



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : G01N 33/58, 33/53, 21/76 G01N 33/543, 33/548, 33/538 G01N 33/52, 21/64</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/21530 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Oktober 1993 (28.10.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01115 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Mai 1992 (20.05.92) (30) Prioritätsdaten: P 42 12 148.5 10. April 1992 (10.04.92) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MESSERSCHMITT-BÖLKOW-BLOHM GMBH [DE/DE]; Robert-Koch-Straße, D-8012 Ottobrunn (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : CAMMANN, Karl [DE/DE]; Akazienstr. 1, D-4400 Münster (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).</p>		<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR INCREASING THE SENSITIVITY AND SELECTIVITY OF IMMUNO-ASSAYS, MOLECULE-RECEPTOR, DNA-COMPLEMENTARY DNA and FOREIGN MOLECULE-HOST MOLECULE INTERACTION ASSAYS

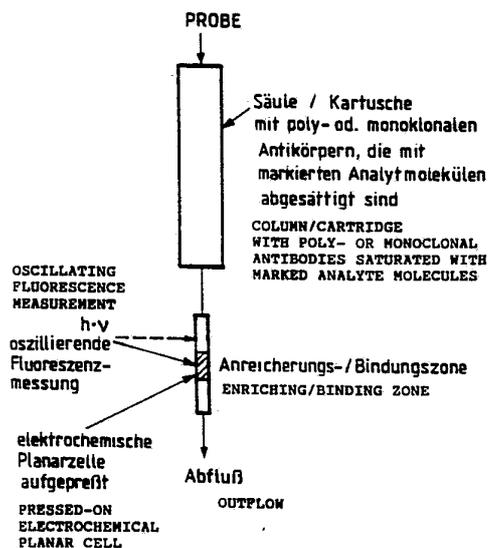
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR EMPFINDLICHKEITS- UND SELEKTIVITÄTSSTIEGERUNG BEI IMMUNO-ASSAYS, MOLEKÜL-REZEPTOR-, DNA-KOMPLEMENTÄR-DNA- UND GAST-WIRTSMOLEKÜL-WECHSELWIRKUNGS-ASSAYS

(57) Abstract

A process is disclosed for carrying out particularly sensitive immuno-assays and other assays that rely on molecule-receptor, DNA strand-complementary DNA strand and foreign molecule-host molecule interaction forces, with rapid and repetitive measurements of the current density or fluorescent light and double measurement and comparison/quotient calculation in at least two measurement zones or calibration in an analogue manner to the inner standard method, by using stable redox or IR-fluorescence marked analyte molecules in immuno-assays and the like.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA-Strang- sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskraften beruhen, mit schnellen und repetitiven Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei Immuno-Assays und ähnlichen Assays.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	MI	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

Verfahren und Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays

Die Erfindung richtet sich auf ein allgemein anwendbares Verfahren, das aus einer Kombination ausgewählter Schritte besteht und Vorrichtungen für extrem empfindliche und ungestörte Konzentrationsbestimmungen beliebiger Antikörper-Antigenpaar, komplementärer Molekül-Rezeptorpaare, komplementärer DNA-Stränge sowie selektiver Gast-/ Wirtsmolekülpaare. Ferner betrifft sie eine Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays.

Die quantitative Analyse komplexer Stoffgemische unter Ausnutzung der sehr selektiven Antikörper-Antigen-Bindung (Schlüssel-Schloß-Prinzip) und der DNA-Paarbildung bei den sog. DNA-Sonden ist in der Biochemie und klinischen Chemie eine etablierte Analysenmethode und dementsprechend weit verbreitet. Meist werden kompetitive Tests mit markierten Antigenen, Antikörpern oder DNA-Molekülen benutzt. Beim Radio-Immuno-Assay (RIA) ist das der Meßlösung zugesetzte Antigen (bzw. das Antikörpermolekül bei der Sandwich-Methode) radioaktiv markiert. Beim Enzym-Immuno-Assay (EIA oder das heterogene Enzym-Linked-Adsorbend-Assay, ELISA) ist an den betreffenden Markermolekülen ein sog. Marker-Enzym gebunden. Diese markierten Moleküle konkurrieren mit den zu messenden, unmarkierten Molekülen (zu bestimmender Stoff = Analyt) um die Bindung an den meist trägergebundenen Antikörper (bzw. DNA-Sequenz), so daß sich die unbekannte Menge Antigen (DNA-Art und Menge) bestimmen läßt, wenn zum Ver-

2

gleich ein Test mit einem Antigen (DNA-Molekül) bekannter Konzentration durchgeführt wird. Die Meßsignale sind bei dieser Methode umgekehrt proportional zur Konzentration. Bei den sog. Sandwichtests werden markierte Antikörper benutzt. Diese binden sandwichartig an Antigenmoleküle an, die ihrerseits zuvor konzentrationsabhängig an trägergebundene Antikörper gebunden sind.

Die sehr spezifische Bindung zweier komplementärer Moleküle erlaubt natürlich auch umgekehrt die quantitative Bestimmung des größeren Partners (Antikörper-, Rezeptor-Analyse resp. des komplementären DNA-Moleküls (oder Bio-Oberfläche), welches mindestens in einem Teilbereich eine komplementäre DNA-Sequenz zur markierten Sequenz aufweist) und sind daher die wichtigsten biochemischen Analysenverfahren. Nachdem es inzwischen möglich ist, auch für kleinere Moleküle (Haptene) monoklonale Antikörper in beliebigen Mengen zu produzieren, werden diese immunologischen Methoden auch für die Umweltanalytik zunehmend bedeutsam. Beispielsweise kann man unter Verwendung monoklonaler Antikörper für die verschiedenen Dioxine die gesamten Analysenkosten dadurch erheblich senken, daß nur bei positivem Ergebnis des immunologischen Tests die sehr teure GC-MS Analyse durchgeführt werden muß (Screening).

Die inzwischen traditionellen immunologischen Bestimmungsverfahren (RIA und EIA bzw. ELISA) weisen erhebliche Nachteile auf, die hinlänglich bekannt sind. Entweder treten wegen der Verwendung radioaktiven Materials Entsorgungs-, Versand- und Lagerprobleme auf oder man muß mit einer Beeinflussung der immunologischen Reaktion durch das meist, verglichen zum relativ kleinen Antigenmolekül, voluminöse Enzymmolekül rechnen. Enzymmarkierte Antigen- oder Antikörpermoleküle (bzw. eines der Partner von Molekül-Rezeptor-, Gast-Wirtsmolekül-, DNA-komplementär DNA-Wechselwirkungsmethoden) weisen alle Nachteile enzymatischer Verfahren auf. Die Lebensdauer des Enzyms ist begrenzt und die enzymatische Reaktion (Biokatalyse) kann bei unbekanntem Umweltmatrices durch Inhibitoren oder Enzymgifte (z.B. Schwermetalle) empfindlich gestört werden, so daß falsche Ergebnisse auftreten. Meist muß die enzymmarkierte Verbindung aus Stabilitätsgründen kühl gelagert werden. Wegen dieser abnehmenden Aktivität

sind zusätzliche Kalibrierschritte erforderlich und die GLP-Richtlinien (Gute Labor Praxis), die bei quantitativen Analysen eingehalten werden müssen, erfordern durch Rückstellproben eine Menge der teureren Enzym-markierten Verbindungen. Auch ist eine Phasentrennung erforderlich, ein Substrat muß zugegeben werden, wodurch die Handhabung sehr kompliziert wird. Die erforderlichen Arbeitsschritte benötigen i.d.R. einige Stunden. Ohne Phasentrennung laufen die sog. homogenen Enzym-Immuno-Assays (EMIT) ab, die kompetitiv arbeiten und sich nur für kleine Antigenmoleküle eignen.

Über eine einfache und allgemein anwendbare analytisch-chemische Ausnutzung selektiver Molekül-Rezeptor Wechselwirkungskräfte, DNA-Paarbildungsreaktionen sowie der gleichermaßen selektiven Gast-Wirtsbeziehungen der supramolekularen Chemie zum Zwecke einer quantitativen Bestimmung oder gar zum Aufbau von entsprechenden Sensoren existieren nur wenige Vorarbeiten.

Der vorteilhafte Aufbau eines einfachen und preiswerten elektrochemischen Meßsystems, das in Form der Potentiometrie oder Amperometrie den geringsten apparativen Aufwand erfordert, scheidet in der Regel daran, daß der zu bestimmende Stoff (Analyt) nicht als potentialbestimmendes Ion, sondern als neutrales Molekül vorliegt bzw. nicht elektrochemisch selektiv umgesetzt werden kann. Die Verwendung optischer Methoden (Spektralphotometrie, Fluoreszenzmessung, Ellipsometrie, Surface Plasmon Resonance Spektroskopie, Methode der evaneszenten Welle, usw.) zur Erfassung der oben erwähnten spezifischen Molekül-Wechselwirkungen ist beschrieben worden. Einige können die immunologische Reaktion auch ohne markierten Partner aufgrund der Änderung des Brechungsindex an einer Phasengrenze erfassen, haben aber große Probleme bei kleinen Analytmolekülen (wie in der Umweltanalytik üblich) im Spurenbereich (< 1 ppm), da die nichtspezifische Bindung von störenden Begleitstoffen, die sogar meist in einem großen Überschuß neben dem Analyten in einer realen Probe mitanwesend sind, empfindlichkeitslimitierend ist.

4

Optische Verfahren mit den üblichen Fluoreszenzmarkern, die eine Anregungswellenlänge im UV oder sichtbaren Bereich erfordern, benötigen einen hohen apparativen Aufwand, der einer weitverbreiteten Routineanwendung im Wege steht. Der Aufwand zur Stabilisierung der Lichtquelle, zur Monochromatisierung mittels eines streulichtfreien Monochromators, zur Vermeidung von Fremdlichteinflüssen, zur Empfindlichkeitssteigerung etc. erfordert apparative Aufbauten, die sehr komplex und damit teuer sind. Außerdem werden neben den fluoreszierenden Molekülgruppen des Markers auch viele Stoffe in typisch biologischen Matrices mitangeregt (z.B. Tryptophan u.a.), so daß ihre Fluoreszenz nicht von der des Markermoleküls unterschieden werden kann, was die Nachweisgrenze extrem verschlechtert. Lediglich die Markierung mittels spezieller Fluoreszenzmarker, die nach der Methode der zeitverzögerten Fluoreszenz arbeiten, kann diese Probleme umgehen. Diese Methode benötigt aber teurere Geräte und wird praktisch nur mittels sog. Enhancement-Schritte zur Steigerung der Empfindlichkeit durchgeführt, was aber einen zusätzlichen Arbeitsgang bedeutet.

In der deutschen Patentanmeldung DE 3916432 A1 von 1990 wird ein potentiometrisches Verfahren zur Detektion einer Immuno-Reaktion zwischen unmarkierten komplementären Partnern beschrieben, welches aber ebenfalls bei kleineren Analytmolekülen in einem Bereich unter 1 ppm anwendbar ist.

Bei Immuno-Assays, die wie die Affinitätschromatographie betrieben werden und bei denen eine Verdrängungsreaktion mit einem markierten Analytmolekül ausgenutzt wird, beschreibt der Stand der Technik bisher nur Messungen mittels Durchflußmeßzellen, bei denen die Wechselwirkungszeit (=reine Meßzeit) mit den messenden Größen (Licht, Strom etc.), durch die Strömungsgeschwindigkeit vorgegeben, relativ kurz (nur wenige Sekunden) ist. Eine derartig kurze Meßzeit erlaubt vor allem bei Durchflußmessungen keine hohe elektronische Dämpfung. Daher sind der elektronischen oder optoelektronischen Verstärkungstechnik durch das in den empfindlichsten Bereichen stark abfallende Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R-Verhältnis) Grenzen gesetzt. Ebenfalls unmöglich sind bei dem schnellen Durchströmen der markierten Substanz durch den Durchfluß-De-

ERSATZBLATT

tektor Wiederholmessungen, die sich bei Mittelwertbildung ähnlich positiv auf das S/R-Verhältnis auswirken. Darüber hinaus benötigen Wiederholmessungen einen Bezugspunkt, d.h. eine Untergrundmessung (Blindwertmessung oder engl. blanc value), die eine entsprechende Vorrichtung verlangt.

Über eine einfache und quasi automatische Abtrennung der ebenfalls aus der immunologischen Reaktionszone austretenden Probenmatrix mit störenden Komponenten wird außer im Zusammenhang mit den heterogenen ELISA-Techniken, die einen zusätzlichen Abtrennungsschritt vorschreiben, im Stand der Technik nichts berichtet. Dies ist aber für richtige Messungen von zentraler Bedeutung und unabdingbare Voraussetzung bei repetitiven Messungen, bei denen sich natürlich Fehlmessungen ebenfalls addieren.

Eine Gleichstellung von Immunoreaktionen mit Rezeptorreaktionen bzw. DNA-Paarbildung und molekülerkennenden Gast-/Wirtsmolekül-Einlagerungen bezüglich der erfindungsgemäßen, allgemein gültigen, sensorisch ausnutzbaren Anordnung wurde bisher nicht beschrieben, da die Markierung mit einem voluminösen Enzym diese selektiven Bindungsreaktionen sehr stark behindert (sterische Behinderung). Dies ist bei den relativ kleinen Redox-Systemen oder IR-fluoreszierenden Molekülen nicht der Fall.

Es besteht daher ein Bedürfnis für ein generell anwendbares Verfahren und eine Vorrichtung, die die bekannten Nachteile der direkt anzeigenden und auch der mit markierten immunologischen Partnern ablaufenden Verfahren (alle derzeitigen Immuno-Assays) vermeidet.

Die Aufgabe der Erfindung, die Empfindlichkeit zu erhöhen bei gleichzeitiger Verminderung der bekannten Querstörungen aller traditionellen Immuno-Assays und ähnlicher Verfahren, wird erreicht insbesondere durch die ausgewählte Kombination von mehreren Verfahrensschritten gemäß Anspruch 1. Zur Erzielung der geforderten extrem niedrigen Nachweisgrenze im Spurenanalysenbereich werden erfindungsgemäß anstelle der anfälligen und ungenauen enzymatischen Signal-Verstärkungsmethoden repetitierbare elektrochemische und optische Meßmethoden zusammen mit einer speziellen

6

elektronischen Signalaufbereitung (Signal-Mittelwertsbildung) und entsprechenden Meßanordnungen angewandt.

Der zu bestimmende Immuno-Partner (Antigen oder Antikörper, Molekül oder dazugehöriger Rezeptor, Gastmolekül oder dazugehöriges Wirtsmolekül, DNA-Strang und dazugehörige komplementäre Sequenz) wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder mit einem stabilen Redox-System oder einer stabilen, im Infrarotbereich (> 700 nm) fluoreszierenden Verbindung haltbar (z.B. kovalent gebunden) verbunden. Die Auswahl dieser beiden Marker-Molekülsorten erfolgte nach umfangreichen Vorversuchen und an Hand bestimmter Kriterien, die hiermit offenbart werden. Als Redox-Systeme eignen sich vorzugsweise anorganische oder organische Systeme mit hohen Standardaustauschstromdichten an inerten Metallelektroden. Bei den Fluoreszenz-Markern sind Moleküle, die mit preiswerten Laserdioden zur Fluoreszenz im fernen Infrarot (> 800 nm) angeregt werden können, die vorteilhaftesten Markermoleküle.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfacher, empfindlicher, schneller, richtiger und daher letztendlich auch preiswerter als alle bisher beschriebenen Immuno-Assays. Vorteilhafter ist auch die direkte, extrem empfindliche und schnelle Erfassung von kleineren Antigenen, die nach den oben erwähnten Offenlegungsschriften mit den dort beschriebenen Verfahren nur mangelhaft oder überhaupt nicht möglich ist. Gerade hier existiert aber ein großer Anwendungsbereich für die neue Molekülanalytik (Schadstoffanalytik) vor allem im Bereich des Umweltschutzes oder der Überwachung von maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen sowie der klinischen Chemie (medizinischen Diagnose, Pathologie, Gerichtsmedizin).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann unterschiedlich durchgeführt werden:

In einer vorteilhaften Version wird das markierte Analytmolekül zuvor an dem immobilisierten Partner gebunden. Das unmarkierte Analytmolekül in der Probe verdrängt bei Kontakt mit den gebundenen, markierten Partnern sein markiertes Gegenstück (redox- oder fluoreszenzmarkiertes Antigen- oder Antikörpermolekül = markiertes Analytmolekül) aus der Oberflä-

chenbindung, welches dann durch eine Flüssigkeitsströmung wegtransportiert wird.

