



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 38 470 T2 2008.12.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 946 865 B1

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/47** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 38 470.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/23663**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 952 578.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/027417**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.12.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **25.06.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.10.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.01.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.12.2008**

(30) Unionspriorität:

768449 18.12.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

BE, DE, ES, FR, GB, IT, NL, SE

(73) Patentinhaber:

Kimberly-Clark Worldwide, Inc., Neenah, Wis., US

(72) Erfinder:

**EVERHART, Dennis S., Alpharetta, GA 30201, US;
KAYLOR, Rosann Marie, Cumming, GA 30131, US;
GRUNZE, Michael, D-69151 Neckargemünd, DE;
MORHARD, Friderike Karolin, D-69115 Heidelberg, DE**

(74) Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80802 München

(54) Bezeichnung: **DIFFRAKTIONSSABBILDENDE BIOSENSOREN**

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**TECHNISCHES GEBIET**

[0001] Die vorliegende Erfindung liegt allgemein auf dem Gebiet des Nachweisen von Analyten in einem Medium und genauer gesagt betrifft die vorliegende Erfindung das Mikrokontaktdrucken analytenspezifischer Rezeptoren auf metallisierte Kunststofffilme für die Entwicklung von Wegwerfsensoren zur Einmalverwendung zum Anzeigen der Anwesenheit eines Analyten in einem Medium.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Viele System und Vorrichtungen sind zum Nachweisen einer großen Vielfalt von Analyten in verschiedenen Medien erhältlich. Die meisten dieser Systeme und Vorrichtungen sind relativ teuer und erfordern einen ausgebildeten Techniker, um den Test durchzuführen. Es gibt viele Fälle, in denen es vorteilhaft wäre, bestimmen zu können, ob ein Analyt in einer großen Anzahl von Proben vorliegen würde. Ein gutes Beispiel für diese Art von Bedarf ist beim Verpacken von Lebensmitteln. Derzeit werden Lebensmittelproben durch herkömmliche Assaytechniken stichprobenartig auf eine mikrobielle Verunreinigung getestet. Obwohl dieses Probenahmeverfahren Trends in einer Population von Proben anzeigt, testet es nicht jede Probe in einer Population. Was benötigt wird, ist ein preiswertes und genaues Verfahren zum Testen jeder verwendeten Probe.

[0003] Sandstrom et al., 24 Applied Optics 472, 1985, beschreiben die Verwendung eines optischen Siliciumsubstrats mit einer Siliciummonoxidschicht und einer Siliciumschicht, die als dielektrische Filme gebildet werden. Sie geben an, dass eine Änderung der Filmdicke die Eigenschaften des optischen Substrats ändert, wodurch in Bezug auf die Filmdicke unterschiedliche Farben erzeugt werden. Die Filmdicke steht in Beziehung zu der beobachteten Farbe und ein Film, der auf einem optischen Substrat bereitgestellt wird, kann eine sichtbare Farbänderung erzeugen. Die Autoren geben an, dass ein mathematisches Modell verwendet werden kann, um die Farbänderung zu quantifizieren, und dass "[B]erechnungen, die unter Verwendung des Computermodells durchgeführt werden, zeigen, dass aus der Verwendung einer mehrschichtigen Struktur sehr wenig an optischer Leistung gewonnen werden kann, aber dass eine Bioschicht auf der Oberfläche die Reflexion derartiger Strukturen sehr wenig ändert, da die optischen Eigenschaften hauptsächlich durch die Grenzflächen innerhalb der mehrschichtigen Struktur bestimmt werden. Das empfindlichste System zum Nachweis von Bioschichten ist ein einschichtiger Überzug, während bei den meisten anderen Anwendungen die Leistung durch zusätzliche dielektrische Schichten erbracht werden kann." Sandstrom et al.

geben weiter an, dass aus Metalloxiden auf Metall gebildete Objekträger bestimmte Nachteile aufweisen und dass die Anwesenheit von Metallionen bei vielen biochemischen Anwendungen auch schädlich sein kann. Sie geben an, dass der ideale dielektrische Deckfilm eine 2–3 nm dicke Schicht aus Siliciumdioxid ist, die spontan gebildet wird, wenn eine Schicht aus Siliciummonoxid bei Umgebungsatmosphäre abgeschieden wird, und dass eine 70–95 nm dicke Schicht aus Siliciumdioxid auf einer 40–60 nm dicken Schicht aus Siliciummonoxid auf einem Glas- oder Kunststoffsubstrat verwendet werden kann. Sie beschreiben auch die Bildung eines Siliciummonoxidkeils durch selektives Ätzen des Siliciummonoxids, Behandlung der Siliciumdioxidoberfläche mit Dichlordimethylsilan und Auftragen einer Bioschicht aus Antigen und Antikörper. Aus dieser Keilkonstruktion konnten sie die Filmdicke mit einem Ellipsometer bestimmen und merken an, dass der "maximale Kontrast in dem Bereich um 65 nm gefunden wurde, wo sich die Interferenzfarbe von lila nach blau änderte." Sie geben an, dass die Empfindlichkeit eines derartigen Systems für den Nachweis von Proteinantigenen durch immobilisierte Antikörper hoch genug ist. Sie schließen, dass "die angegebenen Gestaltungen für einen großen Anwendungsbereich empfindlich genug sind. Die Materialien, d. h. Glas, Silicium und Siliciumoxide, sind chemisch inert und beeinflussen die untersuchte biochemische Reaktion nicht. Unter Verwendung der vorstehenden Berechnungen ist es möglich, Objekträger zu gestalten, die für unterschiedliche Anwendungen optimiert sind. Die Objekträger können durch Industrieverfahren hergestellt und qualitätsgesichert werden und zwei Entwürfe sind nun im Handel erhältlich.

[0004] Das US-Patent Nr. 5,482,830 an Bogart et al. beschreibt eine Vorrichtung, die ein Substrat einschließt, das eine optisch aktive Oberfläche aufweist, die als Reaktion auf darauf einfallendes Licht eine erste Farbe zeigt. Diese erste Farbe wird als eine Spektralverteilung des herausstrahlenden Lichts definiert. Das Substrat zeigt auch eine zweite Farbe, die anders als die erste Farbe ist (indem sie eine Kombination von Lichtwellenlängen aufweist, die sich von der in der ersten Farbe vorliegenden Kombination unterscheidet, oder indem sie eine andere Spektralverteilung aufweist, oder indem sie eine andere Intensität einer oder mehrerer dieser Wellenlängen aufweist, als sie in der ersten Farbe vorliegen). Die zweite Farbe wird als Reaktion auf das gleiche Licht gezeigt, wenn der Analyt auf der Oberfläche vorliegt. Die Änderung von einer Farbe zur anderen kann entweder durch die Verwendung eines Geräts oder durch das Auge gemessen werden. Ein derartig empfindlicher Nachweis ist ein Fortschritt gegenüber den von Sandstrom und Nygren, vorstehend, beschriebenen Vorrichtungen und ermöglicht die Verwendung der Vorrichtungen auf rentable und kompetitive Weise.

[0005] Das Verfahren und die Vorrichtungen, die in dem Patent von Bugart et al. beschrieben werden, haben jedoch einige Nachteile. Ein Nachteil sind die hohen Kosten der Vorrichtung. Ein anderes Problem mit der Vorrichtung ist die Schwierigkeit, die verschiedenen Lagen zu kontrollieren, die auf der Scheibe angeordnet werden, so dass man eine verlässliche Ablesung erhält. Was benötigt wird, ist eine Biosensor-Vorrichtung, die leicht und preiswert herzustellen ist und zum verlässlichen und empfindlichen Nachweis des nachzuweisenden Analyten fähig ist.

[0006] US 5512131 offenbart ein Verfahren zur Musterbildung ebener oder nicht ebener Oberflächen mit selbstorganisierten molekularen Monoschichten (SAMs) auf Oberflächen-Metallschichten 32 unter Verwendung eines Mikrostempels 20 mit Vertiefungen 24, sowie dadurch hergestellte Gegenstände, zur Verwendung als biochemische Sensoren. Die SAM-Moleküle in den Bereichen 28 haben jeweils eine funktionelle Gruppe, wie zum Beispiel ein Thiol, das sich selektiv an einer Metalloberfläche 30 der Schicht 32 anheftet, wobei der Rest jedes Moleküls mit den benachbarten Molekülen in der Monoschicht in Wechselwirkung tritt, um eine relativ geordnete Anordnung zu bilden. Die SAM-Muster bilden sich aus einer exponierten molekularen Spezies, die das Befestigen biologischer Spezies (z. B. Antikörper) gestattet, sowie einer Funktionalität für die Befestigung an einer Metalloberfläche und einen Abstandshalterteil zwischen der Form R'-A-R", wobei R' an die Oberfläche 30 bindet, A ein Abstandshalter ist und R" eine Gruppe ist, die exponiert ist. Ein dünner Metallfilm 32 kann auf einem Substrat 34 liegen, das selbst in Form eines Films aus einem Material, wie zum Beispiel Kunststoff oder einem anderen organischen Polymer, vorliegt. Der Nachweis der Beendigung des Assays wird zum Beispiel unter Verwendung eines Analyten durchgeführt, der mit einer reflektiven Spezies, wie zum Beispiel Gold, markiert ist, so dass die Analyse bei der Bestrahlung durch einen Laser in den Bereichen 28 auf der Grundlage von Reflexion durchgeführt wird. Alternativ dazu kann ein großer Bereich der Bereiche 28 mit kohärenter elektromagnetischer Strahlung beleuchtet und ein Beugungsmuster beobachtet werden, wobei die Intensität des Beugungsmusters verwendet wird, um die Menge an immobilisierter Markierung zu quantifizieren.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt eine preiswerte und empfindliche Vorrichtung und ein Verfahren zum Nachweisen und Quantifizieren von Analyten, die in einem Medium vorliegen, gemäß der angehängten unabhängigen Ansprüche 1, 30 bereit. Die Vorrichtung umfasst einen metallisierten Film, auf den ein spezifisches vorbestimmtes Muster eines analytenspezifischen Rezeptors gedruckt ist. Nach Befestigung eines Zielanalyten, der fähig ist, Licht zu

streuen, an ausgewählten Flächen des Kunststofffilms, auf den der Rezeptor gedruckt ist, findet mittels der physikalischen Dimensionen und der definierten, präzisen Anordnung des Analyten eine Beugung von Durchlicht und/oder reflektiertem Licht statt. Ein Beugungsbild wird erzeugt, das leicht mit dem Auge oder gegebenenfalls mit einer sensorischen Vorrichtung gesehen werden kann.

[0008] Die vorliegende Erfindung benutzt Verfahren zum Kontaktdrucken von gemusterten, selbstorganisierenden Monoschichten von Alkanthiolaten, Carbonsäuren, Hydroxamsäuren und Phosphonsäuren auf metallisierte thermoplastische Filme, die dadurch hergestellten Zusammensetzungen und die Verwendung dieser Zusammensetzungen. An die selbstorganisierenden Monoschichten sind aufnahmefähige Materialien gebunden. Die aufnahmefähigen Materialien sind für einen bestimmten Analyten oder eine bestimmte Analytenklasse spezifisch, je nach dem verwendeten Rezeptor. Die Verfahren zum Kontaktdrucken gemusterter, selbstorganisierender Monoschichten werden vollständig in den US-Patentanmeldungen Nr. 08/707,456 und 08/768,449 offenbart.

[0009] Gemusterte selbstorganisierende Monoschichten ermöglichen mittels der Muster analytenspezifischer Rezeptoren die kontrollierte Anordnung von Analyten darauf. Die dadurch hergestellten erfundungsgemäßen biosensorischen Vorrichtungen werden verwendet, indem die biosensorische Vorrichtung zuerst einem Medium ausgesetzt wird, das den Analyten der Wahl enthält, und indem dann, nach einer angemessenen Inkubationszeit, ein Licht, wie zum Beispiel ein Laser, durch den Film durchgeleitet wird. Falls der Analyt im Medium vorliegt und an die Rezeptoren auf der gemusterten selbstorganisierenden Monoschicht gebunden ist, wird das Licht auf eine derartige Weise gebeugt, dass ein sichtbares Bild erzeugt wird. Mit anderen Worten, die gemusterten selbstorganisierenden Monoschichten mit dem daran gebundenen Analyten können optische Beugungsmuster erzeugen, die sich je nach der Reaktion des Rezeptors auf der selbstorganisierenden Monoschicht mit dem Analyten von Interesse unterscheiden. Das Licht kann sich im sichtbaren Spektrum befinden und kann entweder von dem Film reflektiert oder durch ihn durchgeleitet werden, und bei dem Analyten kann es sich um jede Verbindung oder jedes Teilchen handeln, die bzw. das mit der selbstorganisierenden Monoschicht reagiert. Bei dem Licht kann es sich um ein weißes Licht oder um monochromatische elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Bereich handeln. Die vorliegende Anmeldung offenbart auch einen flexiblen Träger für eine selbstorganisierende Monoschicht auf Gold oder einem anderen geeigneten Metall oder einer anderen geeigneten Metalllegierung.

[0010] Die vorliegende Anmeldung offenbart einen

Träger für eine selbstorganisierende Monoschicht auf Gold oder einem anderen geeigneten Material, der keinen Adhäsionspromotor für die Bildung einer wohlgeordneten selbstorganisierenden Monoschicht erfordert. Die vorliegende Anmeldung offenbart auch einen Träger für eine selbstorganisierende Monoschicht auf Gold oder einem anderen geeigneten Material, der für kontinuierliches Drucken anstelle von Chargenfertigung geeignet ist. Zusätzlich stellt die vorliegende Erfindung einen preiswerten Wegwert-Biosensor bereit, der massenproduziert werden kann. Die erfindungsgemäßen Biosensoren können als ein einzelner Test zum Nachweisen eines Analyten hergestellt werden oder sie können als eine Mehrfachtestvorrichtung formatiert werden. Die erfindungsgemäßen Biosensoren können verwendet werden, um eine Verunreinigung in Kleidungsstücken, wie zum Beispiel Windeln, nachzuweisen, und um eine Verunreinigung durch Mikroorganismen nachzuweisen.

[0011] In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform können Nährstoffe für eine spezifische Klasse von Mikroorganismen in die selbstorganisierende Monoschicht eingegliedert werden. Auf diese Weise können sehr geringe Konzentrationen von Mikroorganismen nachgewiesen werden, indem der erfindungsgemäße Biosensor zuerst mit den darin eingegliederten Nährstoffen in Kontakt gebracht wird und der Biosensor dann unter Bedingungen inkubiert wird, die für das Wachstum des gebundenen Mikroorganismus angemessen sind. Man lässt den Mikroorganismus wachsen, bis es genügend Organismen gibt, um ein Beugungsmuster zu bilden.

[0012] Die vorliegende Erfindung kann auch auf Kontaktlinsen, Augengläsern, Fensterscheiben, pharmazeutischen Fläschchen, Lösungsmittelbehältern, Wasserflaschen, Wundpflaster und dergleichen verwendet werden, um eine Verunreinigung nachzuweisen.

[0013] Diese und andere Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden nach einer Durchsicht der folgenden ausführlichen Beschreibung der offenbarten Ausführungsformen ersichtlich werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0014] [Fig. 1](#) zeigt einen Biosensor, der zum gleichzeitigen Messen mehrerer unterschiedlicher Analyte in einem Medium fähig ist.

[0015] Bei [Fig. 2](#) handelt es sich um eine schematische Darstellung des Kontaktdrucks selbstorganisierender Monoschichten. Ein Polydimethylsiloxan (PDMS; Silikonelastomer 184; Dow Corning Corp., Midland, MI) wird auf einer Silikonvorlage, die ein vorbestimmtes Muster enthält, polymerisiert. Dieses Muster hat Pixel, die sich einer Größe von einem Mi-

krometer nähern, und könnte das Beugungsbild eines einfachen Hologramms darstellen. Das PDMS wird von der Vorlage abgezogen und dann einer $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ enthaltenden Lösung ausgesetzt. Der mit Alkanthiol beschichtete Stempel wird dann auf das goldbeschichtete Substrat gestempelt. Dann wird die Oberfläche des Substrats einer Lösung ausgesetzt, die ein anderes Alkanthiol, wie zum Beispiel $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$, enthält.

