

Lateralflusstest 2.0

Maximale Sensitivität mittels verstärkter Raman-Streuung

Mujo Adanalic¹, Asen Dankov¹, Roland Grzeschik¹, Sebastian Schlücker^{1,2,3}

Lateralflusstests (LFA, lateral flow assay) werden in der Vor-Ort-Testung (POCT, Point-of-care testing) in Bereichen wie z.B. der klinischen Chemie, der Umweltanalytik sowie dem Drogennachweis eingesetzt. Sie sind robust und schnell durchführbar, jedoch nicht besonders empfindlich; eine Steigerung der Nachweisgrenze um gleich mehrere Größenordnungen ist mit Hilfe der verstärkten Raman-Streuung erreichbar (LFA 2.0).



© winya - stock.adobe.com



Eine empfindlichere Vor-Ort-Testung (LFA 2.0) ist wünschenswert, denn erst ein Nachweis in niedrigeren Konzentrationen ermöglicht eine Früherkennung, beispielsweise von Biomarken in der Krebsvorsorge.

Vor- und Nachteile von Lateralflusstests

Lateralflusstests (LFA, lateral flow assay) sind immunologische Schnelltests, die auf der Erkennung eines Analyten (Antigen) durch einen spezifisch bindenden Antikörper basieren. Zwei prominente Beispiele sind der Schwangerschaftstest und der Corona-Schnelltest. Ein LFA ist in der Anwendung für den Verbraucher einfach, schnell und überall einsetzbar sowie zudem noch kostengünstig. Neben diesen wichtigen Vorteilen gibt es aber auch einen gravierenden Nachteil: seine beschränkte Empfindlichkeit.

Aufbau und Funktionsweise eines LFA

Der Teststreifen eines LFA ist in vier Bereiche unterteilt: Probenkissen, Konjugatkissen, Membran mit Test- und Kontroll-Linie (Abb. 2) sowie Absorptionskissen. Die zu untersuchende Probe kommt auf das Probenkissen und fließt dann durch Kapillarkräfte zum Konjugatkissen. Dort befinden sich die für den Nachweis erforderlichen Konjugate aus dem Detektions-Antikörper und den rötlichen Goldnanopartikeln. Der nachzuweisende Analyt wird über den Detektions-Antikörper selektiv erkannt und dadurch an die Konjugate gebunden. Anschließend gelangen die Goldnanopartikel mit dem gebunde-

nen Analyten zur Nitrocellulose-Membran. Hier sind auf der Kontroll-Linie (CL) solche Antikörper immobilisiert, die den Analyten nicht erkennen und daher nicht „herausfischen“ können, wohl aber die Goldkonjugate; in jedem Fall werden also die Goldkonjugate auf der CL gebunden – egal, ob ein Analyt vorhanden ist (positiver Test) oder nicht (negativer Test) – und ihre rote Farbe bestätigt die Funktionalität des Tests.

Auf der Test-Linie (TL) hingegen befinden sich spezifische Fänger-Antikörper für den Analyten. Wenn der Analyt in der Probe vorhanden ist, dann wird er zusammen mit den an ihn gebundenen Goldkonjugaten „herausgefischt“ und auf der TL festgehalten; der so entstandene Immunkomplex wird auch als „Sandwich-Komplex“ bezeichnet: der Analyt ist quasi der Aufschnitt/Belag zwischen den beiden Brothälften (oben: Detektions-Antikörper, unten: Fänger-Antikörper). Bei einem positiven Test kann man den entstandenen Immunkomplex aufgrund der roten Farbe seiner Goldpartikel auf der TL erkennen. Allerdings ist die Nachweisempfindlichkeit solcher Tests mit dem bloßen Auge limitiert: als groben Richtwert kann man eine Nachweisgrenze von ca. 1-10 ng/mL annehmen. Der Nachweis von Stoffen im Bereich von pg/mL oder gar fg/mL ist mit diesem konventionellen Ansatz (LFA 1.0) nicht möglich. Solche Proben müssen derzeit noch zur Labordiagnostik

geschickt werden, was Zeit und Kosten verursacht. Daher ist eine empfindlichere Vor-Ort-Testung (LFA 2.0) wünschenswert, denn erst ein Nachweis in niedrigeren Konzentrationen ermöglicht eine Früherkennung, beispielsweise von Biomarken in der Krebsvorsorge.