In einer anderen Version wird der Probe das markierte Analytmolekül in einem bekannten Verhältnis zugesetzt und man läßt die Mischung mit den immobilisierten Immuno-Partnern (worunter alle oben erwähnten komplementären Systeme zu verstehen sind) in Wechselwirkung treten. Je nach der Konzentration des Analyten werden unterschiedliche Mengen des markierten Analytmoleküls kompetitiv gebunden, wobei eine umgekehrte Relation besteht. Bei beiden Versionen werden die nichtgebundenen oder freigesetzten markierten Analytmoleküle auf kleinstem Raum wieder mittels des betreffenden immunologischen (komplementären) Partners, der immobilisiert oder örtlich begrenzt und fixiert vorliegt, gesammelt, aufkonzentriert und durch Spülen von anhaftender Probenmatrix gereinigt.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der eine elektrochemisch und optisch zugängliche Oberfläche vorliegt, kann aber auch der Teil vermessen werden, der nicht der Eluatsammlung entspricht. Beim kompetitiven Test, bei dem die Oberfläche der Vorrichtung vor Kontakt mit der Probe mit immobilisierten Partnermolekülen bedeckt ist, die mit ihrem markierten Komplementärmolekül abgesättigt sind, kann auch die Abnahme der Intensität der Markierung gemessen werden, die der Analytmenge proportional ist. Bei dem anderen kompetitiven Test, bei dem markierte und unmarkierte Analytmoleküle zusammen zu den immobilisierten Komplementärmolekülen, die freie Bindungsstellen haben, zugesetzt werden, ist die Zunahme an markierten Molekülen in diesem Oberflächenbereich der Konzentration des Analyten umgekehrt proportional. Hier ist die Menge der markierten Moleküle, die die immunogene Zone ungebunden passieren, der Analytmenge direkt proportional. Bei der Messung zugänglichen Oberflächen kann man also bei einer derartigen immunologisch-analytischen Vorrichtung das Analysenergebnis doppelt (redundant) erhalten. Diese zweifache Bestimmungsmöglichkeit ist neu und verbessert die Zuverlässigkeit des gesamten Immuno-Assays erheblich. Fehler und Störungen können durch die mangelnde Übereinstimmung dieser beiden Meßwerte sofort erkannt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren läuft auf eine Doppelbestimmung des Analyten hinaus. Die Abnahme der über die immunogene Zone integrierten Signalintensität (konzentrationsproportional) muß bei einem Verdrängungssay der betreffenden Zunahme in der "Molekülfänger"-Zone (s. Abb. 2) entsprechen. Analoges gilt auch für die Methode, bei der das markierte Analytmolekül vor jeder Analyse der Probe in einem bekannten Verhältnis beigemischt wird. Durch ein Auffangen der nichtgebundenen markierten und unmarkierten Analytmoleküle in einer speziellen Fängerzone läßt sich aus der dort meßbaren Konzentration an markierten Analytmolekülen direkt auf die Konzentration der unmarkierten Analytmoleküle, die in der Probe vorliegen, schließen. Je höher die Konzentration an markierten Analytmolekülen nach dem Durchströmen der immunogenen Zone, desto höher die Analytkonzentration in der Probe.

Ein weiterer Vorteil (empfindlicher und ungestörter als bisherige Verfahren auf nicht enzymatischer Basis) der Erfindung ist die Abtrennung der nicht spezifisch gebundenen Matrixsubstanzen vor der eigentlichen Messung sowie die Sammlung oder Anreicherung der markierten Moleküle auf einer flachen Oberfläche, auf der unmarkierte Partnermoleküle mit freien Bindungsstellen fest angebonden sind, so daß sie die markierten Partner, die den anderen immunologischen Bindungsbereich ungebonden durchlaufen haben oder dort durch den unmarkierten Analyten freigesetzt (aus der Bindung verdrängt) wurden, spezifisch anbinden. Die auf einer flachen Oberfläche angebondenen markierten Analytmoleküle, deren Menge nach Kalibration eine Information über die in der Probe vorliegenden (unmarkierten) Analytmoleküle erlaubt, können dann, je nach Art der Markierung, elektrochemisch oder optisch bestimmt werden, wobei sowohl lange Meßzeiten mit hoher Dämpfung als auch zyklische oder repetitive Messungen mit elektronischer (oder rechnergestützter) Mittelwertbildung möglich sind. Nach den Gesetzen der Statistik läßt sich durch N Messungen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um den Faktor Wurzel-N verbessern.

Anstelle der spezifisch bindenden Immuno-Partner-Moleküle mit freien Bindungsplätzen als selektive "Molekülfänger" nach der primären kompetitiven Immuno-Reaktion können auch andere Sammelphasen verwendet werden.

Bei lipophilen Analytmolekülen reicht dazu eine zu durchströmende Zone, die mit Öl oder Wachs (oder PVC plus Weichmacher o.ä.) getränkt ist, aus. Alternativ kann dafür auch ein Material verwendet werden, daß in der reversed phase Chromatographie üblich ist (z.B. RP-18 stationäre Phase). Das letztere bietet sich insbesondere an, wenn ionisch vorliegende Analytmoleküle festgehalten werden sollen. Hier gibt man der Fließlösung ein entsprechend geladenes, lipophiles Gegenion zu. Dadurch kommt es zu einer Ionenpaarbindung im Öl oder Fett, welche eine Erschwerung der Passage der markierten Analytmoleküle durch diese Molekülfängerzone bewirkt. Sie werden sich bei einer strömenden Trägerlösung gegen Ende der lipophilen Zone anreichern und können so der empfindlichen Messung zugänglich gemacht werden.

Eine besonders einfache und elegante Vorrichtung stellt in diesem Zusammenhang mit der Erfindung die Verwendung von teststreifenähnlichem chromatographischen Material dar. Hier kann sowohl die Papierchromatographie (erweitert um die Membranfiltermaterialien auf Celluloseacetat, -nitrat o.ä. Basis) als auch die Dünnschichtchromatographie Material-Lieferant (s. Abb. 2) sein. Die Produktion der erfindungsgemäßen Vorrichtungen geschieht denkbar einfach und rationell. Im Bereich der umweltanalytischen Anwendung des hier offenbarten Verfahrens werden die entsprechenden poly- oder monoklonalen Antikörper bzw. F_{ab} -Fragmente mit Hilfe bekannter Bindungstechniken (kovalente Immobilisierung mittels Spacermoleküle und F_c -Teil bindenden Komponenten) richtig orientiert (Bindungsstellen nach außen) auf über 75 % der Teststreifenfläche aufgebracht. Nach Fixierung dieser analyterkennenden Makromoleküle auf der Teststreifenoberfläche wird der Anfangsbereich in eine Lösung getaucht, die nur markierte Analytmoleküle enthält. Dadurch werden alle Bindungsstellen mit diesem markierten Analytmolekül abgesättigt. Die Länge dieser immunogenen Zone entspricht dabei der Größe des Meßbereichs. Danach wird gründlich gespült, um rein adsorptiv gebundene, markierte Analytmoleküle zu entfernen. Der Rest des Teststreifens enthält nunmehr die analyterkennenden Antikörpermoleküle (oder bei den anderen analogen Reaktionen, die entsprechenden DNA's oder Wirtsmoleküle) mit freien Bindungsstellen und dient als Molekülfänger für die spätere Messung. Zum Abschluß dieser

10

Sammelzone kann vorteilhafterweise eine dünne Zone mit Dialysier-Eigenschaften verwendet werden.

Dadurch wird erreicht, daß der fließende Grundelektrolyt (durch die Art der Antikörpermoleküle bestimmt) zwar diese Zone passieren kann, die größeren markierten Analytmoleküle aber zurückgehalten werden und dadurch in einer extrem kleinen Zone auch angereichert werden. Diese Anordnung kann auch in durchsichtigen Glasröhren oder preiswerteren Plastikröhren, gefüllt mit dem betreffenden chromatographischen Material, durchgeführt werden. Falls diese Röhre mit der Dialysiermembran abgeschlossen wird, kann man auch auf andere Sammelzonen verzichten. Hier muß nur der ungehinderte Zugang der optischen Strahlengänge garantiert werden, die hier vorzugsweise nicht seitlich der Röhre sondern axial angebracht werden. Bei redoxmarkierten Analytmolekülen wird diese Dialysierfolie demontierbar angebracht, so daß deren Innenseite mit den aufgesammelten, markierten Analytmolekülen, die in der primären Immunozone analytproportional freigesetzt worden sind, der planaren elektrochemischen Zelle zugänglich gemacht werden. Selbstverständlich kann letztere auch zuvor durch mikroelektronische Methoden fest auf die Innenseite der Dialysierfolie aufgebracht sein.

Die Elektrodenflächen sind miniaturisiert und erfordern nur minimale Edelmetallmengen, so daß auch in diesem Fall die Prüfröhrchen-ähnlichen Gebilde nach einer Messung verworfen werden können. Die Röhrenanordnung erfaßt wegen der größeren Menge an immobilisierten analyterkennenden und -bindenden Antikörpermolekülen einen größeren Konzentrationsbereich des Analyten, d.h. die Kalibrierkurve geht später als bei den planaren Anordnungen in einen Sättigungsbereich über. Die Auswertung kann auch über die verdrängten Strecken (oder integriert davon) erfolgen (s. Abb. 2). Dazu kann ein preiswerter Laserdioden Scanner verwendet werden.

Zur Anreicherung der freigesetzten oder nicht gebundenen markierten Analytmoleküle kann sowohl bei der Verdrängungsmethode als auch beim kompetitiven Verfahren (jeweiliger Zusatz von markierten Analytmolekülen zu Beginn des Assays) auch eine freie Endzone der oben erläuterten An-

11

ordnungen dienen, bei der aber das Lösungsmittel verdampft. Die ausgewählten, stabilen Redox-Marker-Moleküle sowie die IR-Fluoreszenzmoleküle vertragen dabei auch Temperaturerhöhungen. Bei Antikörperverträglichkeit lassen sich auch leichter verdampfbare Lösungsmittel zu Effizienzsteigerung verwenden, wobei auch eine Zudosierung nach der primären immunogenen Zone möglich wird. Wichtig ist, daß die Verdampfung zur Konzentrierung der Markermoleküle auf eine kleine Zone (Bereich) beschränkt wird. Weil dadurch das Lösungsmittel die zu detektierenden Moleküle dorthin transportiert bevor es verdampft und seine Transportfracht dort zurück läßt. Die Abb. 1 bis 2 verdeutlichen anhand von Skizzen die verschiedenen Anordnungsmöglichkeiten.

Die erfindungsgemäß optimierte elektrochemische Meßmethode stellt eine zyklische Voltammetrie in Verbindung mit einem stabilen Redoxsystem dar, wobei sich letzteres von allen möglichen dadurch auszeichnet, daß es eine besonders hohe Standardaustauschstromdichte besitzt. Die zyklische Voltammetrie garantiert bei Dünnschicht-Meßzellen, daß nettomäßig keine Meßsubstanz elektrochemisch umgesetzt, d.h. verbraucht wird. Hierbei wird stets nur oxidiert und reduziert. Die höchste Meßempfindlichkeit wird erfindungsgemäß dann erzielt, wenn der Potentialbereich, in dem die Arbeitselektrode(n) zyklisch betrieben wird, das Halbstufenpotential des Redoxmarkers einschließt ($\pm 200-600$ mV). Bei hohen Potentialänderungsgeschwindigkeiten ($\gg 500$ mV/sec Scanrate) entstehen bei Arbeitselektroden > 10 mm anodische und kathodische Stromspitzen, die der Konzentration des Redoxsystems proportional sind. Je höher die Scanrate desto größer werden die Stromspitzen, was einer Empfindlichkeitssteigerung gleichkommt. Werden als Redox-Marker, Systeme mit den höchsten Standardaustauschstromdichten (z.B. Ferrocenverbindungen, Rutheniumkomplexe, Hexacyanoferrat II/III, J^-/J u.a. verwendet, dann stören nicht vollständig abgetrennte Redoxsysteme aus der Probenmatrix wesentlich weniger, wenn mit kurzen Zykluszeiten (schneller Spannungsrampen) gearbeitet wird. Die besten, reversiblen Redoxsysteme lassen hierbei durchaus über 1000 zyklische Voltammogramme pro Sekunde (1000 Hz !) zu. Restbestände von weniger reversiblen, eventuell störenden Redoxsystemen aus der Probenmatrix lassen sich elektrochemisch nicht so schnell umsetzen und erzeugen daher auch kein Meßsignal (Stromfluß).

12

Alternativ können andere elektrochemische Methoden angewandt werden, die zu keinem Verbrauch oder Netto-Umsatz des reagierenden Systems führen, d.h. auch die Methode der Pulsvoltammetrie oder der differentiellen Pulsvoltammetrie oder der Square-wave Voltammetrie sind hierzu geeignet, lassen sich aber aus prinzipiellen Gründen nicht so schnell zyklisch betreiben.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Verfahrensschritt, der vorteilhafterweise zur gewünschten extremen Empfindlichkeitssteigerung führt, liegt in einer speziellen Kompensationsmethode für den bei schnellen Arbeitselektrodenpotential-Scanraten zunehmenden kapazitiven Strom, der den Signaluntergrund bildet.

Dazu wird ein computergesteuertes Auswertsystem verwendet, das mittels eines schnellen AD-Wandlers wie ein Scanrecorder arbeitet. Die Kompensation des nicht-faradayschen Untergrundstromes, die ebenfalls zur Empfindlichkeitssteigerung einen entscheidenden Anteil beiträgt, kann auf zwei Arten erfolgen, die für sich allein oder zusammen verwendet werden können. Bei Arbeitselektroden mit Durchmessern über 10 mm wird die Kanalzuordnung des Scanrecorders bei Erreichen des Potentialumkehrpunktes ebenfalls umgekehrt, als ob mit einem X-Y-Scheiber die Spannung an der Arbeitselektrode gegen den fließenden Strom (engl. C-V Diagram) aufgezeichnet würde. Da dies einer einfachen Signaladdition gleichkommt, kompensieren sich pro Meßkanal (Zeitfenster oder Potential) gleich große anodische und kathodische Ströme. Lediglich bei den um ca. 60 mV auseinanderliegenden Stromspitzen ist das nicht der Fall.

Ein weiterer Schritt, der für das Ziel dieser Erfindung wesentlich von Vorteil ist, ist die erst durch schnelle Wiederholmessungen ohne Verbrauch der gemessenen Substanz mögliche elektronische Mittelwertbildung. Mit einem Signalmittelwertbildner läßt sich zusätzlich dabei auch noch das Signal/Rauschverhältnis (S/R) drastisch steigern, weil man mehrere Tausend Zyklen mitteln kann. Da man bei reversiblen Redoxsystemen leicht weit über 100 Potentialzyklen pro Sekunde ($>>100$ Hz) durchscannen kann, ergibt sich hier beispielsweise schon in einer Sekunde eine Verbesserung

des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um den Faktor 10. Bei Meßzeiten, die denen der Immuno-Assay-Verfahren mit Enzymmarkern entsprechen, ergeben sich Verbesserungen dieses die Nachweisgrenze bestimmenden S/R-Verhältnisses um mehrere Größenordnungen, ohne daß die Nachteile der empfindlichen Eiweißmoleküle (Enzyme) hier stören. Das zweite Verfahren zur Unterdrückung des störenden kapazitiven Stromuntergrundes bei der zyklischen Voltammetrie verwendet als Arbeitselektrode ein Ultramikroelektroden-Array mit Einzelelektroden durchmessern von unter 10 µm. Hier entstehen keine anodischen und kathodischen Stromspitzen mehr sondern eine Stromstufe mit gut ausgeprägten Plateaus. Die Stufenhöhe ist ähnlich wie bei der Polarographie der Konzentration des elektrochemisch umgesetzten Redoxsystems (Markermoleküls) proportional. Die erfindungsgemäße Vorrichtung verwendet hierzu eine planare Array-Anordnung von ca. 2000 Einzelelektroden mit 3 µm Durchmesser, bei der die Bezugs- und Gegenelektrode bereits optimiert in die Oberfläche integriert vorliegt. Hier hat sich nur eine von vielen möglichen geometrischen Anordnungen als geeignet erwiesen (siehe Abb. 3).

