

Analytische Chemie
Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 23862–23869

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202009000

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202009000

Multiplex-Nachweis von Analyten auf einem einzelnen Teststreifen mit Antikörper-gesteuerten und Indikator freisetzenden mesoporösen Nanopartikeln

Estela Climent, Mustafa Biyikal, Delia Gröninger, Michael G. Weller, Ramón Martínez-Máñez und Knut Rurack*

Abstract: Vor dem Hintergrund der einzigartigen Modularität, hohen Empfindlichkeit und Selektivität von Antikörper-gesteuerten Indikatorfreisetzungssystemen (gAID-Systemen) wurde hier ein Multiplex-Assay für drei organische Explosivstoffmoleküle (TATP, TNT, PETN) entwickelt, der es erlaubt, die Analyten gleichzeitig in flüssiger Phase mit einem einzelnen Teststreifen und einem Fluoreszenzlesegerät bzw. Smartphone als Detektor in Konzentrationen bis in den unteren ppb-Bereich in < 5 min nachzuweisen. Alle drei Systeme, darunter die hier neu entwickelten Systeme für TNT und PETN, tolerieren zudem nicht nur gepufferte wässrige Modelllösungen, sondern auch komplexere Matrices. Neben einem konventionellen Teststreifen mit einem Kanal erlaubte uns die Anwendung von Wachsdrucktechnologie das Herstellen von mehrkanaligen Streifen mit vergleichbarer analytischer Leistungsfähigkeit, was das enorme Potenzial der modular aufgebauten, hybriden Biosensormaterialien im Hinblick auf eine für den Endanwender maßgeschneiderte Vor-Ort-Analytik unterstreicht.

Einleitung

In den Bereichen Gesundheit,^[1] Lebensmittel,^[2] Sicherheit^[3] und Umwelt^[4] gewinnen Schnelltests zum Einsatz außerhalb des Labors direkt am Ort des Geschehens immer mehr an Bedeutung. Insbesondere im Hinblick auf das sogenannte ASSURED-Prinzip^[5,6] der WHO weisen dabei mikrofluidische Chips und papierbasierte Systeme eine hohe Relevanz auf.^[7] Ihre Popularität und ihr Durchbruch am Markt hängen dabei nicht nur von der Robustheit, Benutzerfreundlichkeit und analytischen Performance ab, sondern vor allem auch von der Möglichkeit, mehrere Zielanalyten gleichzeitig erfassen zu können.^[8] Wenn man beispielsweise drei Tests mit sich herumtragen und anwenden muss, um eine Probe auf drei unterschiedliche Parameter zu untersuchen, würde dies das Konzept des „ASSURED Testing“ eher konterkarieren. Die Realisierung eines Multiplex-Nachweises bei gleichzeitiger Beibehaltung der Einfachheit, Performance und mobilen Einsatzfähigkeit solcher Tests ist daher eine der wesentlichen Herausforderungen auf diesem Gebiet. Obwohl bereits über die Multiplex-Detektion auf Papier berichtet wurde, beschäftigten sich diese Arbeiten in der Regel mit Protein-Biomarkern oder Metallionen.^[9] Beispiele für kleine organische Moleküle sind selten und wurden bislang ausschließlich auf Basis sogenannter Lateral-Flow-Tests entwickelt, die wie einfache Schwangerschaftstests mit mehreren Linien aufgebaut sind, was allerdings die Modularität deutlich einschränkt, da für das Detektionsprinzip primär die Aggregation von Goldnanopartikeln ausgenutzt wird.^[10]

Antikörper-gesteuerte Indikatorfreisetzungssysteme (gAID-Systeme) stellen hier in Bezug auf Vielseitigkeit und Modularität eine attraktive Alternative dar.^[11] Bei gAID-Systemen handelt es sich um homogene Immunoassays, bei denen die Signalgebung von der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung entkoppelt ist und die daher auf den Einsatz von Markierungsreagenzien verzichten können. Die Systeme sind im Allgemeinen so aufgebaut, dass die Poren von mesoporösen Silica-Nanopartikeln (MSN) mit Indikatormolekülen beladen und mit einer entsprechenden Verschlusschemie an den Porenöffnungen ausgestattet sind, die dafür sorgt, dass die Farbstofffracht in Abwesenheit des Analyten in den Poren verbleibt. In Antikörper-gesteuerten Systemen besteht diese Verschlusschemie herkömmlicherweise aus Hapten-Derivaten (den sogenannten „Torwächtern“), die an die äußere Partikeloberfläche angebunden sind und die entsprechenden Antikörper binden, die dann als Abdeckung der Porengänge fungieren (Schema 1). Da bei Bindung eines einzelnen

[*] Dr. E. Climent, Dr. M. Biyikal, D. Gröninger, Dr. M. G. Weller, Dr. K. Rurack

Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
 Richard-Willstätter-Str. 11, 12489 Berlin (Deutschland)
 E-Mail: knut.rurack@bam.de


Prof. R. Martínez-Máñez
 Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) Universitat Politècnica de València, Universitat de València


Camino de Vera, s/n, 46022, Valencia (Spanien),
 und

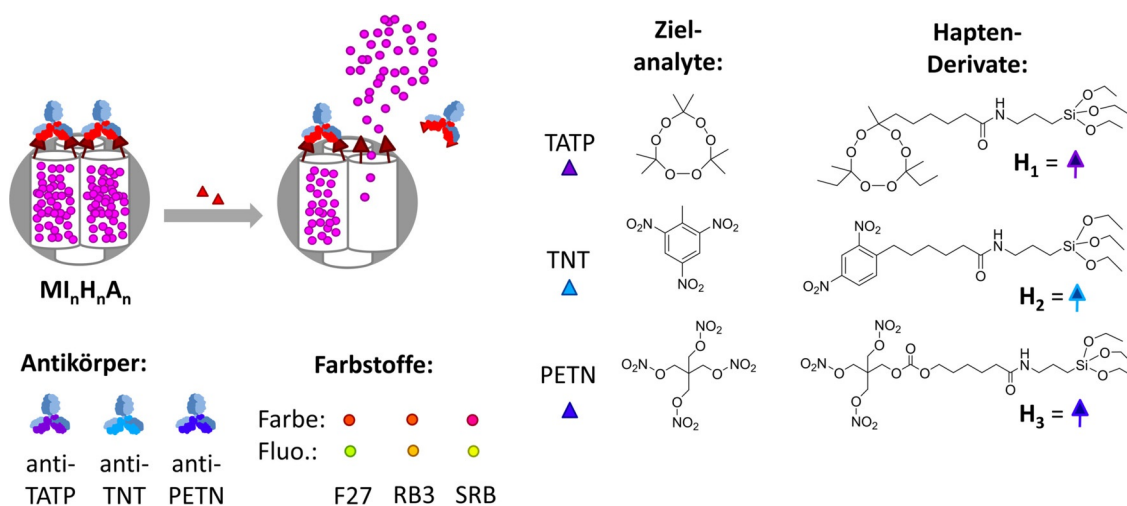
Unidad Mixta UPV-CIPF de Investigación en Mecanismos de Enfermedades y Nanomedicina, Universitat Politècnica de València, Centro de Investigación Príncipe Felipe

C/ Eduardo Primo Yúfera 3, 46012, Valencia (Spanien),
 und

CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) (Spanien)

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter: <https://doi.org/10.1002/ange.202009000> zu finden.