[0016] Bei [Fig. 3](#) handelt es sich um ein Rasterkraftmikroskopiebild von aufgedampftem Gold auf MYLAR®, gekauft von Courtaulds Performance Films (Canoga Park, CA). Die durchschnittliche Rauigkeit der Goldschicht beträgt 3–4 Nanometer, wobei die maximale Rauigkeit 9 Nanometer beträgt.

[0017] Bei den [Fig. 4a](#), [Fig. 4b](#) und [Fig. 4c](#) handelt es sich um Rasterkraftmikroskopiebilder eines hydrophilen selbstorganisierenden Monoschichtkreises aus 16-Mercaptohexadecansäuren, wie in Beispiel 1 beschrieben wird.

[0018] Bei [Fig. 4a](#) handelt es sich um ein Topographiebild, bei [Fig. 4b](#) handelt es sich um ein Querkraftbild und bei [Fig. 4c](#) handelt es sich um eine dreidimensionale Graphik eines Topographiebildes.

[0019] Bei [Fig. 5](#) handelt es sich um ein sekundäres Feldemissionselektronenmikroskopiebild von Kreisen mit 10 Mikrometer Durchmesser aus hydrophilen, selbstorganisierenden Monoschichten, die durch Drucken von 16-Mercaptohexadecansäure, wie im nachstehenden Beispiel 1 beschrieben wird, gebildet werden.

[0020] Bei [Fig. 6a](#) handelt es sich um eine optische Mikraufnahme von Kreisen mit 10 Mikrometer Durchmesser aus hydrophilen selbstorganisierenden Monoschichten, die durch Drucken von 16-Mercaptohexadecansäure, wie im nachstehenden Beispiel 1 beschrieben wird, gebildet werden und nachdem sie einem härtbaren optischen Klebstoff mit hoher Oberflächenenergie ausgesetzt wurden, bei einer Vergrößerung von 300x. Der Klebstoff wurde durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV) gehärtet.

[0021] Bei [Fig. 6b](#) handelt es sich um eine Photographie des Beugungsmusters, das durch sichtbares Licht gebildet wird, welches durch das selbstorganisierende Monoschichtmuster, das durch [Fig. 5a](#) beschrieben wird, durchgeleitet wird.

[0022] Bei [Fig. 7](#) handelt es sich um ein sekundäres Feldemissionselektronenmikroskopiebild von Kreisen mit 10 Mikrometer Durchmesser, die durch Drucken von selbstorganisierten photohärtbaren Polymeren auf hydrophilen, selbstorganisierenden Monoschichten gebildet werden, nachdem sie einem UV-härtbaren Klebstoff mit hoher Oberflächenener-

gie ausgesetzt wurden.

[0023] Bei [Fig. 8](#) handelt es sich um ein sekundäres Feldemissionselektronenmikroskopiebild von Kreisen aus selbstorganisierenden Monoschichten mit 1,5 Mikrometer Durchmesser, die auf goldbeschichtetem MYLAR®, wie in Beispiel 1 beschrieben wird, gedruckt wurden.

[0024] Bei den [Fig. 9a](#) und [Fig. 9b](#) handelt es sich um Beugungs-Biosensoren für *Saccharomyces cerevisiae*, beruhend auf dem Kontaktdrucken von selbstorganisierenden Monoschichten.

[0025] [Fig. 10a](#) zeigt die Anhaftung von *Candida tropicalis* als Funktion der Oberflächenmodifikation. Bei diesen Figuren handelt es sich bei den Kreisen um HS-(CH₂)₁₅-CH₃, das mit CH₃ bezeichnet wird, und bei der umgebenden Fläche um HS-(CH₂)₁₅COOH, das mit COOH bezeichnet wird. Bei [Fig. 10b](#) handelt es sich um eine Photographie des Beugungsmusters von dem in [Fig. 10a](#) gezeigten Muster.

[0026] Die [Fig. 11a](#) und [Fig. 11b](#) zeigen die Anhaftung von *Candida tropicalis* als Funktion der Oberflächenmodifikation. Bei diesen Figuren handelt es sich bei den Kreisen um HS-(CH₂)₁₅COOH, das mit COOH bezeichnet wird, und bei der umgebenden Fläche um HS-(CH₂)₁₅-CH₃, das mit CH₃ bezeichnet wird. Bei [Fig. 11a](#) handelt es sich um eine Mikraufnahme. Bei [Fig. 11b](#) handelt es sich um eine Photographie des Beugungsmusters von dem in [Fig. 11a](#) erzeugten Muster.

[0027] [Fig. 12](#) zeigt eine *Saccharomyces cerevisiae* Zelle, die Mitose durchführt. [Fig. 13](#) zeigt *Saccharomyces cerevisiae* auf 10 µ großen Kreisen mit einer L-Fucose-Endgruppe.

[0028] Die [Fig. 14a](#) und [Fig. 14b](#) zeigen die Bindung von aminomodifizierten Polystyrolteilchen an Kreise, die mit Mercaptohexadecansäure beschichtet sind. Bei [Fig. 14b](#) handelt es sich um eine Ansicht der in [Fig. 14a](#) gezeigten Probe bei hoher Vergrößerung.

[0029] Die [Fig. 15a](#) und [Fig. 15b](#) zeigen ein sekundäres Feldemissionselektronenmikroskopiebild von Concanavalin A, das mit 20 µm großen Goldteilchen markiert ist, die an einer mit Zucker modifizierten, selbstorganisierenden Monoschicht befestigt sind. Das 20 µm große Gold auf dem Concanavalin A erzeugt einen hohen Kontrast für die Bildgebung. Bei [Fig. 15a](#) handelt es sich um eine Ansicht der Goldteilchen in [Fig. 15b](#) bei hoher Vergrößerung.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

[0030] Die vorliegende Erfindung stellt verbesserte

biosensorische Vorrichtungen und Verfahren zur Verwendung derartiger biosensorischer Vorrichtungen zum Nachweisen und Quantifizieren der Anwesenheit oder Menge eines Analyten von Interesse in einem Medium dar. Die Analyte, die durch die vorliegende Erfindung nachgewiesen werden können, schließen Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien, Hefen, Pilze und Viren, ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Im Gegensatz zu früheren Vorrichtungen ermöglichen die erfindungsgemäß den Nachweis von extrem kleinen Mengen eines Analyten in einem Medium in einem schnellen Assay, der nur wenige Minuten dauert. Zusätzlich sind bei den erfindungsgemäß biosensorischen Vorrichtungen keine signalgebenden oder damit zusammenhängenden elektronischen Komponenten erforderlich.

[0031] Die vorliegende Erfindung umfasst das Drucken analytenspezifischer Rezeptoren auf einen metallisierten Kunststofffilm, was die Entwicklung von Wegwerf-Biosensoren zur Einmalverwendung ermöglicht, die auf Lichtbeugung beruhen, um die Anwesenheit des Analyten anzuzeigen. Nach der Befestigung eines Zielanalyten an ausgewählten Flächen des Kunststofffilms, die den Rezeptor enthalten, findet eine Beugung von Durchlicht und/oder reflektiertem Licht mittels der physikalischen Dimensionen und der definierten, genauen Anordnung des Analyten statt. Zum Beispiel sind Hefe, Pilze oder ein Bakterium groß genug, um als Beugungselemente für sichtbares Licht zu dienen, wenn sie in organisierten Mustern auf einer Oberfläche angeordnet sind. Zusätzlich zum Erzeugen eines einfachen Beugungsbildes können Analytenmuster so beschaffen sein, dass sie die Entwicklung eines holographischen sensorischen Bildes und/oder eine Änderung der sichtbaren Farbe ermöglichen. Somit wird das Erscheinen eines Hologramms oder eine Änderung eines bestehenden Hologramms eine positive Reaktion anzeigen. Das durch die Beugung des Durchlichts erzeugte Muster kann jede Form haben, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Umwandlung eines Musters von einem Muster zu einem anderen nach dem Binden des Analyten an das aufnahmefähige Material. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das Beugungsmuster in weniger als einer Stunde nach dem Kontakt des Analyten mit der erfindungsgemäß biosensorischen Vorrichtung erkennbar.

[0032] Das Beugungsgitter, das die Beugung von Licht nach einer Wechselwirkung mit dem Analyten erzeugt, muss eine minimale Periodizität von $\frac{1}{2}$ der Wellenlänge und einen Brechungsindex aufweisen, der anders als der des umgebenden Mediums ist. Sehr kleine Analyte, wie zum Beispiel Viren oder Moleküle, können durch Verwenden eines größeren Teilchens, das für den kleinen Analyten spezifisch ist, indirekt nachgewiesen werden. Eine Ausführungsform, bei welcher der kleine Analyt nachgewiesen werden kann, umfasst das Beschichten des Teilchens, wie

zum Beispiel einer Latexkugel, mit einem aufnahmebereiten Material, das spezifisch an den Analyten von Interesse bindet. Teilchen, die bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließen Glas, Cellulose, synthetische Polymere oder Kunststoffe, Latex, Polystyrol, Polycarbonat, Proteine, Bakterien- oder Pilzzellen und dergleichen ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Teilchen sind vorzugsweise kugelförmig, aber die strukturelle und räumliche Konfiguration der Teilchen ist nicht entscheidend für die vorliegende Erfindung. Zum Beispiel könnte es sich bei den Teilchen um Splitter, Ellipsoide, Würfel und dergleichen handeln. Eine wünschenswerte Teilchengröße reicht von einem Durchmesser von ungefähr 0,2 µm bis 50,0 µm, wünschenswerterweise von ungefähr 0,4 µm bis 1 µm. Die Zusammensetzung des Teilchens ist nicht entscheidend für die vorliegende Erfindung.

[0033] Die selbstorganisierende Monoschicht auf dem metallisierten Film enthält ein aufnahmebereites Material, wie zum Beispiel einen Antikörper, der spezifisch an ein Epitop auf dem Analyten bindet, das sich von dem beim Binden an das Teilchen verwendeten Epitop unterscheidet. Somit wird zum Nachweisen eines Mediums mit einem kleinen Analyten, wie zum Beispiel Viruspartikeln, das Medium zuerst den Latexteilchen ausgesetzt, an welche die Viruspartikel binden. Dann werden die Latexteilchen gegebenenfalls gewaschen und dem metallisierten Film mit den selbstorganisierenden Monoschichten, welche die virenpezifischen Antikörper enthalten, ausgesetzt. Die Antikörper binden dann an die Viruspartikel auf der Latexkugel, und dadurch immobilisieren sie die Latexkugeln im gleichen Muster wie die Monoschichten auf dem Film. Weil die gebundenen Latexkugeln eine Beugung des sichtbaren Lichts verursachen, wird ein Beugungsmuster gebildet, das die Anwesenheit des Viruspartikels in der Flüssigkeit anzeigt. Andere Kombinationen unter Verwendung von Teilchen sind Fachleuten wohlbekannt.

[0034] Die Analyte, von denen in Betracht gezogen wird, dass sie unter Verwendung der vorliegenden Erfindung nachgewiesen werden, schließen Bakterien, Hefen, Pilze, Viren, den Rheumafaktor, Antikörper, einschließlich, aber nicht beschränkt auf IgG-, IgM-, IgA- und IgE-Antikörper; das carcinoembryonale Antigen; ein Streptococcus-Gruppe-A-Antigen; virale Antigene, mit Autoimmunerkrankungen zusammenhängende Antigene, Allergene, Tumorantigene; ein Streptococcus-Gruppe-B-Antigen, HIV-I- oder HIV-II-Antigen; oder Wirtsreaktionen (Antikörper) gegen diese und andere Viren; für RSV spezifische Antigene oder Wirtsreaktionen (Antikörper) gegen das Virus; einen Antikörper; ein Antigen, ein Enzym, ein Hormon; ein Polysaccharid; ein Protein; ein Lipid; ein Kohlenhydrat; einen Arzneistoff oder eine Nucleinsäure; eine Salmonella-Art; eine Candida-Art, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Candida albi-

cans und Candida tropicalis; eine Salmonella-Art; die Neisseria meningitidis Gruppen A, B, C, Y und W, Untergruppe 135; Streptococcus pneumoniae, E. coli K1, Haemophilus influenzae des Typs B, ein von Mikroorganismen abgeleitetes Antigen; ein Hapten, ein Rauschgift, ein therapeutischer Arzneistoff; ein Umweltmittel und für Hepatitis spezifische Antigene ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0035] In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform können Nährstoffe für eine spezifische Klasse von Mikroorganismen in die selbstorganisierende Monoschicht eingegliedert werden. Auf diese Weise können sehr geringe Konzentrationen von Mikroorganismen nachgewiesen werden, indem der erfindungsgemäße Biosensor zuerst mit den darin eingegliederten Nährstoffen in Kontakt gebracht wird und der Biosensor dann unter Bedingungen inkubiert wird, die für das Wachstum des gebundenen Mikroorganismus angemessen sind. Man lässt den Mikroorganismus wachsen, bis es genügend Organismen gibt, um ein Beugungsmuster zu bilden. Natürlich kann sich der Mikroorganismus in manchen Fällen genügend vermehren, um ohne die Anwesenheit eines Nährstoffes ein Beugungsmuster auf der gemusterten Monoschicht zu bilden.

[0036] Ein Teil der vorliegenden Erfindung ist ein aufnahmebereites Material, das auf den metallisierten Film mikrogedruckt werden kann und spezifisch an den Analyten von Interesse bindet. Somit wird das aufnahmebereite Material als ein Teil eines spezifischen bindenden Paars definiert und schließt Antigen/Antikörper, Enzym/Substrat, Oligonucleotid/DNA, Chelatbildner/Metall, Enzym/Inhibitor, Bakterien/Rezeptor, Virus/Rezeptor, Hormon/Rezeptor, DNA/RNA oder RNA/RNA, Oligonucleotid/RNA und Binden dieser Spezies an jede andere Spezies, sowie die Wechselwirkung dieser Spezies mit anorganischen Spezies ein, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0037] Das aufnahmebereite Material, das an die Befestigungsschicht gebunden ist, ist durch eine Fähigkeit gekennzeichnet, den Analyten oder die Analyten von Interesse spezifisch zu binden. Die Vielfalt von Materialien, die als aufnahmebereites Material verwendet werden können, wird nur durch die Materialarten beschränkt, die sich selektiv (in Bezug auf jede gewählte Probe) mit einem sekundären Partner kombinieren. Unterklassen von Materialien, die in die Gesamtklasse von aufnahmebereiten Materialien eingeschlossen werden können, schließen Toxine, Antikörper, Antigene, Hormonrezeptoren, Parasiten, Zellen, Haptene, Metaboliten, Allergene, Nucleinsäuren, Materialien aus dem Kern, Autoantikörper, Blutproteine, Zelltrümmer, Enzyme, Gewebeproteine, Enzymsubstrate, Coenzyme, Neurotransmitter, Viren, Viruspartikel, Mikroorganismen, Proteine, Polysaccharide, Chelatbildner, Arzneistoffe und jedes andere Mitglied eines spezifischen Bindungspaares ein.

Diese Liste schließt nur manche der vielen unterschiedlichen Materialien ein, die auf die Befestigungsschicht aufgeschichtet werden können, um ein dünnes Filmassaysystem herzustellen. Um welchen ausgewählten Analyten von Interesse es sich auch immer handelt, das aufnahmebereite Material wird so gestaltet, dass es spezifisch an den Analyten von Interesse bindet.