LFA 2.0 – maximale Sensitivität mit Raman/SERS

Der zentrale Nachteil des konventionellen LFA ist seine begrenzte Empfindlichkeit. Mit Hilfe verstärkter Raman-Streuung kann die LFA-Nachweisgrenze um sieben Größenordnungen, d.h. um den Faktor 10.000.000, verbessert werden (Abb. 2). Der einzige Unterschied zum konventionellen LFA ist, dass hierbei die Goldnanopartikel zusätzlich noch sog. Raman-Reporter-moleküle auf ihrer Oberfläche haben; ansonsten werden dieselben Komponenten verwendet.

Woher kommt diese enorme Sensitivitätssteigerung um den Faktor 10 Millionen? Der Raman-Effekt beschreibt die unelastische Streuung von Licht an Materie. Allerdings wird nur ein sehr kleiner Bruchteil der einfallenden Photonen unelastisch gestreut, so dass die frequenz-verschobenen Raman-Signale ziemlich schwach sind. Um vergleichbare Intensitäten wie bei der Fluoreszenz zu erhalten (Einzelmoleküldetektion!) kann man

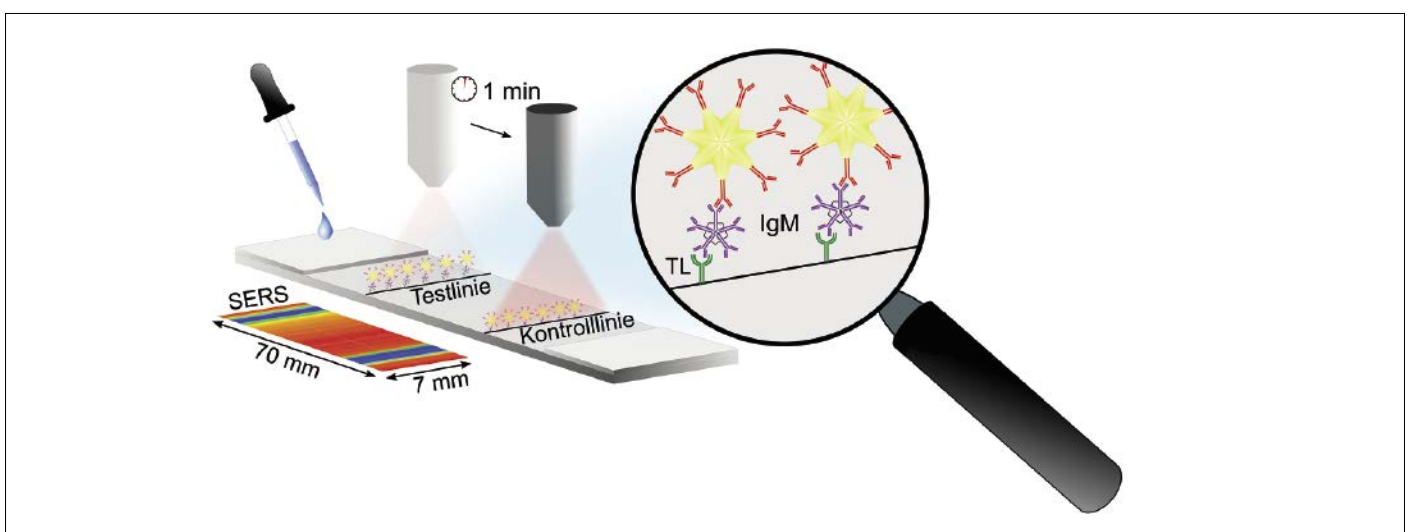


Abb. 1: Schematische Darstellung der Raman/SERS-basierten LFA-Plattform für den hochempfindlichen, quantitativen und selektiven Nachweis von Analyten (hier: Sars-CoV2-spezifischer IgM-Antikörper).

