



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 16 051 T2 2007.06.28**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 364 070 B1**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 16 051.0**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/03606**  
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 726 568.5**  
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/066683**  
(86) PCT-Anmeldetag: **06.02.2002**  
(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **29.08.2002**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.11.2003**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **15.11.2006**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.06.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/50 (2006.01)**  
**G01N 33/53 (2006.01)**  
**G01N 33/543 (2006.01)**  
**C12Q 1/02 (2006.01)**  
**C12Q 1/24 (2006.01)**  
**C12M 1/34 (2006.01)**  
**C12M 1/28 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:  
**266977 P 07.02.2001 US**

(73) Patentinhaber:  
**Massachusetts Institute of Technology,  
Cambridge, Mass., US**

(74) Vertreter:  
**Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman  
Vossius, Dr. Georg Schnappauf, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:  
**HARPER, Douglas, James, Boston, MA 02120, US;  
MATHEWS, Hart, Richard, Chelmsford, MA  
01824-4749, US; JOHNSON, Bernadette, Hollis, NH  
03049, US; PETROVICK, Susan, Martha, Barre, MA  
01005-0341, US; RUNDELL, Ann, West Lafayette,  
IN 47906, US; NARGI, Ellen, Frances, Concord, MA  
01742, US; STEPHENS, Timothy, Lexington, MA  
02420, US; MENDENHALL, Marie, Linda, Acton,  
MA 01720, US; HOLLIS, Alexander, Mark, Concord,  
MA 01742, US; YOUNG, M., Albert, Fishkill, NY  
12524, US; RIDER, Harrison, Todd, Littleton, MA  
01460, US; SCHWOEBEL, David, Eric, Belmont,  
MA 02478, US; VIAN, Rae, Trina, Groton, MA  
01450, US**

(54) Bezeichnung: **OPTOELEKTRONISCHES NACHWEISSYSTEM**

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 eingelegt, 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**

Angabe zu bundesstaatlich geförderter Forschung

**[0001]** Diese Erfindung wurde mit Regierungsmitteln aus US-Airforce-Vertrag Nr. F19628-00-C-0002 gemacht. Die Regierung hat gewisse Rechte an der Erfindung.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Der Bedarf an kleinen, schnellen und empfindlichen Detektoren für biologische Wirkstoffe, die dazu in der Lage sind, eine Umgebung für längere Zeiträume zu überwachen, wird durch die Verbreitung biologischer und chemischer Waffen, die Kernwaffe des armen Mannes, unterstrichen. Unter Kampfbedingungen würde ein nützlicher Detektor einen Soldaten rasch warnen, wenn ein bestimmter biologischer oder chemischer Wirkstoff detektiert wird, so dass Gegenmaßnahmen schnell getroffen werden können.

**[0003]** Solche Detektoren wären auch in nicht-militärischen Anwendungen nützlich. Schnelle Detektion Antibiotika-resistenter Bakterien in einem Patienten würde Krankenhausärzten helfen, ein wirksameres Behandlungsregime auszuwählen. Andauerndes Überwachen der Trinkwasserversorgung einer Stadt würde eine Frühwarnung vor potentiellen Krankheitserregern bereitstellen, was den Beamten für öffentliche Anlagen mehr Zeit gibt, potentielle Gesundheitsschäden für die Öffentlichkeit zu verhindern. Außerdem würde die Verwendung dieser Detektoren bei Fleisch- und Geflügelbeschauen eine signifikante Verbesserung gegenüber dem derzeitigen „Drück-und-Riech“-Verfahren („poke-and-smell“ procedure) darstellen. Im Allgemeinen werden solche Detektoren dringend in analytischen und diagnostischen Anwendungen im Bereich der Medizin (z.B. Veterinärmedizin), der Landwirtschaft, des Umweltschutzes (z.B. um Gebäude-bezogene Krankheit, „sick building syndrome“ zu diagnostizieren) und der Lebensmittelverarbeitung oder -Kontrolle benötigt.

**[0004]** Alle Wirbeltiere erwerben eine spezifische Immunantwort gegen ein fremdes Agens (Antigen) teilweise dadurch, dass sie eine immense Vielfalt an Antikörpermolekülen erzeugen. Antikörpermoleküle binden an ein Antigen mit hoher Spezifität, z.B. können sie unterschiedlich an zwei eng verwandte Stämme von Bakterien, Viren, Protein, Nukleinsäure, Pilz, Einzeller, mehrzelliger Parasit oder Prion sowie Produkte binden, die durch diese Partikel erzeugt oder induziert werden.

**[0005]** Antikörper werden durch B-Zellen, eine entscheidende Komponente des Immunsystems, erzeugt. Ein Antigen kann eine B-Zelle aktivieren, indem es an Antikörper auf ihrer Oberfläche bindet, was zu einer Kaskade intrazellulärer, biochemischer Reaktionen führt, wodurch ein Calciumionen-Einstrom in das Zellplasma der B-Zelle bewirkt wird.

**[0006]** Für einen Übersichtsartikel über Antikörperstruktur und -Funktion und B-Zell-Aktivierung, siehe Paul, Hrsg., Fundamental Immunology, 3. Auflage, Raven Press, New York (1993).

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0007]** Vorrichtungen, die Antikörperdiversität zur Detektion multipler und seltener Targetpartikel oder Antigene ausnutzen, wurden in US-Patent 6,087,114 beschrieben.

**[0008]** Diese Vorrichtungen enthalten im Allgemeinen ein flüssiges Medium, das Sensorzellen (z.B. eine B-Zelle oder Fibroblast) enthält, einen optischen Detektor und das flüssige Medium, das die zu detektierenden Targetpartikel aufnimmt. Jede der Zellen weist Rezeptoren (z.B. chimäre oder einkettige Antikörper) auf, die auf ihrer Oberfläche exprimiert werden und spezifisch für das zu detektierende Antigen sind. Die Bindung des Antigens an den Rezeptor wirkt sich auf einen Signalübertragungsweg aus, der chemische oder biochemische Änderungen bedingt (z.B. einen Anstieg der Calciumkonzentration). Die Zellen können auch Emittermoleküle (z.B. Aequorin oder Indo-1) in ihrem Zellplasma enthalten, die in Reaktion auf den Signalübertragungsweg (z.B. erhöhte Calciumkonzentration im Zellplasma) Photonen emittieren. Der Detektor kann von dem Medium, das die Zellen enthält, durch eine Abdeckung (z.B. Glas) getrennt werden, die gegenüber den Photonen transparent ist. Solch eine Abdeckung kann dazu dienen, das Medium zu tragen, eine zerbrechliche Detektoroberfläche zu schützen, oder sie kann als eine Linse verwendet werden. Der optische Detektor, z.B. ein ladungsgekoppeltes Bauelement („charged coupled device“; CCD), ist dazu in der Lage Photonen zu detektieren, die von den Zellen in Reaktion auf den rezeptorvermittelten Signalübertragungsweg emittiert wurden, um dem Benutzer anzuzeigen, dass das zu bestimmende Antigen vorhanden ist. Andere optische Detektoren, die in der Vorrichtung verwendet werden können, umfassen Fotomultiplirröhren, Fotodioden, Komplementäre Metallo-

xidhalbleiter-Abbildungseinheiten (CMOS; „complimentary metal oxide semiconductor“), Lawinenfotodioden und bildverstärkte ladungsgekoppelte Bauelemente („image-intensified charged-coupled devices“; ICCD) (siehe z.B. jene, die von Photek Ltd., East Sussex, UK erhältlich sind). In einigen Ausführungsformen ist der optische Detektor dazu in der Lage, einzelne Zellen auseinander zu halten.

**[0009]** Eine Vorrichtung zum Detektieren des Vorhandenseins eines Antigens ist in WO 99/30156 offenbart. Die Vorrichtung umfasst ein Gehäuse mit einer Zelle, die Antikörper aufweist, die auf der Oberfläche der Zelle exprimiert werden und die für das darin zu bestimmende Antigen spezifisch sind, wobei die Bindung des Antigens an die Antikörper zu einer Zunahme der Calciumkonzentration im Zellplasma der Zelle führt, wobei die Zelle ferner ein Emittermolekül aufweist, das in Reaktion auf die erhöhte Calciumkonzentration in dem Zellplasma ein Photon emittiert. Die Vorrichtung umfasst ferner ein für das Antigen permeables Netz, ein flüssiges Medium, in welchem die Zelle eingetaucht ist, zum Aufnehmen des Antigens, und einen optischen Detektor, der zur Aufnahme des von der Zelle emittierten Photons angeordnet ist.

**[0010]** WO 99/58975 offenbart ein tragbares, in sich geschlossenes Sensorsystem zum Bestimmen und Quantifizieren einer Vielzahl von Analyten. Das System umfasst eine Affinitätssäule, eine fluorometrische Küvette für Fluoreszenzmessungen, ein erstes Reservoir, das Flüssigkeit zum Spülen der Affinitätssäule enthält, und ein zweites Reservoir zur Freisetzung des Zielanalyten von der Affinitätssäule.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung beruht zum Teil auf der Entdeckung, dass in Abhängigkeit von der Größe des zu bestimmenden Targetpartikels zu untersuchende Kandidatenpartikel mit Photonen-emittierenden Zellen entweder bevor oder nachdem die Zellen in einer Reaktionskammer (z.B. einem Zentrifugenröhrchen) abgelagert worden sind, gemischt werden sollten. Es wurde gefunden, dass die Reihenfolge der Ablagerung die Nachweiseffizienz dramatisch erhöht oder herabsetzt. Wenn das Targetpartikel ein Bakterium ist und folglich kleiner als eine B-Zelle ist, erhöht das Ablagern und Sedimentieren der Kandidatenpartikel in einem Zentrifugenröhrchen, bevor die B-Zellen in dem Röhrchen abgelagert und sedimentiert wurden, die Detektionseffizienz außerordentlich. Dies ergibt sich zum Teil aus der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel (z.B. Zellen und Bakterien), die unterschiedliche Größen aufweisen. Wenn eine Mischung aus Zellen und Bakterien gemeinsam zentrifugiert würde, würden Zellen schneller sedimentieren, während die meisten Bakterien wenigstens für eine gewisse Zeit in der Flüssigkeit oberhalb des Sediments verblieben. Im Gegensatz dazu erhöht eine Vorzentrifugation bei hoher Geschwindigkeit, die die Kandidatenpartikel sedimentiert und konzentriert, bevor die größeren Emitterzellen bei niedriger Geschwindigkeit in die Kandidatenpartikel getrieben werden, eher den Kontakt zwischen den Zellen und den Partikeln als dass sie ihn erniedrigt. Wenn die Targetpartikel (z.B. Einzeller) größer als B-Zellen sind, dann kann die Reihenfolge umgedreht oder zu einer einzigen Zentrifugation der B-Zellen und der Kandidatenpartikel vereinfacht werden. Da die hierin beschriebenen Detektionssysteme vom Kontakt zwischen einer Emitterzelle und einem Targetpartikel abhängig sind, ist es wichtig, den Kontakt so früh und so effizient wie möglich zu erreichen. Daher ist die Reihenfolge der Lokalisierung in einer Reaktionskammer wichtig für das Verbessern der Detektion.

**[0012]** Außerdem sorgt das Entkoppeln des Einführens der Emitterzellen und des Einführens der Kandidatenpartikel in eine oder mehrere Reaktionskammern für Systemflexibilität und erlaubt die Detektion mehrerer Zielpartikel in mehreren Proben. Zum Beispiel können mehrere Emitterzellen, jede spezifisch für ein unterschiedliches Target, mit einer einzelnen Partikelprobe in Kontakt gebracht werden. Alternativ können identische Emitterzellen mit unterschiedlichen Partikelproben in Kontakt gebracht werden. Ob die Emitterzellen, die für verschiedene Antigene oder Targetpartikel spezifisch sind, in unterschiedlichen Reaktionskammern räumlich getrennt werden, hängt davon ab, ob die Photonenwellenlänge der verschiedenen Emitterzellen unterschiedlich oder gleich ist. Wenn die Wellenlängen gleich sind, dann können die Reaktionen, müssen aber nicht, getrennt werden. Siehe US-Patent 6,087,114 für Überlegungen im Hinblick auf Multiplex-Detektion.

**[0013]** In einem Aspekt ist die Erfindung ein optisch-elektronisches System zum Detektieren eines Targetpartikels gemäß Anspruch 1, wobei das System umfasst:

eine erste Reaktionskammer;

einen Probenkollektor für das Sammeln von Kandidatenpartikeln, die in einem Medium vorhanden sind, wobei der Kollektor ausgestaltet ist, die Kandidatenpartikel in der ersten Reaktionskammer abzulagern;

ein erstes Reservoir, das erste Emitterzellen enthält, wobei jede der ersten Emitterzellen erste Rezeptoren (z.B. Antikörper) aufweist, die auf der Oberfläche jeder der ersten Zellen exprimiert werden und spezifisch für ein erstes zu detektierendes Targetpartikel sind, wobei das Binden des ersten Targetpartikels an die ersten Rezeptoren zu einer Zunahme der Calciumkonzentration in dem Zellplasma von jeder der ersten Emitterzellen führt, wobei jede der ersten Emitterzellen ferner ein erstes Emittermolekül aufweist, das in Reaktion auf die Zunahme der Calciumkonzentration ein erstes Photon emittiert, wobei das erste Reservoir ausgestaltet ist, we-

nigstens einen Teil der ersten Zellen in der ersten Reaktionskammer abzulagern; einen optischen Detektor, der für die Aufnahme des Photons ausgestaltet ist, das von der Zelle emittiert wird; und einen Steuermechanismus, der die Kandidatenpartikel und wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen in sequenzieller Reihenfolge basierend auf der Größe der Kandidatenpartikel ablagert. Das System kann ferner einen Rotor umfassen, der ausgestaltet ist, an die erste Reaktionskammer gekoppelt zu werden und während einer Rotation eine Zentripetal- oder Zentrifugalkraft auf die erste Reaktionskammer auszuüben, die hinreichend ist, um einen wesentlichen Teil der Kandidatenpartikel oder einen wesentlichen Teil der ersten Emitterzellen in einem Abschnitt der ersten Reaktionskammer zu sammeln.

**[0014]** In anderen Aspekten ist die Erfindung jedes hierin genannte System: wobei die erste Reaktionskammer auf einem beweglichen Objektisch montiert ist, wobei in einer ersten Position der Objektisch die erste Reaktionskammer in einer ersten Konfiguration positioniert, die es dem Sammler erlaubt, die Kandidatenpartikel in der ersten Reaktionskammer abzulagern, und wobei in einer zweiten Position der Objektisch die erste Reaktionskammer in einer zweiten Position positioniert, die es dem ersten Reservoir ermöglicht, wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen in der ersten Kammer abzulagern; wobei der optische Detektor ein ladungsgekoppeltes Bauelement, eine Lawinenfotodiode, eine CMOS-Abbildungseinheit, eine Fotomultipliierröhre oder einen anderen Fotodetektor oder Arrays solcher Detektoren umfasst; wobei das Medium ein Gas ist; wobei das Medium eine Flüssigkeit ist; wobei die Emitterzellen B-Zellen sind; wobei die B-Zellen ein künstliches Expressionsplasmid aufweisen, das die ersten Rezeptoren kodiert; worin die ersten Rezeptoren einkettige Antikörper („single chain antibodies“) sind; wobei es sich bei dem ersten Targetpartikel um ein Virus, ein Bakterium, ein Protein, eine Nukleinsäure, einen Pilz, einen Einzeller, einen mehrzelligen Parasiten oder ein Prion sowie Produkte handelt, die durch diese Partikel erzeugt oder induziert werden; wobei die ersten Targetpartikel ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Maul- und Klauenseuche-Virus, Yersinia pestis, Francisella tularensis, venezolanischem Pferde-Enzephalitis-Virus, Brucella spp., Vibrio Cholera und Orthopox-Viren (einschließlich Pocken); wobei ein Teil der ersten Reaktionskammer mit einem Trägerprotein beschichtet ist; wobei das Trägerprotein Rinderserumalbumin ist; wobei ein Teil der ersten Reaktionskammer mit poly-L-Lysin beschichtet ist; wobei die sequenzielle Reihenfolge zuerst aus der Ablagerung wenigstens eines Teils der ersten Zellen und anschließend aus der Ablagerung der Kandidatenpartikel besteht; wobei die sequenzielle Reihenfolge zuerst aus der Ablagerung der Kandidatenpartikel und anschließend aus der Ablagerung wenigstens eines Teils der ersten Zellen besteht.

**[0015]** In anderen Aspekten sind die Systeme die hier genannten: ferner umfassend einen Partikelgrößendetektor, der mit dem Steuermechanismus verbunden ist, wobei der Partikelgrößendetektor angeordnet ist, um die Größe der Kandidatenpartikel zu bestimmen, die in den Kollektor eintreten oder in diesem vorhanden sind, wobei (1) wenn der Partikelgrößendetektor Kandidatenpartikel detektiert, die eine Größe aufweisen, die größer als eine Bezugsgröße ist, dann der Steuermechanismus ausgestaltet ist, zuerst wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen abzulagern und anschließend die Kandidatenpartikel abzulagern und (2) wenn der Partikelgrößendetektor Kandidatenpartikel detektiert, die eine Größe aufweisen, die kleiner als eine Bezugsgröße ist, der Steuermechanismus ausgestaltet ist, zuerst die Kandidatenpartikel abzulagern und anschließend wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen abzulagern; wobei der Steuermechanismus einen beweglichen Objektisch umfasst, auf dem eine erste Reaktionskammer montiert ist, wobei in einer ersten Position der Objektisch die erste Reaktionskammer in einer ersten Konfiguration positioniert, die es dem Sammler erlaubt, die Kandidatenpartikel in der ersten Reaktionskammer abzulagern, und wobei in einer zweiten Position der Objektisch die erste Reaktionskammer in einer zweiten Konfiguration positioniert, die es dem ersten Reservoir ermöglicht, wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen in der ersten Reaktionskammer abzulagern; wobei die erste Reaktionskammer eine klebende Oberfläche umfasst und der Sammler einen Gasstrom gegen die klebende Oberfläche richtet; wobei die erste Reaktionskammer ein Filter umfasst und der Kollektor den Fluss des Mediums durch das Filter erzwingt; wobei das erste Reservoir ferner zweite Zellen enthält, wobei jede der zweiten Zellen zweite Rezeptoren (z.B. Antikörper) aufweist, die auf der Oberfläche jeder der zweiten Zellen exprimiert werden und die spezifisch für ein zweites zu detektierendes Targetpartikel sind, wobei jede der zweiten Zellen ferner ein zweites Emittermolekül aufweist, das in Reaktion auf die Bindungen des zweiten Targetpartikels an die zweiten Rezeptoren ein zweites Photon emittiert, wobei das erste Reservoir ausgestaltet ist, wenigstens einen Teil der zweiten Zellen in der ersten Reaktionskammer abzulagern und wobei das zweite Photon eine andere Wellenlänge als das erste Photon aufweist.

**[0016]** Die Systeme sind auch die hier genannten: ferner umfassend ein zweites Reservoir, das zweite Zellen enthält, wobei jede der zweiten Zellen zweite Rezeptoren (wie Antikörper) aufweist, die auf der Oberfläche jeder zweiten Zelle exprimiert werden und für ein zweites zu detektierendes Targetpartikel spezifisch sind, wobei jede zweite Zelle ferner ein zweites Emittermolekül aufweist, das in Reaktion auf die Bindung des zweiten Targetpartikels an die zweiten Rezeptoren ein zweites Photon emittiert, wobei das erste Reservoir ausgestaltet

ist, wenigstens einen Teil der zweiten Zellen in der ersten Reaktionskammer abzulagern, und wobei das zweite Photon eine andere Wellenlänge als das erste Photon aufweist; ferner umfassend eine zweite Reaktionskammer und ein zweites Reservoir, das zweite Zellen enthält, wobei jede der zweiten Zellen zweite Rezeptoren (z.B. Antikörper) aufweist, die auf der Oberfläche jeder der zweiten Zelle exprimiert werden und die für ein zweites zu bestimmendes Targetpartikel spezifisch sind, wobei jede der zweiten Zellen ferner ein zweites Emittermolekül aufweist, das in Reaktion auf die Bindung des zweiten Targetpartikels an die zweiten Rezeptoren ein zweites Photon emittiert, wobei das zweite Reservoir ausgestaltet ist, wenigstens einen Teil der zweiten Zellen in der zweiten Reaktionskammer abzulagern und wobei die Kandidatenpartikel auch in der zweiten Reaktionskammer abgelagert werden; ferner umfassend eine Luftprobensammlungs-vorrichtung; ferner umfassend einen biologischen Aerosolwarnsensor; und jene, bei denen die Luftprobensammlungs-vorrichtung ein Luftimpaktor ist.

**[0017]** Ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Detektieren eines Targetpartikels in einer flüssigen Probe unter Verwendung von Emitterzellen, umfassend:

- a) Feststellen, dass die Größe des zu bestimmenden Targetpartikels kleiner als die Größe der Emitterzellen ist;
- b) Sammeln von Targetpartikeln, die in der flüssigen Probe vorhanden sind, mittels eines Probenkollektors;
- c) Ablagern der flüssigen Probe aus dem Probenkollektor in einer Reaktionskammer;
- d) Lokalisieren der Targetpartikel innerhalb der Reaktionskammer;
- e) Hinzufügen der Emitterzellen aus einem ersten Reservoir in die Reaktionskammer, um ein Gemisch von Emitterzellen und Targetpartikeln auszubilden, wobei die Zellen einen oder mehrere Rezeptoren umfassen, die für die Wechselwirkung mit einem Targetpartikel und Emittermolekülen geeignet sind, wobei das Binden des einen oder der mehreren Rezeptoren an das Targetpartikel zu einer Zunahme der Calciumkonzentration in dem Zellplasma der Zelle führt und wobei die Emittermoleküle Photonen in Reaktion auf die Zunahme der Calciumkonzentration emittieren;
- f) Lokalisieren der Emitterzellen innerhalb der Reaktionskammer; und
- g) Messen der Photonenemission der Emitterzellen in dem Gemisch.

**[0018]** Ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Detektieren eines Targetpartikels in einer flüssigen Probe unter Verwendung von Emitterzellen, umfassend:

- a) Feststellen, dass die Größe des zu bestimmenden Targetpartikels größer als die Größe der Emitterzellen ist;
- b) Hinzufügen der Emitterzellen aus einem ersten Reservoir in eine erste Reaktionskammer, wobei die Zellen einen oder mehrere Rezeptoren umfassen, die für eine Wechselwirkung mit einem Targetpartikel und Emittermolekülen geeignet sind, wobei das Binden des einen oder der mehreren Rezeptoren an das Targetpartikel zu einer Zunahme der Calciumkonzentration in dem Zellplasma der Zelle führt und wobei die Emittermoleküle Photonen in Reaktion auf die Zunahme der Calciumkonzentration emittieren;
- c) Lokalisieren der Emitterzellen innerhalb der Reaktionskammer mittels Sedimentierung;
- d) Sammeln von Targetpartikeln, die in der flüssigen Probe vorhanden sind, mittels eines Probenkollektors;
- e) Ablagern der flüssigen Probe von dem Probenkollektor in einer ersten Reaktionskammer, um ein Gemisch von Emitterzellen und Targetpartikeln auszubilden;
- f) Lokalisieren der Targetpartikel innerhalb der ersten Reaktionskammer, indem eine Sedimentierung ermöglicht wird; und
- g) Messen der Photonenemission der Emitterzellen in dem Gemisch.

**[0019]** Ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Detektieren eines Targetpartikels in einer Luftprobe, umfassend:

- a) Sammeln von Targetpartikeln, die in der Luftprobe vorhanden sind, mittels eines Probenkollektors;
- b) Ablagern der Luftprobe aus dem Probenkollektor in eine erste Reaktionskammer;
- c) Lokalisieren der Targetpartikel aus der Luftprobe auf einer Oberfläche oder der inneren Oberfläche der ersten Reaktionskammer;
- d) Hinzufügen der Photonen-emittierenden Zellen aus einem ersten Reservoir in die erste Reaktionskammer, wobei die Zellen einen oder mehrere Rezeptoren umfassen, die für eine Wechselwirkung mit einem Targetpartikel und Emittermolekülen geeignet sind, wobei das Binden des einen oder der mehreren Rezeptoren an das Targetpartikel zu einer Zunahme der Calciumkonzentration in dem Zellplasma der Zelle führt und wobei die Emittermoleküle Photonen in Reaktion auf die Zunahme der Calciumkonzentration emittieren, um ein Gemisch auszubilden;
- e) Lokalisieren der Emitterzellen in dem Gemisch durch Flüssigkeitsentfernung;
- f) Messen der Photonenemission der Zellen in dem Gemisch.

**[0020]** In anderen Aspekten sind die Verfahren alle hier genannten: wobei es sich bei der Probe um Luft oder Flüssigkeit handelt; wobei es sich bei den emittierenden Zellen um B-Zellen handelt; wobei die emittierenden Zellen Antikörper gegen die Targetpartikel enthalten; wobei die emittierenden Zellen Expressionsplasmide umfassen, die die Antikörper kodieren; wobei die emittierenden Zellen Nukleinsäuren umfassen, die Aequorin kodieren; wobei die emittierenden Zellen Fibroblasten umfassen, die zur Induktion der Calcium-Mobilisation geeignet sind; wobei das Messen die Verwendung einer Fotomultiplerröhre, einer Fotomultiplierarrayröhre oder eines Arrays aus Fotomultiplerröhren umfasst; wobei das Messen das Verwenden eines ladungsgekoppelten Bauelements, einer Lawinenfotodiode oder eines Arrays aus Lawinenfotodioden, einer CMOS-Abbildungseinheit oder eines bildverstärkten ladungsgekoppelten Bauelements („image-intensified charged-coupled device“; ICCD) umfasst.