[0038] Bei der Matrix, die den Analyten von Interesse enthält, kann es sich um eine Flüssigkeit, einen Feststoff, ein Gas oder eine Körperflüssigkeit, wie zum Beispiel Schleim, Speichel, Urin, fäkales Material, Gewebe, Mark, Liquor, Serum, Plasma, Vollblut, Sputum, gepufferte Lösungen, extrahierte Lösungen, Samen, Vaginalsekrete, Perikard-, Magen-, Peritoneal-, Pleura- oder andere Spülungen und dergleichen handeln. Bei dem Analyten von Interesse kann es sich um ein Antigen, einen Antikörper, ein Enzym, ein DNA-Fragment, ein intaktes Gen, ein RNA-Fragment, ein kleines Molekül, ein Metall, ein Toxin, ein Umweltmittel, eine Nucleinsäure, eine Zytosplasmakomponente, eine Komponente von Pili oder Flagellen, ein Protein, ein Polysaccharid, einen Arzeistoff oder jedes andere Material, wie zum Beispiel die in Tabelle A aufgeführten, handeln. Zum Beispiel kann aufnahmebereites Material für Bakterien eine Oberflächenmembrankomponente, ein Protein oder Lipid, ein Polysaccharid, eine Nucleinsäure oder ein Enzym spezifisch binden. Bei dem Analyten, der für das Bakterium spezifisch ist, kann es sich um ein Polysaccharid, ein Enzym, eine Nucleinsäure, eine Membrankomponente oder einen durch den Wirt als Reaktion auf die Bakterien produzierten Antikörper handeln. Die Anwesenheit des Analyten kann eine (bakterielle oder virale) Infektionskrankheit, Krebs oder eine andere Stoffwechselstörung oder ein anderes Leiden anzeigen. Die Anwesenheit des Analyten kann ein Anzeichen für eine Lebensmittelvergiftung oder eine andere toxische Belastung sein. Der Analyt kann Drogenmissbrauch anzeigen oder kann Spiegel therapeutischer Mittel überwachen.

[0039] Eines der Assayprotokolle, denen man am häufigsten begegnet, für das diese Technologie verwendet werden kann, ist ein Immunoassay. Die allgemeinen Betrachtungen betreffen jedoch Nucleinsäure-resonden, Enzym/Substrat und andere Assayformate mit Ligand/Rezeptor. Für Immunassays kann ein Antikörper als aufnahmebereites Material dienen oder er kann der Analyt von Interesse sein. Das aufnahmebereite Material, zum Beispiel ein Antikörper oder ein Antigen, muss eine stabile, dichte, reaktive Schicht auf der Befestigungsschicht der Testvorrichtung bilden. Falls ein Antigen nachgewiesen werden soll und ein Antikörper das aufnahmebereite Material ist, muss der Antikörper für das Antigen von Interesse spezifisch sein; und der Antikörper (das aufnahmebereite Material) muss das Antigen (den Analyten) mit ausreichendem Drang binden, damit das Antigen

an der Testoberfläche zurückgehalten wird. In manchen Fällen bindet der Analyt das aufnahmebereite Material vielleicht nicht einfach, sondern kann verursachen, dass eine nachweisbare Modifikation des aufnahmebereiten Materials stattfindet. Diese Wechselwirkung könnte eine Erhöhung der Masse an der Testoberfläche verursachen oder eine Abnahme der Menge des aufnahmebereiten Materials auf der Testoberfläche. Ein Beispiel für letzteres ist die Wechselwirkung eines abbauenden Enzyms oder Materials mit einem spezifischen, immobilisierten Substrat. In diesem Fall würde man vor einer Wechselwirkung mit dem Analyten von Interesse ein Beugungsmuster sehen, aber das Beugungsmuster würde verschwinden, wenn der Analyt vorläge. Der spezifische Mechanismus, durch den Bindung, Hybridisierung oder Wechselwirkung des Analyten mit dem aufnahmebereiten Material stattfindet, ist für diese Erfindung nicht wichtig, kann aber die im endgültigen Assayprotokoll verwendeten Reaktionsbedingungen beeinflussen.

[0040] Im Allgemeinen kann das aufnahmebereite Material passiv an die Befestigungsschicht angeheftet werden. Falls erforderlich können die freien funktionellen Gruppen, die durch die Befestigungsschicht auf der Testoberfläche eingeführt worden sind, für eine kovalente Befestigung des aufnahmebereiten Materials an der Testoberfläche verwendet werden. Chemische Verfahren, die zur Befestigung von aufnahmebereiten Materialien zur Verfügung stehen, sind Fachleuten wohlbekannt.

[0041] Eine große Auswahl von Techniken kann verwendet werden, um das aufnahmebereite Material an der Befestigungsschicht anzuheften. Testoberflächen können durch vollständiges Eintauchen in eine Lösung über einen vorbestimmten Zeitraum hinweg mit aufnahmebereitem Material; Auftragen von Lösung in diskreten Anordnungen oder Mustern; Sprühen, Tintenstrahl, oder andere Aufdruckverfahren; oder durch Rotationsbeschichtung aus einem geeigneten Lösungsmittelsystem beschichtet werden. Die ausgewählte Technik sollte die Menge an aufnahmebereitem Material minimieren, die zum Beschichten einer großen Anzahl von Testoberflächen erforderlich ist, und die Stabilität/Funktionalität des aufnahmebereitem Material während des Auftragens aufrechterhalten. Die Technik muss das aufnahmebereite Material auch in einer sehr gleichmäßigen und reproduzierbaren Weise auf die Befestigungsschicht auftragen oder an ihr anheften.

[0042] Die Rezeptorschicht wird aus Material gebildet, das aus der Gruppe, bestehend aus Antigenen, Antikörpern, Oligonucleotiden, Chelatbildnern, Enzymen, Bakterien, Bakterienpili, Material aus bakteriellen Flagellen, Nucleinsäuren, Polysacchariden, Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Metallen, Viren, Hormonen und Rezeptoren für diese Materialien,

ausgewählt wird. In den bevorzugten Ausführungsformen wird die biosensorische Vorrichtung konfiguriert und angeordnet, um als Reaktion auf das Durchlassen von polychromatischem Licht ein durch das Auge nachweisbares Muster bereitzustellen, wenn der Analyt von Interesse zwischen das aufnahmefreie Material und ein sekundäres Bindungsreagenz eingeschoben wird.

[0043] Das Medium, in dem sich der Analyt befinden kann, kann fest, gelartig, flüssig oder ein Gas sein. Für die Zwecke des Nachweises eines Analyten in einer Körperflüssigkeit wird die Flüssigkeit aus der Gruppe, bestehend aus Urin, Serum, Plasma, Rückenmarksflüssigkeit, Sputum, Vollblut, Speichel, urogenitalen Sekreten, Extrakten aus Fäzes, Perikard-, Magen-, Peritoneal-, Pleuraspülungen, Vaginalsekreten und einem Halsabstrich ausgewählt; und das Verfahren schließt gegebenenfalls das Verwenden eines Spektrophotometers ein, um das Auftauchen des Brechungsmusters zu messen. Das häufigste Gas, das zur Verwendung mit der erfindungsgemäßen biosensorischen Vorrichtung in Betracht gezogen wird, ist Luft.

[0044] Die erfindungsgemäße biosensorische Vorrichtung benutzt Verfahren zum Drucken gemusterter selbstorganisierender Monoschichten von Alkanthiolaten, Carbonsäuren, Hydroxamsäuren und Phosphonsäuren auf metallisierte Polymerfilme, wünschenswerterweise thermoplastische Polymerfilme, die dadurch hergestellten Zusammensetzungen und die Verwendung dieser Zusammensetzungen. Gemusterte selbstorganisierende Monoschichten ermöglichen die kontrollierte Anordnung von Flüssigkeiten darauf, die einen Analytenrezeptor enthalten können. Der Begriff "gemusterte selbstorganisierende Monoschichten darauf", wie er hierin verwendet wird, bedeutet die selbstorganisierenden Monoschichten in jedem Muster auf den metallisierten Polymerfilmen, einschließlich eines festen Musters.

[0045] Wenn der Film mit den selbstorganisierenden Monoschichten darauf einem Analyten ausgesetzt wird, der fähig ist, mit der selbstorganisierenden Monoschicht zu reagieren, erzeugt der Film optische Beugungsmuster, die sich je nach der Reaktion der selbstorganisierenden Monoschicht mit dem Analyten von Interesse unterscheiden. Bei der Flüssigkeit kann es sich um eine Flüssigkeit mit hoher Oberflächenspannung, wie zum Beispiel Wasser, handeln. Das Licht kann sich im sichtbaren Spektrum befinden und entweder von dem Film reflektiert werden oder durch ihn durchgeleitet werden, und bei dem Analyten kann es sich um jede Verbindung handeln, die mit der selbstorganisierenden Monoschicht reagiert.

[0046] In bevorzugten Ausführungsformen bezieht das Verfahren das In-Kontakt-Bringen des Substrats mit einer Testprobe, die möglicherweise den Analy-

ten enthält, unter Bedingungen ein, bei denen das Substrat eine Änderung des Brechungsexponenten der Monoschicht verursacht. Wenn Licht durch das metallisierte thermoplastische Polymer mit der selbstorganisierenden Monoschicht durchgeleitet wird, wird ein sichtbares Muster gebildet und es kann durch Richten des Lichts auf eine Oberfläche oder durch direktes Schauen durch das Substrat sichtbar gemacht werden.

[0047] In einer Ausführungsform wird die vorliegende Erfindung in Form eines Messstabes in Betracht gezogen, wobei der mikrokontaktebedruckte metallisierte Film an das Ende des Messstabes montiert wird. Bei der Verwendung wird der Messstab in die Flüssigkeit getaucht, in welcher der vermutete Analyt vorliegen kann, und man lässt ihn über einige Minuten hinweg dort bleiben. Der Messstab wird dann entfernt und dann wird entweder ein Licht durch den metallisierten Film projiziert oder der Film wird mit einem Licht hinter dem Film beobachtet. Wenn ein Muster beobachtet wird, dann liegt der Analyt in der Flüssigkeit vor.

[0048] In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform wird ein Mehrfachanalytentest auf dem gleichen Träger konstruiert. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt wird, wird ein Streifen **10** mit einigen mikrokontaktebedruckten metallisierten Filmen **20, 25, 30** und **35** bereitgestellt, wobei auf jedem Film ein selbstorganisiertes Monoschichtmuster **40** aufgedruckt ist. Jeder der mikrokontaktebedruckten metallisierten Filme **15, 20, 25** und **30** hat ein anderes aufnahmefreies Material, das für unterschiedliche Analyten unterschiedlich ist. Man kann sehen, dass die vorliegende Erfindung in jeder Anordnung mit einer Vielfalt von mikrokontaktebedruckten metallisierten Filmen formatiert werden kann, wodurch dem Anwender der erfindungsgemäßen biosensorischen Vorrichtung ermöglicht wird, die Anwesenheit mehrerer Analyte in einem Medium unter Verwendung eines einzelnen Tests nachzuweisen.

[0049] In noch einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der Biosensor an einem selbstklebenden Aufkleber oder Plättchen befestigt werden, der/das dann auf einer harten Oberfläche oder der Wand eines Behälters angebracht werden kann. Der Biosensor kann auf der inneren Oberfläche eines Behälters, wie zum Beispiel einer Lebensmittelverpackung oder eines Glasfläschchens, angebracht werden. Der Biosensor kann dann sichtbar gemacht werden, um zu bestimmen, ob es eine mikrobielle Verunreinigung gibt.

Selbstorganisierte Monoschichten auf metallisiertem Film

[0050] Selbstorganisierte Monoschichten organischer Verbindungen auf anorganischen oder Metallo-

berflächen sind ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung. Obwohl es viele unterschiedliche Systeme selbstorganisierender Monoschichten, beruhend auf unterschiedlichen organischen Bestandteilen und Trägern, gibt, sind erwünschte Systeme diejenigen von Alkanthiolaten, $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{R}$, auf Goldfilmen. Typischerweise wird ein 5 bis 2000 nm dicker Goldfilm von einer mit Titan vorbehandelten Si/SiO_2 -Scheibe oder Glasplatte getragen. Das Titan dient als ein Adhäsionspromotor zwischen Gold und dem Träger. Die Alkanthiole chemisorbieren aus einer Lösung, in die der Goldfilm eingetaucht wird auf die Goldoberfläche, und bilden unter Verlust von Wasserstoff adsorbierte Alkanthiolate. Die Adsorption kann auch aus dem Dampf stattfinden. Selbstorganisierende Monoschichten, die aus langkettigen Alkanthiolaten der Struktur $\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{Y}(\text{CH}_2)_m\text{S}$ auf Gold gebildet werden, sind hoch geordnet und können als kristalline oder quasi-kristalline molekulare Anordnungen betrachtet werden. Eine große Vielfalt organischer funktioneller Gruppen (X, Y) kann in die Oberfläche oder das Innere der Monoschicht eingegliedert werden.

[0051] Selbstorganisierende Monoschichten können deshalb maßgefertigt werden, um eine große Vielfalt von Materialeigenschaften bereitzustellen: Benetzungsfähigkeit und Schutz gegen Korrosion durch chemische Ätzmittel sind besonders relevant für das Mikrokontakteindrucken.

[0052] [Fig. 2](#) umreißt das zum Mikrokontakteindrucken verwendete Verfahren. Ein elastomerer Stempel wird verwendet, um Alkanthiol- "Farbe" durch Kontakt auf eine Goldoberfläche zu übertragen; wenn der Stempel gemustert ist, bildet sich eine gemusterte selbstorganisierende Monoschicht. Der Stempel wird durch Gießen von Polydimethylsiloxan (PDMS) auf eine Vorlage mit dem gewünschten Muster hergestellt. Vorlagen werden unter Verwendung von photolithographischen Standardtechniken hergestellt oder aus existierenden Materialien mit Oberflächenmerkmalen im Mikrobereich konstruiert.

[0053] In einem typischen experimentellen Verfahren wird eine photolithographisch hergestellte Vorlage in eine Petrischale aus Glas oder Kunststoff gelegt und ein Gemisch aus SYLGARD® Silikonelastomer 184 und SYLGARD® Silikonelastomer 184 Härtungsmittel (Dow Corning Corporation) im Verhältnis 10:1 (Gew./Gew. oder Vol./Vol.) wird darüber gegossen. Man lässt das Elastomer ungefähr 30 Minuten lang bei Raumtemperatur und reduziertem Druck zum Entgasen ruhen, dann wird es 1–2 Stunden lang bei 60°C gehärtet und vorsichtig von der Vorlage abgezogen. Eine "Einfärbung" des elastomeren Stempels wird erreicht, indem der Stempel einer 0,1 bis 1,0 mM Lösung von Alkanthiol in wasserfreiem Ethanol ausgesetzt wird, entweder durch Gießen der Lösung über die Oberfläche des Stempels oder durch sanftes

Reiben des Stempels mit einem Q-Tip, der mit der Färbelösung gesättigt worden ist. Man lässt den Stempel trocknen, bis mit dem Auge keine Flüssigkeit auf der Oberfläche des Stempels zu sehen ist (normalerweise etwa 60 Sekunden), entweder unter Umgebungsbedingungen oder indem man ihn einem Strom von Stickstoffgas aussetzt. Nach dem Einfärben wird der Stempel (normalerweise von Hand) auf eine Goldoberfläche angewendet. Ein sehr leichter Druck der Hand wird verwendet, um beim vollständigen Kontakt zwischen dem Stempel und der Oberfläche zu helfen. Der Stempel wird dann sanft von der Oberfläche abgezogen. Nach dem Entfernen des Stempels wird überschüssiges Thiol von der Oberfläche gewaschen und die gemusterte Goldoberfläche kann chemischen Ätzmitteln (siehe unten) unterworfen werden, die nicht derivatisierte Flächen der Goldoberfläche und, falls gewünscht, den (die) darunterliegenden Träger selektiv entfernen. Alternativ dazu kann eine weitere Derivatisierung ungestempelter Flächen entweder durch Verwendung eines zweiten Stempels oder durch Waschen der gesamten Oberfläche mit einem anderen Alkanthiol erreicht werden.