Die neue Anwendung der zyklischen Voltammetrie zur Erzielung extremer Meßempfindlichkeiten bei Redoxsystemen oder Markermolekülen mit Redoxgruppen ist dadurch möglich, weil durch die abwechselnde Oxydation und Reduktion kein Verbrauch des Meßstoffes auftritt. Eine Wegdiffusion des Redoxsystems wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine Dünnschichtzellen-Anordnung gewählt wird. Hierbei werden die Arbeitselektrode(n) sowie die Gegen- und Referenzelektrode gegen die mit Grundelektrolyt befeuchtete Oberfläche mit den redoxmarkierten Partnermolekülen gedrückt. Gegebenenfalls können die unmarkierten Partnermoleküle, die die redoxmarkierten Moleküle binden, auch direkt auf oder unmittelbar neben der Elektrodenoberfläche immobilisiert sein. Die Zyklisierung ist bei Nachweisgrenzen unter 1 ppb (Redox-System) notwendig, denn bei solch extrem kleinen Konzentrationen müssen möglichst alle Moleküle elektrochemisch erfaßt werden. Dann entspricht eine Stromstärke von einem mA einer umgesetzten Substanzmenge von ca. 10^{-10} mol/sec. Derzeitig erlauben gute elektrochemische Meßzellen auch noch zuverlässige Strommessungen im nA-Bereich, was einer tausendfach kleineren Umsatzrate entspricht. Durch

14

die Signalmittelwertbildung werden nunmehr Pico- und Femto-Amperströme meßbar, was zu Umsatzraten von 10^{-16} resp. 10^{-19} mol/sec führt.

Bei der optischen Detektion erhält man die gewünschte Empfindlichkeitssteigerung durch die Kombination von mehreren, mindestens zwei Verfahrensmaßnahmen. Als erste Maßnahme verwendet man Markermoleküle, die im IR stark absorbieren, und im noch fernerem Infrarot fluoreszieren, weil dadurch der störende Fluoreszenzuntergrund von einigen Eiweißmolekülen (z.B. bei biologischen Matrices) nicht auftritt und die preiswerten Laserdioden als Anregungsquelle hoher spektraler Leuchtdichte besonders vorteilhaft sind. Das emittierte Laserlicht erlaubt durch seine geringe Strahlkonvergenz besonders exakte Abgrenzungen des Meßfensters. Als weitere Maßnahme verwendet man Fluoreszenzmarkermoleküle, deren Fluoreszenz besonders langsam abklingt, so daß man diese Fluoreszenz gut von der schnell abklingenden der störenden Moleküle in der Probenmatrix abtrennen kann. Im Gegensatz zu einer kommerziell erhältlichen Anordnung, bei der einfach das Anregungslicht durch einen Shutter unterbunden wird, und die eigentliche Messung des Fluoreszenzlichtes erst nach einigen Millisekunden (nach völligen Abklingen der Störfluoreszenzstrahlung) beginnt und über eine gewisse Zeit integriert wird, geschieht die Auswertung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren über eine direkt und schneller messende elektronische Berücksichtigung der langsameren Abklingzeit. Hierzu wird ein Lock-In Verstärker benutzt, der eine frequenz- und phasenselektive Verstärkung ermöglicht. Die Unterdrückung der störenden Fluoreszenz mit der schnellen Abklingzeit geschieht hier durch eine geeignete Wahl des Phasenwinkels am Meßgerät. Vorteil dieser Methode gegenüber der Zählratemethode (Photonenzählung) der kommerziellen Version ist die höhere Empfindlichkeit, weil die frequenzselektive Verstärkung nur einen Bruchteil des meist weißen elektronischen Rauschens des Photo-Empfängers verstärkt und weil bei höheren Licht-Chopper Frequenzen gearbeitet werden kann, was die Anzeigegeschwindigkeit drastisch erhöht, so daß auch Durchflußmessungen, wie bei der FIA üblich, noch entsprechend sensitiv durchgeführt werden können.

Diese u.a. Vorteile werden bei der Erfindung erhalten durch::

- A) eine Art Affinitätschromatographischer Säule oder auch eine offene oder der optischen und elektrochemischen Messung zugänglichen Oberfläche eines beliebigen Trägermaterials mit immobilisierten Partnermolekülen zu dem zu bestimmenden Molekül (Analyt);
- B) eine gleichartige der Messung zugängliche "Sammeloberfläche" für freigesetzte markierte Analytmoleküle (im Falle einer Verdrängungsreaktion auf obiger Säule oder Oberfläche, die möglichst vollständig mit markierten immunogen gebundenen Analytmolekülen belegt ist, durch unmarkierte Analytmoleküle);
- C) eine erfindungsgemäße flache elektrochemische Meßzelle in einer aus zwei oder drei Elektroden bestehenden potentiostatischen Schaltung mit einer oder mehreren Arbeitselektroden, die eine Zykovoltammetrie im elektroaktiven Bereich des betreffenden Redoxsystems (repetitive Oxidation und Reduktion) durchführt und die in unmittelbarem Kontakt mit der "Sammeloberfläche" oder der unter A) genannten gebracht werden kann;
- D) eine Fluoreszenzanordnung, die mittels Laserdioden zur Fluoreszenz bei Emissionswellenlängen > 700 nm anregt und die schnell zwischen einem unmarkierten Untergrund und den Stellen, wo die optisch markierten Analytmoleküle auf den betreffenden Oberflächen festgehalten werden hin und her oszilliert (alternativ können auch Fluoreszenzmarker verwendet werden, die die Methode der zeitverzögerten Fluoreszenz ermöglichen, wobei aber hier die direkte und schnelle Messung mittels eines elektronischen phasenselektiven Verstärkers erfolgt, die ebenfalls mit Hilfe von Lichtleitern schnell zwischen einem unmarkierten und markierten Untergrund hin und her oszillieren kann).
- E) einen elektronischen Signalmittelwertbildner oder eine computergestützte Aufaddition von Signal-Zeit-Kurven (Zeit proportional zur

Spannung bei der elektrochemischen Detektion oder zum Meßort beim optischen Verfahren). Dabei mittelt sich ein statistisches elektronisches Rauschen in den höchsten Empfindlichkeitsbereichen zu Null.

- F) Falls bei der auswertenden Messung sowohl die Änderung der markierten Analytmoleküle in der primären immunogenen Zone als auch die in der Sammelzone erfaßt wird, kann man neben einer Doppelmessung auch durch Quotientenbildung eine Art innere Standardisierung durchführen. Dies verbessert die Zuverlässigkeit der Messungen ähnlich wie bei der internen Standardisierung von emissionsspektroskopischen Methoden.

Die Oberfläche mit dem immobilisierten immunologischen Partnermolekül zum Analyten sollte im Interesse eines großen Meßbereichs hoch beladen sein. Auch muß das betreffende Molekül mit einer richtigen Orientierung (Epitop-Bereich außen) dort immobilisiert sein. Dies läßt sich u.a. auch unter Zuhilfenahme eines geeignet gewählten elektrischen Feldes (oder Stromes) an der Phasengrenze Trägeroberfläche/Meßlösung bewerkstelligen. Dadurch kommt es zu einer gerichteten Immobilisierung dieser Partner, ohne daß teure Spezialsubstanzen (als übliche Spacermoleküle) dafür benötigt werden. Die gerichtete Immobilisierung ergibt zusammen mit einer hohen Immobilisierungsdichte eine hohe Meßempfindlichkeit und einen großen Meßbereich. Alternativ können die immobilisierten Partnermoleküle aber auch durch die bekannten Techniken mittels F_c -Teil bindender Spacermoleküle (bei der im Umweltanalytikbereich üblichen Immobilisierung von Antikörpern) an Trägeroberflächen (z.B. Glas-Beads, chromatographische stationäre Phasen, Mikrotiterplatten etc.) angebunden werden.

Als besondere Variante der Ausführungsbeispiele bietet sich auch Papier als preiswerter Träger an. Hier kann sowohl laborübliches Filterpapier als auch Membranfilter auf der Basis von Cellulose oder anderer Materialien dienen. Auch chromatographische Dünnschicht Träger sind hierfür hervorragend geeignet, da sie oberflächlich leicht zu modifizieren sind. Eine bevorzugte Art sind in diesem Zusammenhang Dünnschichtplatten mit oder ohne Fluoreszenzgrundmarkierung, die schon in ein sog. Reversed

17

Phase (RP-Material) modifiziert wurden. Hier gelingt die gerichtete Immobilisierung der Partner Molekülsorte (d.h. des jeweils nicht den Analyt darstellenden Partners dieser sich gegenseitig bindenden komplementären Moleküle) dann besonders gut, wenn man diesen Molekülen gezielt gegenüber dem Epitopbereich eine oder mehrere langkettige aliphatische Reste (C_6-C_{25}) ansynthetisiert oder bei Antikörpern die gentechnisch erzeugten F_{ab} -Fragmente mit den spezifischen Bindungsstellen lipophile Molekülgruppen an der gegenüberliegenden Molekülstelle erzeugen läßt. Die lipophilen Reste der zu immobilisierenden Moleküle tauchen dann in die aliphatische Molekülbürste der Trägeroberfläche ein und werden so bei höchster Dichte ohne Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens fixiert. Sie können aber bei Denaturierung oder Desaktivierung wie in der Chromatographie üblich eluiert werden, so daß der Träger für eine Immobilisierung mit frischen Molekülen zur Verfügung steht. Bei Verwendung von Dünnschichtplatten auf Basis einer Aluminiumfolie läßt sich letztere auch elegant bei der elektrochemischen Detektionsmethode als Gegenelektrode verwenden.

Dieser Prozeß kann auch dynamisch im Rahmen einer Fließinjektionsanalyse automatisiert werden, d.h. auf die unbeladene RP-Oberfläche werden zunächst die zu immobilisierenden Moleküle (ohne gebundenes Analytmolekül mit Marker aber auch mit) gegeben bevor nach einer Spülung zum Entfernen des Überschusses im Fall der unbeladenen Moleküle die markierten Analytmoleküle bis zur Absättigung über die Oberfläche geleitet werden. Nach einer erneuten Spülung kann dann die Probe aufgegeben werden. Die Verwendung von zugänglichen flachen Oberflächen für die Immobilisierung der Partnermoleküle kann einen Verfahrensschritt ersparen, denn man kann die Menge der dort gebundenen markierten Analytmoleküle bei beiden Versionen (Vorimmobilisierung mit markierten Analytmolekülen und Konkurrenzbindung von der mit der Probe zugesetzten markierten Analytmolekülen) sowohl mit der planaren elektrochemischen Meßzelle (durch einfaches Aufpressen auf die Oberfläche) als auch mit der optischen Fluoreszenzmethode leicht bestimmen ohne eine zusätzliche Sammeloberfläche zu benutzen.

Bei beiden Detektionsmethoden ist es wichtig, daß störende Stoffe aus der Probenmatrix vor den eigentlichen Messungen fortgespült werden. Dies erfolgt durch reine, gepufferte Elektrolytlösung, die sowohl die Stabilität der Biomoleküle unterstützt als auch den Grundelektrolyt für die elektrochemische oder optische Detektionsart darstellt.

Als Redox-Systeme werden bei der Erfindung diejenigen ausgewählt, die an dem verwendeten Arbeitselektrodenmaterial (Platin, Gold, anderes Edelmetall) die höchsten Standardaustauschstromdichten zeigen. Hierzu zählen von allen möglichen Redoxsystemen vorzugsweise nur die besonders reversiblen Systeme, wie die auf der Basis von Ferrocen, Rutheniumkomplexen, Hexacyanoferrat (II/III), Jod/Jodid etc. Besonders vorteilhafte Redoxsysteme haben ein Redoxpotential in der Nähe desjenigen von Sauerstoff, so daß sie von letzterem nicht gestört werden und man in diesem Fall die zyklische Voltammetrie auch ohne Inertgasspülung durchführen kann.

Bei der elektrochemischen Zelle läßt sich besonders vorteilhaft auch eine planare Mikroelektroden-Array-Anordnung einsetzen, weil bei Einzelelektroden durchmessern < 10 μm die Vorteile von Ultramikroelektroden auftreten. Letztere sind: Redox-Stufen statt Peaks im Voltammogramm, Verminderung des Verhältnisses von kapazitiven zu faradayschen Strom, Rührunabhängigkeit, quasi-verbrauchslose Messung schon ohne die Spannung zu zyklisieren u.a..

Als besonders vorteilhafte Molekülklasse für die Fluoreszenzmarkierung bieten sich z.B. an Bis-isothiocyanat-Derivat von 2-[4'-chloro-7'(3''-ethyl-2''-benzothiazolinylyden)-3',5'-(1'''-propanediyl)-1',3',5'-heptatrien-1'-yl]-3-ethylbenzothiazoliumbromid große Porphyrinringe oder geeignete Phthalocyanine an (siehe Abb. 4). Sie lassen sich durch die preiswerten langwelligen monochromatischen und fremdlichtfreien Laserlichtquellen anregen und erzeugen eine Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich, wo kaum andere Moleküle stören. Die Verwendung von Laserdioden mit entsprechenden IR-empfindlichen Halbleiterdetektoren erlaubt besonders kleine Meßaufbauten (z.B. Handmeßgeräte).

13

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Arbeitsweisen werden anhand von Beispielen noch näher erläutert:

Beispiel 1

Verdrängung des markierten Analytmoleküls vom immunologisch präparierten Oberflächenbereich durch das unmarkierte Analytmolekül in der Probe:

Eine vorteilhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung und des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht auf einer kompetitiven Reaktion zwischen markiertem und unmarkiertem Analytmolekül. Hier kompensieren sich nichtspezifische Anbindungen, da sie in beiden Fällen im gleichen Ausmaß auftreten. Wünschenswert ist ferner, daß das unmarkierte Analytmolekül eine etwas geringere Bindungskonstante als das markierte aufweist, um es effektiver verdrängen zu können. Dies ist in der Regel der Fall, da die kovalente Verknüpfung mit einem relativ großen Markermolekül die Antikörper-Antigen-(bzw. allgemein: Molekül-Komplementärmolekül-) Bindung schwächt, weil sich beide Moleküle nicht mehr optimal nähern können.