 © 2020 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.



Schema 1. Architektur und Arbeitsweise der gAID-Systeme $MI_nH_nA_n$ (links oben, willkürlicher Farbcode), chemische Strukturen der entsprechenden Zielanalyt/Hapten-Paare (rechts), eingesetzte polyklonale Antikörper (ganz links unten: anti-TATP = A_1 , anti-TNT = A_2 , anti-PETN = A_3) und Indikatorfarbstoffe (Mitte links unten: 2,7-Dichlorfluorescein, F27 = I_1 ; Ruthenium-tris(bipyridin), RB3 = I_2 ; Sulforhodamin B, SRB = I_3). Die Farbcodes der Zielanalyten, Hapten-Derivate und Antikörper werden im gesamten Artikel verwendet; bei den Farbstoffen repräsentieren die Punkte in der oberen Reihe (rot, rot, pink) die Farbe ihrer wässrigen Lösungen und die Punkte in der unteren Reihe (grün, orange, gelb) ihre Emissionsfarbe.

Analyten an eine Antikörper-Abdeckung und die damit verbundene Inhibierung der erneuten Anbindung des Antikörpers an das Hapten eine wesentlich größere Menge an Indikatorfarbstoffen (Mitte links unten: 2,7-Dichlorfluorescein, F27 = I_1 ; Ruthenium-tris(bipyridin), RB3 = I_2 ; Sulforhodamin B, SRB = I_3). Die Farbcodes der Zielanalyten, Hapten-Derivate und Antikörper werden im gesamten Artikel verwendet; bei den Farbstoffen repräsentieren die Punkte in der oberen Reihe (rot, rot, pink) die Farbe ihrer wässrigen Lösungen und die Punkte in der unteren Reihe (grün, orange, gelb) ihre Emissionsfarbe.

Analyten an eine Antikörper-Abdeckung und die damit verbundene Inhibierung der erneuten Anbindung des Antikörpers an das Hapten eine wesentlich größere Menge an Indikatorfarbstoffen aus den Poren diffundieren kann, sind diese Systeme durch eine inhärente chemische Signalverstärkung gekennzeichnet.^[12] Eine Einbettung solcher hybriden Sensormaterialien auf Papierstreifen und deren Einsatz in Lateral-Flow-Assays erlaubt es daher, einfache aber leistungsstarke Teststreifen zu erhalten.^[13] Die in Schema 1 skizzierte Modularität deutet dabei direkt das Potenzial des Ansatzes für die Multiplex-Analytik an. Eine erste Charge an MSN kann mit einem ersten Indikator beladen und mit einer ersten Torwächter/Abdeckungssimmunchemie verschlossen werden, eine zweite Charge an MSN kann mit einem zweiten Indikator beladen und mit einer zweiten Torwächter/Abdeckungssimmunchemie verschlossen werden usw., bis eine Bibliothek an Sensormaterialien zur Hand ist, für die die Freisetzung eines spezifischen Indikators direkt die Anwesenheit des Analyten anzeigen würde, der selektiv an die entsprechenden, die Poren abdeckenden Biomakromoleküle gebunden hat.^[14] Wir berichten hier über das erste Beispiel einer generischen biomimetischen Strategie für den simultanen Nachweis von drei kleinen organischen Molekülen auf einem einzelnen Teststreifen mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität. Als Analyten wurden die drei Explosivstoffe Triacetontriperoxid (TATP), Trinitrotoluol (TNT) und Nitropenta (PETN) ausgewählt, über deren Relevanz insbesondere aus Gründen der öffentlichen Sicherheit kein Zweifel besteht.^[15] Die Einbettung der Hybrid-Partikel auf Teststreifen erlaubte es uns, die drei Explosivstoffe gleichzeitig in weniger als 5 min bis in den unteren ppb-Bereich mit einem einfachen Lateral-Flow-Test nachzuweisen.

Ergebnisse und Diskussion

Für die hybriden gAID-Systeme $MI_1H_1A_1$, $MI_2H_2A_2$ und $MI_3H_3A_3$ wurde dasselbe mesoporöse Silica-Trägermaterial vom Typ MCM-41 (**M**) verwendet, dessen Poren mit den drei Indikatorfarbstoffen 2,7-Dichlorfluorescein (F27 = I_1), für MI_1 , Ruthenium-tris(bipyridin) (RB3 = I_2 , für MI_2) und Sulforhodamin B (SRB = I_3 , für MI_3) beladen wurden. Drei Hapten-Derivate, die den drei Zielanalyten TATP, TNT und PETN entsprechen, wurden dann kovalent an die äußere Oberfläche von MI_1 - MI_3 angebonden, woraus MI_1H_1 - MI_3H_3 resultierten. Schließlich wurden die Porenöffnungen mit den entsprechenden polyklonalen Antikörpern A_1 (anti-TATP), A_2 (anti-TNT) und A_3 (anti-PETN) durch Bindung an die verankerten Hapten-Derivate verschlossen und so Sensormaterialien $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ erhalten (Schema 1). F27, RB3 und SRB wurden primär aus zwei Gründen ausgewählt: (i) die Farbstoffe können in hinreichend unterschiedlichen spektralen Fenstern angeregt und ihre Emission beobachtet werden, wobei kein teurer optischer Aufbau notwendig ist (Abbildung S1, Hintergrundinformationen), und (ii) das Retentionsverhalten der Farbstoffe auf den Teststreifen ist hinreichend unterschiedlich, so dass sie chromatographisch getrennt werden können. A_1 - A_3 standen uns intern zur Verfügung, im Rahmen der Aktivitäten der BAM zur Etablierung einer Bibliothek an Antikörpern gegen die weit verbreiteten organischen Sprengstoffmoleküle.^[16]

Da das System auf eine schnelle Freisetzungskinetik bei Anwesenheit des Analyten, aber auch auf einen effizienten Verschluss der Poren in Abwesenheit des Analyten angewiesen ist, wählten wir für die Verschlusschemie die Strategie der Kombination strukturell leicht abweichender Hapten-Derivate („hapten heterology“)^[17] mit stark bindenden Antikörpern, d. h., mit Seren, die in späten Immunisierungszyklen während der Antikörperproduktion erhalten werden.