**[0021]** In anderen Aspekten sind die Verfahren alle hier genannten: wobei das Aufbringen einer Zentrifugalkraft und das Messen der Photonenemission in einer einzelnen Vorrichtung und mit dem Probengemisch in einem einzelnen Probenbehälter durchgeführt wird; wobei das Aufbringen einer Zentrifugalkraft und das Messen der Photonenemission in 30 Sekunden oder weniger (z.B. 10 Sekunden oder weniger, 5 Sekunden oder weniger) durchgeführt wird, wobei das gesamte Verfahren in 10 Minuten oder weniger (z.B. 5 Minuten oder weniger, 2 Minuten oder weniger, eine Minute oder weniger) durchgeführt wird; wobei eine Probe gleichzeitig auf eine Vielzahl von Targetpartikeln analysiert wird; worin eine Vielzahl an Proben gleichzeitig auf ein Targetpartikel analysiert wird; worin eine Vielzahl an Proben gleichzeitig auf eine Vielzahl an Targetpartikeln analysiert wird; worin 1–20 (z.B. 1–10) Proben gleichzeitig auf 1–100 (z.B. 1–50, 1–25) Targetpartikel analysiert werden; wobei sich das Emittiermolekül im Zellplasma befindet; wobei die Proben gleichzeitig in einer einzelnen Vorrichtung auf Targetpartikel analysiert werden; wobei die Proben gleichzeitig in einer einzelnen Vorrichtung mit 1–10 Kanälen auf Targetpartikel analysiert werden; wobei das Targetpartikel Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV), venezolanisches Pferde-Enzephalitis-Virus (VEE), Yersinia pestis, Francisella tularensis, Brucella spp., die O1- und O139-Stämme von Vibrio Cholera oder Orthopox-Viren ist; und wobei ein hierin beschriebenes System verwendet wird.

**[0022]** Die Systeme sind auch jene hier genannten: ferner umfassend 1–10 Kanäle; wobei eine Probe gleichzeitig auf eine Vielzahl von Targetpartikeln analysiert wird; wobei eine Vielzahl von Proben gleichzeitig auf ein Targetpartikel analysiert wird; wobei eine Vielzahl von Proben gleichzeitig auf eine Vielzahl von Targetpartikeln analysiert wird; das Abmessungen von 30,5 cm × 30,5 cm × 30,5 cm (12 Inch × 12 Inch × 12 Inch) oder weniger (z.B. 15,2 cm × 10,2 cm × 2,5 cm [6 Inch × 4 Inch × 1 Inch] oder weniger) aufweist.

**[0023]** Die Systeme der Erfindung sind nützlich in analytischen und diagnostischen Anwendungen auf den Gebieten der Medizin (z.B. Veterinärmedizin), Landwirtschaft, Umweltschutz (z.B. um Gebäude-bezogene Krankheit zu diagnostizieren) und der Lebensmittelverarbeitung oder -kontrolle.

**[0024]** Andere Merkmale oder Vorteile der vorliegenden Erfindung werden durch die folgende detaillierte Beschreibung und auch durch die Patentansprüche offenkundig werden.

#### Beschreibung der Zeichnungen

**[0025]** [Fig. 1](#) ist ein Schema des optisch-elektronischen, zellbasierten Sensorkonzepts.

**[0026]** [Fig. 2](#) ist ein Schema, das die allgemeine Architektur eines optisch-elektronischen Sensors mit einem Probennehmer (Auslöser) zum vorbereitenden Aufspüren verdächtiger Wirkstoffe zeigt.

**[0027]** [Fig. 3](#) ist ein Schema, das die Erzeugung von Zelllinien zur Verwendung in dem optisch-elektronischen Sensor veranschaulicht.

**[0028]** [Fig. 4](#) ist ein Schema eines integrierten Systems aus biologischem Aerosol-Warnsensor (BAWS) und optisch-elektronischem Sensor.

**[0029]** [Fig. 5](#) veranschaulicht die B-Zell-Reaktion auf Maul- und Klauenseuche-Virus in dem optisch-elektronischen Sensor.

**[0030]** [Fig. 6](#) veranschaulicht ein Trockenimpaktormodul für den optisch-elektronischen Sensor.

**[0031]** [Fig. 7](#) ist ein Schema, das die Wirkung der Lokalisierung und des Mischens veranschaulicht.

- [0032] [Fig. 8](#) veranschaulicht die Wirkung der Lokalisation unter Verwendung von Tularemia-Zellen.
- [0033] [Fig. 9](#) veranschaulicht ein automatisiertes Zellablagemodul für den optisch-elektronischen Sensor.
- [0034] [Fig. 10](#) veranschaulicht eine Dosis-Reaktions-Beziehung für eine Probe Tularemia-Zellen unter Verwendung des optisch-elektronischen Sensors.
- [0035] [Fig. 11](#) veranschaulicht die B-Zellen-Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischer und biologischer Kontamination.
- [0036] [Fig. 12](#) veranschaulicht ein automatisiertes Zentrifugenmodul für den optisch-elektronischen Sensor.
- [0037] [Fig. 13](#) ist ein Schema, das einen Luftimpaktor/optisch-elektronischen Sensor veranschaulicht.
- [0038] [Fig. 14](#) ist ein Schema, das einen optisch-elektronischen Sensor veranschaulicht.
- [0039] [Fig. 15](#) veranschaulicht ein Optik-Fotomultiplier (PMT)-Modul für den optisch-elektronischen Sensor.
- [0040] [Fig. 16](#) ist ein Schema, das einen Luftimpaktor/optisch-elektronischen Sensor veranschaulicht.
- [0041] [Fig. 17](#) ist ein Schema, das eine Mehrkanalzentrifuge in dem optisch-elektronischen Sensor veranschaulicht.
- [0042] [Fig. 18](#) ist ein Schema, das ein Nasszentrifuge/Impaktor-Konzept in dem optisch-elektronischen Sensor veranschaulicht.
- [0043] [Fig. 19](#) ist ein Schema, das ein Nasszentrifuge/Impaktor-Konzept in dem optisch-elektronischen Sensor veranschaulicht.
- [0044] [Fig. 20](#) ist ein Schema einer speziell angefertigten Röhre für den optisch-elektronischen Sensor.
- [0045] [Fig. 21](#) veranschaulicht einen integrierten Trockenimpaktor/optisch-elektronischen Sensor.
- [0046] [Fig. 22](#) veranschaulicht die Wirkung von Zellbehandlungen auf die Reaktion Yersinia pestis-spezifischer B-Zellen.
- [0047] [Fig. 23](#) veranschaulicht einen Impaktor, der ausgestaltet ist, Aerosolproben zu sammeln.

#### Ausführliche Beschreibung

[0048] Die Erfindung bezieht sich auf Detektionssysteme, die auf Zellen beruhen, die auf ihrer Oberfläche Antikörper aufweisen und eine Verbindung enthalten, die auf externe Stimulation durch ein Antigen oder ein Targetpartikel hin ein Photon emittieren. Die zur Verwendung der Erfindung geeigneten Materialien und Verfahren werden unten beschrieben.

#### Zellen

[0049] Die Zelle könnte jede prokaryontische oder eukaryontische Zelle sein, die entweder von Natur aus, durch Genmanipulation oder durch chemischen Zusatz einen geeigneten Rezeptor, einen Signalübertragungsweg und ein Signalausgabeverfahren aufweist. Die Zelle könnte sogar eine künstliche oder nicht lebende Einheit sein, vorausgesetzt, dass sie einen funktionellen Rezeptor, einen Signalübertragungsweg und ein Signalausgabeverfahren aufweist. Bei Bindung des Antigens an die Antikörper mobilisiert die Zelle Calciumionen in das Zellplasma. Ein Beispiel für eine Zelle, die in der Vorrichtung und den Verfahren der Erfindung nützlich ist, ist eine B-Zelle (d.h. eine B-Zelle von einem kalt- oder warmlütigen Wirbeltier mit einem knöchernen Kiefer), die genetisch manipuliert werden kann, einen oder mehrere oberflächengebundene monoklonale Antikörper zu exprimieren. Der monoklonale Antikörper kann z.B. dadurch hergestellt werden, dass ein Tier mit dem zu bestimmenden Antigen immunisiert wird und die B-Zelle aus dem immunisierten Tier gewonnen wird. DNA, die den monoklonalen Antikörper kodiert, kann dann isoliert und in eine immortalisierte Zelllinie transferiert werden, und die Zellen können auf die Produktion eines oberflächengebundenen monoklonalen Antikörpers hin, der spezifisch für das zu bestimmende Antigen ist, durchsucht werden. B-Zellen sind sowohl für qualitative als

auch quantitative Analysen nützlich, insbesondere weil sich das Emissionssignal aus ihnen typischerweise nicht wesentlich verringert, wenn es einer zusätzlichen Targetprobe ausgesetzt wird, und auch weil solch ein Emissionssignal linear ist.

**[0050]** Alternativ kann die Zelle ein Fibroblast sein. Jedoch enthalten Fibroblasten nicht den Signalübertragungsapparat, der notwendig ist, um ein Signal vom cytoplasmatischen Teil eines Oberflächenantikörpers zu den Calciump speichern in der Zelle zu übertragen. Um dieses Problem zu bewältigen, kann ein chimärer Oberflächenantikörper in dem Fibroblasten exprimiert werden. Dieser chimäre Antikörper enthält eine cytoplasmatische Aminosäuresequenz, die von einem Polypeptid (z.B. einem Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor) abgeleitet ist, welches ein Signal von der inneren Oberfläche der Plasmamembran des Fibroblasten zu den intrazellulären Calciump speichern weiterleiten kann. Auf diese Weise wird Calciummobilisation induziert, wenn ein Antigen an den extrazellulären Teil des chimären Antikörpers bindet, um Antikörperaggregation auf der Oberfläche zu verursachen. Eine ähnliche Strategie unter Verwendung chimärer Antikörper kann bei jedem anderen Zelltyp verwendet werden, der nicht eine B-Zelle ist, so dass die Zelle für die Verwendung in den Vorrichtungen und Verfahren der Erfindung geeignet ist.

**[0051]** Zellen, die in den hierin genannten Vorrichtungen und Verfahren nützlich sind, sind diejenigen, die gestaltet sind eine spezifische Substanz zu erkennen, einschließlich jener, die auf ihrer Oberfläche Rezeptoren aufweisen, die spezifisch an jene Substanz binden. Ein bevorzugter Rezeptor ist ein Antikörper oder einkettiger Antikörper, obwohl andere geeignete Rezeptoren einen Mitogenrezeptor (wie einem Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor), einen Makrophagen-Scavenger-Rezeptor, einen T-Zell-Rezeptor, ein Zelladhäsionsmolekül, ein DNA bindendes Protein wie einen Teil eines Sequenz-spezifischen Restriktionsenzym oder eines Transkriptionsfaktors, ein einzelsträngige RNA oder doppelsträngige RNA bindendes Protein, ein Oligonukleotid, das zu einer erkennenden DNA- oder RNA-Sequenz komplementär ist, oder einen anderen Ligand-bindenden Rezeptor (z.B. Fas; Cytokin-, Interleukin- oder Hormonrezeptoren; Neurotransmitterrezeptoren; Geruchsrezeptoren; Chemoattraktantrezeptoren, etc.) umfassen, der spezifisch die zu erkennende Substanz bindet. Der Rezeptor kann an die Zelloberfläche mittels einer Transmembrandomäne, eines Membran-gebundenen Moleküls, das spezifisch an den Rezeptor bindet (so wie Fc-Rezeptoren an Antikörper binden), oder mittels einer kovalenten oder nicht kovalenten Verbindung (z.B. Biotin-Streptavidin, Disulfidbindungen etc.) an ein Membran-gebundenes Molekül befestigt werden. Der Rezeptor kann auch ein chimäres Molekül sein; z.B. kann er eine extrazelluläre Domäne wie einen Antikörper, einen einkettigen Antikörper, ein Lektin oder eine andere Substanz-spezifische Bindedomäne oder ein Peptid und eine intrazelluläre Domäne wie diejenige aus dem Insulinrezeptor, dem Fibroblastenwachstumsfaktor, einem anderen Protein, das eine Second-Messenger-Kaskade auslöst, etc. aufweisen. Anstatt direkt an die zu erkennende Substanz zu binden, kann der Rezeptor spezifisch an ein anderes Molekül oder Objekt binden, das wiederum spezifisch an die zu erkennende Substanz bindet, wie ein sekundärer Antikörper, ein markiertes Bead, ein Antigenkonjugiertes Oligonukleotid etc.

**[0052]** Alternativ braucht nur einer dieser Bindungsschritte spezifisch zu sein. Zum Beispiel können DNA- oder RNA-haltige spezifische Sequenzen aus einer Lösung unter Verwendung von Oligonukleotidsonden, die an ein Antigen (oder direkt an ein Bead oder an eine Matrix) konjugiert sind, herausgezogen werden, und ein zweiter Satz unspezifischer, Antigen-konjugierter Oligonukleotidsonden, die an die Ziel-DNA/RNA angelagert sind, würden verwendet werden, um Zellen zu stimulieren, die für jenes zweite Antigen spezifisch sind. Es könnten auch unspezifische Nukleinsäurebindepoteine (Histone, Protamine, RNA-Bindungsproteine), die auf der Zelloberfläche als Chimären exprimiert sind, oder Antikörper gegen jene Bindungsproteine verwendet werden, um das Vorhandensein von Nukleinsäuren nach einem Sequenzspezifischen Selektionsschritt zu bestimmen.

#### Antikörper

**[0053]** Was auch immer der ursprüngliche Zelltypus ist, die Antigen-bindenden variablen Regionen monoklonaler Antikörper können entweder als DNA-Sequenz aus einer öffentlich zugänglichen Quelle erhalten werden oder mittels RT-PCR aus einer Hybridomazelllinie kloniert werden. RT-PCR wird unter Verwendung von Primersätzen durchgeführt, die dafür vorgesehen sind, sich am 5'-Ende entweder an die Leader- oder Gerüstregionen („framework regions“) der variablen Region und am 3'-Ende an die konstante Region anzulagern.

**[0054]** Die variablen Antikörperregionen werden dann in Expressionsvektoren kloniert, die bereits die konstanten Regionen der leichten und schweren Kette enthalten. Der in Bradbury, Gene 187:9–18, 1997, beschriebene Expressionsvektor für die leichte Kette ist besonders zu diesem Zweck geeignet. VKExpress, beschrieben in Bradbury, enthält den EF-1 $\alpha$ -Promotor, eine Leadersequenz, multiple Klonierungsstellen und die konstante Region des humanen Ig-kappa und ein Polyadenylierungssignal. Der Expressionsvektor für die schwere



Kette leitet sich von Invitrogens pDisplay ab. Dieser Vektor enthält einen CMV-Promotor, eine Leadersequenz, ein HA-Tag, eine multiple Klonierungsstelle und ein myc-Tag, gefolgt von der PDGFR-Transmembrandomäne und dem Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumshormons („bovine growth hormone“).

**[0055]** pDisplay kann zur Expression der schweren Kette wie folgt modifiziert werden. Die PDGFR-Transmembrandomäne des pDisplay wird mit der konstanten Region des murinen IgM ohne das Exon, das Sekretion erlaubt, ersetzt. Dies gewährleistet, dass das Protein Membran-gebunden bleibt. Das Neomycin-Resistenzgen kann durch jedes einer Anzahl an Antibiotika-Resistenzgenen ersetzt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Hygromycin-, Bleomycin-, Puromycin-, Kanamycin- und Blasticidin-Gene. Die variable Region der schweren Kette (oder alternativ der leichten Kette kann in einem Zwei-Schritt-Verfahren unter Verwendung von „overlap-extension“-PCR inseriert werden, um die auf beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle des pDisplay vorhandenen HA- und myc-Tags zu entfernen. Ein Vektor kann auch entwickelt werden, um die Insertion eines „overlap-extension“-Produkts zu ermöglichen, dass die variable Region fusioniert mit ungefähr 300 Basenpaaren der konstanten Region des IgM enthält, so dass das Klonieren in einem einzelnen Schritt durchgeführt werden kann.

**[0056]** Die unten beschriebenen Beispiele wurden unter Verwendung des unmittelbar zuvor beschriebenen Antikörper-Vektor-Konstruktionsverfahrens ausgeführt.

**[0057]** Ein Antikörper, der spezifisch an das zu bestimmende Antigen bindet, ist ein Molekül, das an das Antigen oder an ein Epitop des Antigens bindet, aber das im Wesentlichen nicht andere Antigene oder Epitope in der Probe bindet. Solche Antikörper können chimär (d.h. sie enthalten Aminosäuresequenzen von Nicht-Antikörpern) oder einkettig sein (d.h. die Komplementarität bestimmende Region des Antikörpers wird durch eine fortlaufende Polypeptidsequenz gebildet).

**[0058]** Alternativ können an der Oberfläche Antikörper-produzierende Zellen aus dem Tier erhalten und verwendet werden, um in Standardverfahren wie der ursprünglich von Kohler et al., *Nature* 256:495–497 (1975); Kozbor et al., *Immunol Today* 4:72 (1983); oder Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc., Seiten 77–96 (1985) beschriebenen Hybridomatechnik eine monoklonale Population an Zellen herzustellen, die an der Oberfläche Antikörper produzieren. Die Technik zur Erzeugung von Zellen, die monoklonale Antikörper exprimieren, ist wohl bekannt (siehe z.B. *Current Protocols in Immunology* (1994) Coligan et al. (Hrsg.) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY), wobei Modifikationen notwendig sind, um Oberflächenantikörper anstelle von sezernierten Antikörpern auszuwählen.

**[0059]** Jedes der vielen gut bekannten Protokolle, die zur Fusionierung von Lymphozyten und immortalisierten Zelllinien verwendet werden, kann zum Zweck der Erzeugung einer Zelle, die einen monoklonalen Antikörper an der Oberfläche produziert, eingesetzt werden (siehe z.B. *Current Protocols in Immunology*, supra; Galfre et al., *Nature* 266:55052, 1977; Kenneth, In *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York, 1980; und Lerner, *Yale J Biol Med* 54:387–402 (1981). Außerdem wird sich die durchschnittliche Fachkraft bewusst sein, dass es zahlreiche Variationen solcher Verfahren gibt, die auch nützlich sein würden.

**[0060]** Polyklonale Zellen, die Antikörper exprimieren, können hergestellt werden, indem ein geeignetes Tier mit dem zu bestimmenden Antigen immunisiert wird. Die Zellen, die Antikörpermoleküle, die gegen das Antigen gerichtet sind, herstellen, können aus dem Tier isoliert werden (z.B. aus dem Blut) und weiter durch gut bekannte Verfahren, wie Auswählen („panning“) gegen eine Antigen-beschichtete Petrischale gereinigt werden. Als eine Alternative zum Herstellen monoklonaler Zellen kann eine Nukleinsäure, die einen monoklonalen Antikörper kodiert, identifiziert und durch Durchsuchen einer rekombinanten, kombinatorischen Immunglobulinbibliothek (z.B. eine Antikörper-Phagendisplay-Bibliothek) mit dem Antigen isoliert werden, um dadurch Immunglobulinbibliotheksmitglieder zu isolieren, die das Antigen binden. Kits zum Erzeugen und Durchsuchen von Phagendisplay-Bibliotheken sind kommerziell erhältlich (siehe z.B. Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Katalog Nr. 27-9400-01 und der Stratagene SurfZAP® Phage Display Kit, Katalog Nr. 240612). Zusätzlich können Beispiele für Verfahren und Reagenzien, die besonders geeignet zur Verwendung im Erzeugen und Durchsuchen von Antikörper-Display-Bibliothek sind, z. B. in US-Patentnummer 5,223,409; PCT-Veröffentlichungsnummer WO 92/18619; PCT-Veröffentlichungsnummer WO 91/17271; PCT-Veröffentlichung WO 92/20791; PCT-Veröffentlichungsnummer WO 92/15679; PCT-Veröffentlichung WO 93/01288; PCT-Veröffentlichungsnummer WO 92/01047; PCT-Veröffentlichungsnummer WO 92/09690; PCT-Veröffentlichungsnummer WO 90/02809; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum Antibod Hybridomas* 3:81–85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275–1281 (1989); Griffiths et al., *EMBO J* 12:725–734 (1993) gefunden werden.

**[0061]** Nachdem das gewünschte Mitglied der Bibliothek identifiziert worden ist, kann die spezifische Sequenz in jeden geeigneten Nukleinsäure-Expressor kloniert und in eine Zelle wie einen Fibroblasten transfiziert werden. Der Expressor kann auch Aminosäuren kodieren, die operativ mit der Aminosäuresequenz verknüpft sind, wie es für die Zelle geeignet ist, die den Antikörper exprimieren soll. Wie oben diskutiert, kann die cytoplasmatische Transmembransequenz eines Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptors („fibroblast growth factor receptor“) mit einem einkettigen Antikörper verknüpft werden, der für das zu bestimmende Antigen spezifisch ist, so dass die Zelle Calcium immobilisiert, wenn sie mit dem Antigen in Kontakt gebracht wird. Auch wenn getrennte rekombinante schwere Ketten und leichte Ketten in den Fibroblasten exprimiert werden können, um den chimären Antikörper auszubilden, sind auch einkettige Antikörper geeignet (siehe z.B. Bird et al., Trends Biotechnol 9:132–137, 1991; und Huston et al., Int Rev Immunol 10:195–217, 1993).

#### Photonen-emittierende Moleküle

**[0062]** Die Bindung der gewünschten Substanz an den Zelloberflächenrezeptor sollte einen Signalübertragungsweg innerhalb der Zelle auslösen. Ein bevorzugter Signalübertragungsweg ist die in B-Zellen, T-Zellen, Mastzellen, Makrophagen und anderen Immunzellen gefundene Second-Messenger-Kaskade, wobei Vernetzen der Zelloberflächenrezeptoren eine Tyrosinkinase aktiviert, die dann Phospholipase C phosphoryliert, die dann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin spaltet; IP3 öffnet dann Calciumkanäle, um Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum freizusetzen oder um extrazelluläres Calcium einzulassen, wodurch die Calciumkonzentration im Zellplasma der Zelle steigt. In Abhängigkeit vom Rezeptortyp, Zelltyp und dem gewünschten Signalverfahren könnten alternative Second-Messenger-Kaskaden verwendet werden, wie eine G-Protein-Adenylyl-cyclisches-cAMP-Proteinkinase-A-Kaskade.

**[0063]** Ein Verfahren zum Überwachen der internen Signalübertragung der Zelle in Reaktion auf zu identifizierende Substanzen sollte bereitgestellt werden. Wenn die interne Signalübertragung einen Anstieg des cytoplasmatischen Calciums mit sich bringt, ist ein bevorzugtes Detektionsverfahren ein Calcium-sensitives, lumineszierendes oder fluoreszierendes Molekül wie Aequorin, Obelin, Thalassicolin, Mitrocomin (Halistaurin), Clytin (Phialidin), Mnemopsin, Berovin, Indo-1, Fura-2, Quin-2, Fluo-3, Rhod-2, Calcium Green, BAPTA, Cameleons (A. Miyawaki et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 2135-40) oder ähnliche Moleküle. Es wird erwartet, dass die relativen Intensitäten des Lichts und die Sensorzellenspeichercharakteristika, die durch Verwendung Calcium-sensitiver Moleküle ermöglicht werden, in Abhängigkeit von der Effizienz der Lichtproduktion bei dem spezifischen Emittiermolekül und von der Halbwertszeit des aktivierten Emittiermoleküls variieren können – was in einigen Fällen für signifikante Vorteile sorgt (z.B. verbesserte Sensitivität, quantitative oder qualitative Detektion). Zusätzliche Leistungssteigerungen können sich aus der Verwendung von Strukturanaloga der natürlichen Kofaktoren der Fotoproteinemittiermoleküle ergeben. Verschiedene Calcium-sensitive fluoreszierende Farbstoffe, die von lebenden Zellen aufgenommen werden können, sind aus kommerziellen Quellen beziehbar, einschließlich Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. Proteine wie Aequorin, Obelin, Thalassicolin, Mitrocomin (Halistaurin), Clytin (Phialidin), Mnemopsin, Berovin oder Cameleons könnten genetisch hinzugefügt, in die Zellen injiziert oder über ein Proteinaufnahme-Tag aus HIV-TAT (ungefähr Aminosäuren 47–57; A. Ho et al. (2001) Cancer Research 61, 474–477) oder durch andere Mittel eingebracht werden. Wenn erwünscht, können solche Reporteremoleküle Zielsignale („targeting signals“) enthalten, um sie zur cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums oder der Plasmamembran, ins Innere der Mitochondrien oder an andere Orte zu dirigieren, wo die Änderung der lokalen Calciumkonzentration besonders groß sein könnte. Optische Verfahren zum Bestimmen der Aktivität an anderen Punkten im Signalübertragungsweg könnten auch verwendet werden, wie Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) fluoreszierender Gruppen, die an Komponenten des Signalübertragungswegs befestigt sind (S. R. Adams et al. (1991) Nature 349, 694–697). Wo die interne Signalübertragung einen Anstieg reaktiver Sauerstoff-Spezies mit sich bringt (z.B. Superoxidanionenradikale, Hydroxylradikale, Verbindung I oder II der Meerrettichperoxidase etc.), ist ein bevorzugtes Detektionsverfahren ein auf reaktiven Sauerstoff sensitives, lumineszierendes oder fluoreszierendes Molekül wie das Photoprotein Pholasin (ein 34 kDa-Glycoprotein aus der biolumineszierenden Molluske Pholas dactylus) oder ähnliche Moleküle. Alternativ könnte ein Reporter gen für eine beliebige Luciferase mit einem Promotor verknüpft werden, der durch den Signalübertragungsweg induziert wird. In einigen Zellen wie T-Zellen und Mastzellen löst der Signalübertragungsweg Exocytose von Granula aus, die Proteasen wie Granzyme, Tryptasen oder Chymasen enthalten. Exocytose dieser Proteasen könnte über colorimetrische oder fluorometrische Verfahren bestimmt werden (z.B. p-Nitroanilin oder 7-Amino-4-trifluormethylcumarin (AFC), die mit Peptiden verknüpft sind, die durch die Proteasen gespalten werden [S.E. Lavens et al. (1993) J. Immunol. Methods 166, 93; D. Masson et al. (1986) FEBS Letters 208, 84; R&D Systems]). Auch Mikroelektroden oder andere Verfahren zum Bestimmen elektrischer Aktivität, die mit dem Calciumfluss oder anderen signalgebenden Ionenflüssen in Verbindung steht, sind geeignet, um die Signalübertragungsantwort in der Zelle zu überwachen.