Als Modellanalyt wurde in diesem Beispiel Humanserumalbumin (HSA) gewählt. Als immobilisiertes Partnermolekül wurde der dazugehörige Antikörper (anti-HSA) verwendet. Die anti-HSA Antikörper wurden mit den bekannten Immobilisierungstechniken an die Oberfläche von Sepharose-Material kleiner Korngröße (150 nm) angebunden und mit fluoreszenzmarkierten HSA belegt. Als Fluoreszenzmolekül wurde eine Europiumchelate (BCPDA) gewählt. An ein HSA Makromolekül konnten mehrere fluoreszierende Chelatkomplexe kovalent angebunden werden (20-30). Die Europiumchelateverbindung wurde in diesem Beispiel anstelle des IR-Licht emittierenden Markers genommen, weil die hier auftretende Fluoreszenz wesentlich langsamer abklingt als die der störenden Probenmatrix (Eiweißmoleküle bei biologischen Proben). Gemessen wurde am Ende einer kleinen Säule, die mit dem Sepharose-Material und dem markierten Immunkomplex beladen war. Bei Zugabe von unmarkierten HSA wurde das mit dem Fluoreszenzmarker versehe-

20

ne von der Oberfläche der mit HSA-Antikörpern beladenen Sepharose-Partikel verdrängte HSA Molekül in einer Durchflußmeßzelle vermessen. Dazu wurde Licht der Wellenlänge 350 nm verwendet, dessen Strahlengang durch einen optischen Chopper mit einer Frequenz von 140 Hz zerhackt wurde. Im rechten Winkel zum Anregungslicht wurde das Fluoreszenzlicht gemessen. Als Lichtdetektor wurde ein Photomultiplier verwendet und am Lock-In Verstärker ein Phasenwinkel von 0° eingestellt. Die Abb. 5 zeigt die Signale, die durch die Zugabe von unmarkiertem HSA gemessen werden können. Sie sind der HSA-Konzentration der auf die Säule aufgegebenen Probe proportional. Durch diese Meßtechnik lassen sich pro Zeiteinheit wesentlich mehr Proben analysieren, als mit der Photonenzählung, die auch der FIA-Technik verschlossen bleibt. Neben HSA konnten durch die Immobilisierung entsprechender mono- und polyklonaler Antikörper auch andere Analyte, wie Atrazin oder andere Schadstoffe sehr empfindlich im sub ppm-Bereich mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

Beispiel 2

Elektrochemische Detektion von Redox-markierten Analytmolekülen:

Als Analyt wurde das umweltrelevante Atrazin gewählt. Letzteres wurde durch Standardmethoden der organischen Synthese in 6 Stufen mit einem modifizierten Ferrocen-Molekül kovalent verknüpft. Das ausgewählte, sehr reversible Redox-System mußte zuvor in eine wasserlösliche Form durch Anfügen stark polarer Seitenketten überführt werden. Die einzelnen chemischen Syntheseschritte, die - ausgehend vom kommerziell erhältlichen Ausgangsprodukt - notwendig waren sind in Abb. 6 aufgeführt.

Die letzte Verbindung, das redoxmarkierte Atrazin wurde nach Reinigung sowohl für die Verdrängungsmethode als auch für die kompetitive Methode in einem Atrazin-Assay eingesetzt. Die entsprechenden Antikörper wurden von Hock et al. in der Literatur beschrieben [1,2]. Die Abb. 7 zeigt zyklische Voltammogramme dieses redoxmarkierten Atrazins in extrem hoher Verdünnung auf einer Trägeroberfläche. Bedingt durch den unmittelbaren

Kontakt des Redoxsystems mit der Arbeitelektrodenoberfläche und dem Nichtvorhandensein von andiffundierenden oder abdiffundierenden Redoxmolekülen ergeben sich im zyklischen Voltammogramm scharfere Peaks als üblich. Dieser Effekt wirkt auch empfindlichkeitssteigernd.

Beispiel 3

Steigerung der Nachweisgrenze durch repetitive elektrochemische Oxidation mit anschließender Reduktion:

Als reversibles Redox-System wurde Hexacyanoferrat (II/III) in einem Verhältnis von etwa 1 : 1 gewählt. Die typische Nachweisgrenze für dieses System bei der klassischen zyklischen Voltametrie liegt im millimolaren Konzentrationsbereich. Durch die Methode der elektronischen Signalmittelwertbildung, die hier wegen der verbrauchslosen Meßtechnik angewandt werden kann, lassen sich, wie Abb. 8 zeigt, noch extrem geringe Redoxkonzentrationen weit unterhalb des mikromolaren (mmol/L) Bereiches mit einem sehr guten Signal/Rauschverhältnis quantitativ bestimmen. Bei einer Zyklusfrequenz von ca. 1000 Hz können beispielsweise in einer Sekunde 1000 Oxidations- und Reduktionsreaktionen durchgeführt werden, was bezüglich des elektrochemischen Signals gleichbedeutend mit einer zehntausendfach höheren Redoxmittelkonzentration (verglichen zur üblichen 0,1 Hz Arbeitsweise) ist oder einer entsprechend erhöhten Elektronentransferzahl entspricht, was gleichbedeutend wäre mit einem Analytmolekül, an dem eine entsprechende Anzahl von Ein-Elektronen-Redoxmolekülen angebunden wären.

Beispiel 4

Unterdrückung des kapazitiven Stromanteils bei schnellen zyklischen Voltammogrammen durch Anwendung der zyklischen Mittelwertbildung:

Bekanntlich tritt bei schnellen Potentialänderungsgeschwindigkeiten wegen der entsprechenden Umladung der Doppelschichtkapazität an der Arbeitselektroden-Grenzfläche ein sog. kapazitiver Strom auf, dessen Größe leider proportional zur Änderungsgeschwindigkeit ist, so daß eigentlich eine extrem schnelle Zyklusgeschwindigkeit bei der zyklischen Voltammetrie ausgeschlossen sein sollte, weil dieser Anteil den des betreffenden Redox-Peaks (faradayscher Strom) bei weitem übersteigt und zu Voltammogrammen führt, wie sie in Abb. 9 dargestellt werden. Führt man hingegen bei Makro-Arbeitselektroden die Spannungskordinatenwerte ähnlich wie bei einem X-Y-Schreiber rückwärts zählend auf die einzelnen Digitalkanäle des Mittelwertbildners oder Scan-Recorders mit dieser Vorrichtung, so führt die Umkehrung des Vorzeichens der Stromstärke bei der Aufaddition in ein und denselben Kanal (der einem genau bestimmten Arbeitselektrodenpotential zugeordnet ist) zu einer Kompensation des kapazitiven Stromanteils. Dies geschieht nahezu vollständig, da der Kapazitätsstrom bei konstanter Doppelschichtkapazität (bei gleichem Arbeitselektrodenpotential) bis auf das Vorzeichen der Potentialänderungsgeschwindigkeit dU/dt proportional ist. Lediglich die faradayschen Strompeaks, die proportional der Konzentration des Redoxsystems sind, werden durch diesen Schaltungstrick nicht kompensiert, da sie bei unterschiedlichen Potentialen ablaufen. Man erhält also ein rauscharmes, gemitteltes zyklisches Voltammogramm, daß wie in Abb. 8e gezeigt, aussieht. Erst durch diese schaltungstechnische und elektronische Vorrichtung ist es möglich, mit Potentialzyklusraten von weit über 100 Hz zu arbeiten.

Beispiel 5

Unterdrückung des kapazitiven Stromanteils durch Anwendung eines Ultra-Mikroelektroden-Arrays:

Wird die Oberfläche der Arbeitselektrode verkleinert, so verringert sich die zugehörige Doppelschichtkapazität wesentlich stärker als die faradaysche Stromdichte, d.h. das Verhältnis von faradayschem Strom (der analytisch proportional ist) zu kapazitivem wird extrem verbessert, so daß

extrem schnelle Potentialänderungsgeschwindigkeiten vom > 500 V/sec möglich werden. Zusätzlich sorgen die veränderten Diffusionsbedingungen für die elektroaktive Species zu einer anderen Signalform. Ultra-Mikroelektroden (Durchmesser < 10 μ m) erlauben zum Unterschied zu einer planaren Diffusion bei Makroelektroden sphärische Diffusionsbedingungen und setzen so wenig Substanz um, daß es zu keiner in die Lösung hineinwachsenden Verarmungsschicht kommt, was sich im Voltammogramm durch eine klare Stufe und ein stabiles Grenzstromplateau zeigt. Die Abb. 10 zeigt den Unterschied zwischen einem zyklischen Voltammogramm einer Spur eines Redoxsystems bei einer Makroelektrode und einem Ultra-Mikroelektroden-Array der in Abb. 3 offenbarten geometrischen Anordnung. Das Array hat genau die gleichen Eigenschaften wie eine einzelne Ultra-Mikroelektrode, hat jedoch den Vorzug, daß die Stromstärke entsprechend der Anzahl der Elektroden vergrößert ist.

Beispiel 6

Anordnung für eine besonders einfache Ausführungsform:

Anstelle der erzwungenen Strömung bei der Fließinjektionsanalyse können vorzugsweise auch Kapillarkräfte herangezogen werden. Neben dem Prinzip der Papier- und Dünnschichtchromatographie können auch andere Träger für die immobilisierten Partnermoleküle verwendet werden. Ein Beispiel dafür kann ein Stück einer säulenförmigen Kreide (oder Sinterglas/keramik) darstellen. Hier werden bei haptenähnlichen Analyten die Antikörpermoleküle schon vor der Immobilisierung an der Kreideoberfläche mit den markierten Analytmolekülen abgesättigt. Die Immobilisierung kann durch einfaches Eintauchen in dieser Lösung geschehen, wobei man die Laufstrecke beobachten kann. Die Molekül-Assoziate werden mittels bifunktioneller Reagenzien quervernetzt bzw. an der Oberfläche fixiert. Von dieser primären immunologischen Zone wird, getrennt durch eine unbehandelte Fließstrecke, eine zweite Molekül-Sammelzone errichtet. Aus Gründen einer hohen Empfindlichkeit genügt hierbei ein schmaler Bereich unmittelbar am Ende des Kreideträgers. Im Beispiel wird die Endoberfläche mit den glei-

24

chen Antikörpern versehen, die auch in der primären immunologischen Zone verwendet wurden, nur mit dem Unterschied, daß hier die analytselektiven Bindungsstellen frei sind, so daß sie die durch den unmarkierten Analyten in der Probe freigesetzten markierten Analytmoleküle wieder aufsammeln und auf kleinstem Raum konzentrieren. Die elektrochemische oder fluorimetrische Messung erfolgt dann auf der polierten Endfläche der Kreidesäule. Die Strömung eines Trägerelektrolyten oder der Probe durch die Kapillarkräfte wird durch Aufsetzen eines saugfähigen Pfropfens auf diese Endfläche aufrechterhalten. Die vermessene Probemenge muß aus der Abnahme des Probenvolumens ermittelt werden.

Wird bei der Erfindung ein Träger (z.B. Durchfluß-Säule, Fließpapier, Membranfilter etc.) verwendet, an dem ein Partner gebunden ist, wird dieser mittels einer kompetitiven Reaktion durch den unmarkierten Analyten verdrängt. Er wird jedoch am Ausgang der Säule noch vor der Messung erneut von immobilisierten Komplementmolekülen gebunden und dadurch zur eigentlichen Messung angereichert wobei gleichzeitig auch störende Begleitstoffe durch Spülen entfernt werden können bevor die extrem empfindliche elektrochemische oder optische Messung repetitiv durchgeführt wird und durch Signalmittelwertbildung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis beliebig gesteigert wird.

Verfahren und Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA-Strang- sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskräften beruhen, **gekennzeichnet** durch schnelle und repetitive Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei Immuno-Assays und ähnlichen Assays.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als analyterkennende Moleküle oder Molekülassoziationen die jeweiligen Partner der sich extrem selektiv verbindenden Molekül-Paare: Antikörper (Antikörperfragment mit Bindungsstelle) - Antigen, Molekül - Rezeptor, DNA-Abschnitt - komplementärer DNA-Abschnitt sowie Gastmolekül - Wirtsmolekül an besonderen Oberflächen und in bestimmten Zonen verteilt immobilisiert verwendet werden.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das zum Analyten komplementäre Partnermolekül an einem stationären Träger an zwei getrennten Zonen immobilisiert wird, wobei die Moleküle der ersten Zone zu Beginn einer Analyse mit dem redox- oder fluoreszenzmarkierten Analytmolekül abgesättigt werden, so daß dadurch alle Bindungsstellen blockiert sind und bei Kontakt mit dem nicht markierten Analytmolekül aus der Probe eine Verdrängung der markierten Analytmoleküle stattfindet, wobei letztere aber an anderer Stelle der Vorrichtung auf möglichst kleinem Volumen wieder gesammelt werden, bevor sie elektrochemisch oder optisch repetitiv bis zum gewünschten Signal/Rauschverhältnis vermessen werden.

4. Vorrichtung nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß neben der Verdrängungsreaktion auch eine kompetitive Bindungsreaktion zwischen dem unmarkierten Analytmolekül in einer Probe und dem redox- oder fluoreszenzmarkierten Analytmolekül, das jeder Probe im bekannten Verhältnis zugegeben werden muß, an trägergebundene Partnermoleküle ablaufen kann, wobei hier nach Spülung der nicht gebundenen Moleküle und Entfernen der Probenmatrix die repetitive elektrochemische oder optische Messung erfolgen kann.

5. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die betreffenden analyterkennenden Komplementmoleküle auf Trägeroberflächen immobilisiert sind, die die repetitive elektrochemische oder optische Messung ermöglichen, also entweder den innigen Kontakt mit einer planaren elektrochemischen Drei-Elektroden-Meßzelle erlauben bzw. die Messung des IR-Fluoreszenzlichtes ermöglichen.

6. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger für die an bestimmten Stellen fixierten analyterkennenden und selektiv bindenden Komplementmoleküle neben dem typischen Mikrotitermaterial Polystyrol vorzugsweise chromatographische stationäre Phasen, wie adsorbentiengefüllte Säulen, RP-18 ähnliche Materialien, Fließpapierstreifen, Membranfilterstreifen auf Cellulosebasis o.ä., die Kapillarflußeigenschaften haben, verwendet werden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer Probenlaufstrecke (Art affinitätschromatographischer Miniatursäule) mindestens eine primäre immunologische (oder allgemein: analyt-spezifisch bindende) Zone gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren Sammel- und Anreicherungszone vorhanden ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die affinitätschromatographische Abtrennung, Verdrängung oder kompetitive Anbindung entweder planar durchgeführt wird, so daß die planare elektrochemische Drei-Elektroden-Meßkette ungehinderten Kontakt mit unterschiedlichen Oberflächenabschnitten finden kann und auch die optische Messung alternativ zwischen einem Trägeruntergrund und den Meßzonen oszillieren kann.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Sammel- und Anreicherungsphase eng begrenzte Zonen in der Proben-Fließrichtung hinter der primären immunogenen Zone (obiger Definition) angelegt werden, die aus den betreffenden analyterkennenden und -bindenden Komplementmolekülen bestehen, die aber freie Bindungsstellen haben und die so gesammelten redox-aktiven oder fluoreszierenden Analytmoleküle der repetitiven Messung zuführen.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als zweite Sammel- und Anreicherungszone die Lipophilie der markierten Analytmoleküle dadurch ausgenutzt wird, daß anstelle der betreffenden Komplementmoleküle eine lipophile Zone mit öl- oder wachsgetränkter Oberfläche oder RP-18 Material verwendet wird, wobei bei ionalen Analyten dieser Phase noch ein lipophiles Gegenion zur Ionenpaarbildung zugefügt wird.

11. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sammel- und Anreicherungsphase für die in der primären Reaktionszone verdrängten markierten Analytmoleküle durch eine entsprechend der Molmasse des markierten Analytmoleküls gewählten Dialysemembran gegeben ist, die in einem gewissen Abstand zur primären Reaktionszone angebracht ist, und die sowohl stationär mittels aufgedapfter Elektroden wie auch demontiert elektrochemisch vermessen werden kann.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß diese Dialysiermembran zusätzlich an der in Fließrichtung an erster Stelle liegenden Oberfläche die analytbindenden Komplementärmoleküle immobilisiert enthält.

13. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sammel- und Anreicherungszone dadurch erzielt wird, daß das Lösungsmittel durch Anwendung von Hitze und Transportgas am Ende der Probenlaufstrecke verdampft wird.

14. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die primäre analyterkennende und -bindende Reaktionszone und die davon getrennte Sammel- und Anreicherungszone innerhalb eines teststreifenähnlichen Trägers mit Kapillarkräften liegt, so daß der Transport der flüssigen Probe durch die verschiedenen Zonen durch letztere erreicht werden kann und keine externe Pumpe notwendig ist, wobei die Auswertung über konzentrationsproportionale Strecken oder integrale Signale über die charakteristischen Streckenabschnitte erfolgt und auch redundant ist. Das Auswertgerät ist hier ein Scanner mit optischer oder elektrischer Messung. Bei dem elektrochemischen "Scannen" werden walzenförmige Arbeitselektroden verwandt.

15. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der Konzentration der redoxmarkierten Analytmoleküle auf den entsprechenden Oberflächenzonen der erfindungsgemäßen Vorrichtung durch die elektrochemische Methode der schnellen zyklischen Voltammetrie oder einer anderen Methode, die ohne Netto-Umsatz (Substanzverbrauch) arbeitet, mittels einer planaren Drei-Elektrodenmeßzelle, die zusammen mit einem geeigneten Grundelektrolyten auf diese Stellen gepresst wird, erfolgt (Prinzip der Dünnschicht-Meßzelle).

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die planare oder quasi-planare elektrochemische Drei-Elektrodenmeßzelle anstelle einer Makro-Arbeitselektrode aus einem Edelmetall, wie Platin, Gold o.ä. ein Ultra-Mikroelektroden-Array aus den gleichen Materialien mit Einzelelektroden durchmessern < 10 mm enthält, um den bei schnellen zyklischen Voltammogrammen stark ansteigenden kapazitiven Strom zu verkleinern.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Arbeitselektrode oder das dazu benutzte Ultra-Mikroelektroden-Array in die betreffenden Zonen des Assays integriert sind.

18. Vorrichtung nach Anspruch 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das zyklische Voltammogramm mit einer hohen Repetitionsrate im Be-

reich 1 bis \gg 100 Hz nicht wie üblicherweise auf einem X-Y-Schreiber sondern auf einem elektronischen Mittelwertbildner registriert wird, der so geschaltet ist, daß die digitalisierten Stromsignale in beiden Potentialrichtungen auf ein und denselben spannungsproportionalen Kanal addiert werden, was wegen des unterschiedlichen Vorzeichens des kapazitiven Stromanteils bei den unterschiedlichen Änderungsrichtungen einer nahezu 100 %igen Kompensation dieses störenden nicht-faradayschen Stromes gleichkommt, während die konzentrationsabhängigen Stromspitzen der Redoxmoleküle bei unterschiedlichen Potentialen auftreten und daher sich gegenseitig nicht kompensieren.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Arbeitselektrode das Ultra-Mikroelektroden-Array verwendet wird.

20. Vorrichtung nach Anspruch 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßvorgang eines Analyten automatisch computergesteuert in der Weise abfolgt, daß sowohl die von der Anordnung aufgenommene Probemenge als auch die Sammelzeit reproduzierbar eingehalten werden und die repetitive elektrochemische Messung jeweils mit gleicher Zahl an Additionszyklen, die von dem Signal/Rauschverhältnis abhängt, durchgeführt wird.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß als Redox-Marker-Moleküle, die mit dem Analytmolekül kovalent verknüpft werden, Redox-Systeme mit besonders hoher Standardaustauschstromdichte verwendet werden, die sich im betreffenden Lösungsmittel oder in der Probenmatrix lösen.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß als besonders reversible Redox-Systeme wasserlösliche, stabile und lagerfähige Ferrocenderivate, Rutheniumkomplexe, Hydrochinone, Hexacyanoferrat (II/III), Jod/Jodid o.ä. verwendet werden, die über Spacermoleküle mit dem Analytmolekül verbunden werden.

23. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14 dadurch gekennzeichnet, daß als Markermoleküle für die repetitive optische Detektion stabile, lager-

fähige spezielle Moleküle verwendet werden, die Licht der Wellenlänge > 700 nm absorbieren und im langwelligeren Bereich wieder als Fluoreszenzlicht emittieren.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß als Molekülklasse für die vorteilhafte IR-Fluoreszenzmarkierung das Bis-isothiocyanat-Derivat von 2-[4'-chloro-7'(3''-ethyl-2''-benzothiazolinylden)-3',5'-(1'''-propanedyl)-1', 3', 5'-heptatrien-1'yl]-3-ethylbenzothiazoliumbromid, Porphyrinderivate mit großen $2n+1$ Pi-Elektronensystemen oder Phthalocyanine verwendet werden, die sich auch durch besonders hohe Extinktionskoeffizienten auszeichnen.

25. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die repetitive optische Messung, die dem Mittelwertbildner zugeführt wird dadurch erreicht wird, daß abwechselnd die zu messende fluoreszierende Oberflächenzone und der Trägeruntergrund an einer nicht mit der Sammelphase oder den Komplementärmolekülen bedeckten Stelle gemessen wird, was durch eine Relativbewegung des optisches Strahles erreicht werden kann.

26. Vorrichtung nach Anspruch 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß als optische Anregungsquelle anstelle einer weißen Lichtquelle und eines Monochromators eine intermittierend betriebene Laserdiode im IR-Wellenlängenbereich mit hoher Strahlungsdichte, Monochromasie und Streulichtfreiheit zusammen mit einer Lock-in Verstärkungstechnik verwendet wird.

27. Verfahren zur Konzentrationsbestimmung eines Partners eines sich chemisch selektiv erkennenden komplementären Molekülpaars (Antikörper-Antigen, Rezeptor-Rezeptormolekül, DNA-Sequenz-komplementärer DNA-Strang, Gast-Wirtsmolekül) mittels eines Immuno-Assays nach den Ansprüchen 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß redox- und fluoreszenzmarkierte Analytmoleküle eingesetzt werden und die elektrochemische bzw. optische Messung der Verteilung dieser markierten Moleküle in den verschiedenen Zonen der Testvorrichtung ohne Materialverbrauch erfolgt, so daß beliebig viele repetitive Messungen möglich sind.

31

28. Verfahren nach Anspruch 1 und 27, dadurch gekennzeichnet, daß die repetitiven Messungen in reproduzierbarer Art und Weise einem Signalmittelwertsbildner zugefügt werden, so daß das Signal/Rauschverhältnis zwischen dem faradayschen Strom und dem Untergrund sowie der Oberfläche mit den fluoreszierenden Molekülen und der freien Trägeroberfläche entscheidend verbessert wird.

Verfahren und Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays

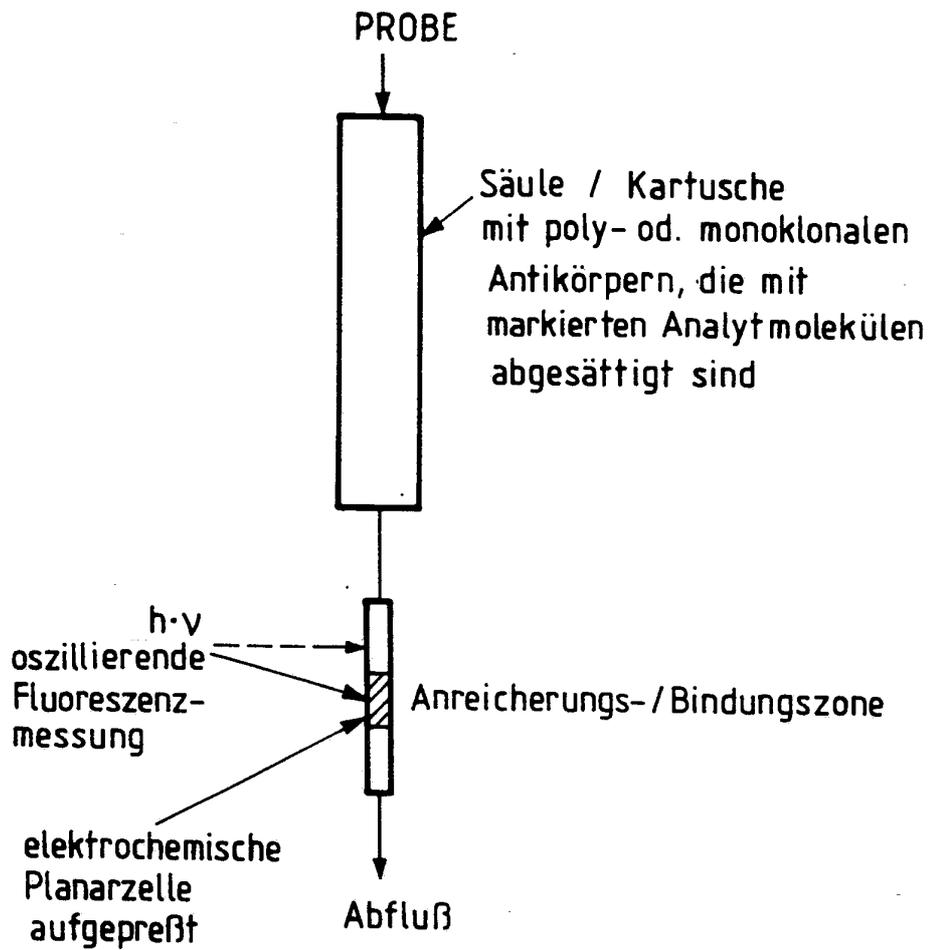
Zusammenfassung:

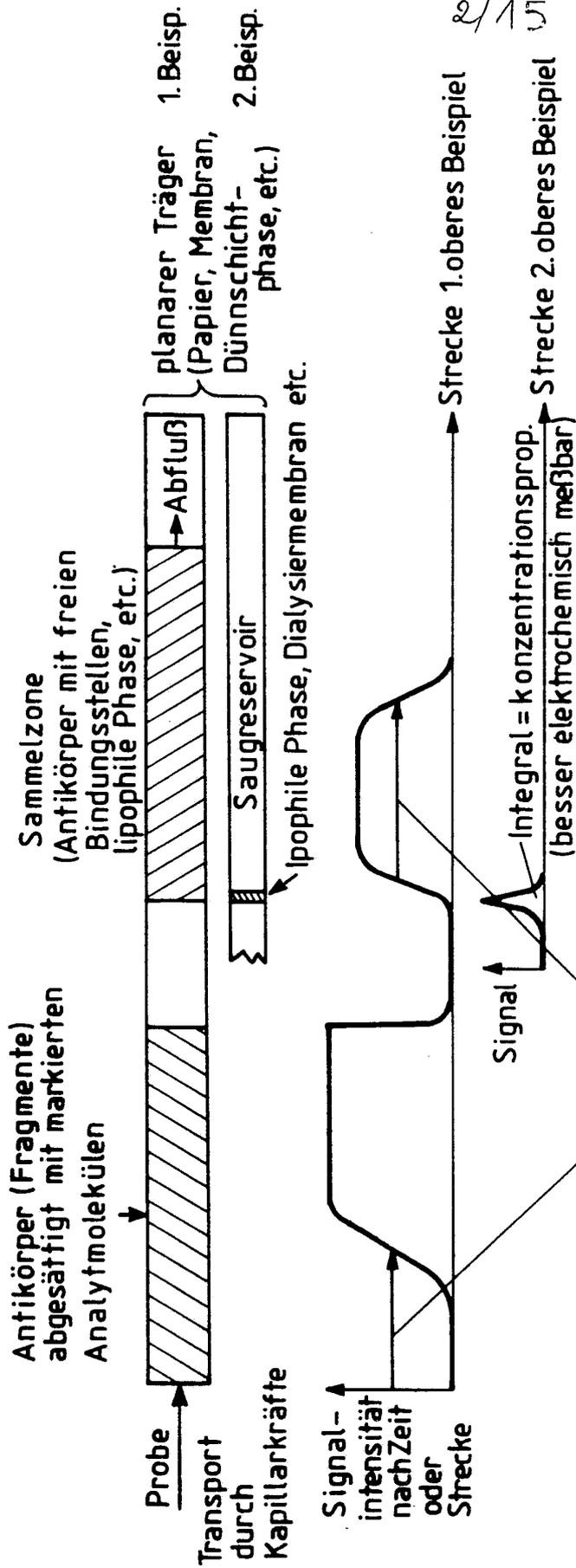
Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA-Strang- sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskräften beruhen, mit schnellen und repetitiven Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei Immuno-Assays und ähnlichen Assays.

Fig. 1

1/15

Abb. 1





Strecke oder Integralwert des Signals = konzentrationsproportional

Abb. 2

3/15

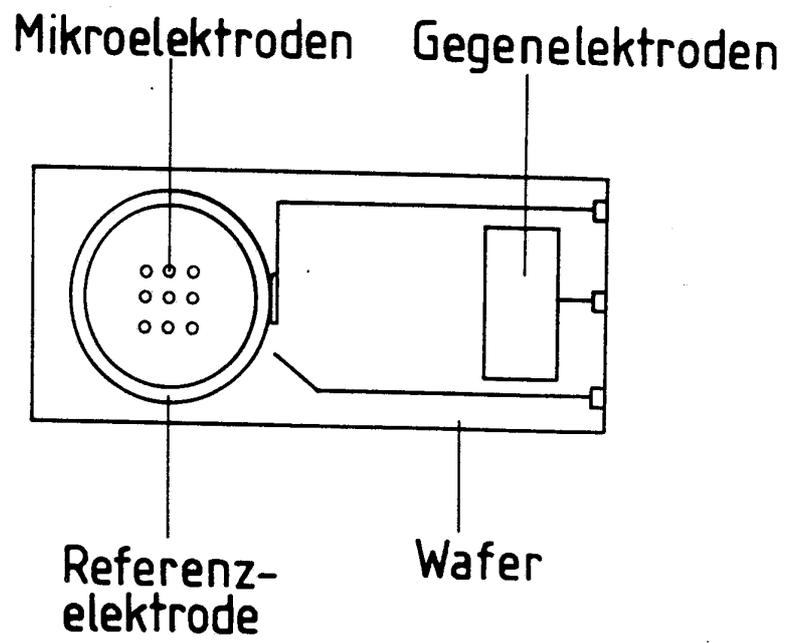
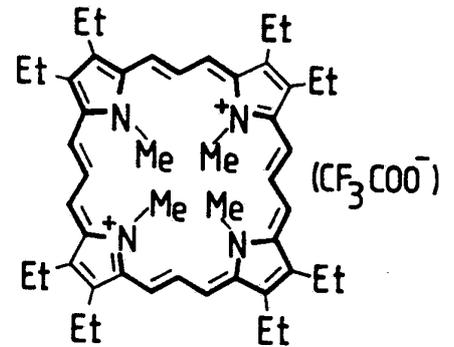
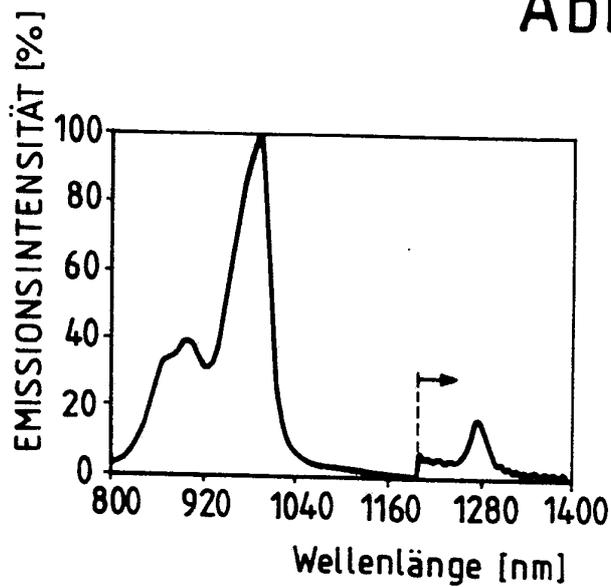


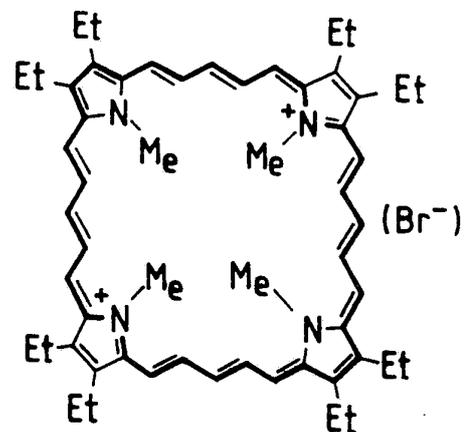
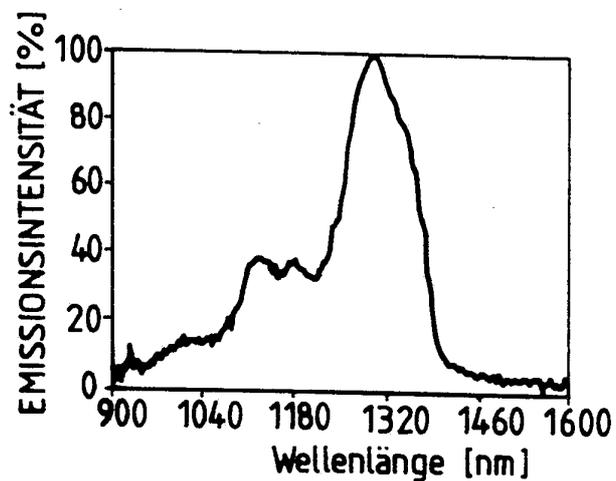
Abb. 3