Bei diesem Ansatz sind die Assoziationskonstanten in der Regel sehr hoch und die Dissoziationskonstanten noch hinreichend schnell, um kurze Assay-Zeiten zu ermöglichen. Dieser Effekt ist besonders bei bivalenter Bindung an einen Antikörper relevant,^[18] wovon bei dem hier verwendeten Format auszugehen ist und wie wir es in einer früheren Arbeit zu einem gAID-System bereits beschrieben haben.^[13a] Hier wurden die in Schema 1 gezeigten Hapten-Derivate H_1 bis H_3 eingesetzt, die sich alle leicht von den zur Immunisierung eingesetzten Haptene unterscheiden. Alle hergestellten Materialien $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ wurden mit Standardverfahren charakterisiert und eine Übersicht über die gesamten Charakterisierungsmethoden und -ergebnisse ist den Hintergrundinformationen beigelegt, in den Abschnitten 2–5, inklusive Schema S1, Abbildungen S2–S4 und Tabelle S1.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die individuellen Kennzahlen für das Ansprechverhalten von $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ auf die entsprechenden Analyten erfasst. Dafür wurden 0.5 mg $MI_nH_nA_n$ in 4 mL PBS (Phosphatpuffer, $10\times$, pH 7.4), der 0.05% (v/v) Tween 20 enthielt, suspendiert, wobei die resultierende Konzentration an $MI_nH_nA_n$ 0.12 mg mL^{-1} betrug. Um die Freisetzungskinetik und die Effizienz des Porenverschlusses in Abwesenheit des Analyten zu untersuchen, d. h., die unspezifische oder Hintergrundfreisetzung des Systems zu kennen, wurden die Suspensionen aliquotiert und der eine Teil (2 mL) mit 50 μL einer Stammlösung des entsprechenden Analyten in MeOH (450 ppm) versetzt, wobei die finale Konzentration an Analyt 10.5 ppm und am organischen Co-Lösungsmittel MeOH 2.5% betragen. Alle drei Antikörper A_1 - A_3 tolerierten diesen Anteil an Methanol in der Assay-Lösung, was sich positiv auf die Dosierung der drei hydrophoben Analyten auswirkte. Das zweite Aliquot wurde nur mit derselben Menge MeOH versetzt und fungierte als Blindprobe. Volumina von 0.25 mL wurden daraufhin beiden Suspension nach bestimmten Zeitintervallen entnommen, zentrifugiert und die Menge an freigesetztem Farbstoff nach jedem Zeitintervall fluorometrisch bestimmt, wobei die jeweils für einen Farbstoff geeig-

nete Anregungs- und Emissionswellenlänge eingestellt wurden. Abbildung 1 zeigt, dass die Anwesenheit von PETN und TATP zu einer schnellen Porenöffnung und anschließender Freisetzung der eingeschlossenen Farbstoffe führt. Das TNT-System ist etwas langsamer, wobei Kontrollexperimente mit $MI_1H_2A_2$ aber den Schluss nahelegten, dass dieses Verhalten nicht durch eine langsamere Öffnungskinetik, sondern durch die chemische Natur des Indikatorfarbstoffes bedingt war (s. Abbildung S5). Während es sich bei F27 und SRB, mit denen die Materialien für TATP und PETN beladen sind, um anionische Farbstoffe handelt, enthält das Material für TNT einen kationischen Farbstoff (RB3). Letzterer wird in den Poren stärker zurückgehalten, da die Porenwände durch die Vielzahl an Silanol-Gruppen in brutto eine negative Ladung tragen.^[19] Nichtsdestotrotz wurde für $MI_2H_2A_2$ bei Anwesenheit von TNT in der Messlösung eine Ansprechrate von $>90\%$ in $<5\text{ min}$ erreicht. Als positiv stellte sich bei allen drei Materialien heraus, dass die Hintergrundfreisetzung in Abwesenheit des entsprechenden Analyten vorteilhaft niedrig ist (Abbildung 1).

Das Ansprechverhalten von $MI_nH_nA_n$ gegenüber den jeweiligen Analyten wurde analog über die Messung der Farbstofffreisetzung in Gegenwart der Explosivstoffe erfasst (Abbildung 2; s. Abbildung S6 für spektrales Ansprechverhalten). 200 μL einer Suspension von $MI_nH_nA_n$ (0.12 mg mL^{-1} in PBS-Tween 20 mit 2.5% of MeOH) wurden dafür mit steigenden Konzentrationen an Explosivstoff versetzt und für 5 min gerührt. Nach dem Abzentrifugieren der Partikel wurde die Fluoreszenz des Überstands gemessen. In allen Fällen wurde eine Korrelation zwischen Farbstofffreisetzung und Analyt-Konzentration beobachtet, was auf eine Verdrängung der Antikörper von den Porenöffnungen nach Bindung des Analyten hinweist. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden dann mit einer logistischen Funktion aus vier Parametern angepasst und die Nachweisgrenzen (NWG) zu 0.3 ± 0.1 , 0.4 ± 0.1 und $0.7 \pm 0.2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ für TATP, TNT und PETN abgeleitet (s. Abschnitt 12, Hintergrundinformationen bzgl. der Details).^[20] Im unteren Messbereich, d. h., bei Explosivstoff-

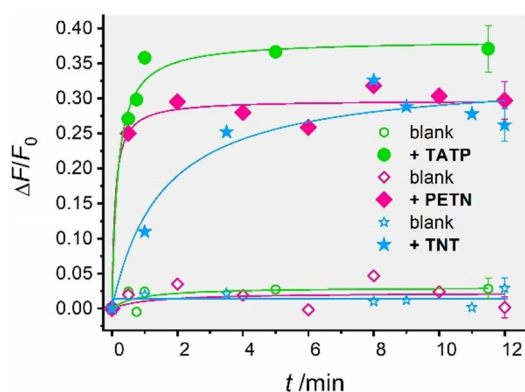


Abbildung 1. Anstieg der Fluoreszenz der Farbstoffe F27 (grüne Punkte; $\lambda_{\text{exc}} = 490\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525\text{ nm}$), SRB (pinke Diamanten; $\lambda_{\text{exc}} = 564\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 588\text{ nm}$) und RB3 (blaue Sterne; $\lambda_{\text{exc}} = 464\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 626\text{ nm}$) über der Zeit für $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ in PBS-Tween 20 mit 2.5% MeOH (pH 7.4) in Anwesenheit (gefüllte Symbole) und Abwesenheit (ungefüllte Symbole) von 10.5 ppm TATP, PETN oder TNT. Die Linien dienen lediglich der besseren Illustration.

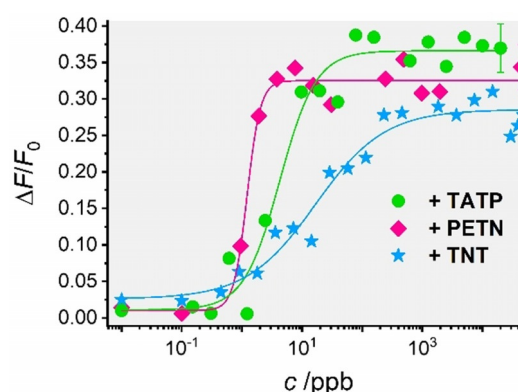


Abbildung 2. Anstieg der Fluoreszenz der Farbstoffe SRB (pinke Diamanten; $\lambda_{\text{exc}} = 564\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 588\text{ nm}$), F27 (grüne Punkte; $\lambda_{\text{exc}} = 490\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525\text{ nm}$) und RB3 (blaue Sterne; $\lambda_{\text{exc}} = 464\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 626\text{ nm}$) über der Konzentration an zugesetztem Analyt für $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ in PBS-Tween 20 mit 2.5% MeOH (pH 7.4) nach einer Reaktionszeit von 5 min. Die Linien beschreiben eine logistische Anpassung mit vier Parametern.

konzentrationen von wenigen ppb, wurden ca. 2–3% der Farbstofffracht freigesetzt, was einer Signalverstärkung von 60–90 Farbstoffen pro verdrängtem Antikörper entspricht.