[0054] Die elastomere Charakteristik des Stempels ist für den Erfolg des Verfahrens wichtig. Wenn Polydimethylsiloxan (PDMS) gehärtet ist, ist es ausreichend elastomer, um einen guten konformalen Kontakt des Stempels und der Oberfläche zu ermöglichen, sogar für Oberflächen mit erheblichem Relief; dieser Kontakt ist unentbehrlich für eine effiziente Kontaktübertragung der Alkanthiol- "Farbe" auf den Goldfilm. Die elastomeren Eigenschaften von PDMS sind auch wichtig, wenn der Stempel von der Vorlage entfernt wird; wenn der Stempel starr wäre (wie es die Vorlage ist), wäre es schwierig, den Stempel und die Vorlage nach dem Härteten zu trennen, ohne eines der beiden Substrate zu beschädigen. PDMS ist auch ausreichend starr, um die Form beizubehalten, sogar in Bezug auf Merkmale mit Größenordnungen unterhalb eines Mikrometers: wir haben Muster mit so kleinen Linien wie 200 nm in der Breite: erfolgreich erzeugt. Die Oberfläche von PDMS hat eine niedrige freie Grenzflächenenergie ($y = 22,1 \text{ Dyn/cm}$) und der Stempel haftet nicht an dem Goldfilm. Der Stempel ist insofern haltbar, als der gleiche Stempel über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinweg bis zu hundert Mal ohne wesentlichen Leistungsabbau verwendet werden kann. Die polymere Beschaffenheit von PDMS spielt auch eine entscheidende Rolle bei dem Färbeverfahren, indem sie dem Stempel ermöglicht, die Alkanthiolfarbe durch Schwellen zu absorbieren. Man kann eine Druckrolle zum Stempeln herstellen, um einen kontinuierlichen Druckvorgang zu ermöglichen.

[0055] Das Mikrokontakteindrucken auf Goldoberflächen kann mit einer Vielfalt von Alkanthiol- "Farben" ausgeführt werden. Alkanthiole, die sich nicht reaktiv

ausbreiten (nach dem Auftragen auf den Goldfilm), sind für die Bildung von kleinen Merkmalen mit hoher Auflösung erforderlich. Für das Stempeln in Luft kann man autophobe Alkanthiole, wie zum Beispiel Hexadecanthiol, verwenden. Das Mikrokontakteindrucken anderer, nicht autophober Alkanthiole, zum Beispiel $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ kann durch Stempeln unter einer Flüssigkeit, wie zum Beispiel Wasser, ausgeführt werden. Gemusterte selbstorganisierende Monoschichten von Alkanthiole auf Gold stellen ein ausgezeichnetes Beständigkeitmerkmal für eine Anzahl von nasschemischen Ätzmitteln bereit.

[0056] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die selbstorganisierende Monoschicht aus einem Alkanthiol mit endständigem Carboxyl gebildet, der mit einem gemusterten elastomeren Stempel auf einen thermoplastischen Film mit einer Goldoberfläche, wie zum Beispiel MYLAR®, gestempelt wird. Das Alkanthiol wird mit einer Lösung von Alkanthiol in Ethanol eingefärbt, getrocknet und mit einer Goldoberfläche in Kontakt gebracht. Das Alkanthiol wird nur in denjenigen Bereichen auf die Oberfläche übertragen, wo der Stempel die Oberfläche berührt, wodurch ein Muster einer selbstorganisierenden Monoschicht hergestellt wird, welches durch das Muster des Stempels definiert wird. Gegebenenfalls können Flächen unmodifizierter Goldoberfläche neben den gestempelten Flächen durch Reaktion mit einem Alkanthiol mit endständigem Methyl hydrophob gemacht werden.

[0057] Eine ausführlichere Beschreibung der erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen folgt.

[0058] Jeder thermoplastische Film, auf den ein Metallsubstrat abgeschieden werden kann, ist für die vorliegende Erfindung geeignet. Diese schließen Polymere, wie zum Beispiel Polyethylenterephthalat (MYLAR®), Acrylnitril-Butadien-Styrol, Acrylnitril-Methylacrylat-Copolymer, Cellophan, cellulosehaltige Polymere wie zum Beispiel Ethylcellulose, Celluloseacetat, Celluloseacetatbutyrat, Cellulosepropionat, Cellulosetriacetat, Cellulosetriacetat, Polyethylen, Polyethylen-Vinylacetat-Copolymere, Ionomere (Ethylenpolymere), Polyethylen-Nylon-Copolymere, Polypropylen, Methylpentenpolymere, Polyvinylfluorid und aromatische Polysulfone ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Der Kunststofffilm weist vorzugsweise eine optische Transparenz von mehr als 80% auf. Andere geeignete Thermoplasten und Lieferanten können zum Beispiel in Referenzwerken, wie zum Beispiel der Modern Plastics Encyclopedia (McGraw-Hill Publishing Co., New York 1923–1996), gefunden werden.

[0059] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform weist der thermoplastische Film mit der Metallbeschichtung darauf eine optische Transparenz von

zwischen ungefähr 5% und 95% auf. Eine wünschenswertere optische Transparenz für den in der vorliegenden Erfindung verwendeten thermoplastischen Film beträgt zwischen ungefähr 20% und 80%. In einer erwünschten erfindungsgemäßen Ausführungsform weist der thermoplastische Film mindestens eine optische Transparenz von ungefähr 80% auf und die Dicke der Metallbeschichtung ist derart, dass eine optische Transparenz von mehr als etwas 20% aufrechterhalten wird, so dass Beugungsmuster durch entweder reflektiertes Licht oder Durchlicht hergestellt werden können. Dies entspricht einer Dicke der Metallbeschichtung von etwa 20 nm. In anderen erfindungsgemäßen Ausführungsformen kann die Golddicke jedoch zwischen ungefähr 1 nm und 1000 nm betragen.

[0060] Das bevorzugte Metall für die Abscheidung auf den Film ist Gold. Silber, Aluminium, Chrom, Kupfer, Eisen, Zirkonium, Platin und Nickel, sowie Oxide dieser Metalle können jedoch verwendet werden. Chromoxid und Goldoxid können verwendet werden, um selbstorganisierende Monoschichten herzustellen.

[0061] Im Prinzip könnte jede Oberfläche mit Riffelungen der geeigneten Größe als Vorlage verwendet werden. Das Verfahren des Mikrokontakteindruckens beginnt mit einer geeigneten Reliefstruktur, von der ein elastomerer Stempel abgegossen wird. Diese 'Vorlagen'-Matrize kann photolithographisch oder durch andere Verfahren, wie zum Beispiel im Handel erhältliche Beugungsgitter, erzeugt werden. In einer Ausführungsform kann der Stempel aus Polydimethylsiloxan hergestellt werden.

[0062] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine optische Assayvorrichtung mit einer optisch aktiven aufnahmefähigen Oberfläche dar, die konfiguriert und angeordnet ist, um den gleichzeitigen Assay einer Vielzahl von Proben auf der Oberfläche auf einen Analyten von Interesse hin zu ermöglichen, und ein automatisiertes Gerät zur Handhabung von Flüssigkeit (z. B. eine Pipettierzelle), das konfiguriert und angeordnet ist, um Proben- und Reagenzlösungen auf der Oberfläche zu verteilen.

[0063] Nachstehend wird eine Angabe der Methodik bereitgestellt, durch welche die optimalen Materialien und Verfahren hergestellt werden können, die zur Konstruktion von erfindungsgemäßen optischen Testoberflächen nützlich sind. Allgemein schließt die vorliegende Erfindung neue optisch aktive Testoberflächen zum direkten Nachweis eines Analyten ein. Diese Testoberflächen weisen ein spezifisches aufnahmefähiges Material auf, das durch die Verwendung einer Befestigungsschicht an die Testoberfläche gebunden ist. Die vorliegende Erfindung stellt somit ein Nachweisverfahren bereit, welches das

In-Kontakt-Bringen der biosensorischen Vorrichtung nach Anspruch 1 mit einer Probenflüssigkeit, die den Analyten von Interesse enthält, und dann das Untersuchen der Änderung der Beugung von Durchlicht, die an der beschichteten Oberfläche erzeugt wird, durch Beobachten, ob ein Beugungsmuster gebildet wird, einschließt.

[0064] Die vorliegende Erfindung hat einen großen Anwendungsbereich und kann bei einer Vielfalt von Assayverfahren mit spezifischen Bindungspaaren benutzt werden. Zum Beispiel können die Vorrichtungen dieser Erfindung in Immunassayverfahren zum Nachweis von entweder Antigen oder Antikörper verwendet werden. Die Vorrichtungen können zur Verwendung bei direkten, indirekten oder kompetitiven Nachweisregimes, zur Bestimmung von enzymatischer Aktivität und zum Nachweis kleiner organischer Moleküle (z. B. Rauschgifte, therapeutische Arzneistoffe, Umweltmittel) sowie zum Nachweis von Nucleinsäuren angepasst werden.

[0065] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform hat die selbstorganisierende Monoschicht die folgende allgemeine Formel:

X-R-Y

X reagiert leicht mit Metall oder Metallocid. Bei X kann es sich zum Beispiel um ein asymmetrisches oder symmetrisches Disulfid (-R'SSY', -RSSY), Sulfid (-R'SY', -RSY), Diselenid (-R'Se-SeY'), Selenid (-R'SeY', -RSeY), Thiol (-SH), Nitril (-CN), Isonitril, Nitro (-NO₂), Selenol (-SeH), dreiwertige Phosphorverbindungen, Isothiocyanat, Xanthat, Thiocarbamat, Phosphen, Thiosäure oder Dithiosäure, Carbonsäuren, Hydroxysäuren und Hydroxamsäuren handeln.

[0066] Bei R und R' kann es sich um Kohlenwasserstoffketten handeln, die gegebenenfalls durch Heteroatome unterbrochen sein können und die vorzugsweise um der optimal dichten Packung willen nicht verzweigt sind. Bei Raumtemperatur beträgt die Länge von R mehr als oder gleich sieben Kohlenstoffatome, um die natürliche Unreelmäßigwerdung der selbstorganisierenden Monoschicht zu überwinden. Bei kälteren Temperaturen kann R kürzer sein. In einer Ausführungsform handelt es sich bei R um -(CH₂)_n, wobei n zwischen 10 und 12 einschließlich beträgt. Die Kohlenstoffkette kann gegebenenfalls perfluoriert sein. Es sollte selbstverständlich sein, dass die Kohlenstoffkette eine beliebige Länge haben kann.

[0067] Y und Y' können eine beliebige Oberflächen-eigenschaft von Interesse aufweisen. Bei Y und Y' könnte es sich zum Beispiel um jede aus einer großen Anzahl von Gruppen handeln, die bei Flüssig-chromatographietechniken zur Immobilisierung ver-wendet werden, wie zum Beispiel Hydroxyl-, Carbo-xyl-, Amino-, Aldehyd-, Hydrazid-, Carbonyl-, Epoxy-

oder Vinylgruppen. Beispiele für Materialien für sen-sorisiche Schichten werden in "Patterning Self-As-sembed Monolayers Using Microcontact Printing: A New Technology for Biosensors?", von Milan Mrksich und George M. Whitesides, veröffentlicht in TIB-TECH, Juni 1995 (Band 13), S. 228–235, dargelegt.

[0068] Selbstorganisierende Monoschichten von Al-kylphosphon-, Hydroxam- und Carbonsäuren können auch für die erfindungsgemäßen Verfahren und Zu-sammensetzungen nützlich sein. Da Alkanthiole nicht auf die Oberflächen vieler Metallocide absor-biert werden, können Carbonsäuren, Phosphonsäuren und Hydroxamsäuren für X bei diesen Metalloci-den bevorzugt werden. Siehe J. P. Folkers, G. M. Whitesides, et al., Langmuir, 1995, Band 11, S. 813–824.

[0069] Bei R kann es sich auch um die Form (CH₂)_a-Z-(CH₂)_b handeln, wobei a ≥ 0, b ≥ 7 und es sich bei Z um eine beliebige chemische Funktionalität von Interesse, wie zum Beispiel Sulfone, Harnstoff, Lactam usw., handelt.

[0070] Der Stempel kann in Luft oder unter einer Flüssigkeit, wie zum Beispiel Wasser, angewendet werden, um eine übermäßige Diffusion des Alkanthiole zu verhindern. Für Druckverfahren in großem Maßstab oder kontinuierliche Druckverfahren ist es äußerst wünschenswert, in Luft zu drucken, da kürze-re Kontaktzeiten für diese Verfahren wünschenswert sind.

[0071] In einer erfindungsgemäßen Ausführungs-form wird das Muster auf dem metallisierten thermo-plastischen Polymer mit der selbstorganisierenden Monoschicht gebildet. In einer anderen erfindungs-gemäßen Ausführungsform wird das Relief des Mu-sters mit der selbstorganisierenden Monoschicht ge-bildet. Nach dem Stempelverfahren können die me-tallisierten Flächen auf dem Kunststoff gegebenen-falls passiviert werden, zum Beispiel mit einer selbst-organisierenden Monoschicht mit endständigem Me-thyl, wie zum Beispiel Hexadecylmercaptan.

[0072] Diese Erfindung wird durch die folgenden Beispiele werter veranschaulicht, die in keiner Weise so ausgelegt werden sollen, als ob sie deren Umfang Beschränkungen auferlegen. Im Gegenteil, es sollte selbstverständlich sein, dass man auf verschiedene andere Ausführungsformen, Modifikationen und Äquivalente davon zurückgreifen kann, die sich nach dem Lesen der hierin vorgelegten Beschreibung dem Fachmann nahelegen, ohne von der vorliegenden Erfindung abzuweichen.

BEISPIEL 1

Bedrucken von goldbeschichtetem MYLAR® (Polyethylenterephthalat) mit Mustern von 16-Mercaptohexadecansäure und Hexadecanthonol

[0073] Muster von goldbeschichtetem MYLAR® (Polyethylenterephthalat) werden mit Mustern von 16-Mercaptohexadecansäure und Hexadecanthonol bedruckt, wie in [Fig. 2](#) gezeigt und nachstehend beschrieben wird.

[0074] Ein MYLAR®-Film, der mit einer plasmaabgeschiedenen Deckschicht aus Gold modifiziert ist, wird von Courtaulds Performance Films (Canoga Park, CA 91304) erhalten. Ein Rasterkraftmikroskopiebild dieses MYLAR®-Films wird in [Fig. 3](#) gezeigt. Eine Dicke des Polymerfilms zwischen 2 und 7 mil und Deckschichten aus Gold, die einen Oberflächenwiderstand von 65 Ohm pro Quadratzentimeter mit einer Durchlässigkeit für sichtbares Licht zwischen 20% und 65% erzeugen, werden verwendet.

[0075] Muster von hydrophilen Alkanthiolen mit endständigem Carboxyl werden unter Verwendung von 16-Mercaptohexadecansäure mit dem folgenden Verfahren auf einen goldbeschichteten Film gestempelt. Ein belichtetes und entwickeltes lichtundurchlässiges Muster von Kreisen mit 10 Mikrometer Durchmesser auf einer Silikonscheibe wird als Vorlage verwendet. Muster haben Merkmale, die durch Anordnung der Merkmale in Abständen von weniger als ungefähr 10 Mikrometer, und am wünschenswertesten weniger als 1–5 Mikrometer, definiert werden. Polydimethylsiloxan (PDMS; Silikonelastomer 184; Dow Corning Co., Midland, MI) wird auf einer Vorlage polymerisiert, um einen Stempel mit Kreisen von 10 Mikrometer Durchmesser im Abstand von fünf Mikrometer herzustellen. Der Stempel wird eingefärbt, indem er einer Lösung von 16-Mercaptohexadecansäure (1 bis 10 mM in Ethanol) ausgesetzt wird und man ihn an der Luft trocknen lässt. Das Substrat wird dann 50 Sekunden lang mit dem Stempel in Kontakt gebracht und 2 bis 4 Sekunden lang mit einer Lösung von Hexadecanthonol (1 bis 10 mM in Ethanol) gewaschen. Das Substrat wird schließlich 10 Sekunden lang in Ethanol gewaschen und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Ergebnisse dieses Druckens werden in [Fig. 4a](#) bis einschließlich c und [Fig. 5](#) für die Kreise der selbstorganisierenden Monoschicht mit endständiger Carbonsäure mit einem Durchmesser von 10 Mikrometer gezeigt.