4/15
Abb. 4



Fluoreszenz-Spektrum: [26] Porphyrin-(3.3.3.3)

Anregungswellenlänge: $\lambda = 546 \text{ nm}$

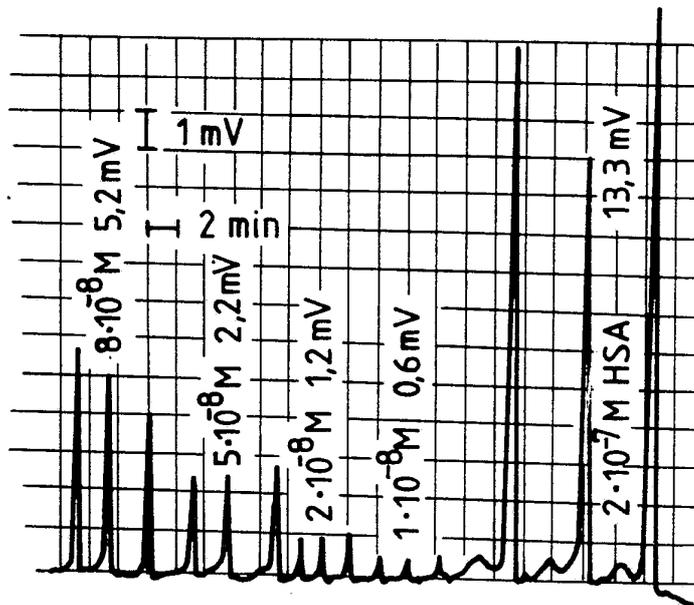


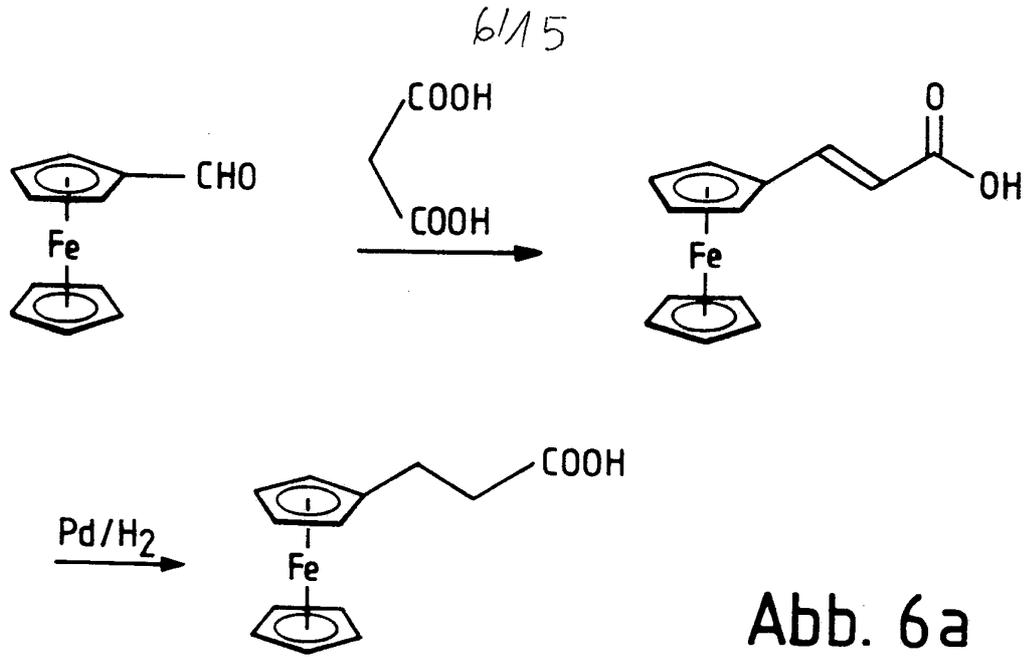
Fluoreszenz-Spektrum: [34] Porphyrin-(5.5.5.5)

Anregungswellenlänge: $\lambda = 578 \text{ nm}$

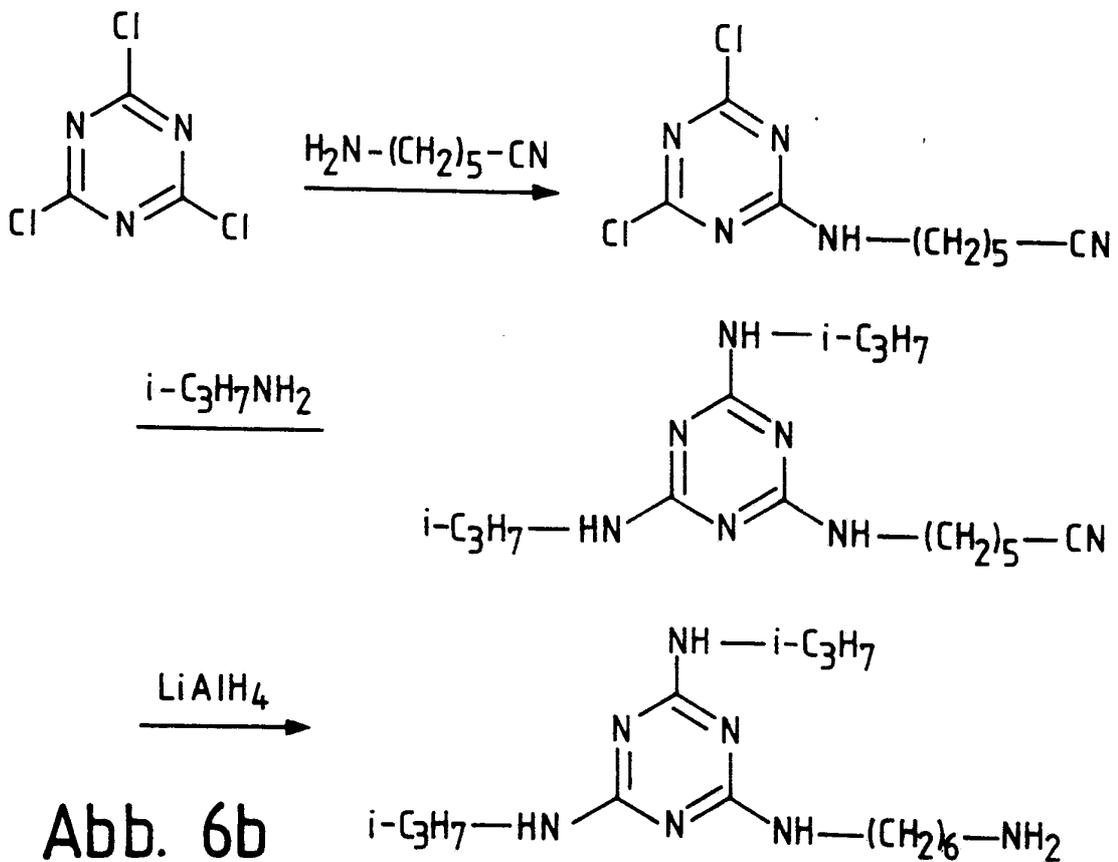
5/15

Abb. 5



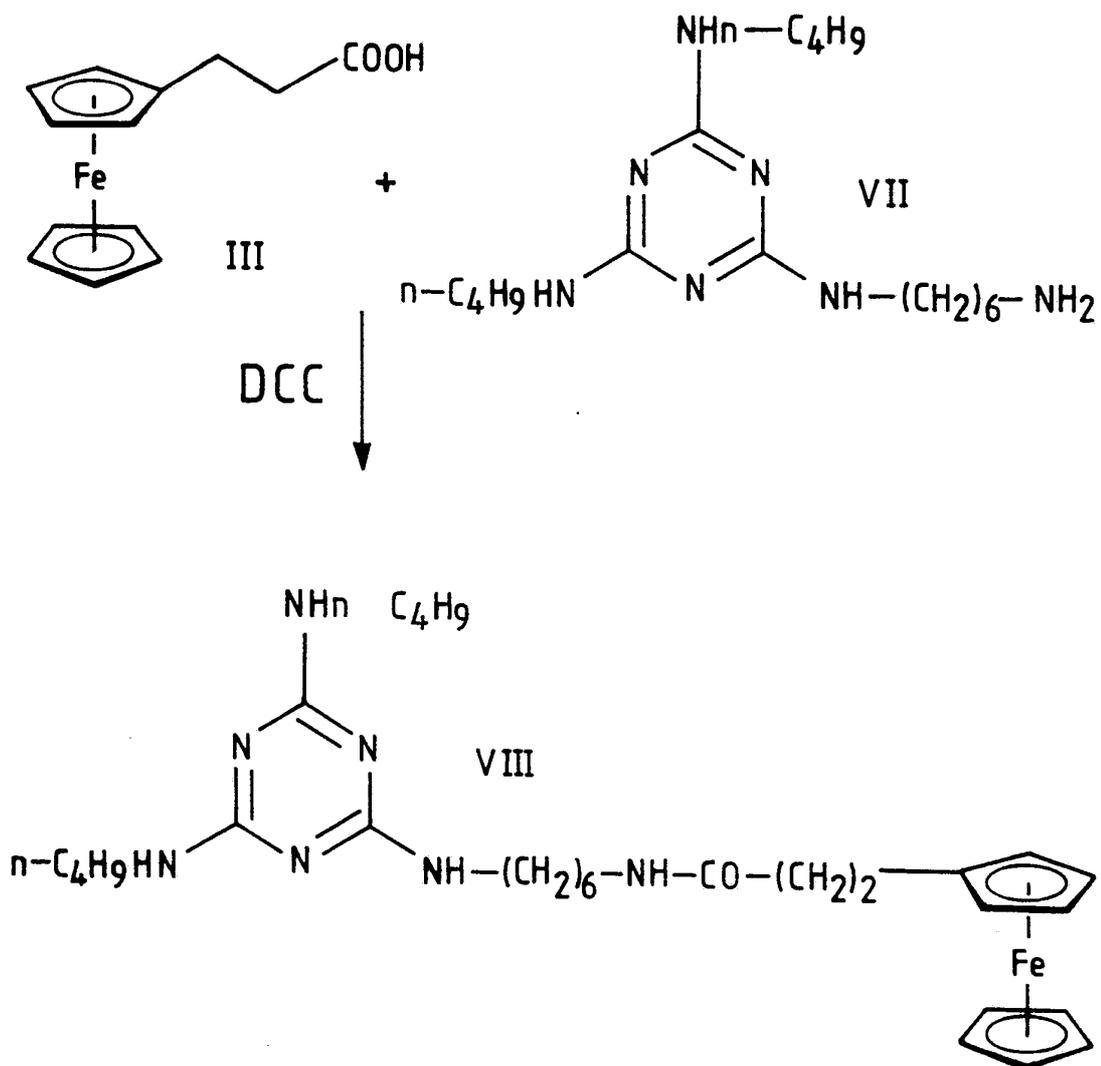


Die Synthese von 3-Ferrocenylpropionsäure.



Die Synthese aminofunktionalisierter Triazinderivate

7/15

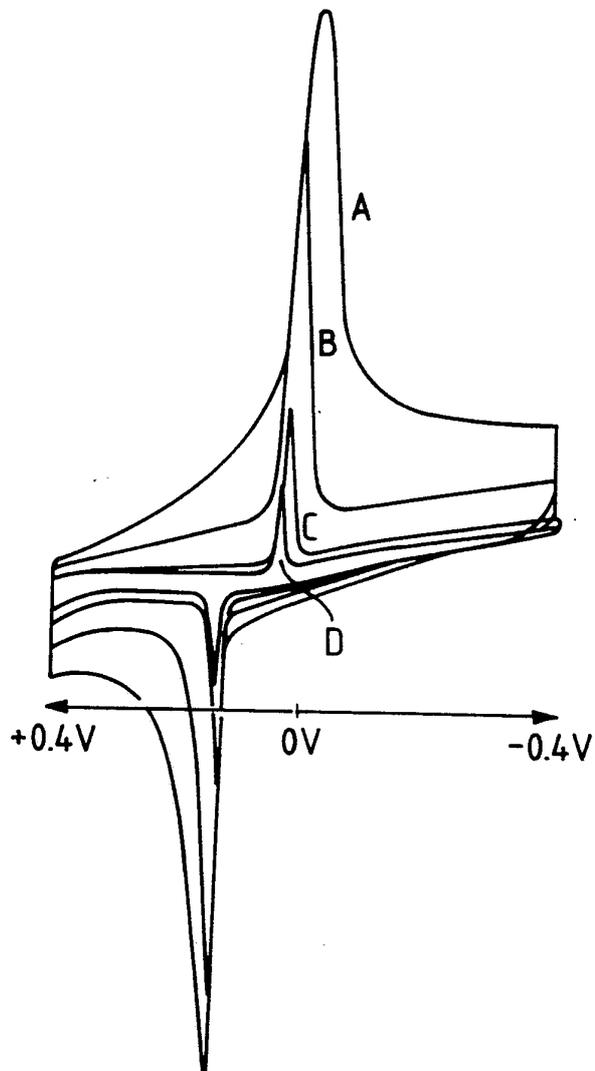


Die Umsetzung von 3-Ferrocenylpropionsäure mit einem aminofunktionalisierten Triazin zum Konjugat

Abb. 6c

8/15

Abb. 7



Stromstärke: $15\mu\text{A}/\text{cm}$, Scanraten:

A: $160\text{ mV}/\text{sec}$

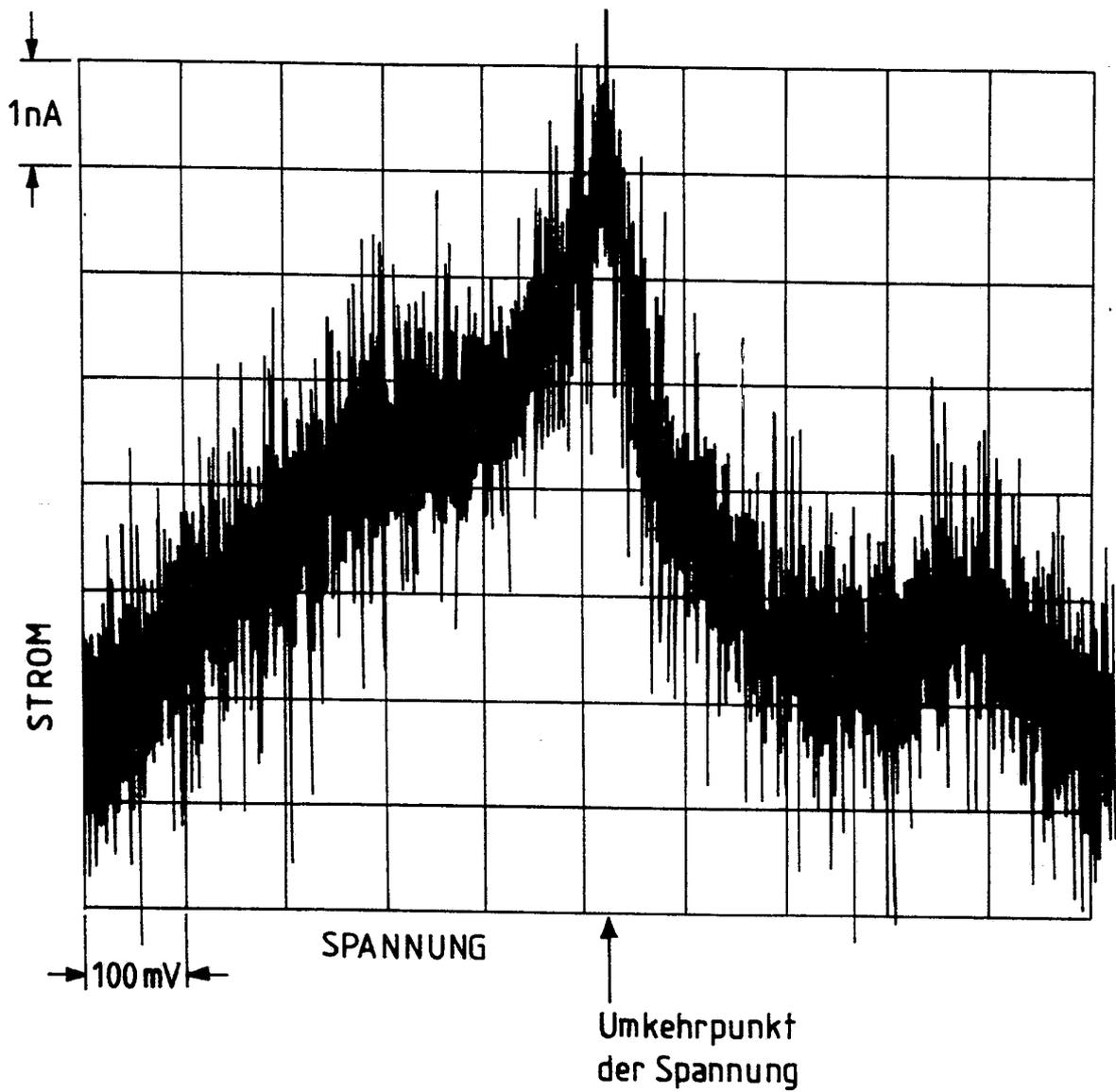
B: $80\text{ mV}/\text{sec}$

C: $26.7\text{ mV}/\text{sec}$

D: $13.3\text{ mV}/\text{sec}$

9/15

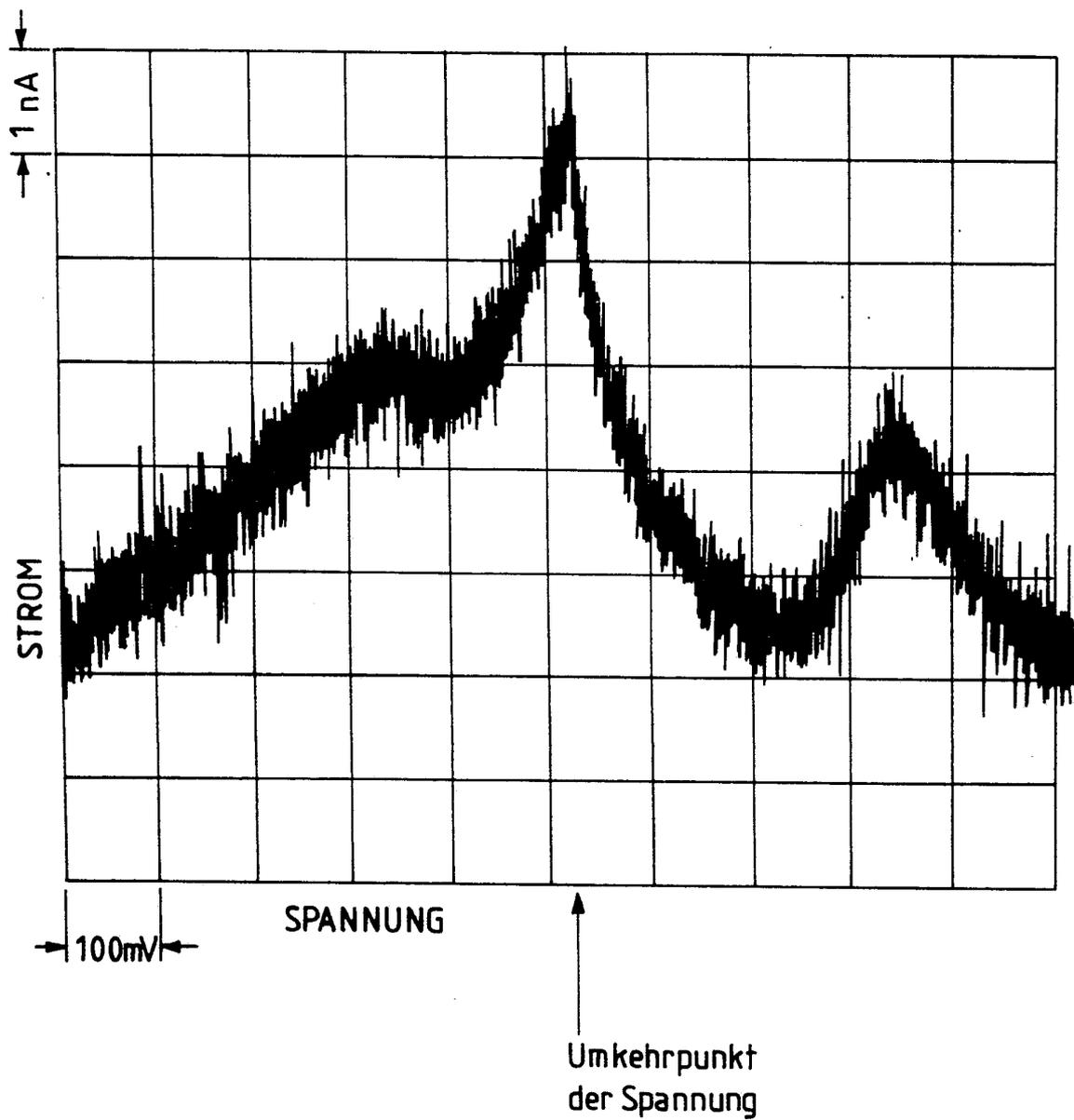
Abb. 8a



Methode: Cyclische Voltammetrie

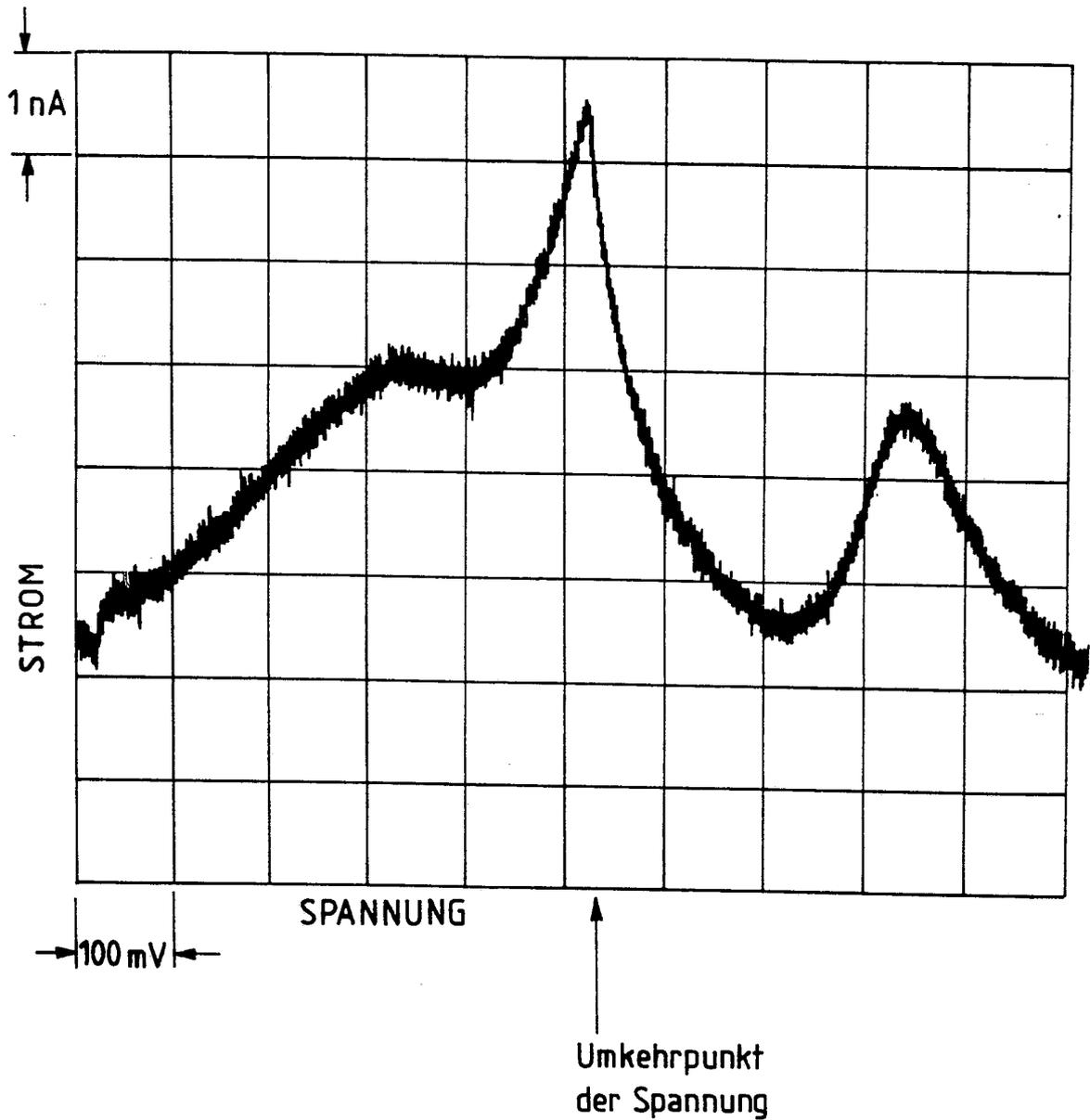
10/15

Abb. 8b



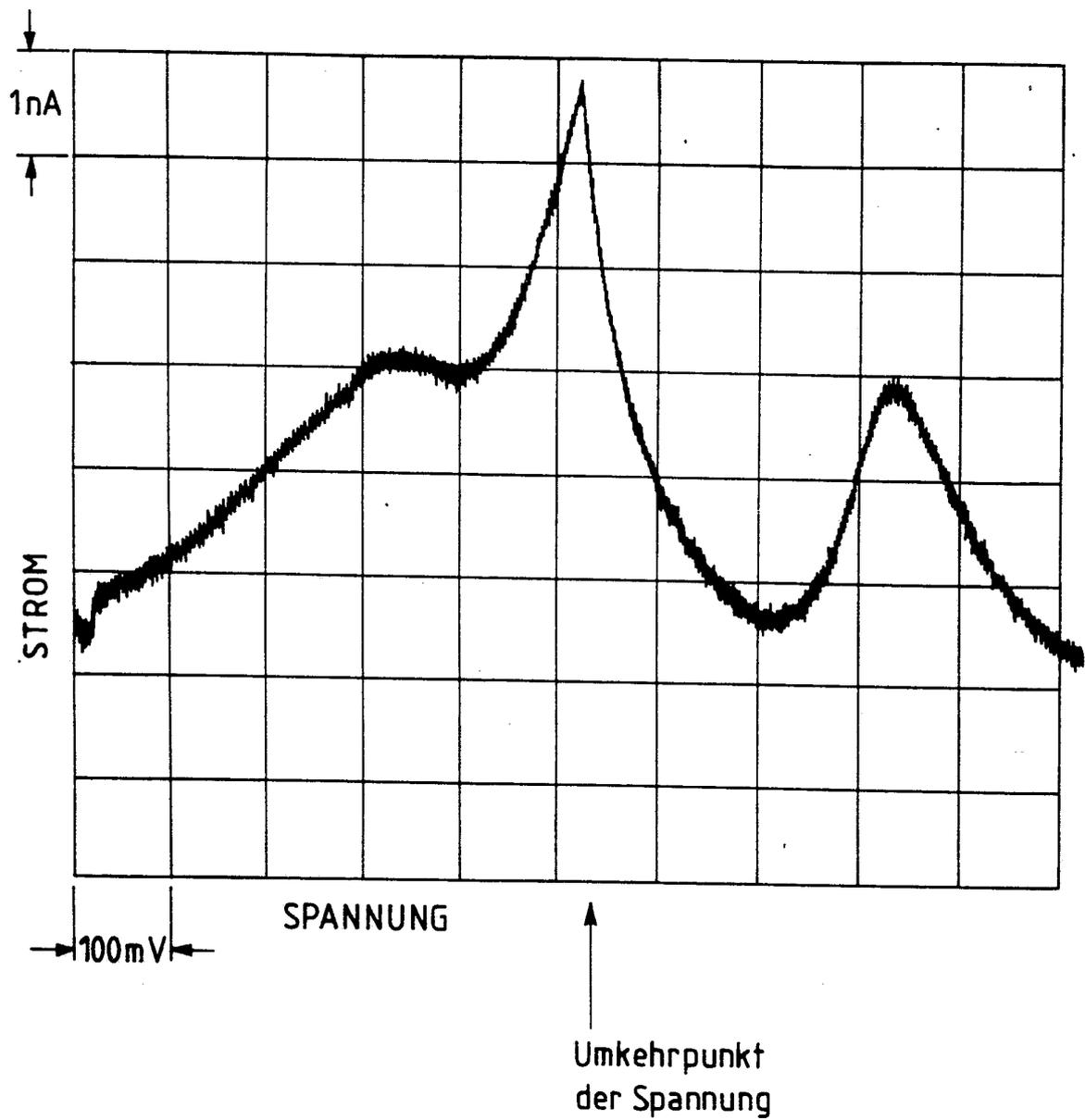
11/15

Abb. 8c



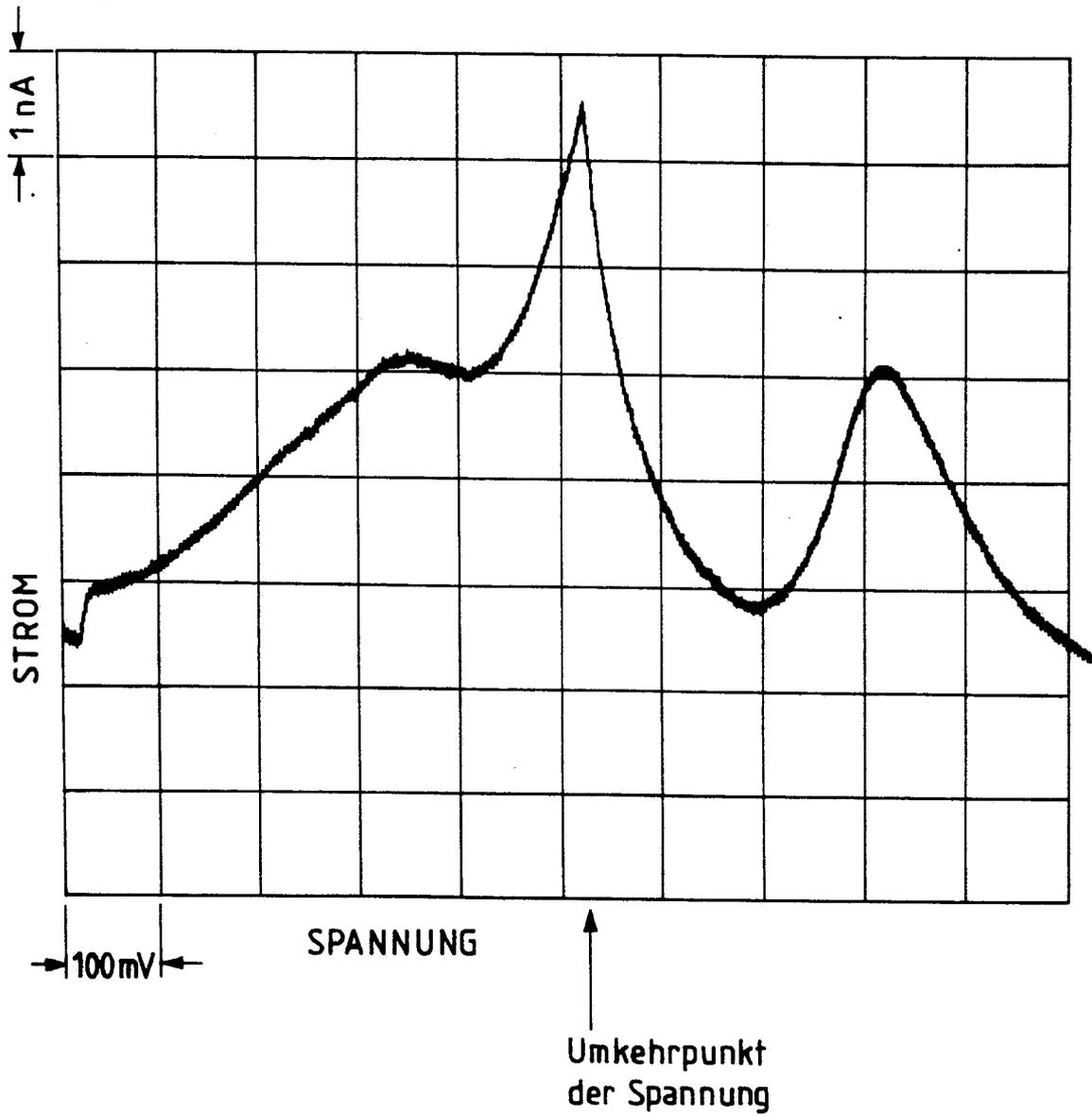
12/15

Abb. 8d



13/15

Abb. 8e



14/15

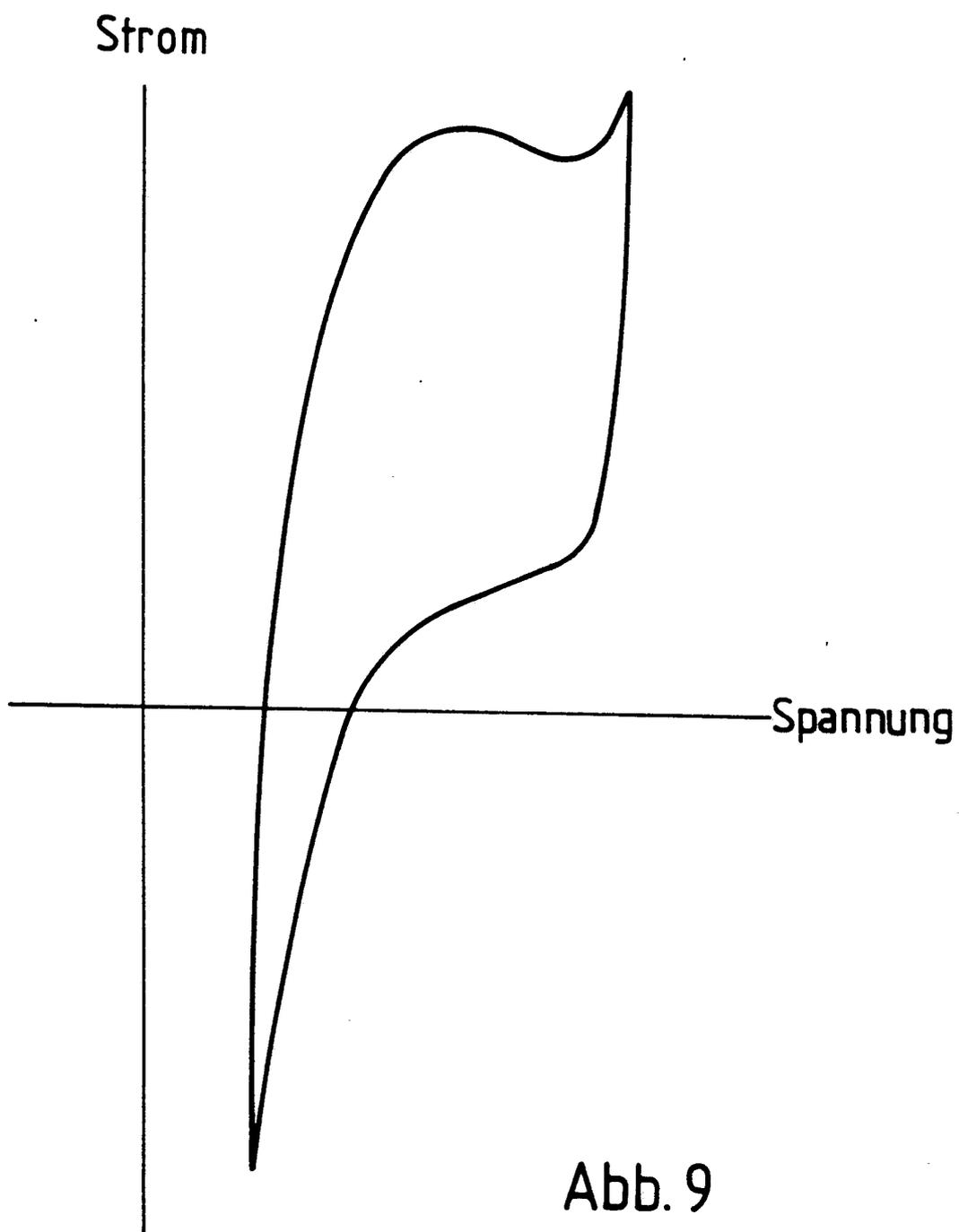


Abb. 9

15/15

Abb. 10a

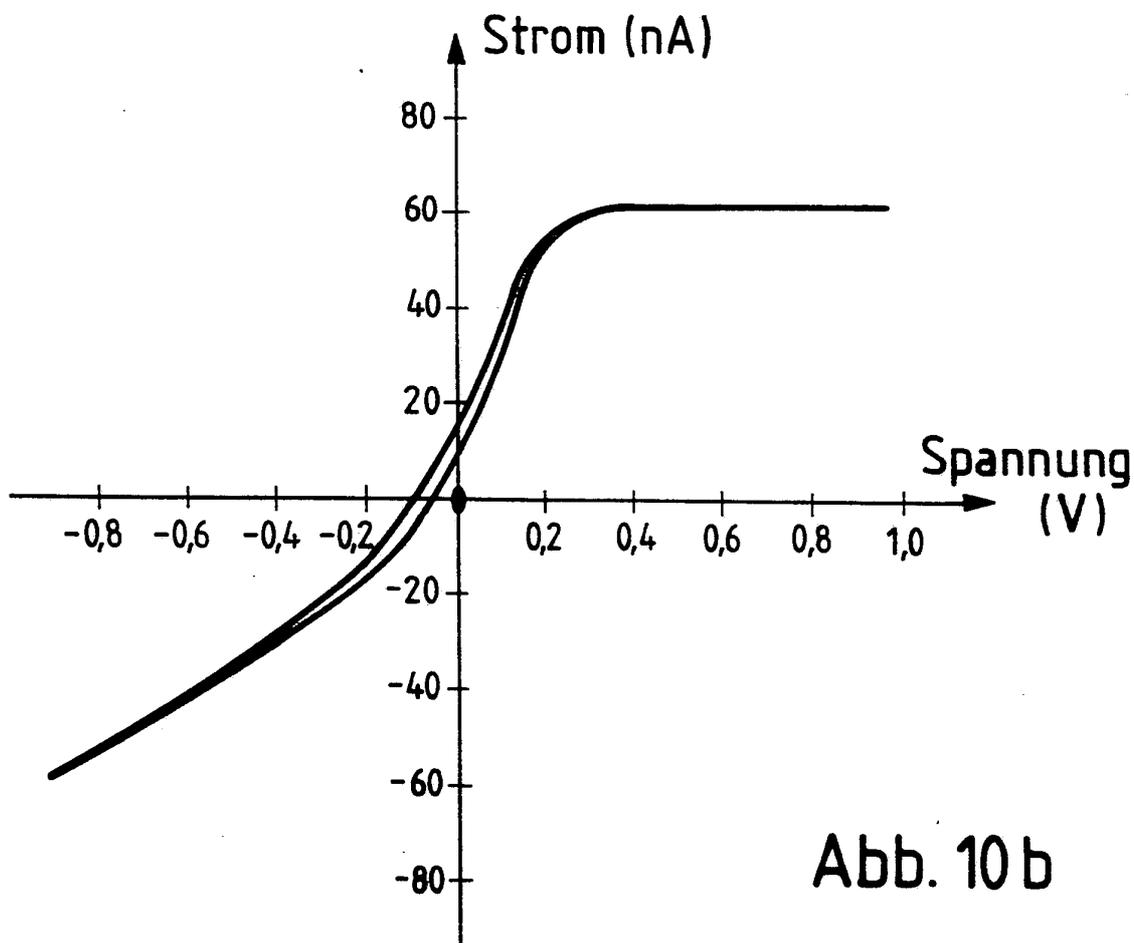
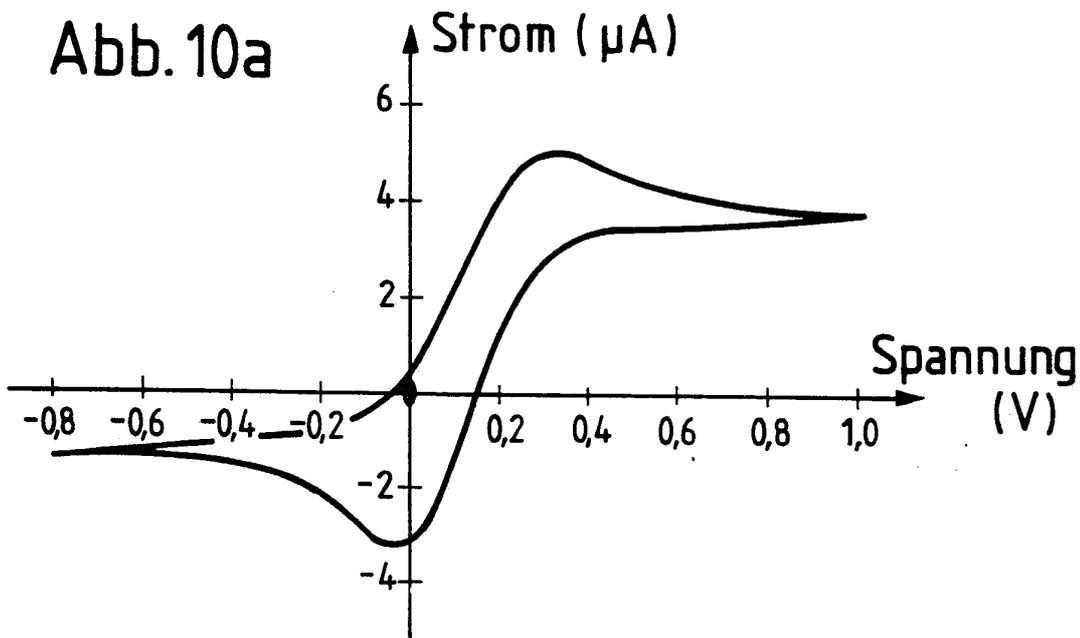


Abb. 10 b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01115

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl. 5: G01N33/58; G01N33/53; G01N21/76; G01N33/543
 G01N33/548; G01N33/538; G01N33/52; G01N21/64
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl. 5: G01N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,4 997 526 (LOIS S. ROBBLEE) 5 March 1991	1
Y	see the whole document	2-22, 27, 28
X	EP,A,0 201 339 (ULTRA DIAGNOSTICS CORPORATION) 12 November 1986	2
Y	see the whole document	2-28
A	see the whole document	1
Y	US,A,4 859 583 (MICHAEL J. HELLER) 22 August 1989	2-14, 23-28
A	see the whole document	1
Y	EP,A,0 046 004 (SYVA COMPANY) 17 February 1982	2-28
A	see the whole document	1
X	EP,A,0 171 148 (UNILEVER PLC) 12 February 1986	2
A	see the whole document	1, 3-28

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 13 August 1993 (13.08.93)	Date of mailing of the international search report 25 August 1993 (25.08.93)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9201115
SA 59971

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

13/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4997526	05-03-91	None	
EP-A-0201339	12-11-86	US-A- 4746631 AU-B- 581082 AU-A- 5730886 JP-A- 61264261 US-A- 4803170	24-05-88 09-02-89 13-11-86 22-11-86 07-02-89
US-A-4859583	22-08-89	None	
EP-A-0046004	17-02-82	US-A- 4366241 AT-T- 10548 CA-A- 1174595 JP-B- 3022589 JP-A- 57063454 JP-A- 3142361	28-12-82 15-12-84 18-09-84 27-03-91 16-04-82 18-06-91
EP-A-0171148	12-02-86	AU-A- 2967289 AU-B- 583040 AU-A- 4491085 AU-B- 588245 AU-A- 4491185 AU-B- 581669 AU-A- 4491385 CA-A- 1231136 CA-A- 1246891 CA-A- 1261256 EP-A, B 0170375 EP-A, B 0170376 EP-A- 0422708 WO-A- 8600135 WO-A- 8600141 WO-A- 8600138 JP-B- 3010902 JP-T- 61502418 JP-T- 61502419 JP-B- 2024459 JP-T- 61502420 US-A- 4978503 US-A- 4810658	25-05-89 20-04-89 10-01-86 14-09-89 10-01-86 02-03-89 10-01-86 05-01-88 20-12-88 26-09-89 05-02-86 05-02-86 17-04-91 03-01-86 03-01-86 03-01-86 14-02-91 23-10-86 23-10-86 29-05-90 23-10-86 18-12-90 07-03-89