**[0064]** Ein geeignetes Emittermolekül ist jedes Molekül, das in Reaktion auf erhöhte cytosolische Calciumkonzentrationen ein Photon emittieren wird, einschließlich biolumineszierende und fluoreszierende Moleküle. Ein Emittermolekül, das biolumineszierende Aequorin-Protein, wird in Button et al., *Cell Calcium* 14:663–671 (1993); Shimomura et al., *Cell Calcium* 14:373–378 (1993) und Shimomura, *Nature* 227:1356–1357 (1970) beschrieben. Aequorin erzeugt Photonen, in dem es Coelenterazin, ein kleines chemisches Molekül, oxidiert. Coelenterazin diffundiert durch zelluläre Membranen, daher kann Coelenterazin oder ein Analogon davon zu dem Kulturmedium, das die Zellen umgibt, hinzugegeben werden. Alternativ können Gene, die Enzyme kodieren, die Coelenterazin herstellen, in die Zelle eingeführt werden. In einer anderen Ausführungsform kann biolumineszierendes grünes fluoreszierendes Protein (GFP) (siehe Chalfie, *Photochem. Photobiol.* 62:651–656 [1995]) oder gelbes fluoreszierendes Protein (YFP) verwendet werden. In dieser Ausführungsform enthält das Zellplasma der Zelle sowohl GFP als auch Aequorin. In Reaktion auf erhöhten Calciumspiegel in dem Zellplasma gibt Aequorin Energie in einem emissionslosen Energieübertragungsprozess an GFP ab. GFP emittiert dann das Photon. Alternativ kann das Emittermolekül ein Calcium-sensitives fluoreszierendes Molekül (z.B. Indo-1) sein, das mit einer Wellenlänge des Lichts beleuchtet wird, die geeignet ist, um Fluoreszenz zu induzieren.

**[0065]** Aequorin oder jedes andere Emittermolekül kann in die Zelle durch im Stand der Technik wohlbekannte Verfahren eingebracht werden. Wenn das Emittermolekül ein Protein ist (wie es bei Aequorin der Fall ist), kann die Zelle einen Expressionsvektor enthalten, der das Protein kodiert (d.h. eine Nukleinsäure oder ein Virus, der das Emittermolekül produzieren wird, wenn sie/es in eine Zelle eingebracht wird). Ein Expressionsvektor kann extrachromosomal existieren oder in das Zellgenom integriert sein.

#### Reaktionskammern

**[0066]** Die zur Verwendung in der Erfindung geeigneten Reaktionskammern können jeder Träger oder jedes Gefäß sein, zu denen Emitterzellen und Kandidatenpartikel gemischt werden und miteinander in Kontakt gebracht werden können. In einer Ausführungsform ist das Reaktionsgefäß ein Zentrifugenröhrchen (z.B. ein Mikrozentrifugenröhrchen oder ein Eppendorfgefäß). Wie hierin beschrieben, ist Zentrifugation ein besonders gut geeignetes Mittel, um zunächst Kandidatenpartikel oder Emitterzellen zu sedimentieren, bevor das andere in das erste Sediment getrieben wird. Um ferner das Sedimentieren von sowohl Partikeln als auch Zellen zu verstärken, können die Seitenwände des Röhrchens mit einem nicht-klebrigen Trägerprotein wie Rinderserumalbumin beschichtet sein, um das Anhaften der Emitterzellen an den Seitenwänden zu verhindern, und der Boden des Röhrchens kann mit poly-L-Lysin beschichtet sein, um dabei zu helfen sicherzustellen, dass die Targetpartikel am Boden des Röhrchens angehaftet bleiben. Andere Proteine oder Moleküle, die Zelladhäsion entweder verhindern oder befördern, sind auf dem Gebiet der Zellbiologie bekannt und sind zur Verwendung in der Erfindung geeignet.

**[0067]** Zentrifugenröhrchen mit speziell angepassten Geometrien der Probenkammer können eine zusätzliche Ausführungsform bereitstellen, die Zentrifugation verwendet, um B-Zell-Interaktionen mit schwierig zu sedimentierenden Partikeln zu erhöhen, und die Notwendigkeit, die Rotationsreihenfolge anzupassen, verringert. In dieser Ausführungsform wird die zu analysierende partikelhaltige Probe in einem Röhrchen platziert, wo die maximale Breite der Probenkammer ungefähr gleich dem Durchmesser einer Emitterzelle ist. Übersichten einer konzentrierten Emitterzell-Suspension über die Probe gefolgt von Zentrifugieren treibt eine große Anzahl an dicht gepackten Emitterzellen durch die kleineren Partikel, während die beschränkte Geometrie die Wahrscheinlichkeit für Emitterzell-Antikörper-Wechselwirkungen mit Partikeln erhöht. Bindung des Zell-assoziierten Antikörpers an das Partikel fängt das schwach sedimentierende Partikel und wird es rasch mit der Emitterzelle zum Boden des Röhrchens ziehen, wo das resultierende Licht mittels einer Fotomultiplivorrichtung beobachtet werden kann.

**[0068]** In einer anderen Ausführungsform sind die Reaktionskammern Vertiefungen in einer zweidimensionalen Anordnung, z.B. einer Mikrotiterplatte, oder Flecken oder Vertiefungen entlang eines Bandes wie in den Figuren gezeigt. Diese Anordnungen ermöglichen Multiplexdetektion von entweder mehreren Proben und/oder mehreren Targetpartikeln. Zur automatischen Abgabe von Kandidatenpartikeln und/oder Emitterzellen sind entweder die Reaktionskammern oder der Probenkollektor und das Emitterzellreservoir in wenigstens zwei Dimensionen adressierbar. Die Vertiefungen der Anordnungen können auch mit klebrigen und nicht klebrigen Beschichtungen wie oben für Zentrifugenröhrchen beschrieben behandelt sein, um Kontakt zwischen Emitterzellen und Kandidatenpartikeln zu erleichtern.

**[0069]** Verschiedene Vorrichtungen können verwendet werden, um Proben aus z.B. Luft zu sammeln. Im Allgemeinen weist eine Luftprobennahmeverrichtung eine Sammelkammer auf, die Flüssigkeit enthält, durch die oder neben der Luft oder Gas hindurchgeleitet wird, oder die ein poröses Filter enthält, das Feinstaub (z.B. Targetpartikel) fängt, wenn Luft oder Gas das Filter durchströmt. Bei Sammelkammern, die Flüssigkeit enthalten, kann die Sammelflüssigkeit zentrifugiert oder auf andere Weise behandelt werden, um Partikel von der Flüssigkeit zu trennen. Die abgetrennten Partikel werden dann in einer Reaktionskammer abgelagert. Bei Sammelkammern, die ein Filter enthalten (z.B. Nitrocellulose), kann das Filter oder Teile des Filters als Reaktionskammer fungieren. Alternativ können Partikel vom Filter gewaschen werden, oder das Filter kann aufgelöst oder auf eine andere Weise von den Partikeln entfernt werden. Eine Filtersammelkammer kann auch dazu angepasst sein, Partikel aus einer Flüssigkeit (z.B. eine Wasserversorgungsprobe oder Cerebrospinalflüssigkeit) zu sammeln, die durch das Filter fließt. Zusätzlich kann, wie oben diskutiert, eine flüssige Probe zentrifugiert werden, um jedes partikuläre Material zu entfernen, das in der Flüssigkeit vorhanden ist. Eine Vielfalt an Probennehmern ist bekannt und zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung erhältlich. Siehe SKC, Inc., die den SKC BioSampler® und andere Probenahmeverrichtungen verkauft.

**[0070]** Andere Luftprobennehmer können verwendet werden. Zum Beispiel ist eine alternative Vorrichtung die Air-O-Cell-Sampling-Kassette (SKC, Inc.). In dieser Vorrichtung werden die in der Luft befindlichen Partikel beschleunigt und man lässt sie mit einem klebrigen Objektträger kollidieren, der für verschiedene Anfärbeverfahren und mikroskopische Untersuchung unmittelbar geeignet ist.

**[0071]** Aerosolschwebstoffe können unter Verwendung von Trägheitstrennung in einer Vorrichtung gesammelt werden, die als ein Impaktor bekannt ist. Ein Luftfluss, der zu sammelnde Partikel enthält, wird aus der interessierenden Umgebung in den Impaktor gezogen, wo er auf eine Oberfläche zum Aufprall gerichtet wird. Bei geeigneten geometrischen Parametern und Flussraten in dem Impaktor werden Partikel mit ausreichender Trägheit den Fließstromlinien nicht folgen, sondern werden auf der Oberfläche aufprallen. Ein signifikanter Anteil der Partikel, die auf der Oberfläche aufprallen, haftet durch elektrostatische und/oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen und wird dadurch gesammelt und konzentriert. Auf diese Weise können Aerosolpartikel, die Proteine (einschließlich Toxine), Viren, Bakterien (vegetative und Sporenformen), Parasiten, Pollen und andere nachweisbare Substanzen enthalten, zur Detektion gesammelt werden, wobei eine Vielzahl erhältlicher Assaytechniken einschließlich der hierin genannten Vorrichtungen und Verfahren verwendet wird.

**[0072]** Trockene Probensammlung für Bioassays unter Verwendung eines Luftimpaktors stellt allgemeine Vorteile gegenüber herkömmlicher Luft-zu-Flüssigkeit-Probensammlung bereit, indem flüssige Verbrauchsmaterialien und Transferiermechanismen verringert oder beseitigt werden, was Assaykosten reduziert und Automatisierung vereinfacht. Von besonderem Vorteil für die hierin genannten Vorrichtungen und Verfahren ist es, dass die Sammlung unter Verwendung von trockener Impaktierung sicherstellt, dass die gesamte gesammelte Probe vor der Zugabe der Sensorzellen der hierin genannten Vorrichtungen und Verfahren unabhängig von der Größe der individuellen Analytpartikel auf der Oberfläche lokalisiert ist. Dies bewirkt die Lokalisierung aller Analyten unabhängig von ihrem Sedimentationskoeffizienten in Flüssigkeit, wodurch die Sensitivität der hierin genannten Vorrichtungen und Verfahren maximiert wird und viele Ausführungen des Assays durch Ausschalten eines Zeit-verbrauchenden Schritts beschleunigt werden.

**[0073]** Jede Oberfläche, die einen Anteil an Partikeln zurückbehält, der auf sie aufprallt und die mit nachfolgenden Bioassays kompatibel ist, ist als eine Sammeloberfläche geeignet. Geeignete Materialien umfassen biokompatible Metalle, Kunststoffe, Glase, Kristalle, Aerogele, Hydrogele, Papiere etc. Besonders nützliche Konfigurationen dieser Materialien umfassen Mikrozentrifugenröhrchen, Platten mit mehreren Vertiefungen („multi-well plates“), die in Hochdurchsatzdurchsuchungsverfahren („high throughput screening“) verwendet werden, fortlaufende Bänder, Filter, Konjugatfreisetzungsaufgaben („conjugate release pads“) von Lateralflossimmunoassays etc. Die Sammeleffizienz kann durch Modifikationen der Sammeloberfläche erhöht werden, einschließlich: die Hinzufügung von Beschichtungen, die die Adhäsion biologischer Partikel unterstützen (diese Beschichtungen können von chemischer oder biochemischer Natur sein, z.B. Polylysin), erhöhte Oberflächenrauigkeit, um den für die Sammlung zugänglichen Oberflächenflächeninhalt zu erhöhen, und speziell angepasste Oberflächengeometrien, die Ablagerung von Partikeln in definierten Regionen auf der Oberfläche unterstützen. Außerdem können zusätzliche Verbesserungen in der Sammeleffizienz dadurch erzielt werden, dass die elektrostatischen Ladungen auf der Sammeloberfläche und den ankommenden Partikeln derartig beeinflusst werden, dass zusätzliche Anziehungskräfte erzeugt werden.

**[0074]** Zusätzliche Verbesserungen können an dem Trockenimpaktionssammler vorgenommen werden, indem ein Luft-zu-Luft-Konzentrator stromaufwärts zum Kollektor verwendet wird, um die Zahl der Partikel in jeder Einheit der Luftprobe zu erhöhen, die auf die Sammeloberfläche aufprallt. Dies kann die Menge an Zeit signifikant verringern, die benötigt wird, um eine Anzahl an Aerosolpartikeln zu sammeln, die ausreichend ist, um verlässliche Ergebnisse für den Detektor bereitzustellen.

**[0075]** In einem Beispiel dieses Sammelkonzepts wurde der in [Fig. 23](#) beschriebene Impaktor eingerichtet, um Aerosolproben auf dem Boden eines kommerziell erhältlichen Plastikröhrchens zu sammeln. Eine Düse ragt nach unten in das Röhrchen und der Auslass ist am Krümmungsradius der inneren Oberfläche des Röhrchens positioniert. Dieses Positionieren erhöht die Wahrscheinlichkeit für ein Partikelaufreffen am Röhrchenboden, wo die Sensorzellen der Vorrichtung am Wahrscheinlichsten mit ihnen in Kontakt kommen. Sobald das Sammeln abgeschlossen ist, wird ein einzelnes Tröpfchen, das die Sensorzellen der Vorrichtung enthält, direkt zu dem Röhrchen hinzugegeben, das die gesammelten Aerosolpartikel enthält, für 5 Sekunden zentrifugiert, um die Zellzuführung zur Röhrchenoberfläche zu beschleunigen, und emittiertes Licht wird unter Verwendung eines Photonendetektors (z.B. PMT, CCD, Fotodiode etc.) gemessen. Unter Verwendung dieser Vorrichtung können trockene Bakteriensporen in weniger als einer Minute aus einem Aerosol gesammelt und direkt mit einer optisch-elektronischen Vorrichtung identifiziert werden. Dieses Verfahren kann mit einer Vielzahl von Röhrchen, die zum Sammeln von Proben verwendet werden, und einem automatisierten System zum Durchführen nachfolgender Assays ausgeführt werden. Ein Beispiel für ein System, das in der Lage ist, wenigstens 10 unabhängige Assays durchzuführen, ist in [Fig. 4](#), [Fig. 6](#), [Fig. 9](#), [Fig. 12](#) und [Fig. 15](#) gezeigt. Durch Implementieren eines Ansatzes, bei dem Assays dazu befähigt werden, nach mehreren Analyten in einem einzelnen Röhrchen zu suchen (Multiplex), kann die Anzahl detektierbarer Substanzen in einem einzelnen Assaydurchgang größer gemacht werden als die Anzahl verfügbarer Röhrchen. Dies kann durch Erzeugen individueller Vorrichtungszelllinien für die optisch-elektronische Detektion, die eine Mehrzahl an Rezeptoren mit Affinität für verschiedene Analyten exprimieren, oder durch Kombinieren mehrerer Zelllinien mit unterschiedlichen Spezifitäten in einem einzelnen Röhrchen geschehen.

**[0076]** [Fig. 4](#) ist ein Schema eines integrierten Systems aus biologischem Aerosol-Warnsensor (BAWS) und optisch-elektronischem Sensor. Das BAWS-Auslösemodul wird verwendet, um vorbereitend die Anwesenheit von Partikeln, z.B. jene eines im Voraus festgelegten Größenbereichs, zu bestimmen. Wenn Partikel bestimmt werden, die die Spezifikationen erfüllen, löst der BAWS einen Luft-zu-Luft-Konzentrator aus, der es Partikeln eines bestimmten Größenbereichs gestattet, gesammelt und in einer Vertiefung (z.B. Reaktionskammer, Röhrchen) mittels eines Trockenimpaktormoduls abgelagert zu werden. Das Trockenimpaktormodul ermöglicht Trockenprobensammlung und steht in Verbindung mit einem Spritzenmodul zur Zellabgabe (z.B. emittierende Zellen) in eine Reaktionskammer (z.B. Röhrchen). Ein Transportmodul wird verwendet, um den Reaktionskammeraufbau (mit einer oder mehreren Kammern oder Röhrchen zu einem Zentrifugenmodul) für die Sedimentation oder das Mischen der Partikelprobe und der Zellen zu transferieren. Das Zentrifugenmodul kann, muss aber nicht notwendigerweise, mit einem Optik/PMT-Modul zur Detektion der Photonenemission in Verbindung stehen. Ein Steuermodul ist nützlich zum Steuern des Betriebs des Systems.

**[0077]** [Fig. 6](#) zeigt ein Beispiel für ein Trockenimpaktormodulkonzept. In diesem Beispiel werden eine Einzelkanal- (z.B. Systemprototyp) wie auch eine Mehrkanalvorrichtung gezeigt, einschließlich einzelner Probenröhrchen (z.B. PCR-Röhrchen) und Röhrchenhalter, in Verbindung mit Luft-zu-Luft-Konzentratoren, aus denen die Partikeltestprobe gesammelt wird.

**[0078]** [Fig. 9](#) zeigt ein Beispiel für eine Zellabgabe, die automatisiert werden kann. Die Sensorzellen (emittierende Zellen) werden in das System mittels einer Spritze und einer Spritzenpumpenanordnung eingebracht, die Pipettierhilfen oder andere Abgabegeräte umfassen kann. Dieser Typ der Anordnung ermöglicht mehrfaches und gleichzeitiges Einbringen von Sensorzellen in die Partikelproben (z.B. Proben in Reaktionskammern (z.B. Röhrchen)).

**[0079]** [Fig. 12](#) zeigt ein Beispiel für ein Zentrifugenmodulkonzept, das verwendet wird, um die Partikelproben oder Zellproben zu zentrifugieren. Halter mit den Probenröhrchen werden über einen Lademechanismus in eine Rotoranordnung eingeführt, die zur Aufnahme der Halter geeignet ist. Der Rotor zentrifugiert die Proben. Die Rotoranordnung steht in Verbindung mit Optikmodulen zur Signalsammlung (z.B. Photonenemission), und ein indizierter Motor kann verwendet werden, um den Abgleich der Probenkammer mit dem Detektor (z.B. Optikmodule) zu ermöglichen.

**[0080]** [Fig. 15](#) zeigt ein Beispiel für ein Optikmodul. In Abhängigkeit von der exakten Konfiguration ermöglicht das Modul eine Vielzahl gleichzeitigen Testens der Proben (z.B. in den Reaktionskammern, Röhrchen). Die

Halter und Röhrchen darin werden derart in die Einheit eingesetzt, dass sie, wenn nötig, in Verbindung mit Linsenanordnungen (z.B. integrierte Reflektoren, Linsen) und schließlich einem Fotodetektor (z.B. eine PMT) stehen. Die PMT erzeugt Signale, die dann an einen Prozessor zur Verarbeitung und Anzeige gesendet werden.

**[0081]** [Fig. 21](#) veranschaulicht einen integrierten Trockenimpaktor/optisch-elektronischen Sensor. Bei diesem Sensor sind die oben beschriebenen Module in einer linearen Anordnung mit einer Kassette montiert, die 30 Träger fasst, die an ein Riemengetriebenes Haltertransportmodul abgegeben werden können. Dieses Transportmodul bewegt die Assayröhrchen nacheinander von dem Kollektor zu dem Zellabgabemodul zu dem Zentrifugenmodul und schließlich nachfolgend zum Abschluss der Photonendetektion zu dem Bestätigungs- und Probenlagermodul. Die gesamte Größe dieses integrierten Sensors beträgt ungefähr 137,2 cm (54 Inch) breit mal 83,8 cm (33 Inch) hoch mal 55,9 cm (22 Inch) tief.

**[0082]** Proben unter Realbedingungen können Substanzen enthalten, die den Assay entweder inhibieren (falsch negative) oder in Abwesenheit eines spezifischen Antigens eine Reaktion verursachen (falsch positive). In vielen Fällen können diese Proben vor dem Assay behandelt werden, um diese Substanzen zu entfernen. Zum Beispiel können lösliche Substanzen wie Detergenzien oder Serumfaktoren durch einen vorgeschalteten Zentrifugationsschritt entfernt werden, bei dem der Wirkstoff am Boden des Röhrchens konzentriert wird und die Flüssigkeit mit Assaymedium ersetzt wird (Portal Shield-Proben). Unlösliche, große partikuläre Substanzen können aus der Probe durch Filtration entfernt werden unter Verwendung handelsüblicher Filter einer Porengröße (3–5 µm), die die Passage des Wirkstoffs erlauben, aber den Kontaminanten (Diesel- oder Rußproben) zurückhalten. Proben können rasch durch Spritzenfilter aufbereitet werden, was der gesamten Assayzeit nur wenige Minuten hinzufügt.

#### Probenlokalisierung

**[0083]** Als Teil des Probenkollektors oder der Reaktionskammer können unterschiedliche Mechanismen (andere als Zentrifugation) implementiert werden, um den Kontakt zwischen Emitterzellen und Kandidatenpartikeln zu erleichtern. Zum Beispiel kann die Verwendung von Elektrophorese, isoelektrischer Fokussierung, Di-elektrophorese, magnetisch markierten Partikeln und ähnlichem an bioelektronischen Vorrichtungen in ein System der Erfindung integriert werden. Siehe z.B. US-Patentnummer 6,017,696 und andere Patente, die auf Nanogen, Inc. übertragen wurden; Goater et al., *Parasitology* 117:5177–189, 1998; und US-Patentnummern 5,512,439 und 4,910,148 und andere auf Dynal AS übertragene Patente.

**[0084]** Das Mischen einer wässrigen Probe, die Targetpartikel enthält (Partikel können hier alles sein, das durch die Emitterzellen erkannt wird – Proteine/Toxine, Viren, Bakterien, Parasiten, Nukleinsäuren etc.), mit einem Aliquotmedium, das Emitterzellen enthält, führt zu Partikel-Zell-Kontakt, was zu einem vorübergehenden Anstieg in der Photonemissionsrate führt. Die Zeit zwischen dem Beginn des Mischvorgangs und der maximalen Emissionsrate hängt von der charakteristischen Reaktion der spezifischen Zellen auf Stimulation ab wie auch von dem Zeitraum, in dem das Mischen auftritt (die Mischzeit), und von der Zeit, die für die Partikel und Zellen üblich ist, um nach dem Mischen in Kontakt zu treten (die Diffusionszeit).

**[0085]** Weil eine Hintergrundrate detektierter Photonen sogar in der Abwesenheit von Targetpartikeln vorhanden sein wird (beispielsweise Hintergrundzellemission und thermisches Rauschen in dem Photonendetektor und seiner Elektronik), können Photonen, die durch einzelne Target-Zell-Wechselwirkungen emittiert wurden, schwierig von diesem Hintergrund zu unterscheiden sein. Um als ein Signal nützlich zu sein, muss ein signifikanter Anstieg in der Rate der detektierten Photonen gegenüber der des Hintergrunds vorhanden sein. Für eine gegebene Probe wird diese Rate maximiert, wenn die Mischzeit und die Diffusionszeit minimiert werden. Andere mögliche Signale, dass Signalpartikel in der Probe vorhanden sind, umfassen: einen Anstieg in der Gesamtzahl an detektierten Photonen innerhalb eines Zeitraums über den des Hintergrunds alleine, eine Änderung in der Statistik der detektierten Photonen oder eine Änderung in den Spektraleigenschaften der detektierten Photonen.

**[0086]** Die Diffusionszeit kann minimiert werden, indem der durchschnittliche Abstand zwischen Partikel und Zelle nach Mischen verringert wird. Dies kann bewerkstelligt werden, indem die Partikel und/oder Zellen in einem kleinen Volumen, oft eine Schicht, innerhalb des größeren gemischten Volumens lokalisiert werden. Allerdings kann die Zeit zum Lokalisieren der Partikel und/oder Zellen länger sein als die charakteristische Ansprechzeit der Zellen (Mischen zwischen Partikeln und Zellen über diese verlängerte Lokalisierung könnte eine geringere Rate der Photonemission erzeugen und dadurch ein geringeres Signal, indem die durchschnittliche Zeit zwischen Emissionen erhöht wird). Um dies zu vermeiden, sollte eines oder beiden getrennt lokalisiert sein, während der Kontakt zwischen ihnen minimiert wird. Diese Lokalisierung kann auch zu einer reduzierten

Mischzeit führen.

**[0087]** Im Allgemeinen umfassen die Mittel zum Bewegen von Partikeln oder Zellen die folgenden:

- Sedimentation (durch Schwerkraft oder eine Zentrifuge)
- Flüssigkeitsfluss (erzwungen oder konvektiv)
- elektrische Kräfte (Elektrophorese und Dielektrophorese)
- magnetische Kräfte (unter Verwendung magnetischer Beads)
- Akustik/Ultraschall (stehende oder wandernde Wellen)

**[0088]** Lokalisierung bedarf eines Mittels zum Bewegen von Partikeln und/oder Zellen kombiniert mit einer Sperre, wo sich Partikel und/oder Zellen sammeln können, wie die feste Oberfläche eines Kanals oder Behälters, die Oberfläche eines Filters oder die Barriere der Potentialenergie, die ein Minimum des elektrischen Feldes umgibt. Beispiele umfassen:

- Sedimentation (Lokalisieren der Zellen auf der unteren Oberfläche einer Kammer)
- Luftimpaktion (aufgeprallte Partikel kleben an oder setzen sich auf einer Sammeloberfläche ab)
- Filtern (Partikel oder Zellen sammeln sich auf der Oberfläche oder im Körper eines Filters)
- Affinitätseinfangen („affinity capture“) (Partikel oder Zellen können über spezifische oder unspezifische Bindungswechselwirkungen lokalisiert werden)
- Magnetisches Einfangen („magnetic capture“) (magnetische Beads, die gegen eine feste Oberfläche, eine Filteroberfläche oder in dem Körper eines Filters durch lokalisierte magnetische Kräfte gehalten werden; Beads können eine Oberflächenchemie zum Unterstützen der Anlagerung von Partikeln oder Zellen aufweisen oder auch nicht)
- Elektrophorese (nur geladene Teilchen; Sammeln auf einer Elektrodenoberfläche)
- Dielektrophorese (positiv: Sammlung von Partikeln oder Zellen auf einer Elektrodenoberfläche; negativ: Sammeln in einer Region minimalen Feldes)

**[0089]** Lokalisieren und Mischen von Partikeln und Zellen kann durch Kombinieren der obigen Verfahren wie auch anderer erzielt werden. In der Tabelle unten werden Beispiele für verschiedene Lokalisierungs/Detektor-Kombinationen bereitgestellt. Bestimmte der typischen Beispiele veranschaulichen Verfahren, um Partikel oder Zellen zweidimensional zu lokalisieren, was eine Verbesserung der Sensitivität oder der Unterscheidung zwischen verschiedenen Partikeln ermöglicht, wenn ein Array von Photonendetektoren (einschließlich ein CCD) im Gegensatz zu einem einzelnen Photonendetektor (wie eine PMT) verwendet wird.