Der Multiplex-Nachweis in einer Probe ist nur möglich, wenn die Querempfindlichkeit gering ist, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Wir haben daher einen Triplex-Assay durchgeführt, bei dem eine Mischung der drei Sensormaterialien in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an den Explosivstoffen untersucht wurden. Dafür wurden Suspensionen mit Mischungen aus $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ (0.12 mg mL^{-1} von jedem Material, in PBS-Tween 20 mit 2.5% of MeOH) mit unterschiedlichen Mengen an TATP, TNT und PETN versetzt und wie oben beschrieben

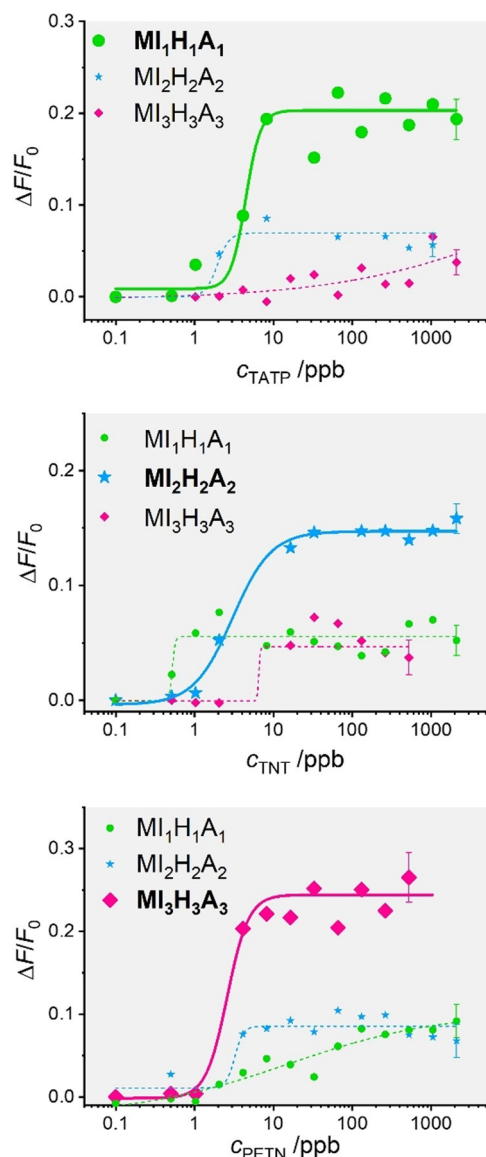


Abbildung 3. Anstieg der Fluoreszenz der aus $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ freigesetzten Farbstoffe SRB ($\lambda_{\text{exc}} = 564 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 588 \text{ nm}$), F27 ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) und RB3 ($\lambda_{\text{exc}} = 464 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 626 \text{ nm}$) in Anwesenheit steigender Konzentrationen an TATP (oben), TNT (Mitte) und PETN (unten) in PBS-Tween 20 mit 2.5% MeOH (pH 7.4) nach einer Reaktionszeit von 5 min. Die Linien beschreiben eine logistische Anpassung mit vier Parametern.

behandelt. Die in Abbildung 3 gezeigten Ergebnisse deuten an, dass ein selektiver Nachweis möglich ist. Eine gewisse Querempfindlichkeit war zu beobachten, aber generell ist die von den gAID-Systemen gezeigte Selektivität vielversprechend. Zudem sind die NWG vergleichbar zu den vormals gefundenen (1.3 ± 0.6 , 0.5 ± 0.1 und $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ für TATP, TNT und PETN). Um Aufschluss über den Einfluss einer komplexeren Matrix zu erhalten, wurden die gleichen Untersuchungen in Milch durchgeführt, wobei auch hier sehr ähnliche Ergebnisse wie zuvor in wässriger Pufferlösung gefunden wurden, s. Hintergrundinformationen, Abschnitt 8 inkl. Abbildungen S7 und S8.

Des Weiteren wurde die Selektivität der Antikörper gesteuerten Materialien in Anwesenheit anderer Explosivstoffe untersucht, wofür das Ansprechverhalten auf die herkömmlichen Sprengstoffe Hexogen (RDX), Octogen (HMX), Nitroguanidin (NG) und Pikrinsäure (PA) mit einer analogen Vorgehensweise erfasst wurde, bei einer Explosivstoffkonzentration von 2 ppm. Obwohl zwar in einigen Fällen eine gewisse Querempfindlichkeit gefunden wurde, war die Selektivität im Allgemeinen sehr vielversprechend für die weitere Entwicklung des Tests, s. Abbildung S9.

Um einen weiteren Schritt in Richtung Anwendung zu gehen, wurden die Hybrid-Partikel auf Nitrocellulose-Streifen aufgetragen und in Lateral-Flow-Assays (LFAs) mit Fluoreszenzdetektion eingesetzt. Die Teststreifen sind dazu wie folgt aufgebaut. In einer Zone A werden die Sensormaterialien deponiert und in einer Zone B, welche einem Bereich am anderen Ende des Streifens entspricht, durch den die Lösungsmittelfront kurz vor Fließende wandert, wird das Signal der freigesetzten Farbstoffe aufgenommen (Abbildung 4a). Wenn ein Streifen in eine Lösung getaucht wird, die keinen Analyten enthält, wird kein Farbstoff freigesetzt und kein Signal in Zone B gemessen, da die Materialien verschlossen geblieben sind. Im Umkehrschluss wird dann bei Anwesenheit eines Analyten in der Probelösung allerdings ein Signal in Zone B gemessen, welches sich proportional zur Analyt-Konzentration verhält, da in Zone A Antikörper von den Porenöffnungen verdrängt worden sind und Farbstoff freigesetzt worden ist. Dabei erfolgt eine räumliche Trennung der Signale von Indikatormolekülen, die in verschlossenen Poren des Materials verblieben sind, und freigesetzten Farbstoffmolekülen, die aus geöffneten Poren freigesetzt worden sind und mit dem Fluss gewandert sind; die Nanopartikel an sich sind zu groß und können nicht mit dem Lösungsmittelfluss wandern. Die Menge an freigesetztem Farbstoff kann dann entweder mit einem Fluoreszenzlesegerät unter entsprechenden Anregungs- und Emissionsbedingungen oder mit einem mobilen Endgerät und adäquatem optischen Zubehör gemessen werden.