[0076] Diese Kreise aus einer hydrophilen selbstorganisierenden Monoschicht ermöglichen die selektive Anordnung von Flüssigkeiten mit hoher Oberflächenspannung, wie zum Beispiel Wasser, Triethyleneglycol oder mit UV-Licht härtbaren Urethan-Acryl-Klebstoffen. Diese Flüssigkeiten können gelöste und suspendierte Reagenzien enthalten, die

mit Analyten, auf die man abzielt, chemisch oder physikalisch reagieren, wodurch der beschichtete Kunststofffilm zu einer Sammlung von 10 Mikrometer großen Mikroreaktoren gemacht wird, die als preiswerte chemische Wegwerfsensoren geeignet sind. Ein Beispiel für eine derartige Vorrichtung wird in [Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#), [Fig. 7](#) und [Fig. 8a](#) und [8b](#) gezeigt.

[0077] Mit diesen Zusammensetzungen wird eine Beugung von sichtbarem Licht gezeigt. Sowohl reflektierte als auch durchgeleitete Beugungsmuster werden beobachtet, wenn eine Laserbelichtung mit 5 mW, 670 nm verwendet wird. [Fig. 6b](#) ist eine Photographie des Beugungsmusters, das durch sichtbares Licht gebildet wird, welches man durch das selbstorganisierende Monoschichtmuster von [Fig. 6a](#) leuchten lässt. Mit weißem Durchlicht werden Regenbogen-Beugungsfarben beobachtet.

BEISPIEL 2

Experimentelles Verfahren zum Nachweisen von *Saccharomyces cerevisiae* unter Verwendung einer Hexamerzucker-Thiostruktur.

[0078] Der metallisierte MYLAR®-Film wird 20 Minuten lang mit Piranha-Lösung gereinigt. Der Film wird dann mit Millipore gereinigtem Wasser gespült, bis das Waschwasser neutral ist. Die Oberfläche wird dann unter Verwendung einer UV-Ozon-Reinigung 30 Minuten lang gereinigt. Das $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-\text{SH}$ (1 mM in EtOH) wird mit einem Q-Tip auf die Stempeloberfläche aufgetragen. Der Stempel wird dann 20 Sekunden lang auf die Goldoberfläche des MYLAR®-Films gedrückt. Der Aufdruck bildet eine umgekehrte Kreisstruktur. Der bedruckte Film wird mit EtOH gespült und unter Stickstoff getrocknet.

[0079] Die nicht bestempelte Oberfläche wird durch Auftröpfen von 40 µl einer 0,5 mM Saccharidlösung auf die Oberfläche mit dem Hexamerzuckerthiol beschichtet. Nach 20 Sekunden wird die überschüssige Saccharidthiollösung abgespült. Diese Scheibe wird umgekehrt in eine Hefesuspension von 5 g Hefe in 30 ml einer isotonen NaCl-Lösung hinein gehängt. Nach 40 Minuten wird die Oberfläche mit EtOH gewaschen. Die Beugungsmuster werden unter Verwendung eines He/Ne-Laserstrahls (Lambda = 832,8 nm) erzeugt.

BEISPIEL 3

[0080] Muster von hydrophilen selbstorganisierenden Monoschichten mit Oligomeren aus durchschnittlich sechs Glucosemolekülen, die am Ende des Alkanthiols befestigt sind, werden auf metallisiertem MYLAR® hergestellt (siehe Beispiel 2). Die im Abstand von fünf Mikrometer angeordneten Kreise mit einem Durchmesser von 10 Mikrometer werden verwendet, um die Platte zu erzeugen, auf der sich

der Zielorganismus anheften würde. Die nicht bestempelte Fläche wird durch Reaktion mit einem Alkanthiol mit endständigem Methyl hydrophob gemacht. Diese Probe ist, wie hergestellt, nicht beugend. Ein Stück dieser Probe mit einer Größe von einem Quadratzentimeter wird 40 Minuten lang 30 ml einer wässrigen Lösung, die 1 Gramm Bäckerhefe und 0,9 Gew.-% Kochsalz enthält, ausgesetzt, gefolgt von Waschen mit reichlichen Mengen Wasser. Die Mikroaufnahme der Probe und das von der mit einem He-Ne-Laser bestrahlten Probe erzeugte Beugungsbild werden in [Fig. 9a](#) beziehungsweise [Fig. 9b](#) gezeigt. Eine den Zucker nicht enthaltende Kontrollprobe zeigt keine Beugung und keine Anheftung von Teilchen. Wie in [Fig. 9a](#) gesehen wird, hat sich die Hefe an die 10 Mikrometer großen Zuckertiolkreise angeheftet, aber nicht an die hydrophoben selbstorganisierenden Monoschichten mit endständigem Methyl. Ein gewisses Zusammenfließen der Kreise mit anhaftender Hefe in einer bevorzugten Richtung ist offenkundig. [Fig. 9b](#) zeigt auf, dass sich mit einer Anheftung von Hefe eine Beugung von Strahlung mit 632 nm ergibt. Die Beugung dient als Grundlage des Wahrnehmens der Anwesenheit von Hefezellen.

BEISPIEL 4

Nachweis von *Saccharomyces cerevisiae*

[0081] Der metallisierte MYLAR®-Film, der bedruckt werden soll, wird 20 Minuten lang mit Piranha-Lösung gereinigt. Der Film wird mit Millipor-gereinigtem Wasser bis zur Neutralisation gespült und dann mit UV-Ozon 30 Minuten lang gereinigt. Zum Mikrokontaktdrucken der hydrophoben Schicht wird $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}-\text{SH}$ (1 mM in EtOH) mit einem Q-Tip auf die Stempeloberfläche aufgetragen. Der Stempel wird 20 Sekunden lang auf die Goldoberfläche des MYLAR®-Films gedrückt. Der Aufdruck bildet eine umgekehrte Kreisstruktur. Der bedruckte Film wird mit EtOH gespült und unter Stickstoff getrocknet.

[0082] Die nicht bestempelte Oberfläche wird durch Hutfropfen von 40 µl einer 0,5 mM Saccharidlösung auf die Oberfläche mit dem Hexamerzuckerthiol beschichtet. Nach 20 Sekunden wird die überschüssige Saccharidthiollösung abgespült. Diese Scheibe wird umgekehrt in eine Hefesuspension von 5 g Hefe in 30 ml isotoner NaCl-Lösung hinein gehängt. Nach 40 Minuten wird die Oberfläche mit EtOH gewaschen. Die Beugungsmuster werden unter Verwendung eines He/Ne-Laserstrahls (Lambda = 832,8 nm) erzeugt.

BEISPIEL 5

Für *Candida tropicalis* spezifische Biosensoren

[0083] Agarplatten (Universalmedium für Hefe) wer-

den mit einem Klon der ursprünglichen *Candida tropicalis* (DSM 1348) angeimpft. Nach 2 Tagen bei 25°C werden die Zellen geerntet und mit dem Hefemedium verdünnt. Die Suspension wird dann in einem Ultraschallbad behandelt, um die Zellaggregate zu trennen.

[0084] Das experimentelle Verfahren des Mikrokontaktdrucks ist das gleiche wie in Beispiel 2. Bei den in diesem Experiment verwendeten Thiolen handelt es sich um

$\text{HS}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$ – als CH_3 bezeichnet,
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ – als COOH bezeichnet.

[0085] Die Inkubationszeit der Lösung des Gold-Wassers in der Zelllösung reichte von 1 Nacht bis zu 3 Tagen. Die Proben werden nach der Inkubation nicht abgespült. Die folgenden Kombinationen werden in den bezeichneten Figuren dargestellt.

3) bei dem Kreis handelt es sich um CH_3 – bei der umgebenden Fläche um COOH , inkubiert über Nacht ([Fig. 10a](#) ist die Mikroaufnahme der Oberfläche und [Fig. 10b](#) ist das Beugungsmuster, das durch die gemusterte Oberfläche von [Fig. 10a](#) erzeugt wird),

2) bei dem Kreis handelt es sich um COOH – bei der umgebenden Fläche um CH_3 , inkubiert über Nacht ([Fig. 11a](#) ist die Mikroaufnahme der Oberfläche und [Fig. 11b](#) ist das Beugungsmuster, das durch die gemusterte Oberfläche von [Fig. 11a](#) erzeugt wird).

BEISPIEL 6

[0086] Ein Gold/MYLAR-Substrat wird unter Verwendung eines mit einer ethanolischen Lösung von Mercaptohexadecansäure beschichteten Stempels mit 10 µ großen Kreisen kontaktbedruckt. Die umgebenden Flächen der Kreise werden dann mit einer Ethanollösung von Hexadecanthiol ausgefüllt. Die sauren Endgruppen werden unter Verwendung einer Carbodiimid-Kopplung mit L-Fucose verestert. Das Verfahren bezieht ein, das kontaktbedruckte Gold/MYLAR® 5–6 Minuten lang in eine Lösung von 41 mM Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Pyridin zu geben und es dann sofort in ein Fläschchen zu übertragen, das eine 3,3 mM Pyridinlösung von L-Fucose enthält. Nach 2½ Stunden wird die Gold/MYLAR®-Probe entfernt, sorgfältig mit destilliertem Wasser und dann Ethanol gespült und getrocknet.

[0087] Die Probe wird einer Suspension von 0,5 g Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in 15 ml einer 0,9%igen wässrigen Natriumchloridlösung ausgesetzt. Nach 8 Tagen wird die Probe kurz mit destilliertem Wasser gespült und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Probe beugte Licht, wenn sie mit einem He/Ne-Laserstrahl (Lambda = 832,8 nm) bestrahlt wurde, und eine Rasterelektronenmikroskopie

(SEM) deckte die Anwesenheit der Hefeorganismen in den 10 Mikrometer großen Kreisen auf (siehe [Fig. 13](#)). [Fig. 12](#) zeigt eine Hefezelle, die eine Mitose durchführt. [Fig. 13](#) demonstriert, dass die Hefezellen immer noch lebensfähig sind, sogar nach dem Binden an die Kreise.

BEISPIEL 7

[0088] Ein Gold/MYLAR®-Substrat wird unter Verwendung eines mit einer ethanolischen Lösung von Mercaptohexadecansäure beschichteten Stempels mit 10 Mikrometer großen Kreisen kontaktbedruckt. Die umgebenden Flächen der Kreise werden dann mit einer Ethanollösung von Hexadecanthiol ausgefüllt.

[0089] Diese Probe wird dann einer wässrigen Suspension aminomodifizierter Polystyrolteilchen von 131 nm (Katalognr. F103092 von Seradyn) mit ungefähr 10^{10} Teilchen/ml ausgesetzt. Nach zwei Tagen wird die Probe entfernt und sanft mit Ethanol gespült, um ungebundene Teilchen zu entfernen. Eine Teilmenge der Probe beugte Licht von einem Laser, eine SEM-Analyse zeigte, dass die Teilchen dazu neigten, sich um die Kreise herum anzusammeln (siehe [Fig. 14a](#) und [Fig. 14b](#)). Bei [Fig. 14b](#) handelt es sich um eine Ansicht der in [Fig. 14a](#) gezeigten Probe bei hoher Vergrößerung.

BEISPIEL 8

[0090] Ein Gold/Silicium-Substrat wird unter Verwendung eines mit einer ethanolischen Lösung von Mercaptohexadecansäure beschichteten Stempels mit 10 Mikrometer großen Kreisen kontaktbedruckt. Die sauren Endgruppen werden unter Verwendung einer Carbodiimid-Kopplung mit D-Mannose verestert. Das Verfahren bezog ein, das kontaktbedruckte Gold/Silicium 5–8 Minuten lang in eine wässrige Lösung von 41 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid ("FDAC") zu geben und es dann sofort in ein Fläschchen zu übertragen, das eine 9,9 mM wässrige Lösung von D-Mannose enthielt. Nach 3½ Stunden wird die Gold/Silicium-Probe entfernt, sorgfältig mit destilliertem Wasser, dann mit Ethanol gespült und getrocknet.

[0091] Diese Probe wird mit einigen Tropfen phosphatgepufferter Kochsalzlösung (20 mM Phosphat, 80 mM Natriumchlorid, pH 7,4) bedeckt, dann werden 20 µl mit 20 nM Goldkolloid markiertes Concanavalin A (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) zu dem Puffertropfen gegeben. Nach 30 Minuten wird die Probe in der Pufferlösung sorgfältig gespült, gefolgt von weiteren Spülungen mit destilliertem Wasser, und dann unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Eine SEM-Analyse zeigt die Anwesenheit an die Kreise gebundener 20 nm großer Goldteilchen (siehe [Fig. 15](#)). Weil Concanavalin A für eine Bindung an

Mannose spezifisch ist, bestätigt dieser Test die Anwesenheit von Mannose in den 10 Mikrometer großen Kreisen.

[0092] Fachleute werden nun sehen, dass bestimmte Modifikationen der hierin offenbarten Erfindung in Bezug auf die veranschaulichten Ausführungsformen vorgenommen werden können, ohne von der Erfindung abzuweichen. Und während die Erfindung vorstehend in Bezug auf die bevorzugten Ausführungsformen beschrieben worden ist, ist selbstverständlich, dass die Erfindung an zahlreiche Umgestaltungen, Modifikationen und Veränderungen angepasst ist, wobei sich alle derartigen Gestaltungen, Modifikationen und Veränderungen innerhalb des Umfangs der angefügten Ansprüche befinden sollen.

Patentansprüche

1. Biosensor, umfassend:
einen mit Metall beschichteten Polymerfilm und
eine auf den metallisierten Polymerfilm gedruckte
selbstorganisierende Monoschicht, wobei sich auf
der selbstorganisierenden Monoschicht ein aufnahmefähiges Material befindet, das für einen Analyten
spezifisch ist;
wobei die selbstorganisierende Monoschicht in ei-
nem nicht beugenden Muster gedruckt ist und dass
der Biosensor, wenn der Biosensor den Analyten bin-
det, Durchlicht beugt, so dass ein Beugungsmuster
gebildet wird.
2. Biosensor nach Anspruch 1, wobei das Beu-
gungsmuster sichtbar ist.
3. Biosensor nach Anspruch 1 oder Anspruch 2,
wobei das Metall aus der Gruppe bestehend aus
Gold, Silber, Chrom, Nickel, Platin, Aluminium, Eisen,
Kupfer, Goldoxid, Chromoxid oder Zirkonium ausge-
wählt ist.
4. Biosensor nach Anspruch 3, wobei es sich bei
dem Metall um Gold handelt.
5. Biosensor nach Anspruch 4, wobei die Goldbe-
schichtung eine Dicke zwischen ungefähr 1 Nanome-
ter und 1000 Nanometer aufweist.
6. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
wobei es sich bei dem Polymerfilm um einen thermo-
plastischen Film handelt.
7. Biosensor nach Anspruch 6, wobei es sich bei
dem Polymerfilm um Polyethylenterephthalat, Acryl-
nitril-Butadien-Styrol, Acrylnitril-Methylacrylat-Copo-
lymer, Cellophan, cellulosehaltige Polymere wie zum
Beispiel Ethylcellulose, Celluloseacetat, Cellulose-
acetatbutyrat, Cellulosepropionat, Cellulosetriacetat,
Polyethylen, Polyethylen-Vinylacetat-Copolymere,
Ionomere (Ethylenpolymere), Polyethylen-Nylon-Co-

polymere, Polypropylen, Methylpentenpolymere, Polyvinylfluorid und aromatische Polysulfone handelt.