<b>Beispiel</b>	<b>Verfahren zum Lokalisieren von Zellen</b>	<b>Verfahren zum Lokalisieren von Partikeln</b>	<b>Mischen: Partikel oder Zellen / Mittel</b>	<b>Detektor</b>
Zentrifuge	Zentrifugieren (kurz)	Zentrifugieren (lang)	Zellen / Sedimentieren (Zentrifugieren)	einzel
Flusszelle	Sedimentieren und an Oberfläche anhaften	flacher Kanal oberhalb der Zellen	Partikel / Sedimentieren (Gravitation)	einzel
Flusszelle (mehrere Zelllinien)	Sedimentieren und an Oberfläche anhaften	flacher Kanal oberhalb der Zellen	Partikel / Sedimentieren (Gravitation)	bildgebend
Flusszelle / magnetisches Bead	Sedimentieren und an Oberfläche anhaften	lokalisiertes Einfangen mit magnetischem Bead	Partikel (auf Beads) / Sedimentieren (Gravitation)	bildgebend
Flusszelle / elektrisches Feld	Sedimentieren und an Oberfläche anhaften	flacher Kanal oberhalb der Zellen	Partikel / Elektrophorese	einzel
Band / Docht	Fluss (in den Docht)	Luftimpakt (Band)	Zellen / Sedimentieren (Gravitation)	einzel
Luftimpakt	Zentrifugieren (kurz)	Luftimpakt (Band)	Zellen / Sedimentieren (Zentrifugieren)	einzel
Uniprep / magnetisches Bead	Sedimentieren auf die Oberfläche	magnetische Beads auf Filteroberfläche	Partikel (auf Beads) / Sedimentieren (Gravitation)	einzel
Fluss an den Zellen vorbei	Zellen auf Filteroberfläche		Partikel / Vorbeifluss an Zellen	einzel
Gegenstrom	Zellen werden auf Filteroberfläche durch Zentrifugation gehalten		Partikel / Vorbeifluss an Zellen entgegengesetzt zur Zentrifugationskraft	einzel
Zentrifugenröhrchenfilter	Zentrifugieren auf Filteroberfläche	auf Filteroberfläche zurückgehalten	Zellen / Sedimentieren (Zentrifugieren)	einzel
dielektrophoretische Falle	Sedimentieren und Anhaften an Oberfläche	im Fluss durch dielektrophoretische Kraft zurückgehalten	Partikel / Sedimentieren (Gravitation)	einzel
Wanderwellen-Dielektrophorese	Wanderwellen-Dielektrophorese	Wanderwellen-Dielektrophorese	Zellen oder Partikel / Wanderwellen-Dielektrophorese	einzel
Röhrchen mit löslicher Membran	separates Kompartiment	Zentrifugieren (lang) auf lösliche Membran	Partikel / Auflösen der Membran und Sedimentieren (Zentrifugieren)	einzel
Akustik / Ultraschall				

## Lokalisierungsbeispiele

**[0090]** In jedem der folgenden Beispiele wird angenommen, sofern nichts anderes angegeben ist: die Probe ist ein Aliquot einer wässrigen Lösung, die mit der kurzen Lebensdauer der Zelle und ihrer Funktion kompatibel ist und möglicherweise Targetpartikel enthält (obwohl die Beschreibungen unten das Vorhandensein von Partikeln annehmen werden). Eine wässrige Probe kann aus Umwelt-, Klinik-, Luft-zu-Flüssig-, gespülten Abstrich- oder anderen Proben gewonnen werden. Eine Luftprobe kann aus einem angetriebenen Luftstrom (Luftprobennehmer oder Oberflächenabtaster), elektrostatischem Einfangen („electrostatic capture“) oder aus abgesetzten, in der Luft befindlichen Partikeln gewonnen werden. Bezugnahmen auf Zellen sollten so verstanden werden, dass sie Emitterzellen in einem wässrigen Medium bedeuten, das mit ihrem Überleben und ihrer Funktion kompatibel ist. Es wird angenommen, dass ein Partikel und eine Zelle, die in Kontakt gebracht werden, zur Emission eines oder mehrerer Photonen führen. Ein Einzel- oder Arrayphotonendetektor ist außerhalb der Kammer vorhanden, in der die Probe und Zellen gemischt werden, und es können zusätzliche optische Ele-



mente vorhanden sein, um das Einfangen und die Detektion emittierter Photonen zu verstärken (wie Spiegel, Linsen, Hohllichtleiter etc.), die entweder außerhalb oder innerhalb der Kammer sind. Es wird vorausgesetzt, dass die Kammern entweder zum Teil oder in Gänze transparent sind oder andere Mittel aufweisen, um emittierten Photonen zu gestatten, den Detektor zu erreichen.

#### Zentrifuge

**[0091]** Eine Probe kann in einer Kammer für eine Zeit zentrifugiert werden, die ausreichend ist, um die Partikel zu sedimentieren. Zellen können in die Kammer eingebracht werden, ohne die Partikel durcheinander zu bringen und kurz zentrifugiert werden, um sie auf die Partikel zu sedimentieren. Photonendetektion kann während oder üblicherweise nach der Zentrifugation geschehen.

#### Affinitätseinfangen (Bindung an Oberflächen)

**[0092]** Eine Probe kann in ein Mikrozentrifugenröhrchen, eine Platte mit mehreren Vertiefungen (multi-well plate), eine Filtereinheit oder eine andere geeignete Vorrichtung eingebracht werden, wo ein gewisser Teil der Oberfläche, der mit der Probe in Kontakt steht, modifiziert wurde, um in der Lage zu sein, durch spezifische oder unspezifische Bindungswechselwirkungen Partikel zu binden und zurückzuhalten, die in der Probe vorhanden sein könnten. Unspezifische Bindung kann durch elektrostatische/Ionenaustausch-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen, hydrophile Wechselwirkungen etc. unterstützt werden. Spezifische Bindung kann dadurch unterstützt werden, dass Komponenten, die Substrate auf den Partikeln (z.B. Antikörper, Rezeptoren, Glycoproteine, Proteine, Peptide, Kohlenwasserstoffe, Oligonukleotide etc.) binden, an der Oberfläche immobilisiert werden, oder dass Komponenten, die von Rezeptoren auf der Oberfläche von Partikeln (kleine Moleküle, Peptide, Proteine, Kohlenwasserstoffe etc.) gebunden sind, immobilisiert werden.

#### Affinitätseinfangen (an beweglichen Substraten)

**[0093]** Ähnlich zum Affinitätseinfangen an einer Oberfläche, aber Partikel sind an bewegliche Substrate (Polymerbeads, Zellen, beladene Moleküle, magnetische Beads, Bakterien etc.) gebunden, die zusätzliche Mittel zum Bewegen und/oder Lokalisieren der Partikel oder Zellen mittels verschiedener Verfahren einschließlich der hierin beschriebenen bereitstellen.

#### Flusszelle

**[0094]** Emitterzellen können in eine flache Flusszelle eingebracht werden und an die Bodenoberfläche anhaften gelassen werden; nicht anhaftende Zellen können durch zusätzlichen Fluss entfernt werden. Eine Probe wird eingebracht, die einen Großteil des Zellmediums ersetzt, und Partikel können auf den anhaftenden Zellen aussedimentieren. Die Photonen werden emittiert, wenn Partikel mit den Zellen in Kontakt kommen.

#### Flusszelle (mehrere Zelllinien)

**[0095]** Ähnlich zu der Flusszelle mit verschiedenen Regionen der Emitterzelle, die für unterschiedliche Targetpartikel sensitiv ist. Die Photonendetektion durch einen bildgebenden Detektor um eine Identifizierung zu erlauben, welche Zellen stimuliert sind, und welche Targetpartikel daher in der Probe vorhanden sind.

#### Flusszelle (magnetisches Bead)

**[0096]** Ähnlich zu der Flusszelle. Geeignete magnetische Beads werden mit der Probe gemischt, wobei Targetpartikel an die Beads anhaften gelassen werden. Diese beladenen Beads können in die Flusszelle eingebracht werden, wo sie ein starkes lokalisiertes Magnetfeld (aufgrund eines Permanentmagneten oder Elektromagneten) auf der Oberfläche oberhalb der angehefteten Zellen einfängt. Mischen kann entweder dadurch ausgelöst werden, dass die magnetische Kraft entfernt wird und die Beads auf die Zellen sedimentiert gelassen werden oder dadurch, dass die magnetische Kraft die Beads zu der Oberfläche zieht, an der die Zellen angeheftet sind.

#### Flusszelle (elektrisches Feld)

**[0097]** Ähnlich zur Flusszelle, wobei die Oberfläche, an der die Zellen anhaften, und diejenige parallel dazu separate Elektroden sind (wenigstens eine davon könnte transparent sein). Eine Probe kann eingebracht werden, die einen Großteil des Zellmediums ersetzt. Eine geeignete Gleichstromspannung wird zwischen den

Elektroden angelegt, und die Partikel werden durch Elektrophorese zu den angehefteten Zellen bewegt.

#### Band/Docht

**[0098]** Eine Luftprobe, die möglicherweise Targetpartikel enthält, kann auf einer transparenten Oberfläche aufprallen gelassen werden, die fest oder flexibel (z.B. ein Band), porös oder nicht porös sein kann. Ein absorbierendes Material, oder Docht, kann den Aufprallbereich umschließen oder im Fall einer porösen Oberfläche auf der gegenüberliegenden Seite jener Oberfläche angebracht sein. Zellen können in dem Aufprallbereich platziert werden und aufgrund des Dochts wird überschüssiges Medium absorbiert, was das Volumen und die Tiefe des Mediums, das die Zellen trägt, reduziert und diese näher an die Partikel bringt. Zellen sedimentieren auf den aufgeprallten Partikeln aus oder werden zusätzlich durch Fluss zu ihnen hingezogen, wenn die Oberfläche porös ist und sich das Dochtmaterial dahinter befindet.

#### Luftimpaktion

**[0099]** Eine Luftprobe, die möglicherweise Targetpartikel enthält, kann in einer (fixierten und anfänglich leeren) Kammer aufgeprallt werden, die für Zentrifugation geeignet ist. Zellen können in die Kammer eingebracht werden, ohne die Partikel durcheinander zu bringen und kurz zentrifugiert werden, um sie auf die Partikel zu sedimentieren. Photonendetektion kann ohne, während oder üblicherweise nach der Zentrifugation erfolgen.

#### Filtervorrichtung/magnetisches Bead

**[0100]** Eine modifizierte spritzenlose Filtervorrichtung, bestehend aus einer Kammer und einem Presskolben mit einem geeigneten Filter (Whatman® Mini-Uniprep™ oder ähnliches), kann mit Zellen beladen werden, die an die Bodenoberfläche der Kammer anhaften gelassen werden; nicht haftende Zellen können gewaschen werden. Eine Probe kann in die Kammer zusammen mit magnetischen Beads mit einer geeigneten Oberflächenaffinität eingebracht werden. Ein modifizierter Presskolben mit einem geeigneten, innen eingesetzten und in der Nähe der Rückseite des Filters fixierten Magneten kann in die Kammer eingesetzt werden, bis die eingeschlossene Luft durch das Filter entweicht. Diese Anordnung kann umgekehrt werden und (gegebenfalls nach einer Zeit, die es den Beads gestattet, auf der Filteroberfläche zu sedimentieren) die Kammer kann auf den Presskolben herabgedrückt werden. Magnetische Beads und Partikel können auf der Filteroberfläche durch Filtration, Sedimentation und magnetische Anziehung akkumulieren. Partikel können sich an die magnetischen Beads anheften oder zwischen diesen gefangen sein. Bei Rückumkehrung des Aufbaus werden die Partikel von den Zellen durch die magnetischen Beads ferngehalten, die wiederum durch den Magneten innerhalb des Presskolbens gehalten werden. Entfernen jenes Magneten lässt die Beads und die Partikel frei, die über die kurze Entfernung auf die Zellen sedimentieren.

#### Fluss an den Zellen vorbei

**[0101]** Eine oder mehrere Zellschichten können auf der Oberfläche eines geeigneten Filters oder einer geeigneten Membran am Boden einer Kammer sedimentieren gelassen werden. Eine Probe kann in die Kammer oberhalb der Zellen eingebracht werden, und Druck (z.B. durch einen Presskolben oder eine externe Pumpe) kann angelegt werden. Wenn die Probe an den Zellen vorbeifließt, die im engen Kontakt sind, werden Partikel in engem Abstand zu den Zellen gebracht, was den Kontakt erlaubt.

#### Gegenfluss

**[0102]** Eine oder mehrere Zellschichten können auf die Oberfläche eines geeigneten Filters oder einer geeigneten Membran an dem Boden einer „Zell“-Kammer sedimentieren gelassen werden. Eine Probe kann in einer separaten „Proben“-Kammer platziert werden, die über einem beliebigen Fließkanal mit der Zellkammer an einen Punkt unterhalb des Filters verbunden ist. Die Kammern können relativ zueinander so angeordnet sein, dass die Probenkammer in einer Zentrifuge näher an der Rotationsachse ist; der Flüssigkeitsspiegel in der Probenkammer näher an der Rotationsachse ist als die Flüssigkeit in der Zellkammer. Auf diese Weise wird während der Rotation der Zentrifuge Flüssigkeit zwischen den Kammern fließen und einen gemeinsamen Abstand von der Rotationsachse suchen. Dies kann einen Teil der Probe aufwärts durch das Filter drücken, das die Zellen trägt, und an den Zellen vorbei, die gegen jenen Fluss durch die auswärtsgerichtete Zentrifugalkraft gehalten werden. Wenn die Probe an den Zellen vorbeifließt, die in engem Kontakt stehen, werden Partikel in engem Abstand zu den Zellen gebracht, was den Kontakt erlaubt.

## Zentrifugenröhrchenfilter

**[0103]** Eine Probe kann in den Filterkorb eines Zentrifugenröhrchenfilters mit einem geeigneten Größenausschluss eingebracht werden. Unter geeigneten Zentrifugationsbedingungen wird die Probe durch das Filter gedrückt, was Partikel, die größer als die Ausschlussgröße des Filters sind, auf der Oberfläche des Filters akkumuliert. Zellen können zum Filterkorb hinzugegeben werden und einer kurzen Zentrifugation ausgesetzt werden, um sie auf der Filteroberfläche und auf die Partikel zu bringen.

## Dielektrophoretische Falle

**[0104]** Ähnlich zu der Flusszelle, aber mit geeigneten Elektroden auf beliebigen der Oberflächen oder in die Flusszelle ragend. Eine Probe kann durch kontinuierlichen Fluss an den Elektroden vorbei eingebracht werden, die mit einer externen Quelle verbunden und von dieser elektrisch angetrieben sein können. Bei einer geeigneten Kombination aus Flussgeschwindigkeit, Frequenz, Wellenform und Amplitude können Partikel durch negative Dielektrophorese zu einer Region minimaler Intensität des elektrischen Feldes oberhalb der Zellen geleitet und in dieser festgehalten werden. Nach Beenden des Flusses und Ändern des elektrischen Antriebs zu den Elektroden (was möglicherweise eine Gleichspannung zwischen einigen Elektroden einschließt, um eine elektrophoretische Kraft zu erzeugen), kann das Partikel sedimentieren oder (durch Elektrophorese oder positive Dielektrophorese) auf die angehefteten Zellen getrieben werden.

## Wanderwellen-Dielektrophorese

**[0105]** In einer flachen zylindrischen Kammer können geeignete Elektroden (vielleicht transparent) auf einer oder beiden der parallelen Flächen angefertigt werden, einschließlich einer zentralen planaren Elektrode zum Sammeln von Partikeln und einer Elektrode um den Umfang herum und ein Satz spiralförmiger Elektroden (entweder auf der gleichen Oberfläche wie die Zentralelektrode oder auf der gegenüberliegenden Oberfläche). Eine Probe kann in die Kammer eingebracht werden und ein Gleichstrompotential kann zwischen der peripheren und der Zentralelektrode angelegt werden, um Partikel durch Elektrophorese zu der Zentralelektrode zu ziehen. Durch einen Austausch von Flüssigkeiten können Zellen in die Kammer eingebracht werden. Anregen der spiralförmigen Elektroden mit den geeigneten phasenverschobenen Wechselstromspannungen kann die Zellen durch Wanderwellen-Dielektrophorese in das Zentrum befördern, wo sie auf den Partikeln sedimentieren können.

## Röhrchen mit auflösbarer Membran

**[0106]** Von einer elektrisch betätigten auflösbaren Goldmembran kann Gebrauch gemacht werden, um die Isolation zwischen Targetpartikeln und Emitterzellen während der Lokalisierung der Partikel durch Zentrifugalsedimentation aufrecht zu erhalten. Entweder können die Partikel auf eine Membran oberhalb der Zellen sedimentiert werden (wie in [Fig. 20](#) gezeigt), oder die Zellen können vom Boden der Kammer durch eine Membran ferngehalten werden, die den Boden einer separaten Kammer (vielleicht ein Einsatzstück) überspannt. In beiden Fällen werden die Partikel und Zellen durch Sedimentation, möglicherweise per Zentrifugation, gemischt, nachdem die Membran durch elektrische Aktivierung aufgelöst worden ist.

## Akustik/Ultraschall

**[0107]** Konzentrierung der Partikel kann unter Verwendung von Schallsignalen oder Ultraschallsignalen bewirkt werden. Partikel können an den Knotenpunkten in dem Muster einer stehenden Welle akkumulieren oder sie können durch ein Wanderwellen-Muster bewegt werden. Zellen können auch auf diese Weise bewegt werden oder sie können durch jedes der verschiedenen oben diskutierten Mittel an den Zielort gebracht werden.

## Toxindetektion

**[0108]** Um monovalente Antigene zu bestimmen, ist es notwendig, ein Vernetzen von Oberflächenantikörpern unter Verwendung einer von zwei allgemeinen Strategien zu induzieren. Erstens kann man zwei unabhängige Bindungsstellen auf der Zelloberfläche exprimieren, so dass zwei Rezeptormoleküle an einen einzelnen Liganden binden können. Alternativ kann eine Bindungsstelle auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wenn der Ligand der Zelle auf eine Weise präsentiert wird, in der er polyvalent zu sein scheint. Die folgenden sind spezifische Beispiele unter Verwendung des Modells der Antikörper-Antigen-Erkennung.

**[0109]** Als erstes können zwei Antikörper auf der Oberfläche einer einzelnen Zelllinie exprimiert werden, wo-

bei jeder für unterschiedliche Epitope eines individuellen Moleküls (Epitop 1 und 2) spezifisch ist. Die Bindung eines einzelnen Moleküls an zwei Antikörper (ein Antikörper gegen Epitop 1 und ein anderer Antikörper gegen Epitop 2) würde Vernetzen und Lichtemission auslösen. Genauer gesagt wird eine einzelne B-Zelllinie manipuliert, zwei unabhängige Antikörper zu exprimieren, wobei jeder ein unterschiedliches Epitop auf einem einzelnen Molekül erkennt. Das Vorhandensein eines monomeren Antigens ist jetzt dazu in der Lage, die Oberflächenantikörper zu vernetzen, was zu einem erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und zur Emission von Licht durch Aequorin führt. Wir haben derzeit eine Zelllinie, die funktionelle Antikörper gegen sowohl *Y. pestis* als auch *F. tularensis* exprimiert (zusätzlich zu dem endogen exprimierten PC-Antikörper). Jeder dieser Wirkstoffe wird unabhängig durch diese Zelllinie erkannt, was anzeigt, dass beide Antikörper funktionell sind und was demonstriert, dass B-Zellen dazu in der Lage sind, zwei funktionelle Antikörper gleichzeitig zu exprimieren.

**[0110]** Ein anderes mögliches Thema ist die Empfindlichkeit der optisch-elektronischen Vorrichtung und der Verfahren bei einem Antigen, das nicht unter Verwendung von Zentrifugalkraft pelletiert werden kann. Das *Yersinia pestis*-F1-Antigen liegt in Lösung als Polymer von niedrigem Molekulargewicht vor, und es ist daher in unserem Assay nicht sedimentierbar. Jedoch sind B-Zellen, die Antikörper gegen F1 exprimieren, in der Lage, lösliches F1-Antigen bei 5 ng/ml nachzuweisen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit derzeitigen Immunoassay-Verfahren und demonstriert, dass die optisch-elektronische Vorrichtung gegenüber löslichen Wirkstoffen recht sensitiv sein kann. Ein ergänzendes Experiment wurde unter Verwendung von mit Ovalbumin konjugiertem Phosphorylcholin-Antigen durchgeführt. Die Fähigkeit dieses einen Antigens Antikörpervernetzung auf der Zelloberfläche zu stimulieren zeigt an, dass dieses Antigen von niedrigem Molekulargewicht, welches mehrere Kopien an PC-Epitopen enthält, dazu in der Lage ist, Oberflächenantikörper effektiv zu vernetzen und Calciumeinstrom und Photonenemission zu erzeugen.

**[0111]** Eine zweite Strategie kann die oben gezeigte Nachweisgrenze für monovalente Antigene verbessern, indem man von der Zentrifugenausführung Gebrauch macht. Dieser Ansatz verwendet ein Schema, bei dem einer der Toxin-Antikörper auf der Oberfläche gutartiger Bakterien exprimiert wird und der zweite Antikörper auf der Oberfläche von B-Zellen. Das Toxin kann jetzt durch Zentrifugation sedimentiert und B-Zellen, die den zweiten Antikörper exprimieren, können hinzugegeben werden. Da mehrere Antigene auf der Oberfläche der Bakterien immobilisiert sind, wird das Toxin den B-Zellen im Wesentlichen polyvalent erscheinen und wird ein Vernetzungsereignis und Photonenemission auslösen. Genauer gesagt wird Antikörper gegen Epitop 1 eines monomeren Antigens (z.B. Toxin) auf der Oberfläche von Bakterien exprimiert. Lösliches Toxin bindet an diese Antikörper, was die Bakterien mit Toxin-Antigen beschichtet. Diese Toxin-beschichteten Bakterien werden vor der Zugabe von B-Zellen, die Antikörper gegen Epitop 2 exprimieren, durch Zentrifugation sedimentiert. Vernetzen der B-Zell-Antikörper führt zu Lichtemission durch Aequorin. Experimentelle Ergebnisse für diese Strategie demonstrieren die Durchführbarkeit der Detektion bakterieller Oberflächenantigene und die erhöhte Sensitivität, die aus dem Sedimentieren jener Bakterien vor der Zugabe von B-Zellen resultiert. Ähnliche Ansätze können auch bei jedem schwach sedimentierenden Wirkstoff verwendet werden, um seine Präsentation gegenüber B-Zellen zu verbessern.

#### Multiplex-Assays

**[0112]** Das Folgende ist eine Beschreibung wie B-Zell-Mischungen verwendet werden könnten, um die Anzahl detektierbarer Antigene zu erhöhen, ohne die Anzahl der Detektionskanäle zu erhöhen (Röhrchen etc.). Der einfachste Weg, um mehrere Analyten zu bestimmen, besteht darin, eine einzelne B-Zelllinie pro Detektionskanal zu verwenden und die Anzahl der Zellassays zu erhöhen, indem die Anzahl der Detektionskanäle erhöht wird. Dies ist für kleine Zahlen an Assays tragbar, aber wenn wachsende Anzahlen von Analyten hinzugegeben werden, wird der Prozess komplexer und Ressourcen-intensiv. Es ist jedoch möglich, bis zu 31 Tests mit gleichzeitigen Negativkontrollen in einem System aus nur 5 Kanälen durchzuführen, wenn unterschiedliche B-Zelllinien zusammengemischt werden.

**[0113]** Als Beispiel kann man höchstens einen einzelnen B-Zell-Assay bestimmen, wenn man einen einzelnen Kanal hat. Wenn man jedoch zwei Kanäle hat, kann man drei getrennte Assays bestimmen, wobei jeder Kanal eine gleichmäßige Mischung von zwei der drei getrennten B-Zelllinien enthält:

Zum Beispiel, wenn man drei B-Zelllinien hat: A, B, C

Und man mischt sie wie folgt in zwei Kanäle –

**Kanal 1: A, B**

**Kanal 2: B, C**

Dann gibt es drei positive Ausgabemöglichkeiten:

**Kanal 1**

**Kanal 2**

Ja

Nein

zeigt an, dass nur A vorhanden ist

Nein

Ja

zeigt an, dass nur C vorhanden ist

Ja

Ja

zeigt an, dass nur B vorhanden ist  
(oder dass mehr als ein Wirkstoff vorhanden ist, was zu diesem Zeitpunkt als unwahrscheinlich angesehen wird)

[0114] Wenn man drei Kanäle hat, kann man in ähnlicher Weise sieben unabhängige Assays bestimmen, indem Gruppen von vier Zelllinien zusammengemischt werden – (Im Nachfolgenden wird eine bequeme Kurzschrift verwendet werden, bei der die Zelllinien für einzelne Wirkstoffe von A bis zu einem Buchstaben, der der Anzahl der Zelllinien entspricht, benannt werden, und die Kanalnummern werden wie folgt aufgeschrieben werden, um anzuzeigen, welche Kanäle benötigt werden, um jeden einzelnen Wirkstoff positiv nachzuweisen – 123: F – bedeutet, dass Kanäle 1, 2 und 3 allesamt positiv anzeigen müssen, um Wirkstoff F zu identifizieren)

Kanal 1

Kanal 2

Kanal 3

**A,B,G,F**

**B,C,E,F**

**C,D,G,F**

**1: A**

**12: B**

**123: F**

**2: E**

**13: G**

**3: D**

**23: C**

[0115] Eine Formel, die die Beziehung ausdrückt, die die Anzahl unabhängiger Assays einfach beschreibt, die durch eine gegebene Anzahl an Kanälen zugänglich gemacht werden kann, wobei man annimmt, dass alle Assays im gleichen Verhältnis gemischt werden, lautet:

$$\text{Anzahl der Zellassays} = 2^n - 1$$

wobei n die Anzahl der Kanäle bezeichnet

und die Anzahl der Zellassays, die in jedem Kanal gemischt werden müssen, durch  $2^{(n-1)}$  gegeben ist.

[0116] Um 16 unterschiedliche B-Zelllinien zusammenzumischen, werden folglich 5 Kanäle benötigt, um 31 unterschiedliche Assays abzufragen. Das Design bei einem 10-Kanalsystem könnte tatsächlich verwendet werden, um die Identifikation von 31 separaten Wirkstoffen mit gleichzeitigen Negativkontrollen zu ermöglichen (5-Kanäle Positivnachweis, 5-Kanäle Negativkontrolle).

[0117] Die Kanalmischungen und die Zuordnung der positiven Detektion bei einem 4-Kanal-System (15 verschiedene Assays) sind unten gezeigt:

Kanal 1

Kanal 2

Kanal 3

Kanal 4

**A,B,G,F,**

**B,C,H,I**

**F,C,D,I**

**D,E,G,H**

I, K, L, M

J,L,M,N

J,K,M,O

J,K,L,M

**1: A**

**23: C**

**123: I**

**1234: M**

**2: N**

**24: H**

**234: J**

**3: O**

**34: D**

**134: K**

**4: E**

**12: B**

**124: L**

**13: F**

**14: G**

[0118] Ohne weitere ausführliche Darstellung wird angenommen, dass ein Fachmann auf der Grundlage der obigen Offenbarung und der Beispiele unten die vorliegende Erfindung in ihrem vollsten Umfang nutzen kann. Die folgenden Beispiele sollen als bloß veranschaulichend dafür angesehen werden, wie ein Fachmann die Erfindung ausführen kann, und sie sind in keiner Weise für den Rest der Beschreibung beschränkend.