Zuerst wurden in diesem Format wieder die einzelnen Materialien $MI_1H_1A_1$, $MI_2H_2A_2$ und $MI_3H_3A_3$ hinsichtlich ihres Detektionsvermögens gegenüber TATP und PETN untersucht, wobei vergleichbare Ergebnisse wie in Suspension erhalten wurden (s. Hintergrundinformationen, Abschnitt 10 inkl. Abbildung S10). In einem nächsten Schritt wurden Teststreifen präpariert, bei dem eine Mischung aus äquivalenten Mengen der drei gesteuerten Materialien auf Hi-Flow-Nitrocellulose-Streifen (HF135 von Millipore) de-

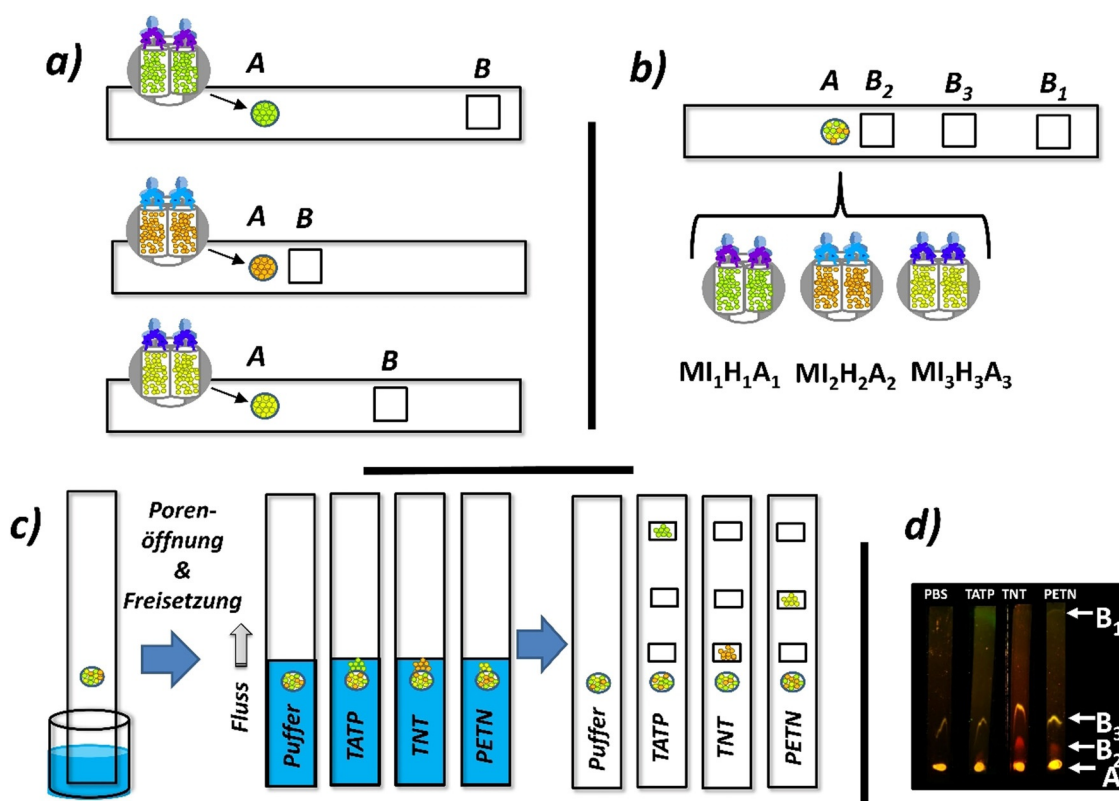


Abbildung 4. Design und Funktionsweise des einkanaligen Lateral-Flow-Assays. a) Aufbau der Teststreifen mit jeweils $MI_1H_1A_1$, $MI_2H_2A_2$ und $MI_3H_3A_3$ in den individuellen Zonen A. b) Aufbau der Teststreifen mit einer Mischung aus $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ in Zone A; die Bezeichnung der unterschiedlichen Zonen B_i entspricht dabei dem chromatographischen Fließverhalten der Farbstoffe. c) Funktionsprinzip der Farbstofffreisetzung in Gegenwart der Explosivstoffe TATP, PETN und TNT. d) Foto einer Reihe an Teststreifen bei Beleuchtung mit einer selbstgebauten Lichtquelle, das die Freisetzung von F27 (I₁), RB3 (I₂) und SRB (I₃) in den unterschiedlichen Zonen B_i auf den Streifen bei einer Analyt-Konzentration von 300 ppb sowie eine entsprechende Kontrollprobe (nur PBS) zeigt.

poniert wurde. Dieses Papier wurde ausgewählt, weil es die besten Retentionseigenschaften für eine optimale chromatographische Trennung der drei Farbstoffe F27, RB3 und SRB aufwies, so dass diese sich in hinreichend unterschiedlichen Zonen B_i sammeln (s. Hintergrundinformationen, Abschnitt 10 inkl. Abbildung S11). Zur Vorbereitung wurden Papierstreifen von 0,5 × 4 cm ausgeschnitten und 1 µL einer Suspension einer Mischung von $MI_1H_1A_1$ - $MI_3H_3A_3$ (alle zu 1 mgmL⁻¹) in PBS (pH 7.4) mit 0,05 % (v/v) Tween 20 im Bereich der Zone A aufgetragen (Abbildung 4b).

Anschließend wurden die Teststreifen in gepufferte Lösungen (PBS-Tween 20 mit 2,5 % MeOH; pH 7.4) getaucht, die 0,6 ppm an TATP, TNT und PETN enthielten, um das selektive Ansprechverhalten zu untersuchen (Abbildung 4c); eine Kontrollprobe wurde ebenfalls untersucht. Nach dem Eintauchen und einer Entwicklungsdauer von 4 min wurden die Teststreifen bei Raumtemperatur getrocknet und die Freisetzung der verschiedenen Farbstoffe mit einer Smartphone-Kamera gemessen. Dazu wurde der Teststreifen in einen 3D-gedruckten Halter eingelegt, der in Analogie zu einem kürzlich von uns publizierten Smartphone-Adapter angefertigt wurde (s. Abschnitt 11.1, Hintergrundinformationen).^[21] Als nächstes wurden Bilder der Teststreifen unter den entsprechenden Beleuchtungsbedingungen gemacht. Die Fluoreszenzintensität der Fotografien der Streifen wurde

analysiert, wobei die integrale Farbdichte der Fluoreszenz in den unterschiedlichen Zonen B_i mit der Software ImageJ ausgewertet wurde. Während Abbildung S12 diese Ergebnisse für steigende TATP-, TNT- und PETN-Konzentrationen und den Smartphone-Aufbau zusammenfasst, sind die entsprechenden, mit dem Fluoreszenzlesegerät erhaltenen Daten in Abbildung S13 zum Vergleich gezeigt (s. Hintergrundinformationen, Abschnitt 11). Wenn keine Explosivstoffe in der Lösung vorhanden sind, wird lediglich ein vernachlässigbares Fluoreszenzsignal in den verschiedenen Zonen B_i gemessen. Sind jedoch die Explosivstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen anwesend, wird eine entsprechende Freisetzung von F27, RB3 oder SRB als Funktion der Analyt-Konzentration in den Zonen B₁-B₃ beobachtet (Abbildung S12). In Bezug auf die Empfindlichkeit wurden vergleichbare Sensitivitäten wie bei den Messungen in Suspension gefunden, d.h., die Nachweisgrenzen lagen auch hier im unteren ppb-Bereich (Tabelle 1). Abbildung 4d zeigt zudem ein Bild der unter geeigneten Beleuchtungsbedingungen aufgenommenen Zonen B₁-B₃ nach Durchführung des Assays mit Probelösungen von 0,3 ppm an TATP, TNT oder PETN bzw. einer Kontrollprobe.