8. Biosensor nach Anspruch 7, wobei es sich bei dem Polymerfilm um Polyethylenterephthalat handelt.

9. Biosensor nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei der thermoplastische Film optisch durchsichtig ist.

10. Biosensor nach Anspruch 9, wobei der thermoplastische Film eine optische Transparenz von zwischen 5% und 95% aufweist.

11. Biosensor nach Anspruch 10, wobei der thermoplastische Film eine optische Transparenz von zwischen ungefähr 20% und 80% aufweist.

12. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die selbstorganisierende Monoschicht aus Verbindungen mit der folgenden allgemeinen Formel

X-R-Y

gebildet ist, wobei:

X leicht mit dem Metall oder Metalloxid auf dem Polymerfilm reagiert;
es sich bei R um eine Kohlenwasserstoffkette handelt und
es sich bei Y um eine Verbindung mit einer beliebigen Eigenschaft von Interesse handelt.

13. Biosensor nach Anspruch 12, wobei:
es sich bei X um ein asymmetrisches oder symmetrisches Disulfid (-R'SSY', -RSSY), Sulfid (-R'SY', -RSY), Diselenid (-R'Se-SeY'), Selenid (-R'SeY', -RSeY), Thiol (-SH), Nitril (-CN), Isonitril, Nitro (-NO₂), Selenol (-SeH), dreiwertige Phosphorverbindungen, Isothiocyanat, Xanthat, Thiocarbamat, Phosphin, Thiosäure oder Dithiosäure, Carbonsäuren, Hydroxylsäuren und Hydroxamsäuren handelt;
es sich bei R und R' um Kohlenwasserstoffketten handelt, die gegebenenfalls durch Heteroatome unterbrochen sein können und die gegebenenfalls perfluoriert sein können und die vorzugsweise nicht verzweigt sind; und
es sich bei Y und Y' um Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino-, Aldehyd-, Hydrazid-, Carbonyl-, Epoxy- oder Vinylgruppen handelt.

14. Biosensor nach Anspruch 12 oder Anspruch 13, wobei R eine Länge von mehr als 7 Kohlenstoffatomen aufweist.

15. Biosensor nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei es sich bei R um eine Verbindung der Form (CH₂)_a-Z-(CH₂)_b handelt, wobei a ≥ 0, b ≥ 7 und es sich bei Z um eine beliebige chemische Funktionalität von Interesse handelt.

16. Biosensor nach Anspruch 15, wobei Z aus der Gruppe bestehend aus Sulfonen, Lactamen und Harnstoff ausgewählt ist.

17. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei es zwei oder mehr selbstorganisierende Monoschichten mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften gibt.

18. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei eine erste selbstorganisierende Monoschicht hydrophob ist und eine zweite selbstorganisierende Monoschicht hydrophil ist.

19. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei es sich bei dem Analyten um Bakterien, Hefe, einen Pilz, ein Virus, den Rheumafaktor, IgG-, IgM-, IgA- und IgE-Antikörper, das carcinoembryonale Antigen, ein Streptococcus Gruppe A-Antigen, virale Antigene, mit Autoimmunerkrankungen zusammenhängende Antigene, Allergene, Tumorantigene, ein Streptococcus Gruppe B-Antigen, ein HIV-I- oder HIV-II-Antigen, Antikörper, Viren, für RSV spezifische Antigene, einen Antikörper, ein Antigen, ein Enzym, ein Hormon, ein Polysaccharid, ein Protein, ein Lipid, ein Kohlenhydrat, einen Arzneistoff oder eine Nucleinsäure, die Neisseria meningitidis-Gruppen A, B, C, Y und W, Untergruppe 135, Streptococcus pneumoniae, E. coli K1, Haemophilus influenzae Typ B, ein von Mikroorganismen abgeleitetes Antigen, ein Hapten, ein Rauschgift, einen therapeutischen Arzneistoff, ein Umweltmittel oder für Hepatitis spezifische Antigene handelt.

20. Biosensor nach Anspruch 19, wobei es sich bei dem Analyten um Bakterien, Hefe, einen Pilz oder ein Virus handelt.

21. Biosensor nach Anspruch 20, wobei es sich bei dem Pilz um eine Candida-Art handelt.

22. Biosensoren nach Anspruch 20, wobei es sich bei dem Bakterium um eine Salmonella-Art handelt.

23. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei das aufnahmefähige Material aus Antigenen, Antikörpern, Oligonucleotiden, Chelatbildnern, Enzymen, Bakterien, Hefen, Pilzen, Viren, Bakteriennpili, Materialien aus bakteriellen Flagellen, Nucleinsäuren, Polysacchariden, Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Metallen, Hormonen und Rezeptoren für diese Materialien ausgewählt ist.

24. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei das aufnahmefähige Material aus Toxinen, Parasiten, Zellen, Allergenen, Materialien aus dem Kern, Autoantikörpern, Blutproteinen, Zelltrümmern, Gewebeproteinen, Enzymsubstraten, Coenzyme, Neurotransmittern, Viruspartikeln, Mikroorga-

nismen und Arzneistoffen ausgewählt ist.

25. Behälter, wobei der wie in einem der Ansprüche 1 bis 24 definierte Biosensor an der inneren Wand des Behälters befestigt ist.

26. Behälter nach Anspruch 25, wobei es sich bei dem Behälter um ein Fläschchen handelt.

27. Behälter nach Anspruch 25, wobei es sich bei dem Behälter um einen Lebensmittelbehälter handelt.

28. Kleidungsstück, wobei der Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 24 an der inneren Wand des Kleidungsstückes befestigt ist.

29. Kleidungsstück nach Anspruch 28, wobei es sich bei dem Kleidungsstück um eine Windel handelt.

30. Verfahren zur Herstellung eines wie in einem der Ansprüche 1 bis 24 definierten Biosensors, wobei das Verfahren das Drucken eines Musters selbstorganisierender Monoschichten mit einem aufnahmefähigen Material, das für einen Analyten spezifisch ist, auf den metallisierten Polymerfilm umfasst; wobei die selbstorganisierende Monoschicht in einem nicht beugenden Muster gedruckt ist und dass der Biosensor, wenn der Biosensor einen Analyten bindet, Durchlicht beugt, so dass ein Beugungsmuster gebildet wird.

31. Verfahren zum Nachweisen eines Analyten in einem Medium, umfassend:

In-Kontakt-Bringen des Mediums, von dem vermutet wird, dass es den Analyten enthält, mit einer wie in einem der Ansprüche 1 bis 24 definierten biosensorischen Vorrichtung;

Durchleiten eines Lichts durch den Polymerfilm und Nachweisen der Anwesenheit des an das aufnahmefähige Material gebundenen Analyten durch Nachweisen eines durch Beugung des Durchlichts gebildeten Musters.

32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei es sich bei dem Analyten um Bakterien, Hefe, einen Pilz, ein Virus, den Rheumafaktor, IgG-, IgM-, IgA- und IgE-Antikörper, das carcinoembryonale Antigen, ein Streptococcus Gruppe A-Antigen, virale Antigene, mit Autoimmunerkrankungen zusammenhängende Antigene, Allergene, Tumorantigene, ein Streptococcus Gruppe B-Antigen, ein HIV-I- oder HIV-II-Antigen, Antikörper, Viren, für RSV spezifische Antigene, einen Antikörper, ein Antigen, ein Enzym, ein Hormon, ein Polysaccharid, ein Protein, ein Lipid, ein Kohlenhydrat, einen Arzneistoff oder eine Nucleinsäure, die Neisseria meningitidis-Gruppen A, B, C, Y und W, Untergruppe 135, Streptococcus pneumoniae, E. coli K1, Haemophilus influenzae Typ B, ein von Mikroorganismen abgeleitetes Antigen, ein Hapten, ein

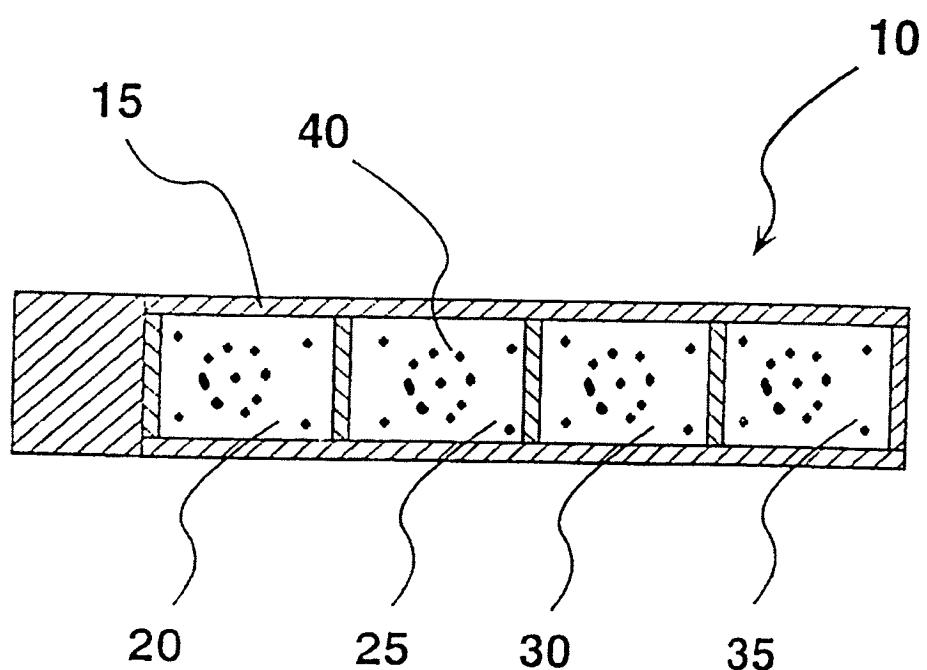
Rauschgift, einen therapeutischen Arzneistoff, ein Umweltmittel oder für Hepatitis spezifische Antigene handelt.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei es sich bei dem Analyten um Bakterien, Hefe, einen Pilz oder ein Virus handelt.

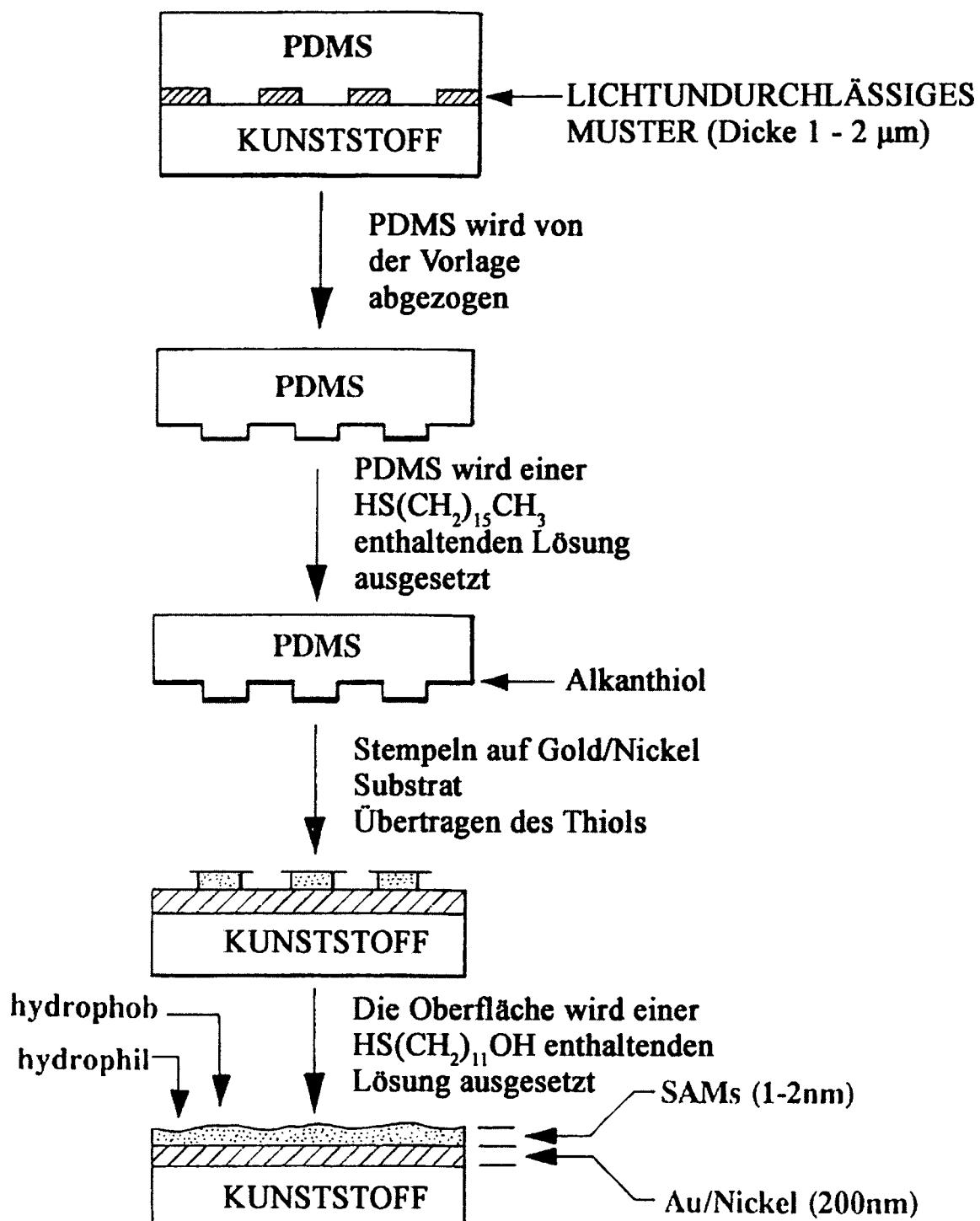
34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei es sich bei dem Pilz um eine Candida-Art handelt.