**[0119]** [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung, die die allgemeinen zellulären Komponenten der Erfindung zeigt. Eine Zelle (hier eine B-Zelle), die ein Emittermolekül (hier Aequorin) enthält, weist auf ihrer Oberfläche Antikörper auf. Diese Antikörper sind spezifisch für ein Antigen auf einem Targetpartikel, wie einem biologischen Kampfstoff. Das Binden des Targetpartikels an Antikörper auf der B-Zelle bringt zwei oder mehr Antikörper auf der Zelloberfläche eng zueinander, was eine Signalübertragungskaskade auslöst, die zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern in das Zellplasma führt. Dieser Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration lässt Aequorin ein Photon emittieren. Das Photon wird dann durch eine Fotomultiplivorrichtung, wie einem CCD, aufgenommen und registriert. Auf diese Weise kann ein zellulärer Biosensor unter Verwendung von Zellen verwirklicht werden, die funktionelle Oberflächenantikörper aufweisen und ein cytoplasmatisches Emittermolekül enthalten, das auf erhöhte Calciumkonzentration reagiert.

**[0120]** Solch ein Zell-basiertes Detektionssystem bietet eine schnelle, sensitive, spezifische, exakte und flexible Detektion jedes Antigens auf jedem Targetpartikel. Im Hinblick auf Flexibilität kann das System modifiziert werden, um auf jedes Partikel oder jede Gruppe an Partikeln abzielen. In einem Beispiel kann eine einzelne Emitterzelle eine Vielzahl an Antikörpertypen enthalten, wobei jeder Typ für nicht überlappende Gruppen an Targetpartikeln spezifisch ist. Diese einzelne Emitterzelle kann dann verwendet werden, um eine Klasse an Targetpartikelspezies auf einmal zu identifizieren.

**[0121]** In einem zweiten Beispiel kann eine Reaktionskammer zwei Typen von Emitterzellen enthalten. Ein Typ der Emitterzelle enthält Antikörper, die spezifisch für eine Klasse an Targetpartikeln (z.B. Bakterien) sind und emittiert ein Photon einer ersten Wellenlänge in Reaktion auf Kontakt mit einem beliebigen Mitglied der Klasse. Der zweite Typ Emitterzelle enthält Antikörper, die spezifisch für eine spezielle Spezies innerhalb der Klasse (z.B. *Yersinia pestis*) sind und emittiert ein Photon einer zweiten Wellenlänge, die anders ist als die erste Wellenlänge in Reaktion auf Kontakt mit der Spezies. Dieses Arrangement bietet äußerst hohe Genauigkeit, indem falsch-positive Signale verringert oder beseitigt werden. Nur wenn Photonen der ersten und zweiten Wellenlänge detektiert werden, würde ein positives Ereignis registriert werden. Dieses Verschachteln der Emitterzellspezifitäten kann, wenn notwendig, auf mehr als zwei Ebenen ausgedehnt werden, um falsch-positive Signale zu verringern oder zu beseitigen.

**[0122]** [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung einer allgemeinen Architektur und Verwendungsumgebung für die Erfindung.

**[0123]** [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung der Molekularbiologie, die in einer Ausführungsform der Erfindung verwendet wird. In diesem Beispiel wird eine universelle B-Zelllinie, die ein Emittermolekül (z.B. Aequorin) exprimiert, aber die nicht Antikörper exprimiert, zur Grundlage zum Erzeugen von B-Zellen, die einen beliebigen Antikörper, der für ein beliebiges Antigen spezifisch ist, exprimieren können. Ein Antikörperexpressionsvektor wird in die universelle B-Zelle eingeführt, auf das Vorhandensein des Expressionsvektors selektiert und zur Verwendung in einem Detektionssystem der Erfindung expandiert. Unter Verwendung dieser Strategie in Verbindung mit pDisplay und VKExpress (oben im Abschnitt „Antikörper“ beschrieben) wurden Target-spezifische Emitterzellen für eine Vielfalt an Targets erzeugt. Es sind Emitterzellen hergestellt worden, die für Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV), venezolanischen Pferde-Enzephalitis-Virus (VEE), *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* spp., die O1- und O139-Stämme von *Vibrio Cholera* und Orthopox-Viren spezifisch sind. Die cDNA und die Sequenz für die variablen Regionen des FMDV-Antikörpers wurden vom USDA erhalten. Die cDNAs und Sequenzen der variablen Regionen der Antikörper gegen *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella* spp., die O1- und O139-Stämme von *Vibrio Cholera* wurden von Forschern am NMRC erhalten. Die variablen Regionen der VEE- und Orthopox-Antikörper wurden aus Hybridomas kloniert, die vom CDC bzw. USAMRIID erhalten wurden. Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV), *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* und venezolanischer Pferde-Enzephalitis-Virus (VEEV) sind für Maul- und Klauenseuche, die Pest, Tularämie bzw. Enzephalitis verantwortlich. Klonieren aus den Hybridomas wurde mit einer Kombination an Primern ausgeführt, die in mehreren veröffentlichten Artikeln beschrieben sind. Für *Bacillus globigii* spezifische Emitterzellen werden hergestellt, weil dieses nicht-pathogene Bakterium von einigen Militärdienststellen in Feldversuchen als ein Testorganismus für Detektionssysteme für biologische Kampfstoffe verwendet wird. [Fig. 5](#) enthält ein Liniendiagramm, das die Photonenemissionsantwort zeigt, als mehrere Klone FMDV-spezifischer Emitterzellen mit lebenden FMDV-Targets in Kontakt gebracht wurden. In jedem Fall feuerten die Emitterzellen Photonen innerhalb von ungefähr 20 bis 30 Sekunden nach Kontakt zwischen dem Target und den Zellen. In dem Graphen sind Daten enthalten, die ein Fehlen von Emission zeigen, als eine FMDV-Mutante (die eine einzelne Aminosäuremutation im viralen Hüllprotein aufweist), von der man nicht erwarten würde, an die Emitterzelle zu binden, mit einem Emitterzellklon in Kontakt gebracht wurde. Die Negativkontrolle belegt

die hohe Spezifität, die in das Detektionssystem eingebaut wurde.

**[0124]** Verschiedene Konfigurationen für eine Zentrifugen- und Fotomultiplerröhren(PMT)-Anordnung können in ein System der Erfindung eingebaut werden. Die Anordnung umfasst einen Rotor (Motor), der ein Mikrozentrifugenprobenröhrchen an einer pendelnden Aufhängung zentrifugiert, und enthält ein Ausgleichsröhrchen in einer fixierten Position. Die PMT ist am Boden dargestellt und zeigt aufwärts in Richtung auf das untere Ende eines Probenröhrchens im Ruhezustand. In einem typischen Experiment für ein Targetpartikel, das kleiner als die Emitterzelle ist, wird die partikelhaltige flüssige Probe in dem Probenröhrchen platziert und unter Bedingungen zentrifugiert, die ausreichend sind, um die Mehrheit der Partikel zum Boden des Röhrchens zu sedimentieren (z.B. 60 Sekunden bei  $5600 \times g$  für *Francisella tularensis*). Eine Suspension von Emitterzellen wird dann auf die Probe in dem Röhrchen geschichtet (so dass die sedimentierten Partikel nicht aufgewirbelt werden) und kurz zentrifugiert, um die Zellen in Kontakt mit den Targetpartikeln zu pelletieren. Wenn unter den Kandidatenpartikeln Targetpartikel vorhanden sind, sollten Photonen einer bestimmten Wellenlänge aus den Zellen emittiert werden und durch die PMT aufgefangen und registriert werden.

**[0125]** In bestimmten Ausführungsformen kann die PMT eine Hamamatsu HC 125-08 PMT sein, die an einen Stanford Research System SR400 gattergesteuerten Zweikanalphotonezähler („Two Channel Gated Photon Counter“) gekoppelt ist. Die Zentrifuge kann ein Sapphire 17 turn, 18.5 AWG, 5 Ampere Motor sein, der eine Ausschwingbecherkonfiguration aufweist.

**[0126]** Das Zentrifugenröhrchen (Reaktionskammer) kann nach Bedarf geändert und nachgerüstet werden, um den Kontakt zwischen Kandidatenpartikeln und den Emitterzellen zu unterstützen. In einer in [Fig. 20](#) gezeigten Ausführungsform enthält das Röhrchen ein geschlossenes Kompartiment, das im Vorhinein geladene Emitterzellen am Boden des Röhrchens enthält. Dieses Kompartiment ist vom Rest des Röhrchens durch eine auflösbare Goldanodenmembran abgetrennt. Bei In-Betriebnahme wird eine Probe, die Kandidatenpartikel enthält, in dem Röhrchen abgelagert und zentrifugiert, um Kandidatenpartikel an der Membran zu konzentrieren. Die Membran wird dann aufgelöst und das Röhrchen kurz zentrifugiert, um die Partikel mit den Emitterzellen in Kontakt zu bringen. Dieses System mit auflösbare Membran wird von Langer und Kollegen in *Angewandte Chemie International Edition* 39:2396–2407, 2000; und *Nature* 397:335–338, 1999, beschrieben.

**[0127]** Die Schritte in dem Zentrifugiervorgang können automatisiert sein oder alternativ so ausgestaltet sein, dass der Anwender die Zentrifuge überhaupt nicht anhalten muss. Zum Beispiel kann das Einbringen und Entfernen von Flüssigkeiten und Proben ohne die Notwendigkeit den Rotor anzuhalten bewerkstelligt werden, indem die mechanischen Eigenschaften präparativer Zentrifugen (z.B. Ultrazentrifugen) erhältlich von Beckman Instruments angepasst werden. Außerdem kann es wünschenswert sein, Photonenemission zu bestimmen, während Zentripetalkräfte noch ausgeübt werden (z.B. wenn der Kontakt zwischen Emitterzellen und Targetpartikeln ohne Zentrifugation instabil ist). Um von den Probenröhrchen emittierte Photonen zu bestimmen, während es rotiert, kann die PMT in einer radialen Position relativ zur Rotorachse angeordnet sein. In den meisten Fällen muss die PMT bei dieser Anordnung nicht zusammen mit dem Probenröhrchen rotieren, sondern kann stattdessen stationär sein und einfach die Emission von Photonen registrieren, wenn sich das Probenröhrchen vor der PMT vorbeibewegt. Wenn das Emissionssignal sehr schwach ist, dann kann der Detektor (z.B. PMT, ein CCD-Chip) an den Rotor gekoppelt werden und zusammen mit dem Probenröhrchen rotiert werden. Alternativ können mehrere PMTs um den Umfang eines Rotors herum zum Bestimmen von Emissionen aufgestellt werden.

**[0128]** Wenn mehrere Proben in dem gleichen Rotor rotiert werden, kann die Positionierung oder Signalverarbeitung der PMT, falls nötig, geändert werden. In einer Ausführungsform bietet der Rotor Platz für vier Probenröhrchen, wobei jedes Zellen enthält, die bei der gleichen Wellenlänge emittieren. Um Emissionen, die von einer Probe stammen, gegenüber den Emissionen aus anderen zu unterscheiden, kann eine einzelne radial ausgerichtete PMT Emissionen kontinuierlich bestimmen. Die kontinuierlichen Emissionsdaten werden dann unter Verwendung einer Taktspur aus dem Rotor aufgelöst, die die Position jeder Probe in Abhängigkeit von der Zeit überwacht, um die Emissionen jeder Probe zuzuweisen. Andere Variationen gehören selbstverständlich zum Umfang der Erfindung.

**[0129]** [Fig. 17](#) ist zum Beispiel eine schematische Darstellung zweier Reaktionsröhrchen, die an einen Rotor gekoppelt sind, wobei zwei PMTs unterhalb der Röhrchen ausgerichtet sind. In einer Ruheposition positioniert der Rotor jedes der beiden Röhrchen unterhalb der korrespondierenden PMT unter Verwendung des Rotorpositionssignalgebers. In einem anderen Beispiel kann das in [Fig. 17](#) gezeigte Zentrifugensystem mit einem Luftprobenkollektor zusammengefasst werden, um das in [Fig. 18](#) gezeigte System zu erhalten. Das radiale Aerosolimpaktorröhrchen kann jeden Typ Partikelmonitor umfassen, wie in US-Patent 5,932,795 und darin zitierten



Quellenangaben beschrieben. In noch einem anderen Beispiel kann das in [Fig. 18](#) beschriebene System so geändert werden, dass nur eine in Bezug auf die Rotorachse radial ausgerichtete PMT benötigt wird, wie in [Fig. 19](#) gezeigt. Wie oben diskutiert, werden durch die PMT registrierte Emissionen für jedes Probenröhrchen unter Verwendung des Achsenimpulsgebers (Drehgeber) aufgelöst.

**[0130]** Zurückverweisend auf [Fig. 17](#) können flüssige Komponenten, einschließlich aber nicht ausschließlich Suspensionen von B-Zellen, die manipuliert wurden, um spezifische Biowirkstoffe zu erkennen, Pufferlösungen, Konservierungsmittel, Zellkulturmedium, in jedes von mehreren Zentrifugenröhrchen platziert werden, mit einer flüssigen Suspension der Probenpartikel gemischt werden, die zuvor aus Aerosolproben in einem getrennten Verfahren gesammelt wurden (Partikel können Proteine, Peptide, Chemikalien, Viren, Bakterien in vegetativer und Sporenform, Pilzsporen, Pollenkörner, Einzeller, Blut- oder von Gewebe abgeleitete Zellen und deren Fragmente entweder alleine oder in Verbindung mit Trägerpartikeln wie Staub umfassen, aber sind nicht darauf beschränkt). Wenn der Zentrifugenmotor gestartet wird, schwingen die Zentrifugenröhrchen in eine radiale Position aus, und die B-Zellen und/oder Probenpartikel werden mit Geschwindigkeiten, die von der Größe und der Dichte der Partikel abhängen, zum Boden der Zentrifugenröhrchen getrieben. Die genaue Reihenfolge, in der zell- und probenhaltige Flüssigkeiten zugegeben und zentrifugiert werden, können auf der Grundlage ihrer relativen Sedimentationsgeschwindigkeiten angepasst werden, um das Signal zu maximieren. Im Allgemeinen nimmt man an, dass maximaler Photonenaustritt von Partikeln erhalten werden kann, die langsamer als B-Zellen sedimentieren, indem man diese Proben für geeignete Zeitdauern vor der Zugabe von B-Zellen zentrifugiert (Vor-zentrifugation; „pre-spin“) und indem man zentrifugiert, um sie in Kontakt zu bringen. Bei Partikeln, die mit gleichen oder schnelleren Geschwindigkeiten als B-Zellen sedimentieren, wird eine einzige Zentrifugation der gemischten Proben- und B-Zell-Komponenten maximalen Photonenaustritt aus dem System auslösen. Daten aus Partikelgrößenanalysatoren (einschließlich aber nicht ausschließlich BAWs-Einheiten und Flüssigpartikelanalysatoren), die stromaufwärts zur Zentrifugationsvorrichtung eingebaut sind, können verwendet werden, um automatisch die optimale Arbeitsreihenfolge zu bestimmen und geeignete computer-gesteuerte automatisierte Probenhandhabung auszulösen.

**[0131]** Wenn der „Rotationszyklus“ beendet ist und der Rotor in einer im Voraus festgelegten, durch den Rotationsmotor und den Achsenimpulsgeber gesteuerten Position zu einem gesteuerten Stopp gekommen ist, rotieren die Ausschwingarme unter Gravitationskräften, so dass die Böden der Zentrifugenröhrchen der sensitiven Oberfläche der Fotomultiplerröhren präsentiert werden, und dann alle Lichtsignale aufgezeichnet werden. In einer modifizierten Version dieser Durchführung kann eine einzelne Fotomultiplerröhre am maximalen Radius der Rotor/Röhrchenkonfiguration positioniert werden und verwendet werden, um Photonen aus jedem Röhrchen zu sammeln, wenn sie sich nacheinander an der sensitiven Oberfläche der Fotomultiplerröhre vorbeibewegen. Der von einzelnen Röhrchen gemessene Photonenaustritt kann auf der Grundlage der Überwachung des Achsenimpulsgebersystems zugeordnet und kombiniert werden.

**[0132]** Zurückverweisend auf [Fig. 18](#) wird der Vorgang des Sammelns der Aerosolpartikel mit dem Verfahren zum In-Kontakt-Bringen der Aerosolpartikel mit den B-Zellen integriert. Hier sind die Zentrifugenröhrchen an Ausschwingarme befestigt, die ihnen erlauben, die Enden von radialen Impaktorröhrchen abzudecken, während sie rotieren, und die Aerosolprobe wird dazu induziert, durch die Zentrifugalkräfte, die auf die Luft in den rotierenden, radialen Impaktorröhrchen wirkt (was nach Bedarf durch zusätzliche Gebläseeinheiten unterstützt werden kann), in den Probeneinlass zu strömen. Die hohe Geschwindigkeit des Flusses lässt Aerosolpartikel auf der inneren Oberfläche des Zentrifugenröhrchens oder der Oberfläche einer Flüssigkeit, die in den Röhrchen enthalten ist, aufprallen und führt zum Einfangen der Partikel auf der Oberfläche des Röhrchens bzw. in der Flüssigkeit. Wenn eine Flüssigkeit vorhanden ist, werden Zentrifugalkräfte, die auf die Flüssigkeit wirken, die Kraft ausgleichen, die durch den Hochgeschwindigkeitsluftfluss vermittelt wird, der zum Partikeleinfangen in der Flüssigkeit benötigt wird, und werden sie daran hindern, durch die auftreffende Luft herausgeblasen zu werden. Die Aerosolpartikel werden anschließend zum Auftreffen auf die Röhrchenoberfläche oder die Flüssigkeit zurückgehalten und im Fall der Flüssigsammlung dazu gezwungen, radial nach außen zu fließen, wodurch am maximalen Radius (dem Boden des Zentrifugenröhrchens) erhöhte lokale Partikelkonzentrationen gebildet werden. Zugabe von B-Zellen und deren Zentrifugation in die Zone lokal konzentrierter Partikel nach der Sammelphase wird einen Photonenaustritt auslösen. Alternativ können die B-Zellen in der Flüssigkeit während der Sammlung vorhanden sein und Lichtausstoß kann in Echtzeit während des Zentrifugierens mit einer einzelnen Fotomultiplerröhre gemessen werden ([Fig. 19](#)). In einer modifizierten Version dieser Ausführung könnten die flüssigen Komponenten (einschließlich aber nicht ausschließlich Partikelproben, die über einen alternativen Bioaerosolkollektor gesammelt wurden, und Suspensionen manipulierter B-Zellen) zu dem Einlass/den Einlässen hinzugegeben werden, und die Zentrifugalkräfte könnten verwendet werden, um sie in die Röhrchen zu verteilen.



**[0133]** Wenn der „Rotationszyklus“ beendet ist und der Rotor in einer im Voraus festgelegten, durch den Rotationsmotor und den Achsenimpulsgeber gesteuerten Position zu einem gesteuerten Stopp gekommen ist, rotieren die Ausschwingarme unter Gravitationskräften, so dass die Böden der Zentrifugenröhrchen der sensitiven Oberfläche der Fotomultiplerröhren präsentiert werden, und dann alle Lichtsignale aufgezeichnet werden. In einer modifizierten Version dieser Durchführung kann eine einzelne Fotomultiplerröhre am maximalen Radius der Rotor/Röhrchenkonfiguration positioniert werden und verwendet werden, um Photonen aus jedem Röhrchen zu sammeln, wenn sie sich nacheinander an der sensitiven Oberfläche der Fotomultiplerröhre vorbeibewegen. Der von einzelnen Röhrchen gemessene Photonenausstoß kann auf der Grundlage der Überwachung des Achsenimpulsgebersystems zugeordnet und kombiniert werden.

**[0134]** [Fig. 7](#) ist eine schematische Darstellung der Ergebnisse sequenzieller Zentrifugationen. Für Targetpartikel, die kleiner als Emitterzellen sind, aber die gleiche Dichte wie Emitterzellen aufweisen, ist es vorteilhaft, zunächst die Kandidatenpartikel (z.B. bei hoher Geschwindigkeit) zu zentrifugieren, um sie zu pelletieren. Danach können die Emitterzellen hinzugegeben und unter Bedingungen zentrifugiert werden, die sanfter sind, um nach Bedarf eine Verringerung ihrer Ansprechempfindlichkeit zu verhindern (obere Bildreihe). Außerdem zwingt diese Abfolge der Zentrifugation fast alle Kandidatenpartikel und Emitterzellen in ein relativ kleines Volumen am Boden eines Zentrifugenröhrchens. Im Gegensatz dazu wird Mischen der Kandidatenpartikel und der Emitterzellen miteinander und ihre gleichzeitige Zentrifugation eher zu einer Trennung als zu Kontakt zwischen den Partikeln und Emitterzellen führen (mittlere Bildreihe). Selbstverständlich reduziert überhaupt keine Zentrifugation dramatisch die effektive Konzentration von Partikeln und Emitterzellen in der Reaktion (untere Bildreihe).

**[0135]** [Fig. 8](#) enthält ein Liniendiagramm, das ein tatsächlich durchgeführtes Experiment zeigt, dass die in [Fig. 7](#) vermuteten Konsequenzen bestätigt. Für *Francisella tularensis* spezifische Emitterzellen wurden mit abgetöteten *Francisella tularensis*-Zellen in den drei in [Fig. 7](#) gezeigten Verfahren gemischt. Wie im Liniendiagramm zu sehen, führte das sequenzielle Zentrifugationsverfahren zu schneller und effizienter Emission nach Kontakt. Im Gegensatz dazu war das Emissionsprofil des Einzelzentrifugationsverfahrens sowohl in zeitlichem Ablauf als auch in Signalthöhe weniger ausgeprägt. Das Verfahren ohne Zentrifugation zeigte kaum eine Reaktion.

**[0136]** Ein ähnliches Emissionsprofil wurde in einem getrennten Experiment erzeugt, wie in dem in [Fig. 8](#) gezeigten Liniendiagramm zusammengefasst. In-Augenscheinnahme der Emissionsspuren deutet darauf hin, dass das Einzelzentrifugationsverfahren ein wenig schneller zu Target-spezifischen Emissionen führt als das Doppelzentrifugationsverfahren. Jedoch wurde gefunden, dass dieses Ergebnis in erster Linie ein Artefakt der längeren Rotationszeit ist, die bei dem Doppelzentrifugationsverfahren benötigt wird, und dass es keine wirkliche Verbesserung in der Ansprechzeit der B-Zellen widerspiegelt. Tatsächlich war die Anfangssteigung beim Doppelzentrifugationsverfahren signifikant größer als die beim Einzelzentrifugationsverfahren, was andeutet, dass das Doppelzentrifugationsverfahren zu einer stabilen Emitterreaktion führt.

**[0137]** Die Sensitivität des in [Fig. 8](#) gezeigten Detektionssystems wurde evaluiert, indem die Anzahl der in dem Zentrifugenröhrchen abgelagerten Tularemia-Zellen titriert wurde. Die Ergebnisse werden in dem in [Fig. 10](#) gezeigten Liniendiagramm zusammengefasst. Es scheint, dass 25.000 Emitterzellen dazu in der Lage waren, in Reaktion auf ungefähr 5300 Tularemia-Targetpartikel Photonen zu emittieren, die gegenüber dem Hintergrund detektierbar waren. Es wird angenommen, dass weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen die Sensitivität weiter steigern wird.

**[0138]** Zellreaktionen sind nach einem einzigen Gefrier-Tau-Zyklus verstärkt (siehe [Fig. 22](#)). In diesem Experiment wurden Zellen, die spezifisch für *Yersinia pestis* (YP) sind, zentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert (RPMI) mit 10% DMSO und zusätzlichen 10% FBS, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und in flüssigen Stickstoff überführt. Die Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und 1 ml Zellen ( $2 \times 10^6$ ) wurden in 4 ml RPMI verdünnt und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 2 Stunden mit Coelenterazin beladen, in  $\text{CO}_2$ -unabhängiges Medium ( $\text{CO}_2$ -I) hineingewaschen und es wurde ihnen erlaubt, sich für 24 Stunden zu erholen. 10000 Zellen wurden mit  $5 \times 10^5$  YP belastet (50  $\mu\text{l}$  YP bei  $10^7/\text{ml}$ ). Unbehandelte Zellen zeigten eine Reaktion von 9500 Photonen pro Sekunde, während eingefrorene und aufgetaute Zellen ungefähr 6-mal mehr Photonen in Reaktion auf YP emittierten. Dieser stimulatorische Effekt konnte zum großen Teil dadurch wiederholt werden, dass die Zellen Einfriermedium ausgesetzt wurden, ohne das eigentliche Einfrieren (5-fache Stimulation). Es scheint, dass der stimulierende Faktor in dem Einfriermedium DMSO ist. Als Zellen mit 2% DMSO behandelt wurden (die DMSO-Endkonzentration, wenn 1 ml Zellen in Einfriermedium, das 10% DMSO enthält, mit 4 ml normalem Medium verdünnt werden), wurde ein ähnliches Niveau an Stimulation detektiert. Die DMSO-Wirkung kann auf einer Vielzahl von Faktoren beruhen. DMSO ist dafür bekannt, hämatopoetische Zelldifferenzie-

rung zu beeinflussen, und es kann die Zellen über diesen Weg stimulieren. Außerdem zeigen Zellen, die in Glycerin-haltigem Medium eingefroren wurden, ähnliche Niveaus der Stimulation. Daher scheint es, dass die Wirkung zum Teil auf einer Stressantwort beruhen kann, die durch das DMSO induziert wird, und es kann möglich sein, dass diese Stimulation nachgebildet wird, wenn man eine beliebige Anzahl von Bedingungen verwendet, die eine „Hitzeschock“-Reaktion stimulieren.

**[0139]** Die Zellen können eingefroren in dem Coelenterazin-beladenen Zustand gelagert werden. Zellen wurden mit Coelenterazin beladen, es wurde ihnen erlaubt, sich für 24 Stunden zu erholen, und dann wurden sie eingefroren. Beim Auftauen wurden die Zellen durch 10 ml CO<sub>2</sub>-I-Medium gewaschen, und die Zellen wurden in CO<sub>2</sub>-I-Medium in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml resuspendiert. Diese Zellen waren dazu in der Lage YP zu nachzuweisen (in diesem Fall ungefähr eine Stunde nach dem Auftauen, aber kürzere Zeiten sind möglich). Diese Zellen blieben für einige Tage dazu fähig, den Wirkstoff zu bestimmen, wenn sie bei RT gelagert wurden. Vorbehandlung dieser Zellen mit DMSO vor dem Beladen mit Coelenterazin und Einfrieren kann die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Wirkstoff nach dem Auftauen erhöhen.

