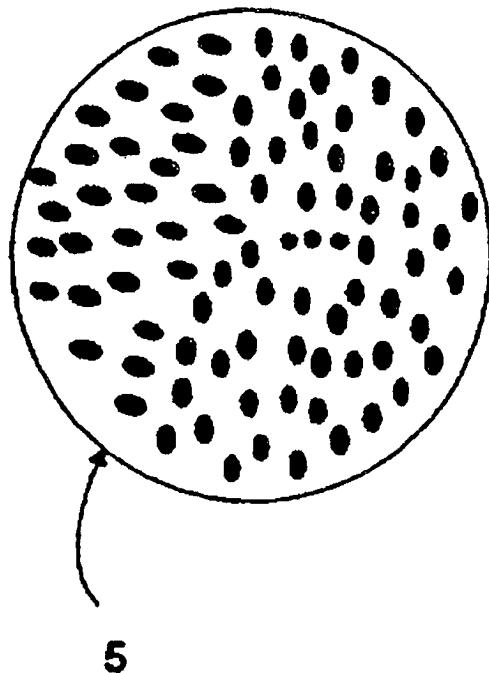
Figur 28



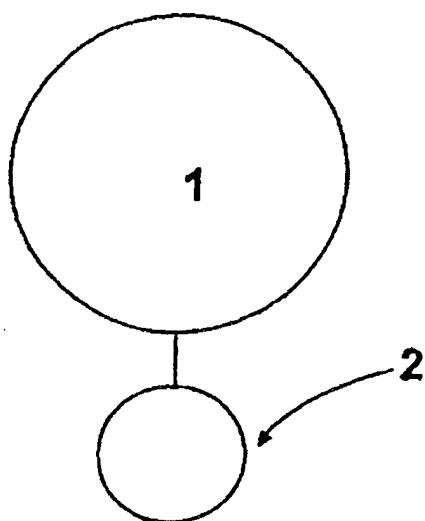
Figur 29A



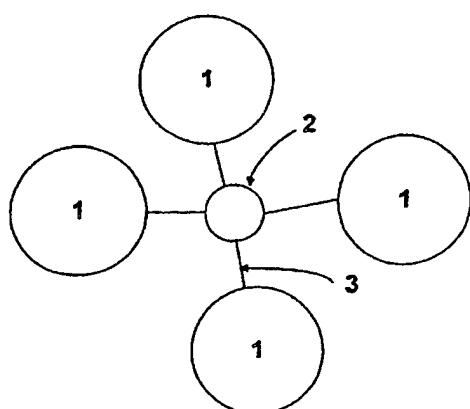
Figur 29B



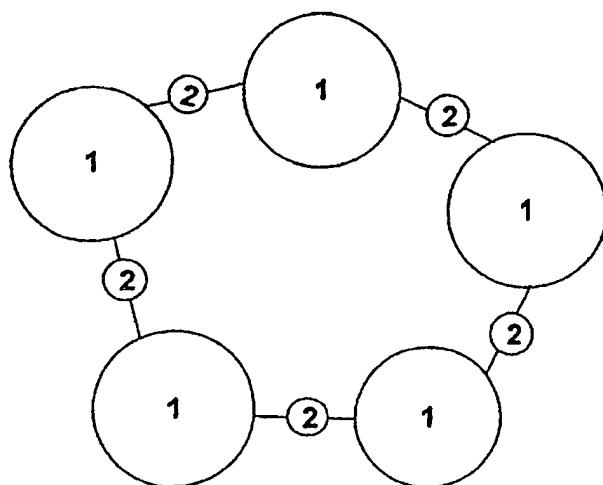
Figur 29C



Figur 30A



Figur 30B



Figur 30C