35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei es sich bei dem Bakterium um eine Salmonella-Art handelt.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen



FIGUR 1



FIGUR 2

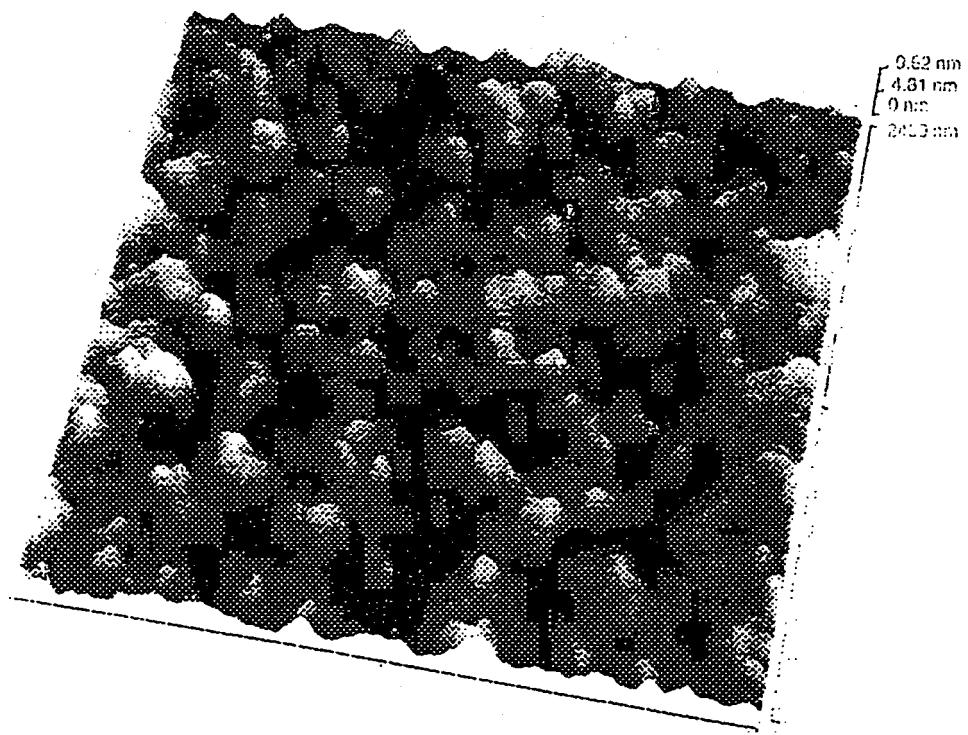


FIG. 3

FIG. 4A

Topographiebild

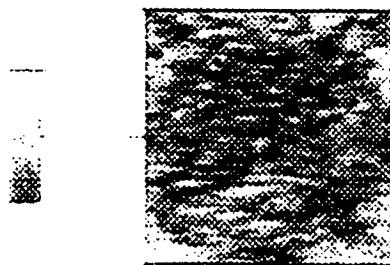
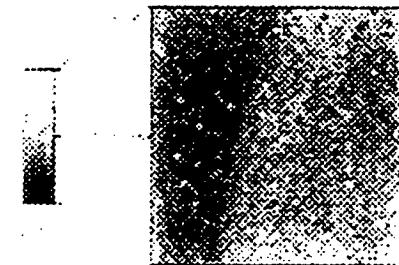