**[0140]** In [Fig. 22](#) wurden Zellen mit 50 µl von 10.000.000 YP/ml, verdünnt in CO<sub>2</sub>-I, nach verschiedenen Zellbehandlungen belastet. Unbehandelt: Zellen in RPMI angezogen, mit Coelenterazin beladen, gewaschen, für 24 Stunden erholen gelassen und YP ausgesetzt. Gefrier/Tauen: Zellen wurden in RPMI angezogen, in Einfriermedium transferiert und eingefroren. Aufgetaute Zellen (1 ml) wurden in 4 ml RPMI gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, mit Coelenterazin beladen, gewaschen, für 24 Stunden erholen gelassen und herausgefordert. Einfriermedium: Zellen wurden in RPMI angezogen, in Einfriermedium überführt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Zellen (1 ml) wurden in 4 ml RPMI überführt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, mit Coelenterazin beladen, gewaschen, für 24 Stunden erholen gelassen und herausgefordert. 2% DMSO: Zellen wurden in RPMI angezogen, in RPMI, das 2% DMSO enthielt, überführt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, mit Coelenterazin beladen, gewaschen, für 24 Stunden erholen gelassen und herausgefordert.

**[0141]** Ein erfolgreiches Detektionssystem für biologischen Kampfstoff sollte gegenüber Kontamination durch übliche auf einem Schlachtfeld vorhandene Umweltschubstanzen resistent sein. Um zu evaluieren, ob Emitterzellen unter Umweltstress oder -kontamination arbeiten können, wurden Emitterzellen mit einem Targetpartikel gemischt, entweder nach Exposition der Emitterzellen für eine Stunde gegen Dieselabgase in voller Stärke (linkes Liniendiagramm in [Fig. 11](#)) oder wenn die Emitterzellen durch 10<sup>7</sup> E. coli kontaminiert wurden (rechtes Liniendiagramm in [Fig. 11](#)), welches als eine Ersatzkontaminante für ein beliebiges Feldbakterium verwendet wurde. Wie in [Fig. 11](#) gezeigt, beeinträchtigten die untersuchten speziellen chemischen und biologischen Kontaminationsstoffe nicht die Fähigkeit der Emitterzellen Photonen in Reaktion auf ein Targetpartikel zu feuern.

**[0142]** [Fig. 13–Fig. 14](#) beschreiben eine andere Ausführungsform der Erfindung, die keine Zentrifugation benötigt. Die schematische Darstellung von [Fig. 13](#) zeigt die verschiedenen Komponenten dieser Ausführungsform. Ein biologischer Aerosolwarnsensor (BAWS) bestimmt die Anwesenheit von Partikeln (z.B. innerhalb eines vorher festgelegten Größenbereichs). Ein Beispiel für ein BWAS ist in Primmerman, Lincoln Laboratory Journal 12:3–32, 2000, beschrieben. Wenn Partikel, die die Anforderungen erfüllen, nachgewiesen werden, löst der BWAS einen Luft-zu-Luft-Konzentrator aus (Probenkollektor; wie in US-Patent-Nr. 5,932,795 beschrieben), der es gestattet, Partikel eines bestimmten Größenbereichs zu sammeln und in einer Vertiefung (Reaktionskammer) auf einem Teil eines Probenbandes an einer ersten Station abzulagern, das in [Fig. 14](#) in unterschiedlichen Ansichten gezeigt ist. Nachdem Kandidatenpartikel in der Vertiefung abgelagert sind, schreitet das Band zu einer zweiten Station unterhalb eines Reservoirs an Emitterzellen und oberhalb einer PMT voran. Emitterzellen, die für ein bestimmtes Antigen auf Targetpartikeln spezifisch sind, werden in der Vertiefung abgelagert, und die Photonenemission aus der Vertiefung wird überwacht.

**[0143]** Während der Zeit, in der Kandidatenpartikel durch den BAWS bestimmt werden, können die Kandidatenpartikel in nachfolgenden Vertiefungen abgelagert werden, wenn das Band durch die erste Station vorgeschoben wird ([Fig. 14](#)). In der zweiten Station ist eine Vielzahl von Emitterzellreservoirs, die jeweils Emitterzellen mit unterschiedlichen Targetspezifitäten enthalten, auf einem Turm montiert, der ein bestimmtes Reservoir in Position rotiert, um verschiedene Emitterzellen in die Vertiefung abzulagern. Auf diese Weise können verschiedene Targets unter den Kandidatenpartikeln bestimmt werden, wie in der schematischen Draufsicht der Vertiefungen in [Fig. 14](#) gezeigt. Wenn die verschiedenen Emitterzellen bei verschiedenen Wellenlängen emittieren, ist es selbstverständlich möglich, die verschiedenen Emitterzellen in eine einzelne Vertiefung abzulagern, die Kandidatenpartikel enthält, vorausgesetzt, dass die PMT unterhalb der zweiten Station Photonen verschiedener Wellenlänge unterscheiden kann.

**[0144]** [Fig. 16](#) zeigt schematisch noch eine weitere Ausführungsform eines Systems der Erfindung. In dieser

Ausführungsform werden Luftpartikel in jeder von sechs Vertiefungen innerhalb einer Reihe einer zweidimensionalen Anordnung (z.B. ein Band mit sechs Reihen und Hunderten von Spalten) an einer ersten Station abgelagert. Wenn die Anordnung um eine Reihe vorgerückt wird, was die Reihe in einer zweiten Station positioniert, werden in jede Vertiefung innerhalb der Reihe verschiedene Emittierzellen abgelagert, und die Emission aus allen sechs Reaktionen wird gleichzeitig durch eine Reihe PMTs unterhalb der zweiten Station bestimmt. Um ein Anhaften der Partikel an die Vertiefungen auf dem Band zu unterstützen, können die Vertiefungen mit einem Klebstoff oder einer Flüssigkeit beschichtet sein.

#### Beispiele für Zellmanipulations- und Assayverfahren

##### A. Zellmanipulationsverfahren:

**[0145]** M 12g3R-Zellen wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 µM nicht-essentiellen Aminosäuren, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin, 250 ng/ml Amphotericin B (Life Technologies), gehalten. Zellen wurden mittels Elektroporation (270 V, 950 µF) mit pCMV.AEQ.IRES.NEO transfiziert und für zwei Wochen in 1 mg/ml G418 selektiert. G418-resistente Klone wurden auf Reaktion gegen anti-IgM gescreent. Jene Klone mit der größten Zunahme der Photonenemission bei Vernetzen der Oberflächen-IgM wurden in nachfolgenden Transfektionen verwendet, um B-Zelllinien zu generieren, die für bestimmte Pathogene spezifisch sind. Oberflächenexpression der Antikörper mit manipulierter Spezifität wird durch Co-Transfektion (mittels Elektroporation) mit Expressionsvektoren für leichte und schwere Ketten sowie mit einem, der ein Gen kodiert, das Resistenz gegen Puromycin vermittelt, erzielt. Puromycinresistente Pools und Klone wurden auf der Grundlage ihrer Reaktion gegen das Antigen ausgewählt. Der Expressionsvektor der leichten Kette, VKExpress, enthält die konstante Region für das humane kappa-Gen stromabwärts zu einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) unter der Kontrolle des Promotors des humanen Elongationsfaktors 1α (EF-1α). Der Vektor für die schwere Kette wurde erzeugt, indem pDisplay (Invitrogen) verändert wurde, wobei die Cytomegalovirus (CMV)-Promotor und die Leader-Sequenz beibehalten wurde, aber die Transmembrandomäne des platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptors mit dem Gen für die Membrangebundene konstante Region des murinen IgM ersetzt wurde und beide Tags auf beiden Seiten der MCS entfernt wurden. Die geeigneten Restriktionsstellen werden zu den variablen Regionen der Antikörper unter Verwendung von PCR hinzugefügt und die Sequenz aller PCR-Produkte wird bestätigt, bevor sie in das Expressionskonstrukt kloniert werden. Die variablen Regionen, die zum Erzeugen des rekombinanten Antikörpers verwendet werden, wurden entweder aus cDNA oder aus Hybridomas unter Verwendung reverser Transkription (RT) mit Zufalls-Oligonukleotidprimern und PCR kloniert. RNA wurde mit Trizol-Reagenz (Life Technologies) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers extrahiert, und die Erststrangsynthese wurde unter Verwendung des Retroscript Kits (Ambion) durchgeführt. PCR wurde unter Verwendung von Primersets durchgeführt, die gestaltet waren, sich an die Leader-Sequenzen entweder der leichten oder der schweren Kette [S. T. Jones und M. M. Bendig, *Bio/Technology* 9, 88 (1991)] am 5'-Ende und an die konstanten Regionen des murinen kappa oder IgG2 am 3'-Ende anzulagern.

##### B. Biolumineszierende B-Zell-Antwort auf FMDV:

**[0146]** Die mit dem pCMV.AEQ.IRES.NEO-Plasmid und Expressionsvektoren für einen rekombinanten Antikörper, der den A12-Stamm des FMDV erkennt, stabil transfizierte M12g3R-B-Zelllinie wurde für den Lumineszenzassay wie folgt vorbereitet: Die Zellen wurden an Tag 1 aufgetaut. Die Aufbereitung der Zellen 24 Stunden nach Auftauen ist für die maximale Aktivität und Zuverlässigkeit wesentlich. Der Gefrier/Tau-Schritt erhöht die Reaktion der B-Zellen um das 100-fache. An Tag 2 wurden 106 Zellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur in Assaymedium [CO<sub>2</sub>-unabhängiges Medium, 10% FBS, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin, 250 ng/ml Amphotericin B (Life Technologies)] mit 50 µM Coelenterazin (Molecular Probes, Eugene, OR) abgedeckt mit einer Folie inkubiert, zweimal gewaschen und in Assaymedium in einer Endkonzentration von 5 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei Raumtemperatur in 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen rotieren gelassen und 15–20 Stunden später untersucht. Für den Assay wurden 25 µl Zellen mit Antigen (5 µl des wt A12pRMC35-Stammes bei 1,4 × 10<sup>8</sup> pfu/ml, 10 µl der A12-Variante, B2PD.3, bei 7,5 × 10<sup>7</sup> pfu/ml) gemischt und die Reaktion in einem Luminometer (Lumat LB 9507, Perkin Elmer) gemessen.

##### C. Biolumineszenz-Assay mit Bakterien und großen Viren:

**[0147]** Die Sensorvorrichtung und -verfahren können für die schnelle Detektion bakterieller wie auch viraler Pathogene verwendet werden. Zelllinien wurden manipuliert, um auf das Bakterium *Francisella tularensis* anzusprechen, das ursächliche Agens für Tularämie. Wenn es jedoch unter Verwendung des gleichen Protokolls

wie bei den FMD- und VEE-Viren untersucht wird, ist die Signalentstehung langsam und nahezu ununterscheidbar vom Hintergrund, was ein Anzeichen für langsame Wechselwirkungsgeschwindigkeiten zwischen den B-Zellen und dem Antigen ist (0s Vorzentrifugation/0s Zentrifugation). Frühere mit Antigen-Bead-Nachahmungen durchgeführte Experimente haben darauf hingedeutet, dass Sensitivität und Geschwindigkeit durch Konzentrieren von Antigen- und B-Zellen erhöht werden konnte (Daten nicht gezeigt), daher wurde das Luminometer dahingehend rekonfiguriert eine Zentrifuge zu umfassen, die oberhalb der Fotomultiplerröhre (PMT) angeordnet war. Wenn das Agenz und Zellen gemeinsam gemischt werden, dann durch Zentrifugation für 5 Sekunden konzentriert werden, wird das Signal verbessert und das Ansprechverhalten wird schneller (0s Vorzentrifugation/5s Zentrifugation). Optimale Ergebnisse werden beobachtet, wenn das langsamer sedimentierende *F. tularensis* vor der Zugabe der Zellen zentrifugiert wird (60s Vorzentrifugation/5s Zentrifugation). Diese Ausführung stellt sicher, dass eine große Anzahl Zellen innerhalb eines kurzen Zeitrahmens in physischen Kontakt mit Antigen kommt, wodurch eine größere Verbesserung der Sensitivität und der Geschwindigkeit bewirkt wird. Nach zusätzlicher Optimierung des Assayprotokolls können wir jetzt bereits 60 Kolonie-bildende Einheiten (cfu) *F. tularensis* in weniger als drei Minuten nachweisen, einschließlich der Zeit, die man benötigt, um das Agenz vorzuzentrifugieren, aber wir sehen keine Reaktion auf inaktiviertes *Yersinia pestis*, das Bakterium, das die Pest verursacht. Diese Nachweisgrenze ist mit zwei anderen Quellen für inaktivierten *F. tularensis* und einem anderen Stamm bestätigt worden (Daten nicht gezeigt). Außerdem weist die Sensorvorrichtung einen weiten Sensitivitätsbereich auf und bestimmt Konzentrationen, die über sieben Größenordnungen reichen.

**[0148]** B-Zellen wurden wie oben beschrieben präpariert. 50 µl, die die angegebenen Mengen an *Y. pestis* oder *F. tularensis* enthielten, wurden für 60 Sekunden bei 6500 × g zentrifugiert, dann wurden 20 µl Zellen hinzugegeben und für zusätzliche 5s in dem Zentrifugenluminometer zentrifugiert. Photonen wurden mit einer Hamamatsu HC-125-Photomultiplerröhre bestimmt und das Signal wurde mit einem Stanford Research Systems SR400 gattergesteuerten Photonen-zähler überwacht.

### Patentansprüche

1. Optisch-elektronisches System zum Detektieren eines Targetpartikels, wobei das System umfasst:
  - eine erste Reaktionskammer;
  - einen Probenkollektor für das Sammeln von Kandidatenpartikeln, die in einem Medium vorhanden sind, wobei der Kollektor ausgestaltet ist, die Kandidatenpartikel in der ersten Reaktionskammer abzulagern;
  - ein erstes Reservoir, das erste Emitterzellen enthält, wobei jede der ersten Emitterzellen erste Rezeptoren aufweist, die auf der Oberfläche von jeder der ersten Emitterzellen exprimiert werden und spezifisch für ein erstes zu detektierendes Targetpartikel sind, wobei das Binden des ersten Targetpartikels an die ersten Rezeptoren zu einer Zunahme der Kalziumkonzentration in dem Zellplasma von jeder der ersten Emitterzellen führt, wobei jede der ersten Emitterzellen ferner ein erstes Emittermolekül aufweist, das in Reaktion auf die Zunahme der Kalziumkonzentration ein erstes Photon emittiert, wobei das erste Reservoir ausgestaltet ist, wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen in der ersten Reaktionskammer abzulagern;
  - einen optischen Detektor, der für die Aufnahme des Photons ausgestaltet ist, das von der Zelle emittiert wird; und
  - einen Steuermechanismus, der die Kandidatenpartikel und wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen in sequenzieller Reihenfolge ablagert, wobei dann, wenn die Kandidatenpartikel eine Größe aufweisen, die größer als eine Bezugsgröße ist, der Steuermechanismus ausgestaltet ist, zuerst wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen abzulagern und anschließend die Kandidatenpartikel abzulagern; und dann, wenn die Kandidatenpartikel eine Größe aufweisen, die kleiner als eine Bezugsgröße ist, der Steuermechanismus ausgestaltet ist, zuerst die Kandidatenpartikel abzulagern und anschließend wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen abzulagern.
2. System nach Anspruch 1, wobei das System ferner einen Rotor umfasst, der ausgestaltet ist, an die erste Reaktionskammer gekoppelt zu werden und während einer Rotation eine Zentripetalkraft auf die erste Reaktionskammer auszuüben, die hinreichend ist, um einen wesentlichen Teil der Kandidatenpartikel oder einen wesentlichen Teil der ersten Emitterzellen in einem Abschnitt der ersten Reaktionskammer zu sammeln.
3. System nach Anspruch 1, wobei der Steuermechanismus einen beweglichen Objektisch umfasst, auf dem eine erste Reaktionskammer montiert ist, wobei in einer ersten Position der Objektisch die erste Reaktionskammer in einer ersten Konfiguration positioniert, die es dem Sammler bzw. Kollektor erlaubt, die Kandidatenpartikel in der ersten Reaktionskammer abzulagern, und wobei in einer zweiten Position der Objektisch die erste Reaktionskammer in einer zweiten Konfiguration positioniert, die es dem ersten Reservoir ermöglicht, wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen in der ersten Kammer abzulagern.

4. System nach Anspruch 1, wobei der optische Detektor ein ladungsgekoppeltes Bauelement (charged coupled device; CCD), eine Lawinendiode, eine CMOS-Abbildungseinheit, einen Photomultiplier oder eine Photomultiplierarrayröhre umfasst.

5. System nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Medium um ein Gas handelt.

6. System nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Medium um eine Flüssigkeit handelt.

7. System nach Anspruch 1, wobei die Emitterzellen B-Zellen sind.

8. System nach Anspruch 7, wobei die B-Zellen ein künstlich exprimiertes Plasmid enthalten, das die ersten Rezeptoren kodiert.

9. System nach Anspruch 8, wobei es sich bei den ersten Rezeptoren um einkettige Antikörper handelt.

10. System nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem ersten Targetpartikel um einen Virus, ein Bakterium, ein Protein, eine Nukleinsäure, einen Pilz, einen Einzeller, einen mehrzelligen Parasiten oder Prionen sowie Produkte handelt, die durch diese Partikel erzeugt oder induziert werden.

11. System nach Anspruch 1, wobei das System ferner einen Partikelgrößendetektor umfasst, der mit dem Steuermechanismus verbunden ist, wobei der Partikelgrößendetektor angeordnet ist, um die Größe der Kandidatenpartikel zu detektieren, die in den Kollektor eintreten oder in diesem vorhanden sind, wobei  
(1) wenn der Partikelgrößendetektor Kandidatenpartikel detektiert, die eine Größe aufweisen, die größer als eine Bezugsgröße ist, dann der Steuermechanismus ausgestaltet ist, zuerst wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen abzulagern und anschließend die Kandidatenpartikel abzulagern, und  
(2) wenn der Partikelgrößendetektor Kandidatenpartikel detektiert, die eine Größe aufweisen, die kleiner als eine Bezugsgröße ist, der Steuermechanismus ausgestaltet ist, zuerst die Kandidatenpartikel abzulagern und anschließend wenigstens einen Teil der ersten Emitterzellen abzulagern.

12. System nach Anspruch 1, wobei die sequenzielle Reihenfolge zuerst aus der Ablagerung wenigstens eines Teils der ersten Emitterzellen und anschließend aus der Ablagerung der Kandidatenpartikel besteht.

13. System nach Anspruch 1, wobei die sequenzielle Reihenfolge zuerst aus der Ablagerung der Kandidatenpartikel und anschließend aus der Ablagerung wenigstens eines Teils der ersten Emitterzellen besteht.

14. System nach Anspruch 1, wobei das erste Reservoir ferner zweite Emitterzellen enthält, wobei jede der zweiten Emitterzellen zweite Rezeptoren aufweist, die auf der Oberfläche von jeder der zweiten Emitterzellen exprimiert werden und spezifisch für ein zweites zu detektierendes Targetpartikel sind, wobei das Binden des zweiten Targetpartikels an die zweiten Rezeptoren zu einer Zunahme der Kalziumkonzentration in dem Zellplasma von jeder der zweiten Emitterzellen führt, wobei jede der zweiten Emitterzellen ferner ein zweites Emittermolekül aufweist, das in Reaktion auf die Zunahme der Kalziumkonzentration ein zweites Photon emittiert, wobei das erste Reservoir ausgestaltet ist, wenigstens einen Teil der zweiten Emitterzellen in der ersten Reaktionskammer abzulagern und wobei das zweite Photon eine andere Wellenlänge als das erste Photon aufweist.

15. System nach Anspruch 1, wobei das System ferner eine Luftsamplingvorrichtung umfasst.

16. System nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei es sich bei den Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, um Antikörper handelt.

17. System nach Anspruch 1, wobei eine Vielzahl von Proben gleichzeitig hinsichtlich einer Vielzahl von Targetpartikeln analysiert wird.

18. Verfahren zum Detektieren eines Targetpartikels in einer flüssigen Probe unter Verwendung von Emitterzellen, die einen oder mehrere Rezeptoren umfassen, die für eine Wechselwirkung mit einem Targetpartikel und Emittermolekülen geeignet sind, wobei das Binden des einen oder der mehreren Rezeptoren an das Targetpartikel zu einer Zunahme der Kalziumkonzentration in dem Zellplasma der Zelle führt und wobei die Emittermoleküle Photonen in Reaktion auf die Zunahme der Kalziumkonzentration emittieren, wobei das Verfahren der Reihe nach die folgenden Schritte umfasst:

a) Feststellen, dass die Größe des zu bestimmenden Targetpartikels kleiner als die Größe der Emitterzellen ist;

- b) Sammeln von Targetpartikeln, die in der flüssigen Probe vorhanden sind, mittels eines Probenkollektors;
- c) Ablagern der flüssigen Probe aus dem Probenkollektor in einer Reaktionskammer;
- d) Lokalisieren der Targetpartikel innerhalb der Reaktionskammer;
- e) Hinzufügen der Emitterzellen aus einem ersten Reservoir in die Reaktionskammer, um ein Gemisch von Emitterzellen und Targetpartikeln auszubilden;
- f) Lokalisieren der Emitterzellen innerhalb der Reaktionskammer; und
- g) Messen der Photonenemission der Emitterzellen in dem Gemisch.

19. Verfahren zum Detektieren eines Targetpartikels in einer flüssigen Probe unter Verwendung von Emitterzellen, die einen oder mehrere Rezeptoren umfassen, die für eine Wechselwirkung mit einem Targetpartikel und Emittermolekülen geeignet sind, wobei das Binden des einen oder der mehreren Rezeptoren an das Targetpartikel zu einer Zunahme der Kalziumkonzentration in dem Zellplasma der Zelle führt, und wobei die Emittermoleküle Photonen in Reaktion auf die Zunahme der Kalziumkonzentration emittieren, wobei das Verfahren der Reihe nach die folgenden Schritte umfasst:

- a) Feststellen, dass die Größe des zu detektierenden Targetpartikels größer als die Größe der Emitterzellen ist;
- b) Hinzufügen der Emitterzellen aus einem ersten Reservoir in eine erste Reaktionskammer;
- c) Lokalisieren der Emitterzellen innerhalb der Reaktionskammer mittels Sedimentierung;
- d) Sammeln von Targetpartikeln, die in der flüssigen Probe vorhanden sind, mittels eines Probenkollektors;
- e) Ablagern der flüssigen Probe von dem Probenkollektor in einer ersten Reaktionskammer, um ein Gemisch von Emitterzellen und Targetpartikeln auszubilden;
- f) Lokalisieren der Targetpartikel innerhalb der ersten Reaktionskammer, indem eine Sedimentierung ermöglicht wird; und
- g) Messen der Photonenemission der Emitterzellen in dem Gemisch.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das Verfahren ferner den Schritt des Aufbringens einer Antriebskraft auf die Partikel oder das Entfernen der Lokalisierungskraft umfasst, um die konzentrierten Partikel an dieselbe Stelle zu bringen wie die Zellen.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Zellen innerhalb der Reaktionskammer auf einer Barriere, einer durchlässigen Membran oder einem Filter mittels einer Sedimentierung oder eines Flusses lokalisiert werden, und wobei der Probe ermöglicht wird, von der Zellenseite durch die Barriere, die durchlässige Membran oder den Filter zu fließen, um zu ermöglichen, dass die Partikel mit den Zellen in Berührung kommen.

22. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei die Targetpartikel in der flüssigen Probe zu einer zweiten Reaktionskammer hinzugefügt werden, die mit der ersten Reaktionskammer an der Seite der Barriere gegenüber den Emitterzellen verbunden ist, und wobei der Probe ermöglicht wird, durch die Barriere unter Einwirkung der Schwerkraft oder mittels Zentrifugieren zu fließen, um zu ermöglichen, dass die Partikel mit den Zellen in Berührung kommen.

23. Verfahren nach Anspruch 18, umfassend:

- a) Ablagern der flüssigen Probe in einer ersten Reaktionskammer,
- b) Hinzufügen von photonenemittierenden Zellen aus einem ersten Reservoir in eine zweite Reaktionskammer, wobei die Zellen einen oder mehrere Rezeptoren umfassen, die für eine Wechselwirkung mit einem Targetpartikel und Emittermolekülen geeignet sind, wobei das Binden des einen oder der mehreren Rezeptoren an das Targetpartikel zu einer Zunahme der Kalziumkonzentration in dem Zellplasma der Zelle führt, und wobei die Emittermoleküle Photonen in Reaktion auf die Zunahme der Kalziumkonzentration emittieren, wobei die zweite Reaktionskammer von der ersten Reaktionskammer durch eine steuerbare Membran isoliert ist;
- c) Lokalisieren der Targetpartikel innerhalb der ersten Reaktionskammer durch Zentrifugieren oder andere Mittel;
- d) Bewirken, dass die Membran sich auflöst;
- e) Lokalisieren der Emitterzellen innerhalb der ersten Reaktionskammer;
- f) Messen der Protonenemission der Zellen in dem Gemisch.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 oder 19, wobei es sich bei den emittierenden Zellen um B-Zellen handelt.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 oder 19, wobei das Aufbringen einer Zentrifugalkraft und das Messen der Photonenemission in einer einzelnen Vorrichtung und mit dem Probengemisch in einem einzelnen Probenbehälter durchgeführt wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 oder 19, wobei eine Vielzahl von Proben gleichzeitig hinsichtlich einer Vielzahl von Targetpartikeln analysiert wird.