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5	G01N33/58; G01N33/548;	G01N33/53; G01N33/538;
		G01N21/76; G01N33/52;
		G01N33/543 G01N21/64
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	G01N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ^o	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	US,A,4 997 526 (LOIS S. ROBBLEE) 5. März 1991	1
Y	siehe das ganze Dokument	2-22, 27, 28

X	EP,A,0 201 339 (ULTRA DIAGNOSTICS CORPORATION) 12. November 1986	2
Y	siehe das ganze Dokument	2-28
A	siehe das ganze Dokument	1

Y	US,A,4 859 583 (MICHAEL J. HELLER) 22. August 1989	2-14, 23-28
A	siehe das ganze Dokument	1

Y	EP,A,0 046 004 (SYVA COMPANY) 17. Februar 1982	2-28
A	siehe das ganze Dokument	1

<p>^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
13.AUGUST 1993		25. 08. 93
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT		DÖPFER K.P.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 171 148 (UNILEVER PLC)	2
A	12. Februar 1986 siehe das ganze Dokument	1,3-28

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9201115
 SA 59971

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

13/08/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4997526	05-03-91	Keine	

EP-A-0201339	12-11-86	US-A- 4746631	24-05-88
		AU-B- 581082	09-02-89
		AU-A- 5730886	13-11-86
		JP-A- 61264261	22-11-86
		US-A- 4803170	07-02-89

US-A-4859583	22-08-89	Keine	

EP-A-0046004	17-02-82	US-A- 4366241	28-12-82
		AT-T- 10548	15-12-84
		CA-A- 1174595	18-09-84
		JP-B- 3022589	27-03-91
		JP-A- 57063454	16-04-82
		JP-A- 3142361	18-06-91

EP-A-0171148	12-02-86	AU-A- 2967289	25-05-89
		AU-B- 583040	20-04-89
		AU-A- 4491085	10-01-86
		AU-B- 588245	14-09-89
		AU-A- 4491185	10-01-86
		AU-B- 581669	02-03-89
		AU-A- 4491385	10-01-86
		CA-A- 1231136	05-01-88
		CA-A- 1246891	20-12-88
		CA-A- 1261256	26-09-89
		EP-A, B 0170375	05-02-86
		EP-A, B 0170376	05-02-86
		EP-A- 0422708	17-04-91
		WO-A- 8600135	03-01-86
		WO-A- 8600141	03-01-86
		WO-A- 8600138	03-01-86
		JP-B- 3010902	14-02-91
		JP-T- 61502418	23-10-86
		JP-T- 61502419	23-10-86
		JP-B- 2024459	29-05-90
		JP-T- 61502420	23-10-86
		US-A- 4978503	18-12-90
		US-A- 4810658	07-03-89

EPO FORM P0673