eine hochempfindliche Variante der Raman-Streuung nutzen: die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS, surface-enhanced Raman scattering). Hierbei fungieren Goldnanopartikel als Nano-Antenne: sie verstärken das Raman-Signal der Moleküle auf ihrer Oberfläche und machen es dadurch leicht detektierbar. Wegen ihrer besonders hohen Raman-Signalverstärkung wurden Goldnanosterne (LFA 2.0) anstelle von quasi-sphärischen Goldnanopartikeln (LFA 1.0) verwendet. Dadurch erreicht man eine extrem hohe Empfindlichkeit bis hin zur Einzelpartikeldektion. Wegen der Proportionalität zwischen Partikelanzahl und ihrem Raman/SERS-Signal ist zudem auch eine Quantifizierung möglich.

Portables und schnelles Raman/SERS-Auslesegerät

Die ersten Raman/SERS-basierten LFA wurden mit sehr teuren und daher nur in Forschungslaboren vorhandenen konfokalen Raman-Mikroskopen durchgeführt. Mit einem Mikroskopobjektiv wird dabei sowohl der Laserstrahl auf den LFA-Teststreifen fokussiert als auch das gestreute Licht gesammelt, bevor das Raman-Streulicht über ein Gitterspektrometer spektral zerlegt und mit einer CCD detektiert wird. Das Erfassen der mm-großen Test-Linie mit dem nur μm -großen Laserfokus dauert viele Stunden, da die Test-Linie punktweise abgerastert werden muss. Die sehr hohen Geräte-Kosten als auch die extrem langen Messzeiten stellten bis dato das zentrale Hindernis für den Einsatz dieser Raman/SERS-Technologie in der POCT dar [2,3].

Genau hier setzte die vorliegende Arbeit an: es wurde ein Prototyp entwickelt (Abb. 3), der nur einen Bruchteil eines teuren Raman-Mikroskops kostet und der vor allem in nur wenigen Sekunden die Tests auslesen kann, indem der Laserfokus die ganze Breite des LFA-Streifens auf einmal erfasst; dies wurde durch den Einsatz einer speziellen Faser-Sonde mit einer Zylinderlinse erreicht. Die Test-Linie muss dann nur noch senkrecht dazu, entlang der Flussrichtung, abgerastert und mit einem Spektrometer/CCD-System erfasst werden. Natürlich lassen sich auch die Stellen zwischen TL und CL schnell und automatisiert vermessen: dadurch kann man gezielt das spezifische Signal der Goldkonjugate ermitteln; dies ist sowohl für eine möglichst niedrige Nachweisgrenze als auch eine verlässliche Quantifizierung wichtig. Das Raman/SERS-Auslesegerät verfügt zudem über eine komfortable Benutzeroberfläche und liefert unmittelbar nach der Messung die ausgewerteten Daten. Die Entwicklung des kompakten und schnellen Lesegerätes (Reader) in Kombination mit einer quantitativen und hochempfindlichen Detektion wurde vor Kurzem in der Fachzeitschrift *Angewandte Chemie* publiziert [4].