Die konzentrationsabhängigen Messungen sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Studien weisen darauf hin,^[13c,22] dass der dynamische Messbereich solcher Assays

Tabelle 1: Nachweisgrenzen (NWG), 5%-Schwellwerte ($X_{0.05}$) und Dynamikbereiche für TATP, TNT und PETN; die Werte basieren auf der Auswertung der mit dem Fluoreszenzlesegerät erhaltenen Fluoreszenzintensitäten sowie der mit dem Smartphone-Aufbau gemachten Bilder.

Geräte	TATP			TNT			PETN		
	NWG /ppb	$X_{0.05}$ /ppb	Bereich /ppb	NWG /ppb	$X_{0.05}$ /ppb	Bereich /ppb	NWG /ppb	$X_{0.05}$ /ppb	Bereich /ppb
Fluoreszenzlesegerät	2.6 ± 0.2	2.9 ± 0.2	10–100	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.5–50	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1–2
Smartphone (1-kanaliger Streifen)	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	5–300	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	2–40	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	5–90
Smartphone (mehrkanaliger Streifen)	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.3	5–40	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	1–15	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	1–30

nicht sehr groß ist, in der Regel zwischen einer und zwei Größenordnungen (s. z. B. die bei den Messungen mit dem Smartphone-Aufbau erhaltenen Daten in Tabelle 1). Dies impliziert, dass solche Assays vor allem qualitative und semi-quantitative Ergebnisse liefern. Da Schnelltest aber für den direkten Einsatz vor Ort bzw. im Verdachtsfall entwickelt werden, kann die Konzentration einer Zielverbindung sehr stark variieren, so dass meistens eine einfache „ja/nein“-Antwort gewünscht und ausreichend ist, um ein weiteres Handeln einleiten zu können, insbesondere wenn es sich bei den Zielsubstanzen um Sprengstoffe handelt. Des Weiteren stehen gerade bei der Explosivstoff-Detektion weniger zulässige (toxikologische) Grenzwerte im Vordergrund, sondern eher Schwellwerte (sogenannte „cut-off values“), d. h. Werte, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Ergebnisses – also des Nichtauffindens eines Sprengstoffs – üblicherweise kleiner als 5 % ist.^[23] Die Schwellwerte für das aktuelle System sind ebenfalls in Tabelle 1 aufgeführt.

Auch für den Lateral-Flow-Assay wurden die Querempfindlichkeiten gegenüber anderen Explosivstoffen erfasst, wofür Proben mit RDX, NG, PA und HMX versetzt und dann mit den Teststreifen, auf die eine Mischung der drei Materialien appliziert wurde, analysiert wurden. In Analogie zu den vorher beschriebenen Experimenten wurden auch hier deutlich schwächere Fluoreszenzsignale in den Zonen B_i gefunden, so dass diese Interferenzen vernachlässigbar sind (Abbildung S13d). Der Nachweis der Explosivstoffe TATP, TNT und PETN gelingt somit auch bei Einsatz eines einzelnen Teststreifen mit einer Mischung aus den drei maßgeschneiderten gAID-Materialien selektiv.

Obwohl diese Ergebnisse sehr vielversprechend sind, hat der Ansatz mit einem einfachen, einkanaligen Teststreifen Limitierungen, vor allem in Bezug auf einen Multiplex-Nachweis von noch mehr Parametern. Daher kombinierten wir unsere Hybridmaterialien mit Teststreifen, die vorher per Wachsdrucktechnik modifiziert wurden. Die Wachsdrucktechnik erlaubt es in relativ einfacher Art und Weise, Papier mit flüssigkeitsdichten, mikrofluidischen Strukturen zu versehen.^[24] So wurden mehrkanalige Streifen hergestellt, die eine an eine Neptun-Gabel erinnernde Struktur aufwiesen, d. h., bei der ein einzelnes Probenreservoir in drei Kanäle auffächert. Diese Features wurden mit einem konventionellen Wachsdrucker auf einem Streifen von 2.5 × 1.5 cm realisiert. Nach dem Druck wurden die Streifen in einem Ofen bei 110 °C für 1 min „gebacken“, um eine vollständige Penetration des Wachses in das Papier zu garantieren. Nur so lassen sich Barrieren implementieren, die das Papier komplett

durchdringen und die Kanäle entsprechend separieren. Die Signalerfassung wurde wiederum mit dem Smartphone-Aufbau und der eingebauten Smartphone-Kamera realisiert, wobei die Unterschiede in der relativen Luminanz in Zone B der bei Anwesenheit und Abwesenheit eines Explosivstoffs geschossenen Bilder ausgewertet werden und Auskunft über die Menge an enthaltenem Analyten geben, s. Abbildungen 5 und S14.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die mit den beiden Auslesemethoden sowie den unterschiedlichen Streifenformaten gefundenen Nachweisgrenzen. Es ist offensichtlich, dass die beiden Ausleseverfahren eine vergleichbare Empfindlichkeit aufweisen. Zudem zeigen auch die beiden unterschiedlichen Streifenformate, ein- bzw. mehrkanalig, eine ähnliche Performance. Ein Vergleich mit Literaturdaten macht deutlich, dass die Leistungsfähigkeit der gAID-Systeme denen vieler ELISAs (enzymgekoppelte Immunadsorptionstests), FIAs (Durchflusszellen-basierte Immunoassays) und Chip-basierter Immunoassay- (IA) Systeme ähnlich ist, wobei die publizierten Ansätze immer nur einen einzelnen Analyten detektieren können und die große Mehrheit der Systeme ausschließlich für den TNT-Nachweis entwickelt worden sind. Verglichen mit einem LFA-basierten IA für TNT (Eintrag 26, Tabelle S2), welcher unseres Wissens nach das einzige publizierte System ist, das unserem in Bezug auf Einfachheit und Portabilität ähnlich ist,^[25] ist der hier vorgestellte gAID-Ansatz deutlich empfindlicher. Unser System ist auch konkurrenzfähig in Bezug auf drei Berichte über den Nachweis von TNT mittels Durchflusszytometrie und Lumineszenz-Partikeln, welche einen Multiplex-Nachweis erlauben würden, der allerdings in den entsprechenden Arbeiten nicht realisiert worden ist (Einträge 27–29, Tabelle S2).^[26]

Obwohl die gleichzeitige Anwendung von drei unterschiedlichen Explosivstoffen vermutlich nicht das häufigste Anwendungsszenario darstellen wird, wäre die simultane Vor-Ort-Bestimmung von verschiedenen Mykotoxinen, Antibiotika, Drogen oder Pestiziden von herausragender Bedeutung auf den Gebieten der Lebensmittelchemie, der Gesundheitsvorsorge oder Umweltüberwachung. Um mehr über das diesbezügliche Potenzial der hier vorgestellten Plattform zu erfahren, wurde als letztes die Performance der mehrkanaligen Teststreifen bei Anwesenheit von Explosivstoff-Mischungen unterschiedlicher Konzentration untersucht. Auch diese Versuche zeigten eine erfreulich geringe Querempfindlichkeit der Materialien (s. Hintergrundinformationen, Abschnitt 11 inkl. Abbildung S15 für weitere Details).