Es folgen 23 Blatt Zeichnungen

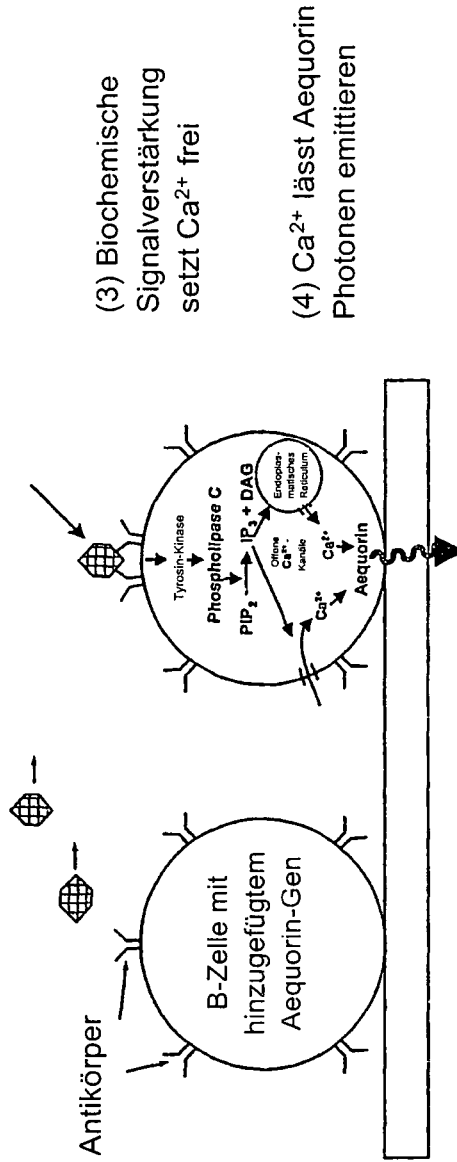
FIG. 1

# Sensorkonzept

## Zellbasierte Erkennung

- Spricht in Sekunden an
- Hohe Sensitivität
- Unterschiedliche B-Zellen sind für unterschiedliche Biowirkstoffe spezifisch

(1) Biowirkstoffe in Zellkulturflüssigkeit (2) B-Zell-Antikörper binden an Biowirkstoffe



(3) Biochemische Signalverstärkung setzt Ca<sup>2+</sup> frei

(4) Ca<sup>2+</sup> lässt Aequorin Photonen emittieren

(5) Photonen aus den Zellen bestimmen

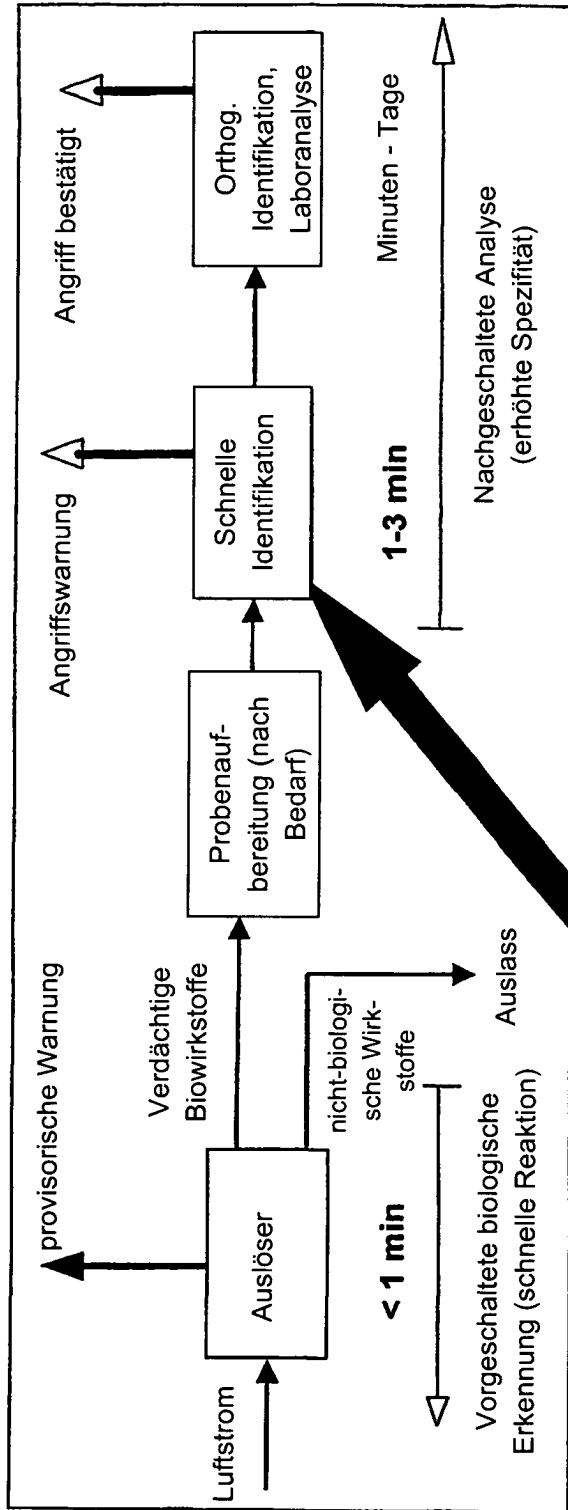
## Grundprinzip

- Einige Biowirkstoffe können auf einem Niveau von 1 - 10 Partikeln infizieren
- Es werden schnelle, empfindliche ID-Sensoren benötigt, um Angriffe mit niedriger Konzentration in Gegenwart typischer biologischer Hintergrundsignale zu detektieren



FIG. 2

# Allgemeiner Biosensoraufbau



## Ziele des Programms

- Schneller, sensibler Sensor zur Identifikation
- Stabil, widerstandsfähig gegen Kontamination

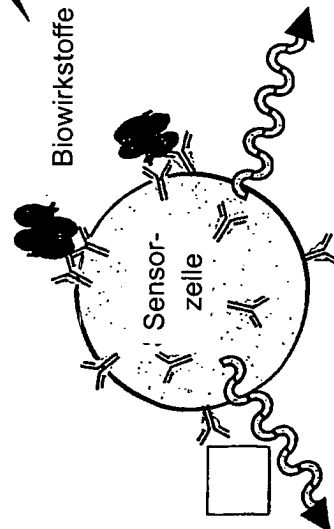


FIG. 3

# Erzeugung der Sensor-Zelllinien

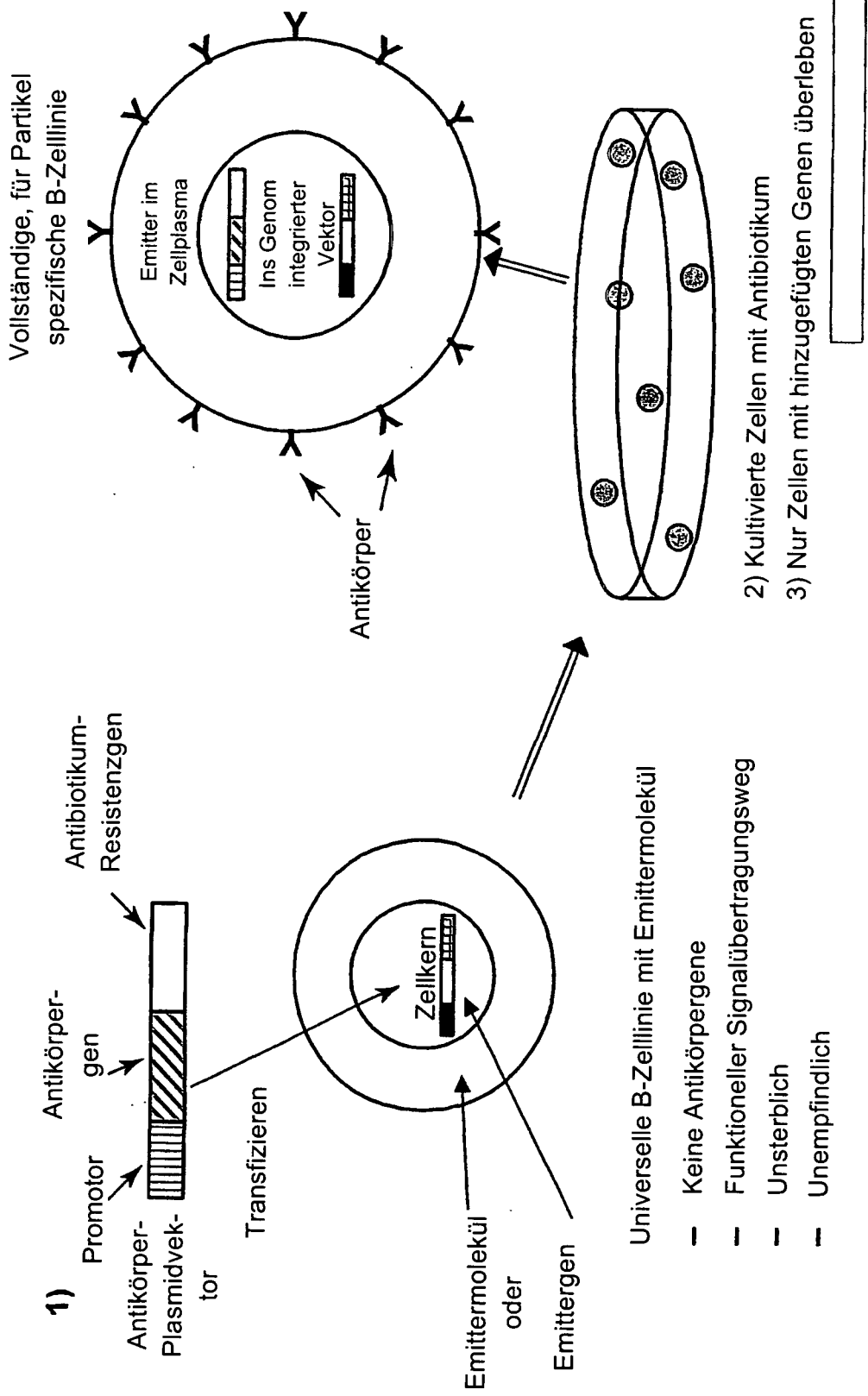
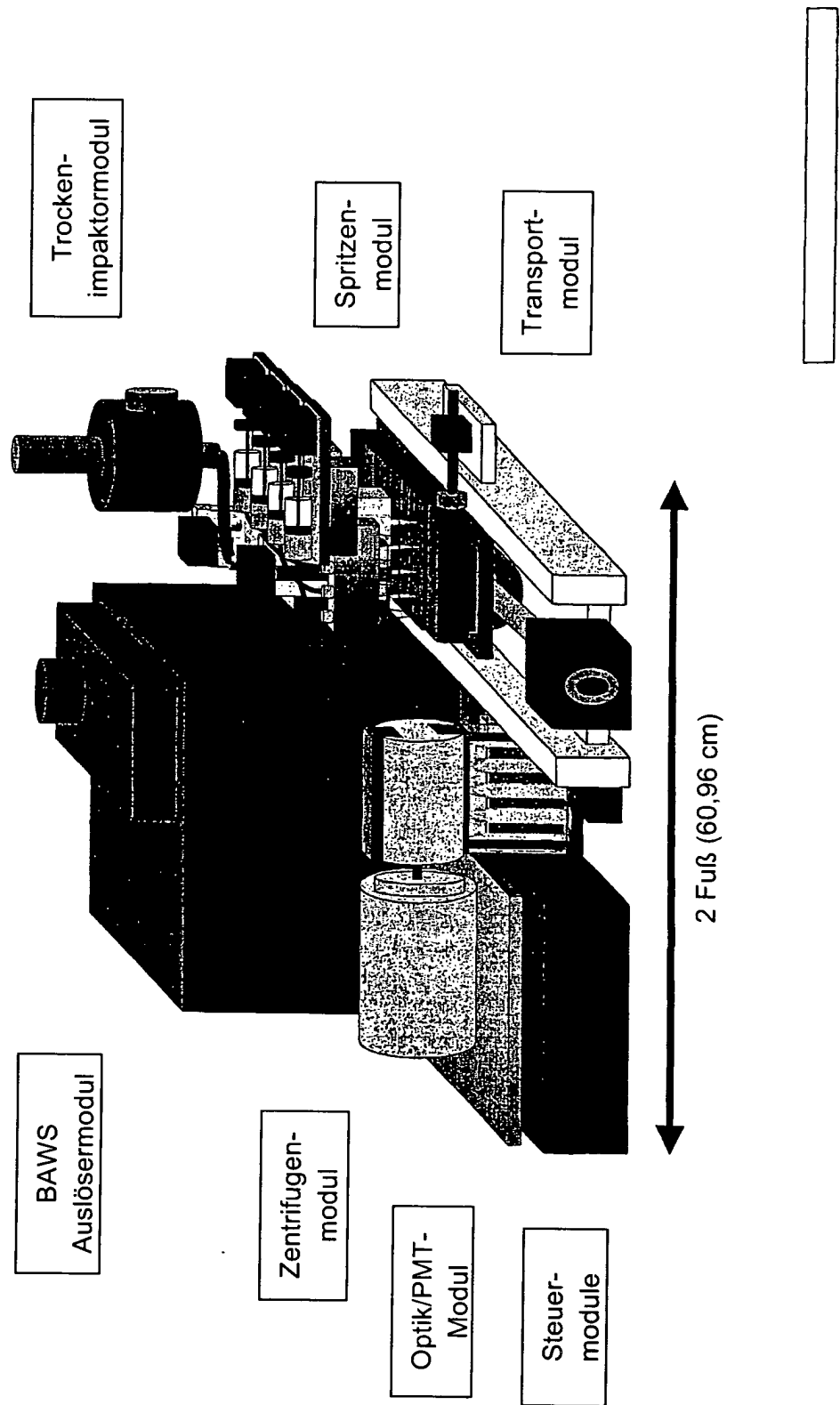


FIG. 4  
**Integriertes BAWs/Sensor-Konzept**



# FIG. 5 B-Zell-Reaktion auf Maul- und Klauenseuche-Virus

• Versuche wurden in der USDA BL-3- Einrichtung auf Plum Island durchgeführt

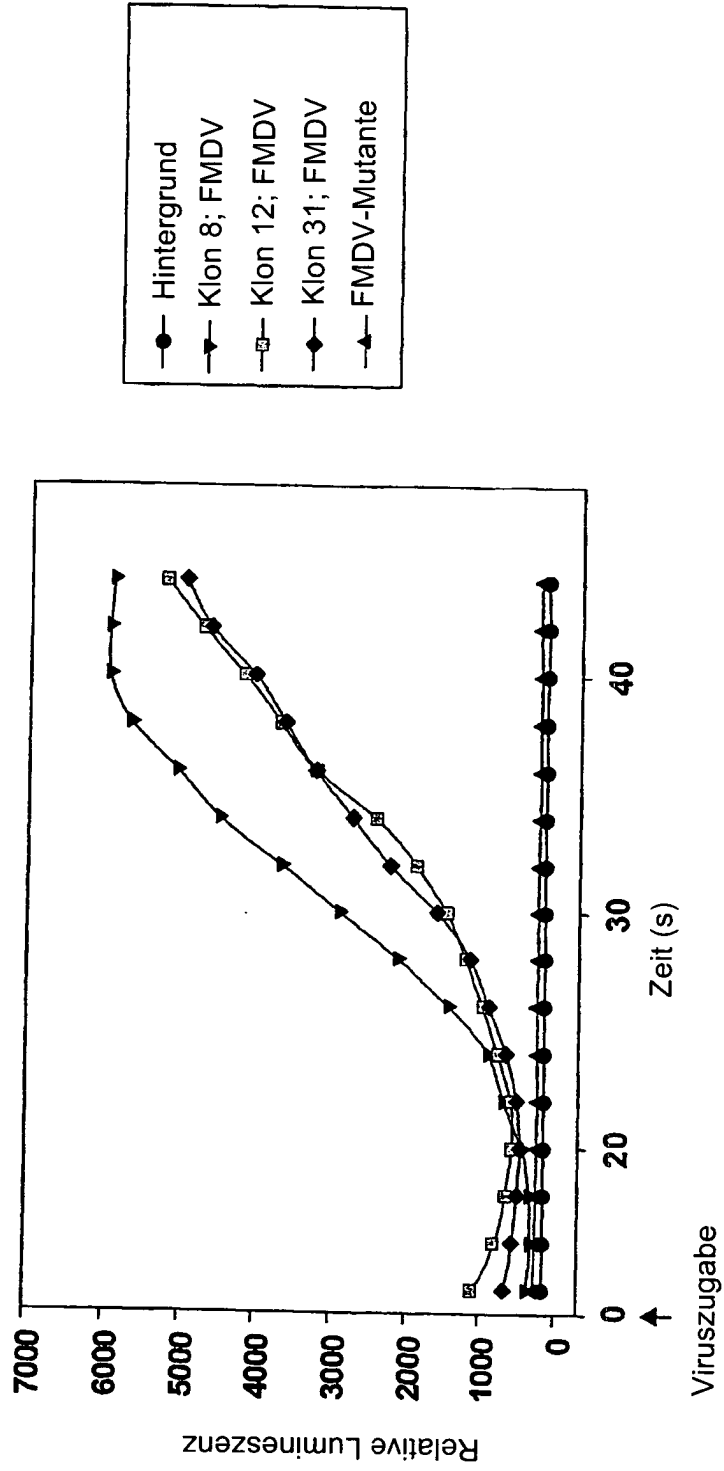
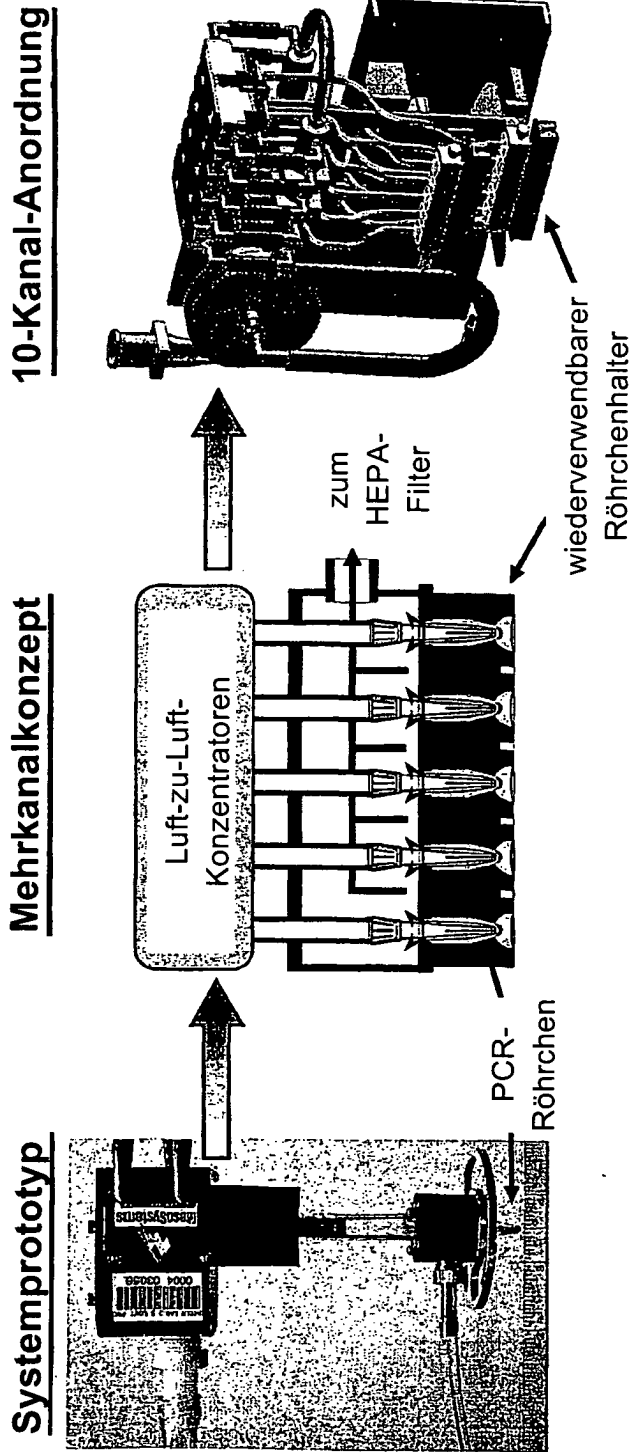


FIG. 6

# Konzept für Trockenimpaktormodul



- Luft-zu-Luft-Konzentratoren konzentrieren Partikel auf ein verringertes Luftvolumen
- Wiederverwendbarer Halter hält PCR-Röhrchen, die direkt als Bestätigungsproben verwendet werden können



**FIG. 7**  
**Aktive Antigenpräsentation mittels Zentrifugation**

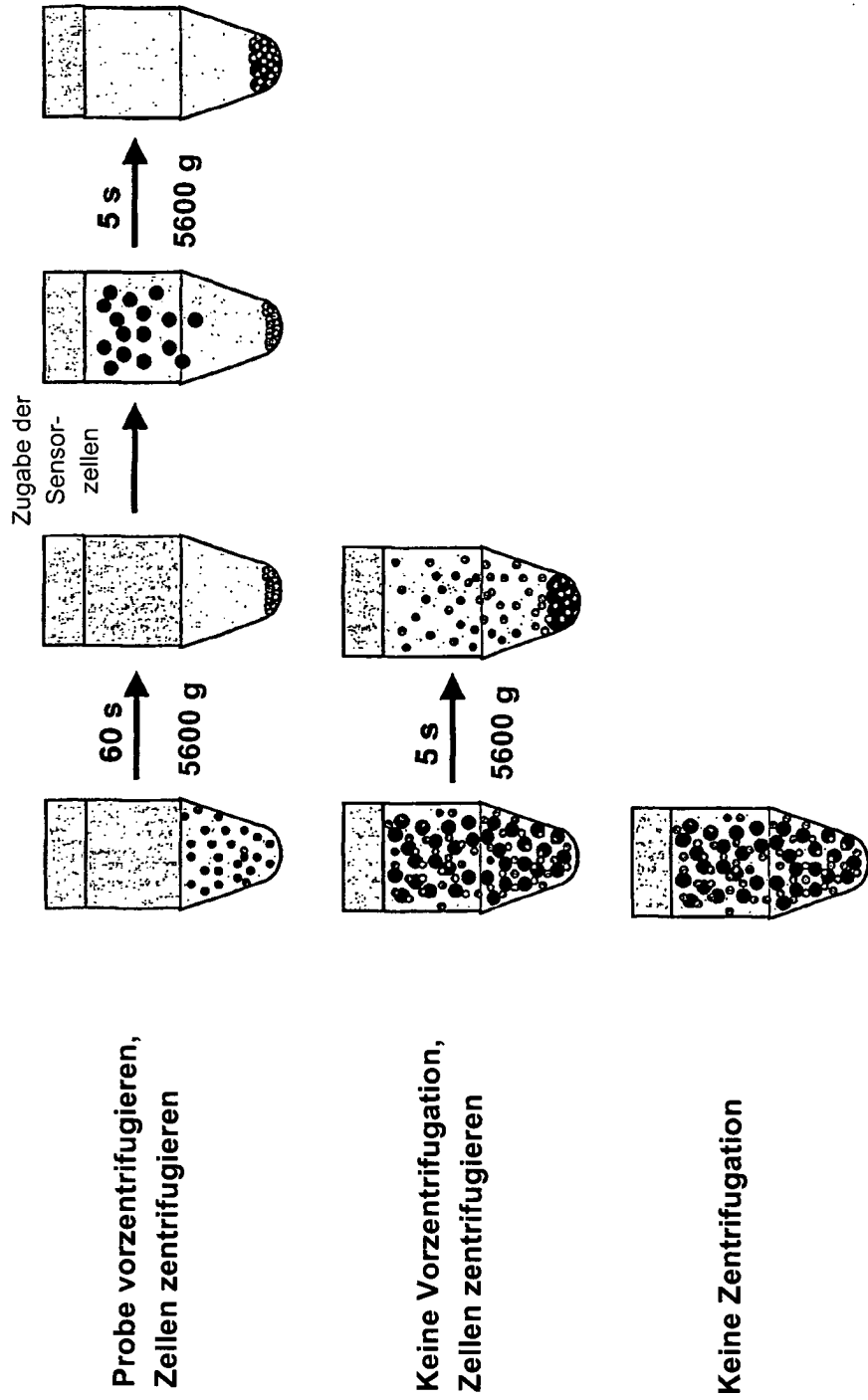
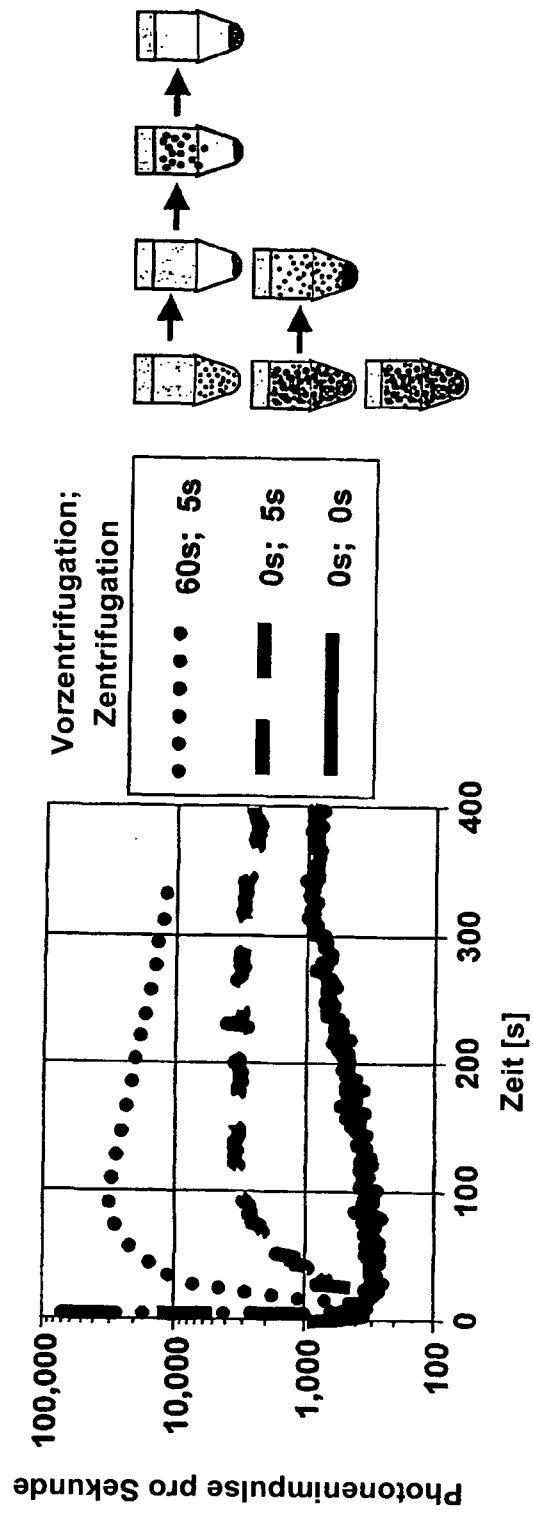