FIG. 4B

Querkraftbild



3D-Graphik des Topographiebildes

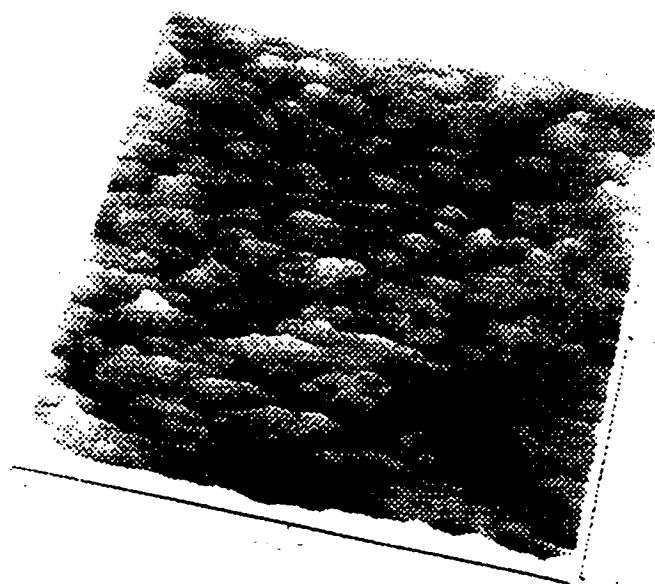


FIG. 4C

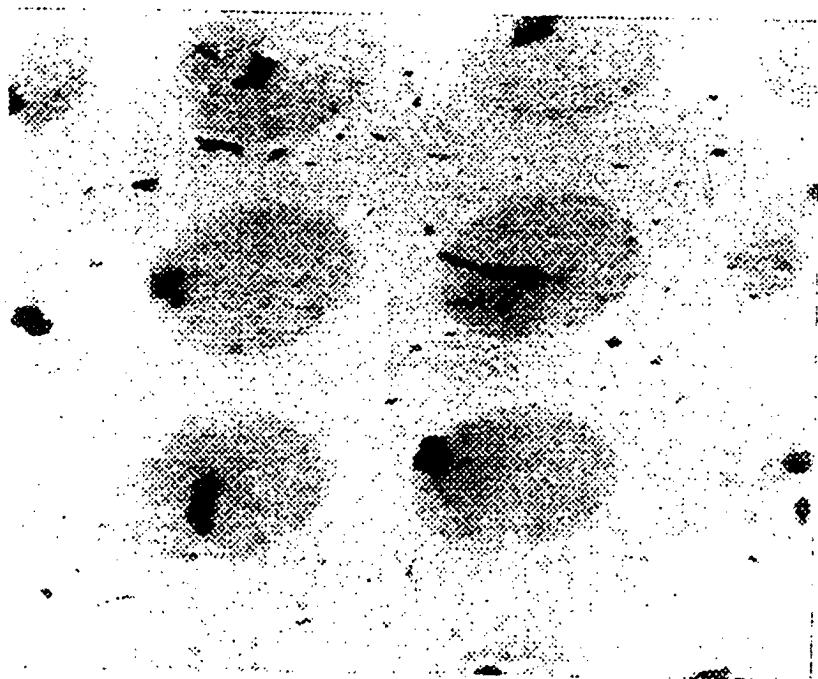


FIG. 5

FIG. 6A

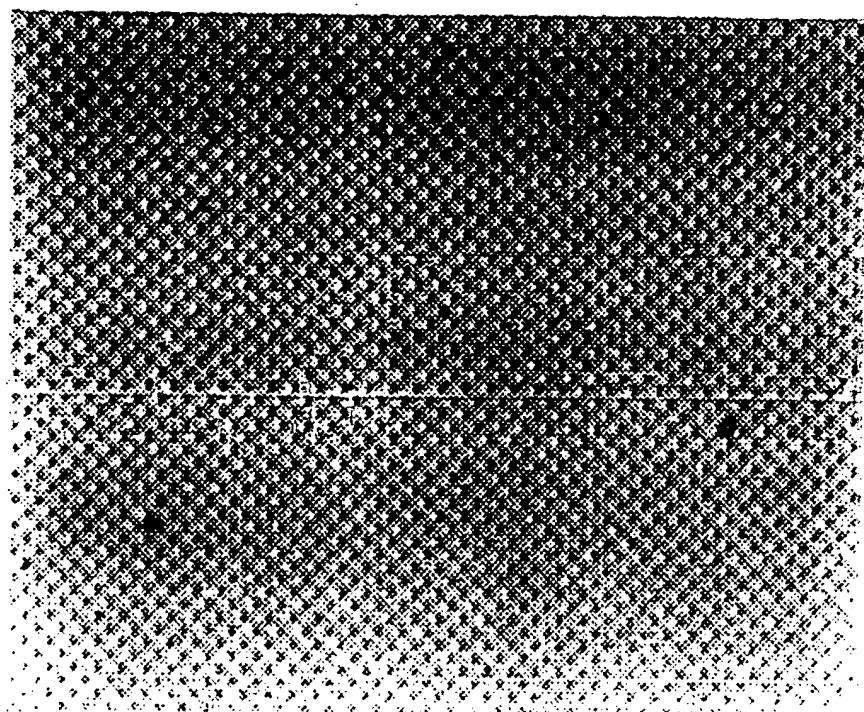


FIG. 6B

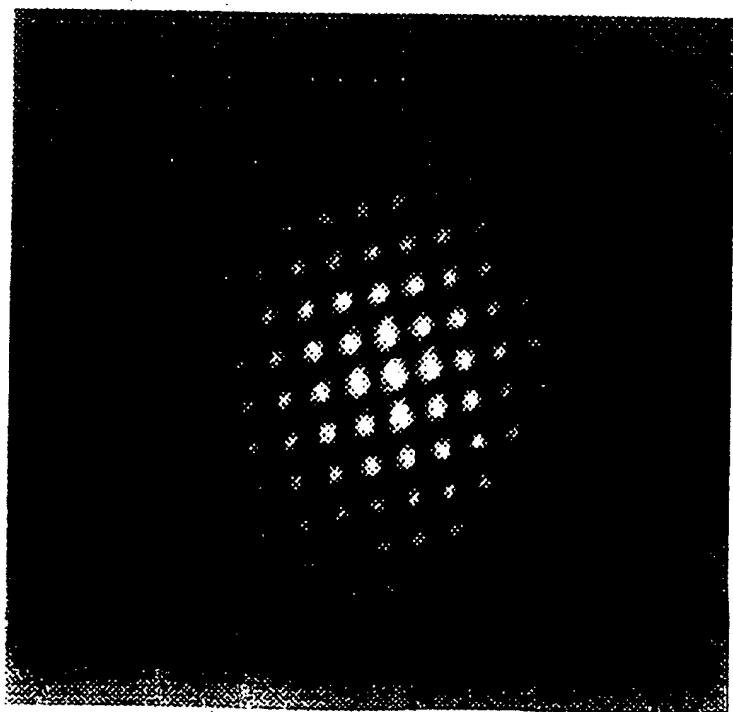


FIG. 7

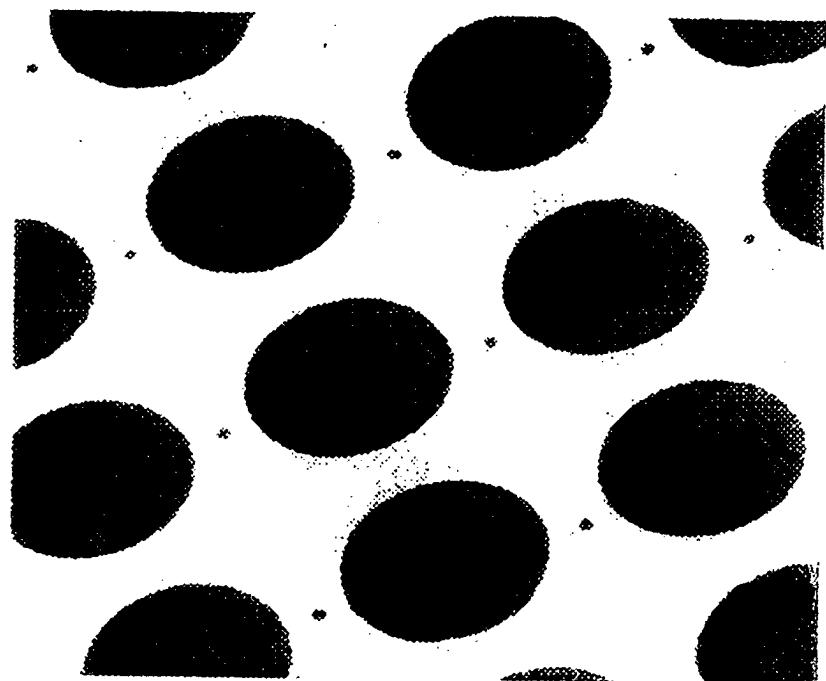


FIG. 8

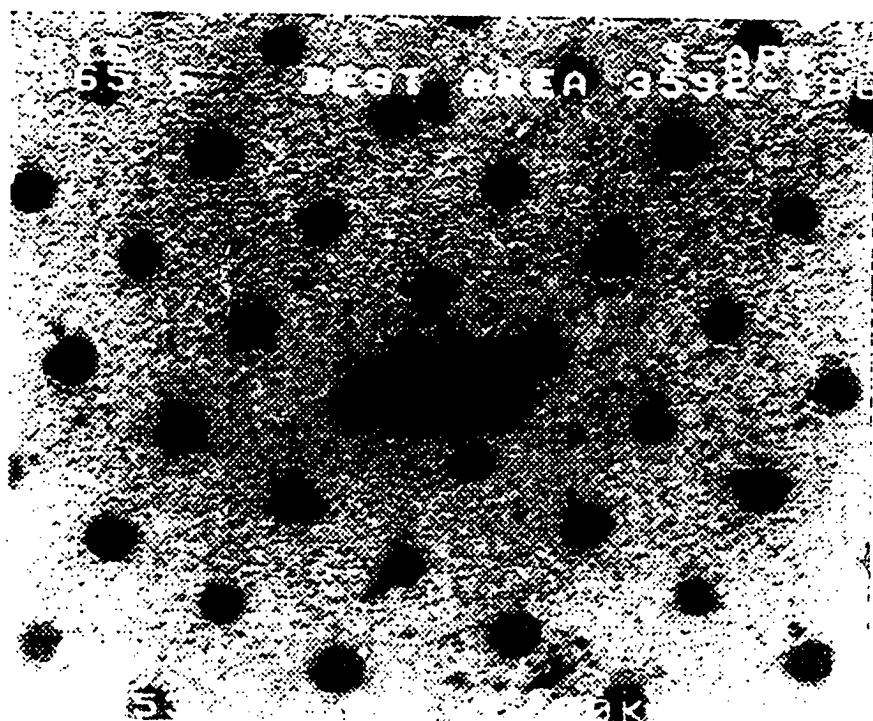


FIG. 9A

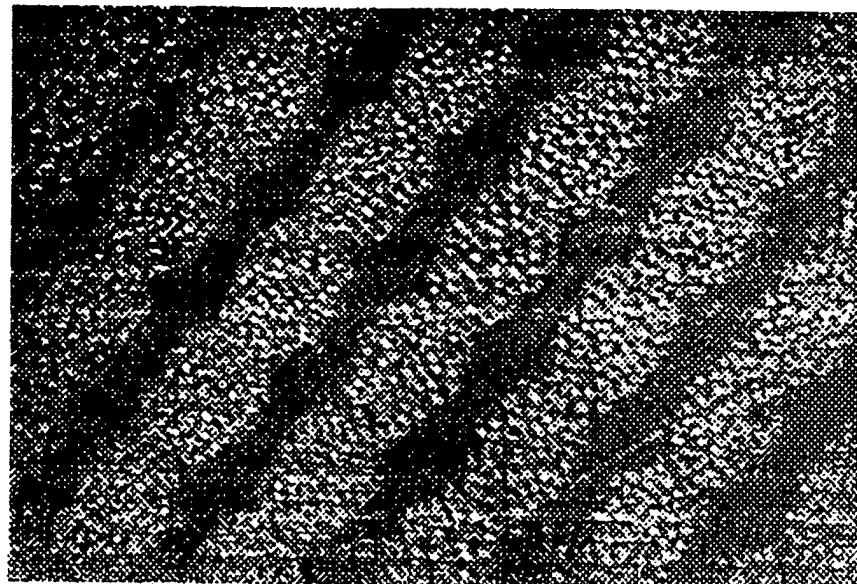


FIG. 9B

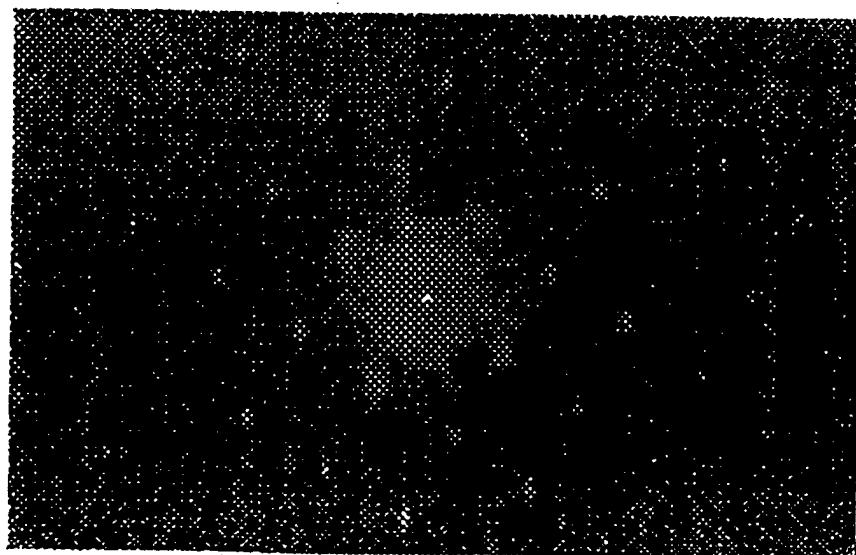


FIG. 10A

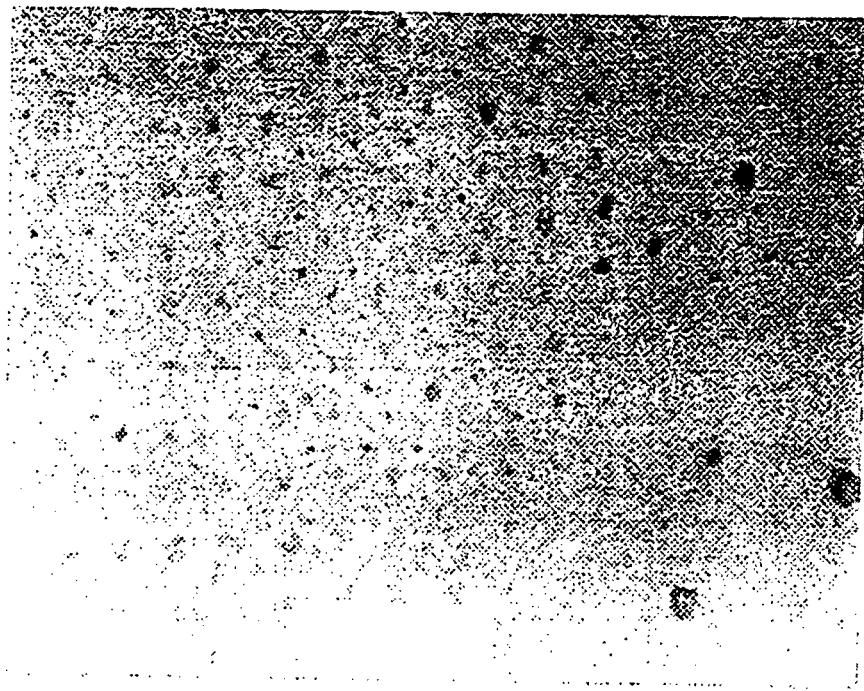


FIG. 10B

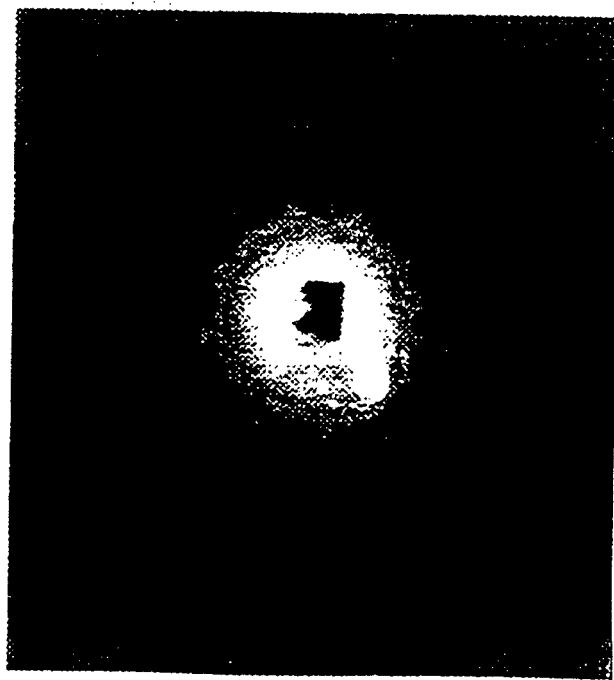


FIG. 11A

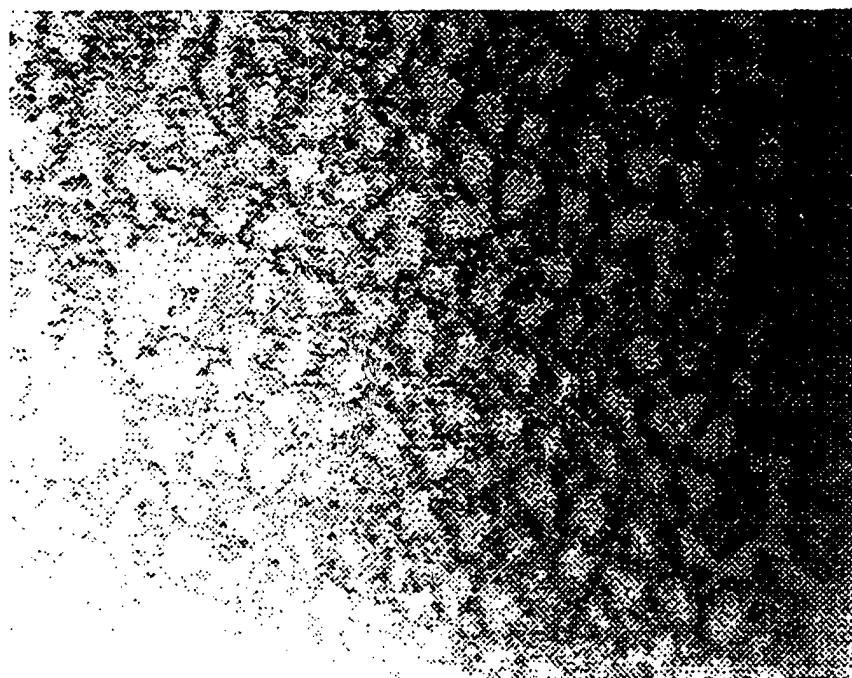


FIG. 11B

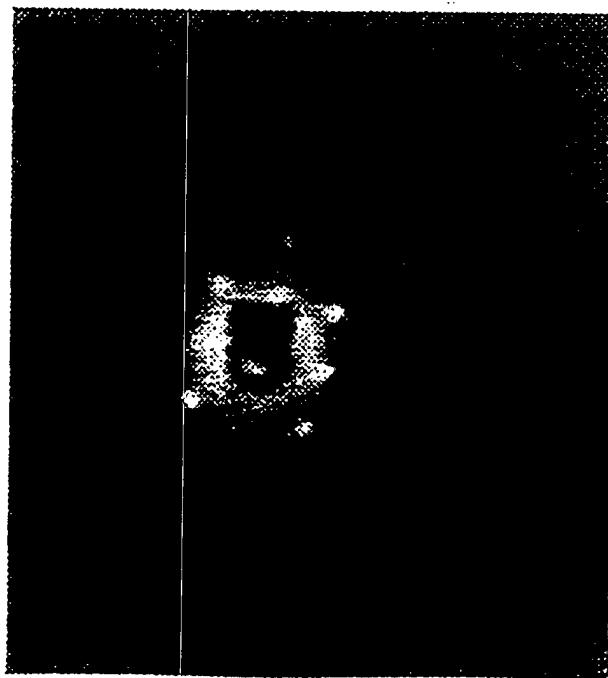


FIG. 12

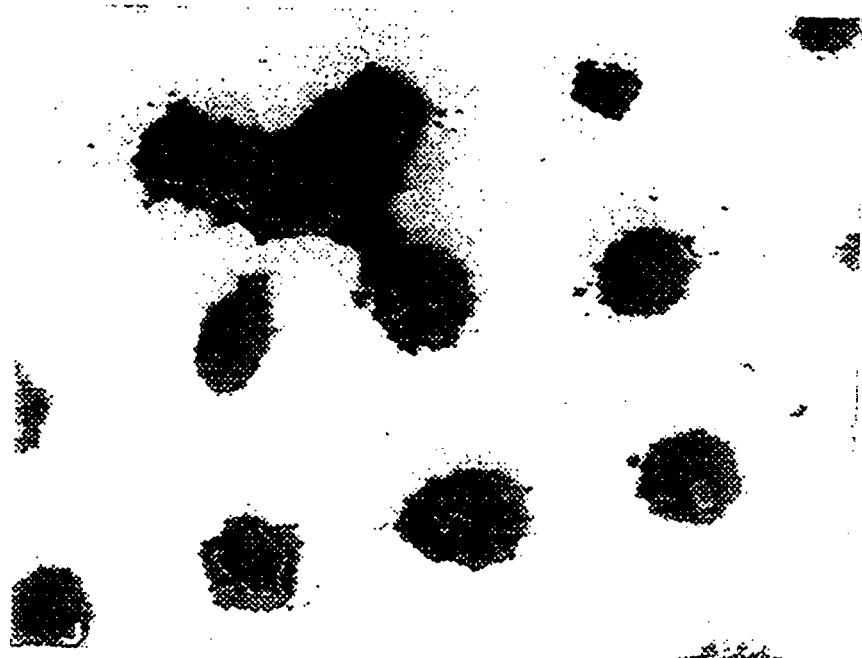


FIG. 13

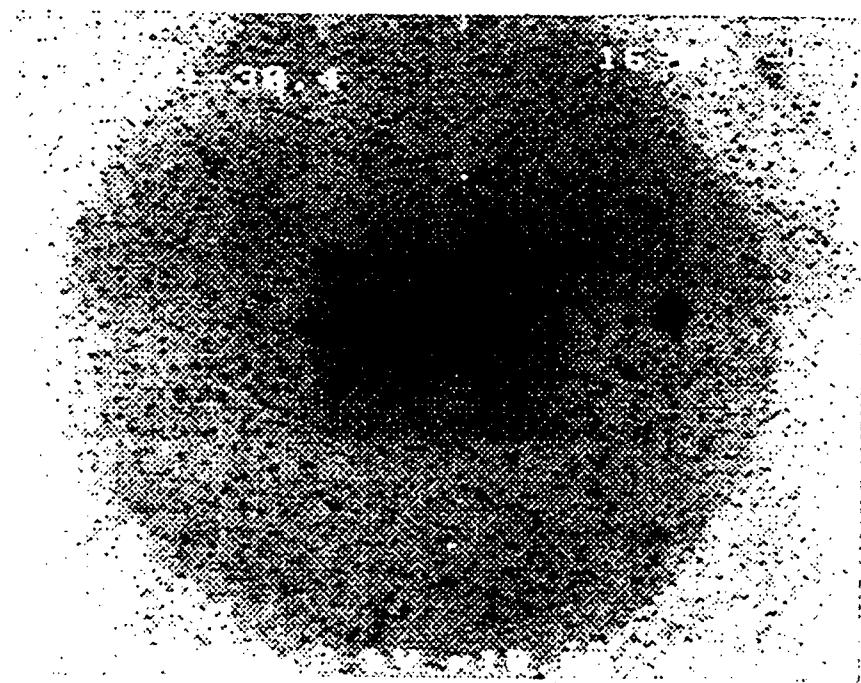


FIG. 14A

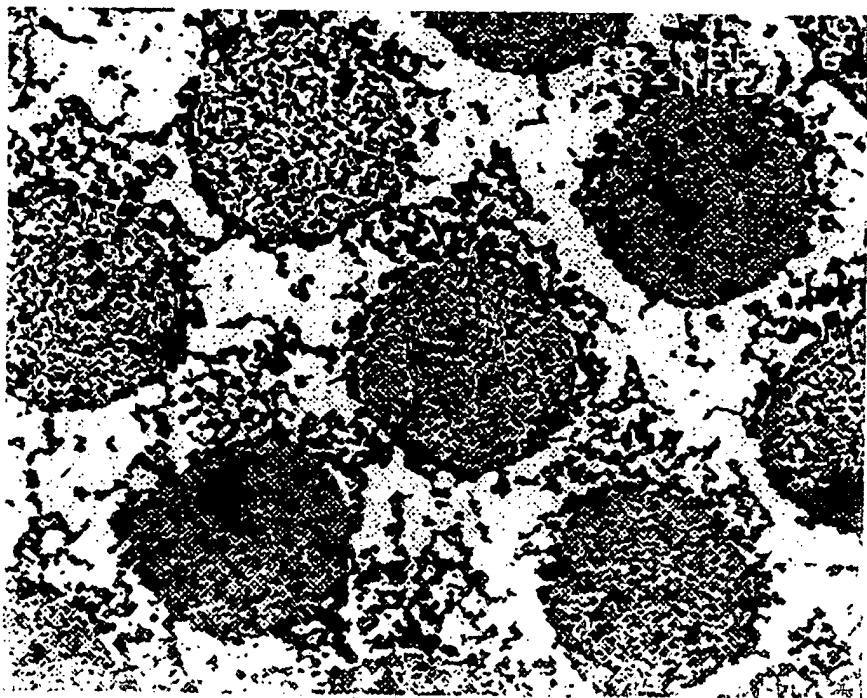


FIG. 14B

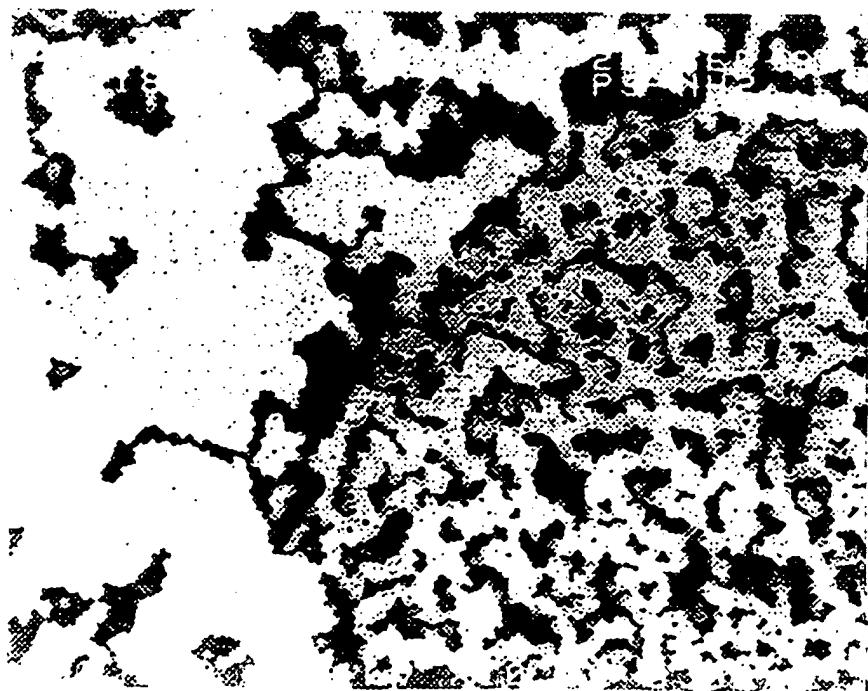


FIG. 15A

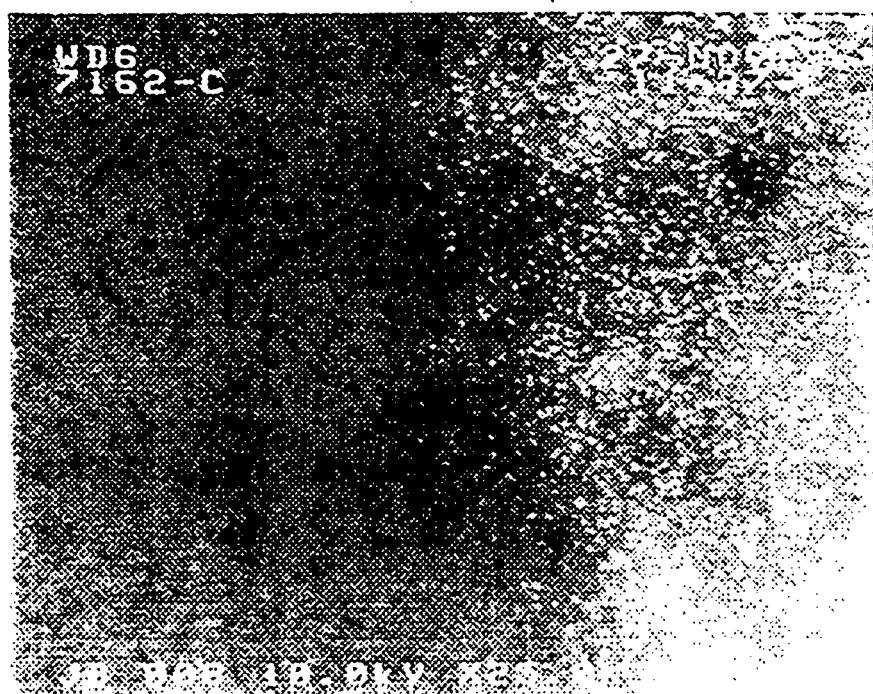


FIG. 15B