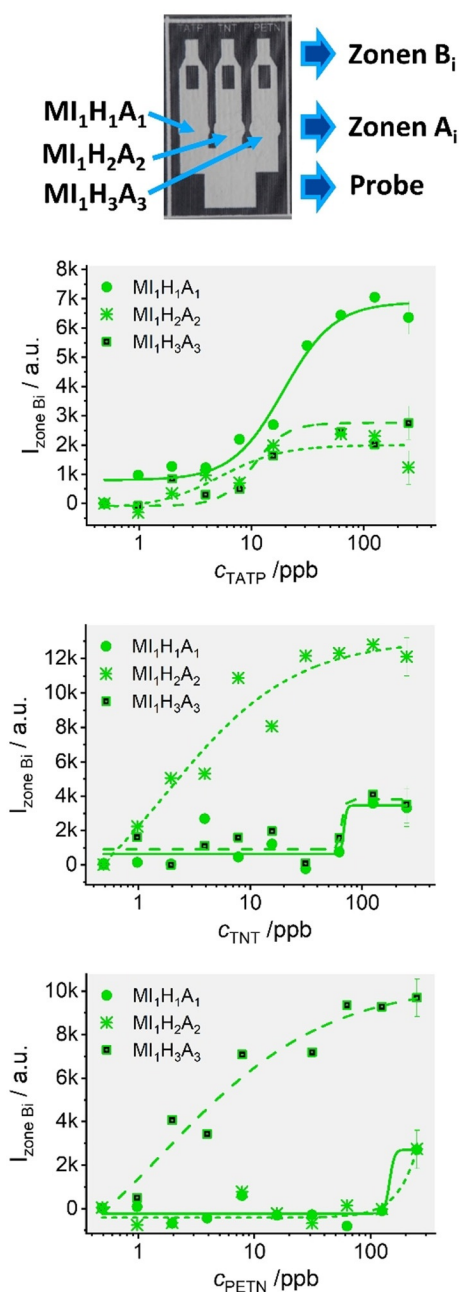


Abbildung 5. Foto einer mit Wachs in einen Nitrocellulose-Streifen gedruckten Struktur, das die Probenaufgabezone, die die Materialien $MI_1H_1A_1$, $MI_1H_2A_2$ und $MI_1H_3A_3$ enthaltenden Zonen A_i und die Zonen B_i zum Sammeln des freigesetzten Farbstoffs in jedem Kanal am Ende des Assays zeigt (oben). Integrale Fluoreszenzfarbendichte von freigesetztem F27, welches in den Zonen B_i der einzelnen Kanäle des Streifens gesammelt wurde, als Funktion der Konzentrationen der drei unterschiedlichen Analyten; die Fluoreszenz eines Kontrollstreifens, der nur in PBS getaucht wurde, diente als Hintergrundsignal und wurde entsprechend subtrahiert. Die Linien beschreiben eine logistische Anpassung mit vier Parametern.

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend haben wir hier ein universelles Nachweissystem vorgestellt, welches auf Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen beruht und den Triplex-Nachweis der

Explosivstoffe TATP, TNT und PETN erlaubt. Die hier entwickelten Materialien erlauben die Bestimmung der Explosivstoffe mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität in nur wenigen Minuten, wobei sie eine bessere Performance als viele andere elektrochemische^[27] oder optische^[28] Sensorplattformen aus der Literatur zeigen. Der Detektionsmechanismus beruht auf einer Verdrängung von Antikörpern von der Oberfläche eines mesoporösen Hybridmaterials aufgrund der hohen Affinität der Explosivstoffe zu den jeweiligen Antikörpern, was zu einer Freisetzung einer großen Anzahl an eingeschlossenen Farbstoffmolekülen aus den Poren führt und somit eine starke Signalverstärkung mit sich bringt. Durch seine ausgesprochene Modularität ist das Konzept leicht verallgemeinerbar und für viele andere kleine organische Moleküle als Analyten anwendbar. Einbettung der Materialien auf Nitrocellulose-Streifen erlaubte es uns, einen einfachen Streifentest für den Multiplex-Nachweis zu entwickeln, der hochselektiv ist und Nachweisgrenzen bis in den unteren ppb-Bereich erreichen lässt. Wird ein Smartphone anstelle eines Fluoreszenzlesegerätes eingesetzt, werden vergleichbare Selektivitäten und Empfindlichkeiten erreicht, wobei dieses System dann eine wesentlich höhere Flexibilität im Hinblick auf die Architektur der Streifen zulässt. Aufgrund der Vielseitigkeit des biomimetischen Materials und der Modularität der Assay-Architektur ist es naheliegend, dass sich der generische Ansatz recht einfach auf Anwendungsfelder in der Lebensmittel- oder Umwelanalytik, der Point-of-care-Diagnostik und andere Gebiete, in denen das schnelle Screenen von mehreren Parametern in flüssigen Proben ohne Probenvorbereitung in einer dezidierten Laborumgebung wichtig ist, übertragen lässt. Erste Untersuchungen zum Einsatz der hier vorgestellten Materialien in Milch haben gezeigt, dass solche Tests in der Tat ein breites Anwendungsfeld haben und auch in komplexen, realistischen Matrices einsetzbar sind.