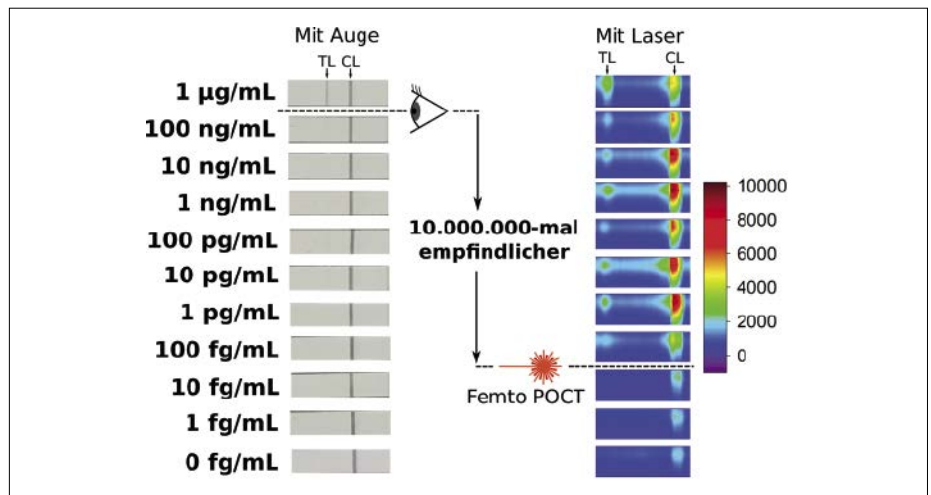


Abb. 2: Vergleich der Nachweisgrenze beim LFA 1.0 (links) und LFA 2.0 (rechts). Mit dem Auge (links) kann man den Analyten nur bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{g/mL}$ auf der Testlinie (TL) erkennen. Mit dem Laser-basierten Raman/SERS LFA (rechts) ist man hingegen 10-millionenfach empfindlicher und kommt in den Femto-POCT-Bereich (fg/mL). Modifiziert nach [1].

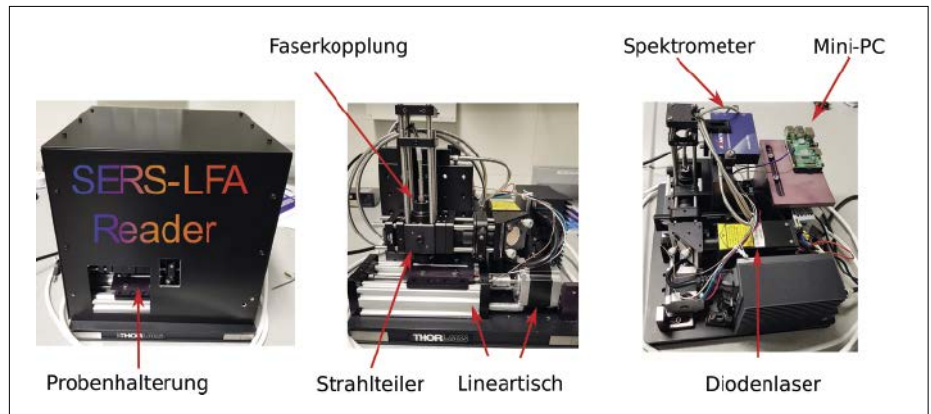


Abb. 3: Aufbau des kompakten und schnellen LFA-Raman/SERS-Auslesegerätes. (Links) Gehäuse mit Probenhalterung gezeigt. (Mitte und rechts) Innenleben mit den einzelnen Komponenten.

Fazit

Die Raman/SERS-Technologie eröffnet neue Möglichkeiten in der POCT: es konnte experimentell eine Steigerung der Nachweisgrenze um den Faktor 10.000.000 demonstriert und damit das Femto-POCT-Regime (fg/mL) erreicht werden. Damit könnte dieser innovative POCT-Ansatz der konventionellen Labordiagnostik, der bislang die Domäne des hochempfindlichen und quantitativen Nachweises vorbehalten war, aufgrund seiner Schnelligkeit zu einer ernstzunehmenden Konkurrenz werden.

Zugehörigkeiten

¹Fakultät für Chemie, Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland

²Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CENIDE), Universität Duisburg-Essen, Duisburg, Deutschland

³Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB), Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland

KONTAKT |

Prof. Dr. Sebastian Schlücker
Fakultät für Chemie
Universität Duisburg-Essen
Essen, Deutschland
sebastian.schluecker@uni-due.de



Weitere Beiträge zum Thema:
<https://bit.ly/WAS-Raman>



Literatur:
<https://bit.ly/GIT-Adanalic>