Danksagung

Wir danken der Alexander-von-Humboldt-Stiftung (Stipendium für E.C.), dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (Projekt DEMONS 06/12), der spanischen Regierung (Projekt RTI2018-100910-B-C41 (MCUI/FEDER, EU)) und der Generalitat Valenciana (Projekt PROMETEO 2018/024) für finanzielle Unterstützung. Wir danken zudem S. Selve (Technische Universität Berlin) für TEM-Aufnahmen, A. Zehl (Humboldt Universität zu Berlin) für die Elementaranalytik, D. Pfeifer und C. Jäger (BAM, Fachbereich Strukturanalytik) für NMR-Unterstützung, A. Zimathies (BAM, Fachbereich Strukturanalytik) für N_2 -Adsorptions/Desorptionsmessungen, Y. Salinas und L. E. Santos für Unterstützung beim Screening der Materialien, A. Walter, S. Ramin und A. Hesse für die Bereitstellung der Seren und R. Gotor und J. Bell für Unterstützung beim Anpassen der selbstgebauten Messumgebung für das Smartphone. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Explosivstoffe · Hybridmaterial · Multiplex-Nachweis · Signalverstärkung · Teststreifenanalytik

- [1] J. B. Tu, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Q. Wang, W. Gao, *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1906713.
- [2] C. A. Hermann, A. Duerkop, A. J. Baeumner, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 569–587.
- [3] L. P. de Oliveira, D. P. Rocha, W. R. de Araujo, R. A. A. Munoz, T. Paixao, M. O. Salles, *Anal. Methods* **2018**, *10*, 5135–5163.
- [4] P. Namour, M. Lepot, N. Jaffrezic-Renault, *Sensors* **2010**, *10*, 7947–7978.
- [5] C. S. Kosack, A.-L. Page, P. R. Klatser, *Bull. W. H. O.* **2017**, *95*, 639–645.
- [6] The ASSURED criteria are: Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable to end-users.
- [7] a) C. Dincer, R. Bruch, E. Costa-Rama, M. T. Fernandez-Abedu, A. Merkoci, A. Manz, G. A. Urban, F. Guder, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1806739; b) M. M. Gong, D. Sinton, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8447–8480.
- [8] A. F. Coskun, S. N. Topkaya, A. K. Yetisen, A. E. Cetin, *Adv. Opt. Mater.* **2019**, *7*, 1801109.
- [9] a) L. M. Fu, Y. N. Wang, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *107*, 196–211; b) C. Carrell, A. Kava, M. Nguyen, R. Menger, Z. Munshi, Z. Call, M. Nussbaum, C. Henry, *Microelectron. Eng.* **2019**, *206*, 45–54.
- [10] R. Kumar, R. P. Sinha, M. Singh, S. Rajendran, A. Kumar, *J. AOAC Int.* **2016**, *99*, 512–519.
- [11] a) M. Hecht, E. Climent, M. Biyikal, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, K. Rurack, *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2589–2606; b) E. Aznar, M. Oroval, L. Pascual, J. R. Murguía, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 561–718.
- [12] J. Lei, H. Ju, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2122–2134.
- [13] a) E. Climent, D. Groninger, M. Hecht, M. A. Walter, R. Martínez-Máñez, M. G. Weller, F. Sancenón, P. Amorós, K. Rurack, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4117–4122; b) E. Costa, E. Climent, S. Ast, M. G. Weller, J. Canning, K. Rurack, *Analyst* **2020**, *145*, 3490–3494; c) E. Costa, E. Climent, K. Gawlitza, W. Wan, M. G. Weller, K. Rurack, *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 4950–4961.
- [14] C. Giménez, E. Climent, E. Aznar, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, P. Amorós, K. Rurack, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12629–12633; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12838–12843.
- [15] a) J. B. Ledgard, *A Soldiers Handbook, Volume 1: Explosives Operations*, Department of the Army, USA, **2007**; b) *Reducing the Threat of Improvised Explosive Device Attacks by Restricting Access to Explosive Precursor Chemicals*, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Washington, DC, **2018**.
- [16] a) M. A. Walter, D. Pfeifer, W. Kraus, F. Emmerling, R. J. Schneider, U. Panne, M. G. Weller, *Langmuir* **2010**, *26*, 15418–15423; b) M. A. Walter, U. Panne, M. G. Weller, *Biosensors* **2011**, *1*, 93–106; c) S. Ramin, M. G. Weller, *J. Mol. Recognit.* **2012**, *25*, 89–97; d) A. Hesse, M. Biyikal, K. Rurack, M. G. Weller, *J. Mol. Recognit.* **2016**, *29*, 88–94.
- [17] E. Ceballos-Alcantarilla, D. López-Puertollano, C. Agulló, A. Abad-Fuentes, A. Abad-Somovilla, J. V. Mercader, *Analyst* **2018**, *143*, 5718–5727.
- [18] U. Piran, D. Silbert-Shostek, E. H. Barlow, *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 879–883.
- [19] a) H. Guo, H. Qian, S. Sun, D. Sun, H. Yin, X. Cai, Z. Liu, J. Wu, T. Jiang, X. Liu, *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 1; b) Z. Li, J. N. Likoko, A. A. Hwang, D. P. Ferris, S. Yang, G. Derrien, C. Charnay, J.-O. Durand, J. I. Zink, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 19496–19506; c) Y. Zhu, D. Jian, S. Wang, *Micro Nano Lett.* **2011**, *6*, 802–805.
- [20] Y. Xiang, J. Donley, E. Seletskaia, S. Shingare, J. Kamerud, B. Gorovits, *AAPS J.* **2018**, *20*, 45.
- [21] R. Gotor, C. Tiebe, J. Schlichka, J. Bell, K. Rurack, *Energy Fuels* **2017**, *31*, 11594–11600.
- [22] a) D. P. Tang, B. Q. Liu, R. Niessner, P. W. Li, D. Knopp, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10589–10596; b) D. P. Tang, Y. X. Lin, Q. Zhou, Y. P. Lin, P. W. Li, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11451–11458; c) Z. Q. Gao, D. P. Tang, M. D. Xu, G. N. Chen, H. H. Yang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6256–6258; d) E. Climent, R. Martínez-Máñez, A. Maquieira, F. Sancenón, M. D. Marcos, E. M. Brun, J. Soto, P. Amorós, *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 251–259.
- [23] E. Trullols, I. Ruisánchez, F. X. Rius, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 137–145.
- [24] S. Altundemir, A. K. Uguz, K. Ulgen, *Biomicrofluidics* **2017**, *11*, 041501.
- [25] S. Girotti, S. A. Eremin, A. Montoya, M. J. Moreno, P. Caputo, M. D'Elia, L. Ripani, F. S. Romolo, E. Maiolini, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 687–695.
- [26] a) G. P. Anderson, S. C. Moreira, P. T. Charles, I. L. Medintz, E. R. Goldman, M. Zeinali, C. R. Taitt, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2279–2285; b) G. P. Anderson, J. D. Lamar, P. T. Charles, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 2888–2893; c) G. P. Anderson, E. R. Goldman, *J. Immunol. Methods* **2008**, *339*, 47–54.
- [27] J. R. Sempionatto, R. K. Mishra, A. Martín, G. Tang, T. Nakagawa, X. Lu, A. S. Campbell, K. M. Lyu, J. Wang, *ACS Sens.* **2017**, *2*, 1531–1538.
- [28] C. L. Jiang, B. H. Liu, M. Y. Han, Z. P. Zhang, *Small Methods* **2018**, *2*, 1700379.

Manuskript erhalten: 29. Juni 2020

Veränderte Fassung erhalten: 25. August 2020

Akzeptierte Fassung online: 7. September 2020

Endgültige Fassung online: 1. Oktober 2020