FIG. 8  
**Aktive Antigenpräsentation erhöht das Signal**



- Die gezeigten Ergebnisse beziehen sich auf eine Belastung mit  $5,3 \times 10^5$  getöteten Tularemia-Zellen
- Die verwendeten Zellen wurden zuvor unter Verwendung eines Standard-Luminometer-Assays (äquivalent zum Fall ohne Zentrifugation) als Negativ-Responder bewertet



FIG. 9

## Konzept für die automatisierte Zellabgabe

- Sensorzellen sind kompatibel mit der Abgabe bei Verwendung von Spritzenpumpen, automatischen Pipettierhilfen etc.
- Unterschiedliche Sensorzelltypen in individuellen, im voraus beladenen Spritzen
- Umweltüberwachung, um B-Zell-Leistungsfähigkeit zu erhalten
- Ein B-Zellen-Tröpfchen pro Test, hinzugefügt nach Aerosolsammlung

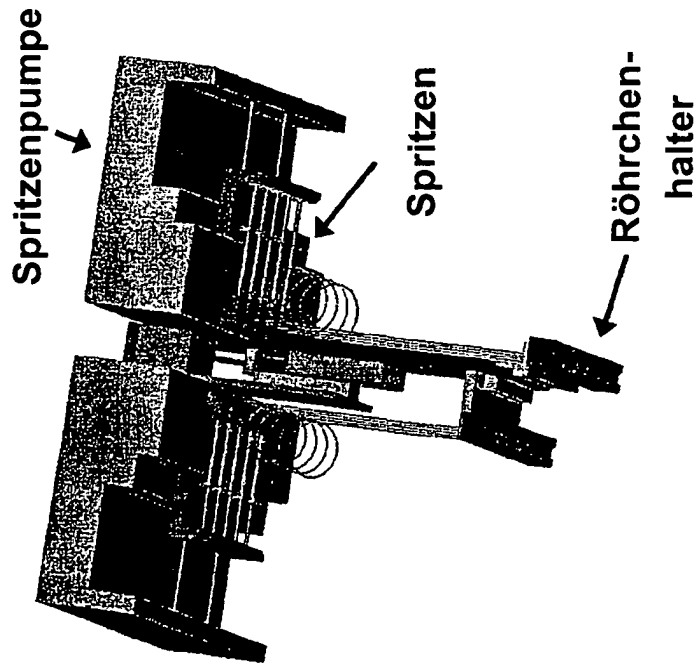




FIG. 10  
**Dosis-Wirkungs-Beziehung bei abgetöteten Tularemia-Zellen**

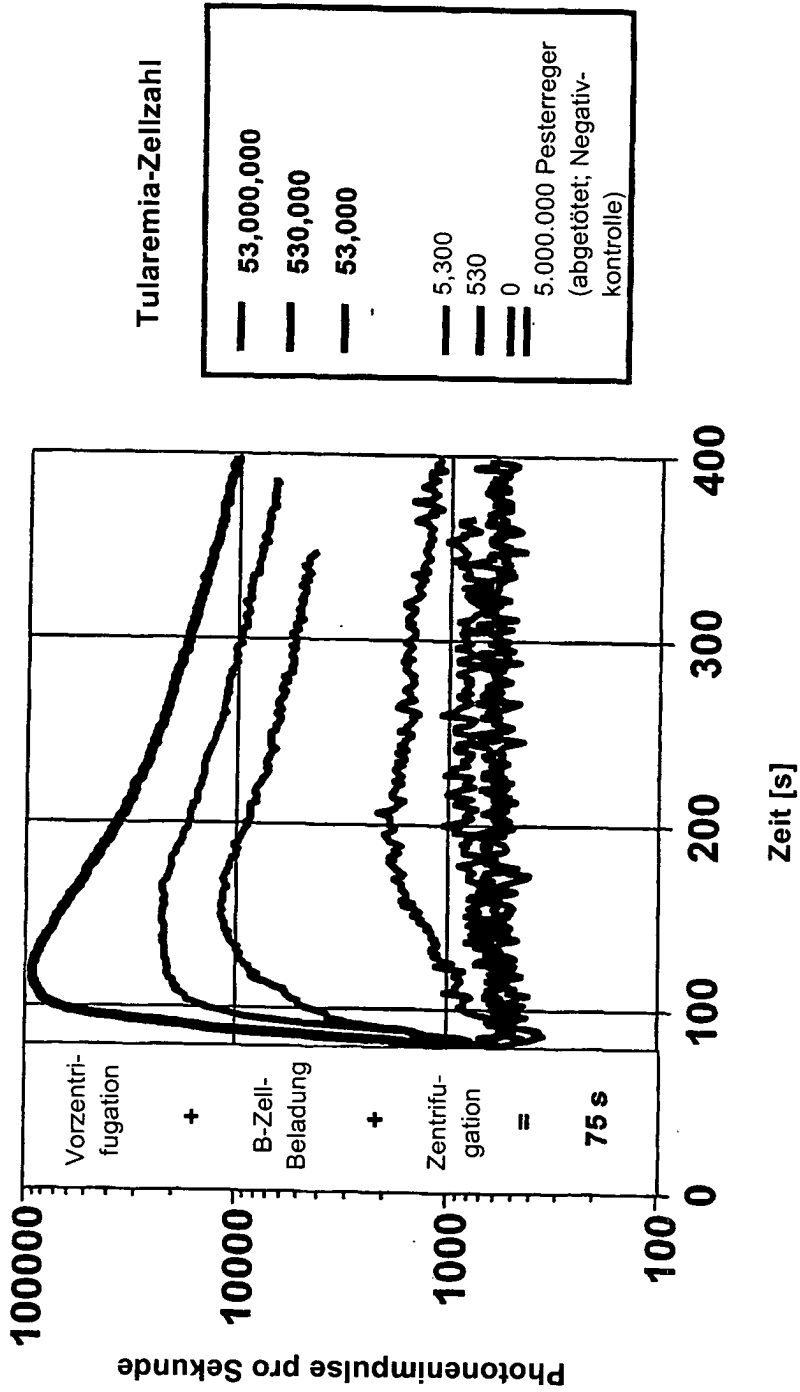
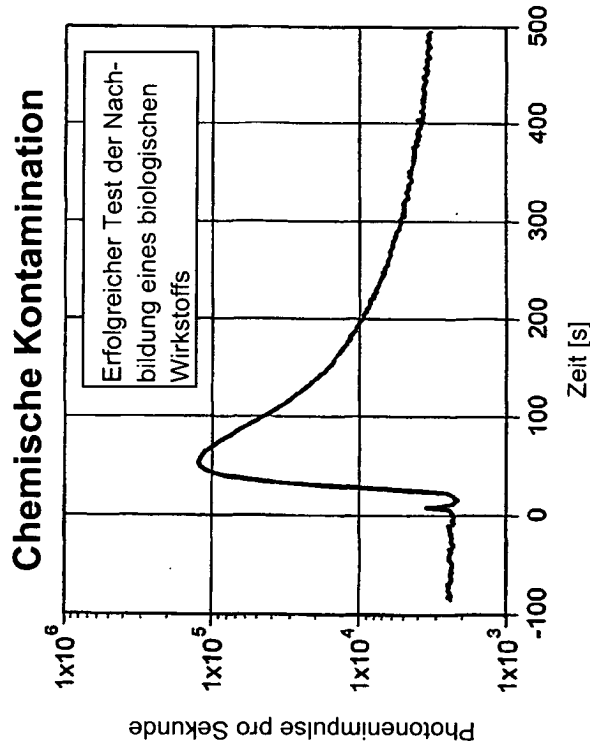


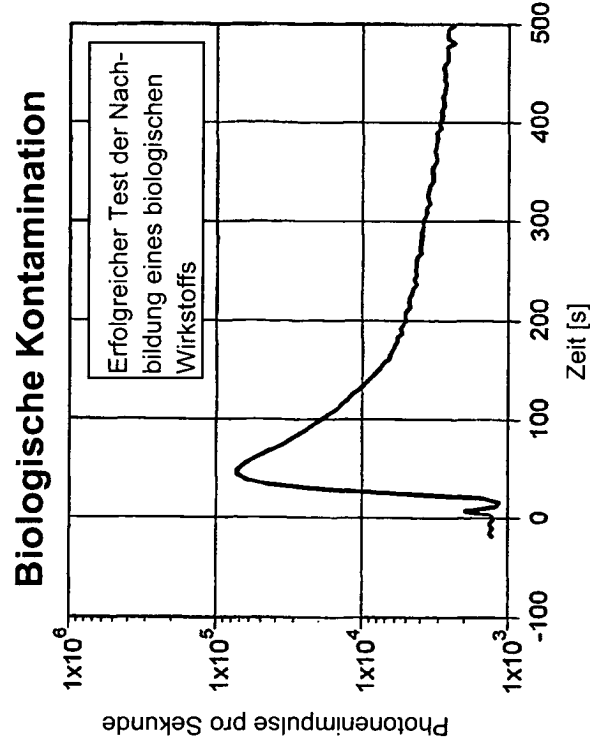
FIG. 11

# Widerstandsfähigkeit gegenüber Kontamination

• B-Zellen sind widerstandsfähig gegen Kontamination



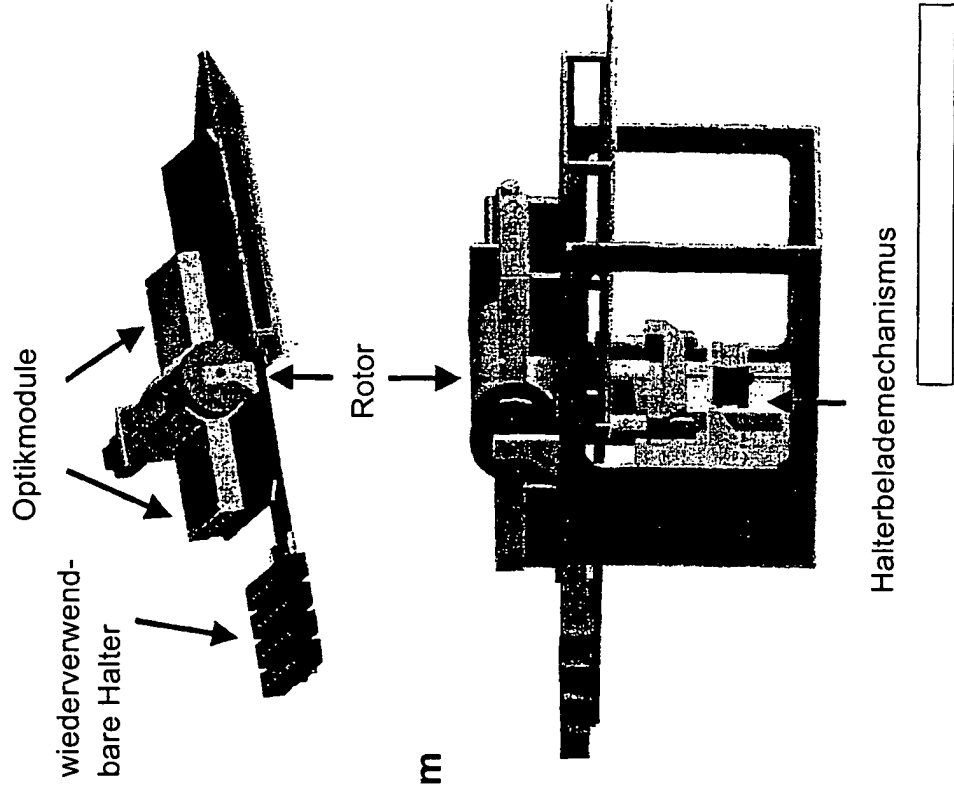
• 1 h Exposition gegen  
Dieselabgasextrakt von voller Stärke



• Kontamination mit  $10^7$  *E. coli*-  
Bakterien



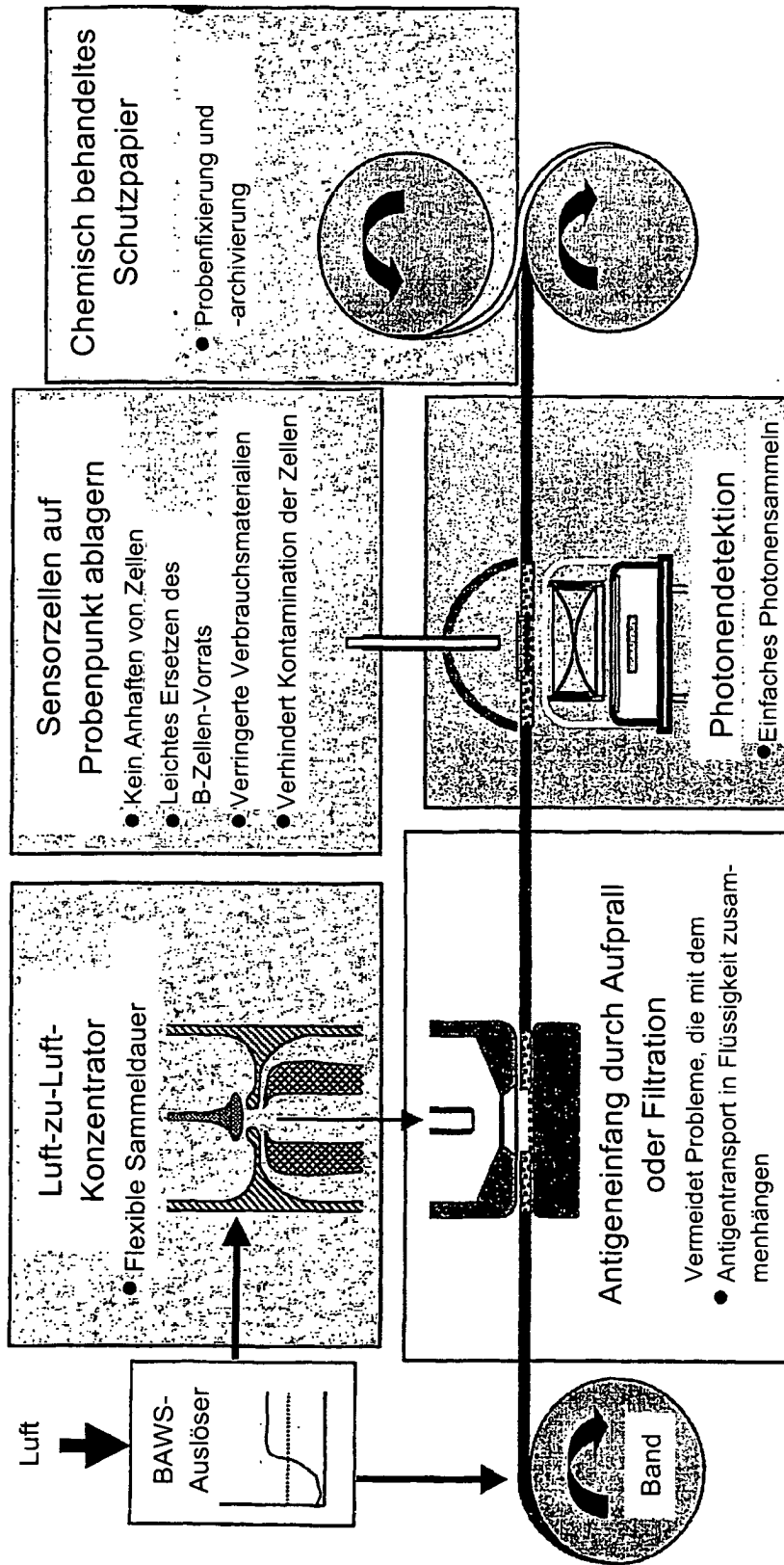
FIG. 12  
**Konzept eines automatisierten Zentrifugenmoduls**



- Zellen werden durch eine 5-sekündige Zentrifugation in die Partikel gedrückt
- Ein indizierter Motor gleicht die Proben zur Signalerfassung mit dem Optikmodul ab
- Lineare Anordnung ist offen für Automatisierung und Maßstabsvergrößerung

FIG. 13

# Sensorkonzept: Direkte Luft-Impaktierung



• Anordnung ist für die gleichzeitige Detektion mehrerer Wirkstoffe geeignet



FIG. 14

# Konzept für einen B-Zellenidentifikator

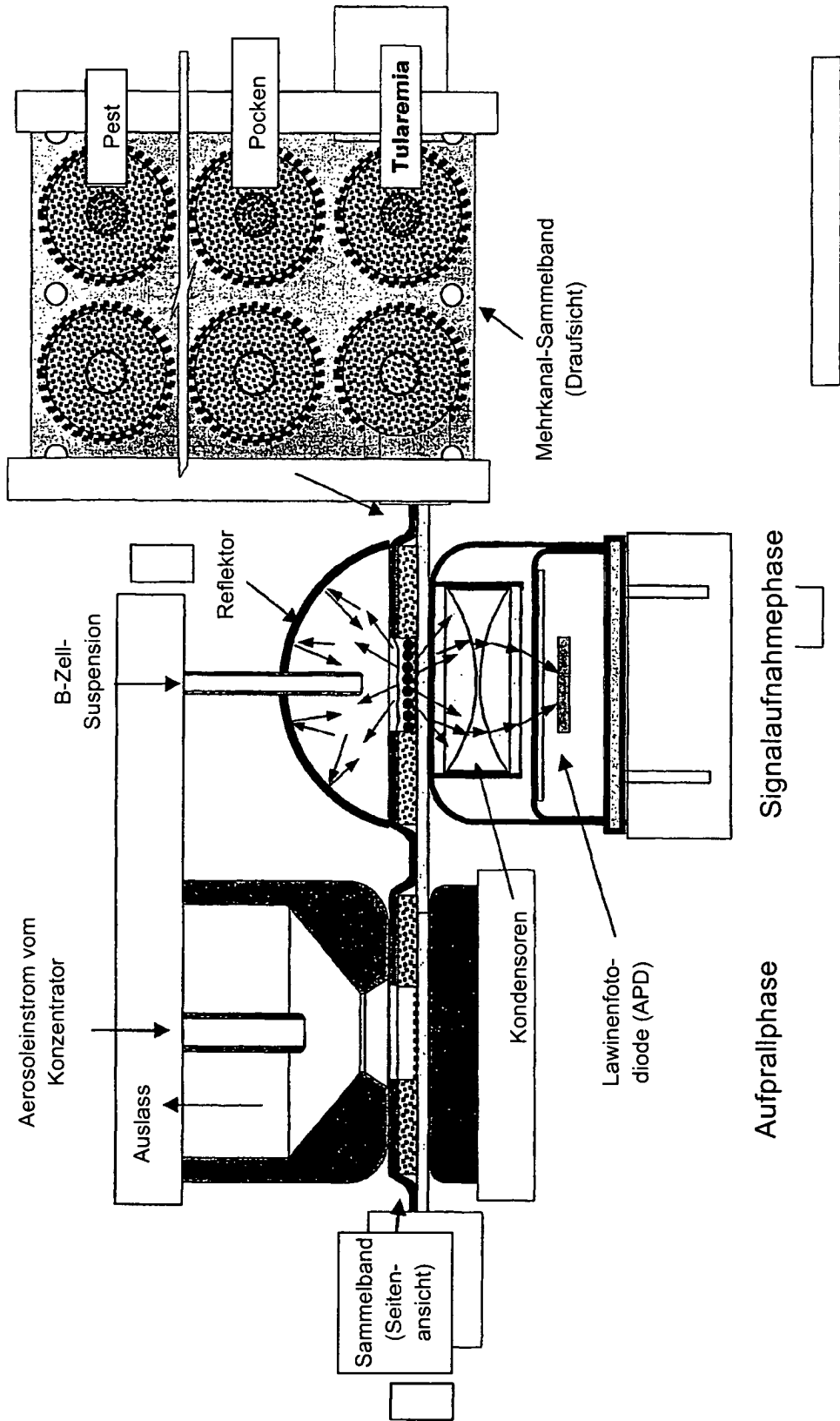


FIG. 15

## Konzept für ein Optik/PMT-Modul

- Komplementäre Formen erleichtern die Ausrichtung und schützen die Optik vor Streulicht
- Integrierte Reflektoren und Linsen verbessern die Lichterfassung
- 10 gleichzeitige Tests unter Verwendung zweier dieser Module pro Rotor
- Signal wird in weniger als einer Minute nach Sammeln der trockenen Probe erhalten

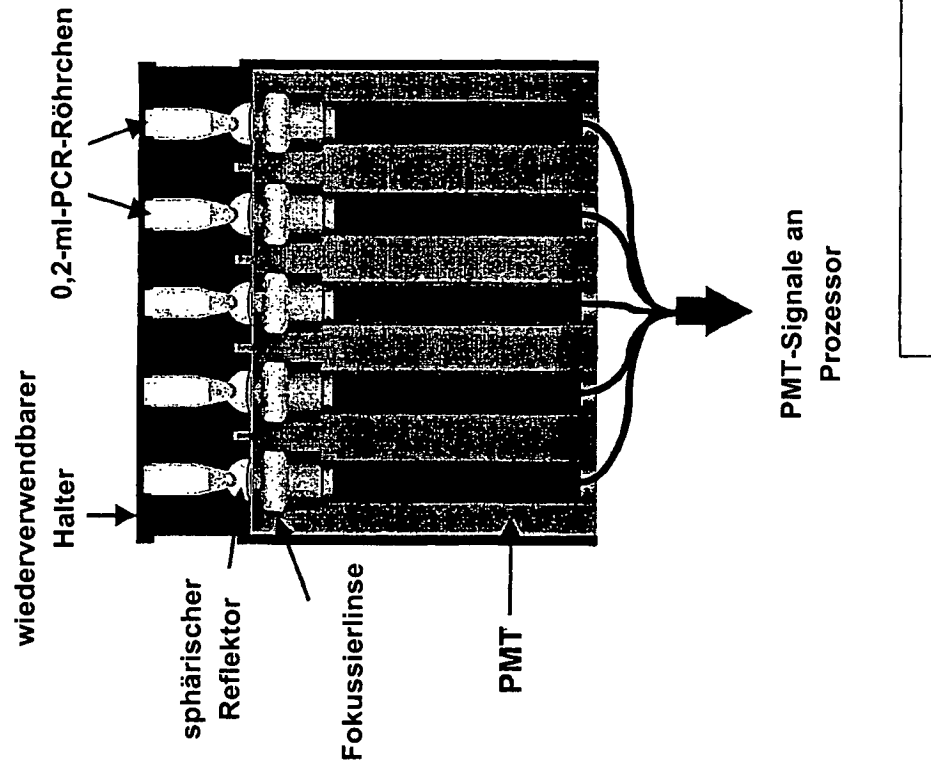


FIG. 16

# Wirkstoff-Abgabesystem mit Direktimpaktierung für den Sensorzellenidentifikationsensor

- Direkte Luftimpaktierung lagert Wirkstoffe in Bändern oder Platten mit mehreren Vertiefungen ab
- Hohe Probenkonzentration durch Luft-zu-Luft-Konzentrator und kleine Flüssigkeitsvolumina ( $\mu\text{l}$ )
- Schnelle Identifizierung mit geringem Materialverbrauch

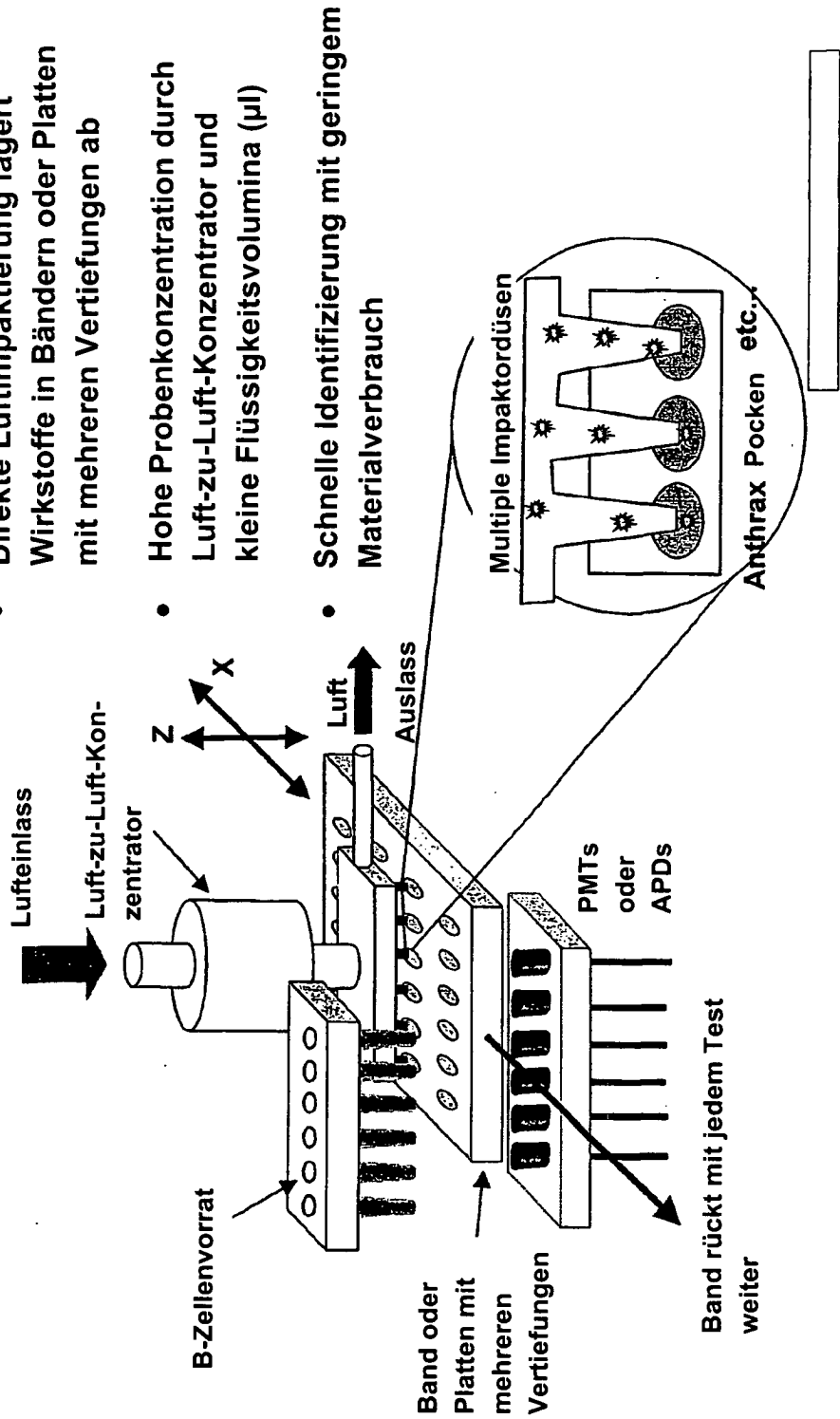


FIG. 17  
**Konzept für eine einfache Mehrkanalzentrifuge**

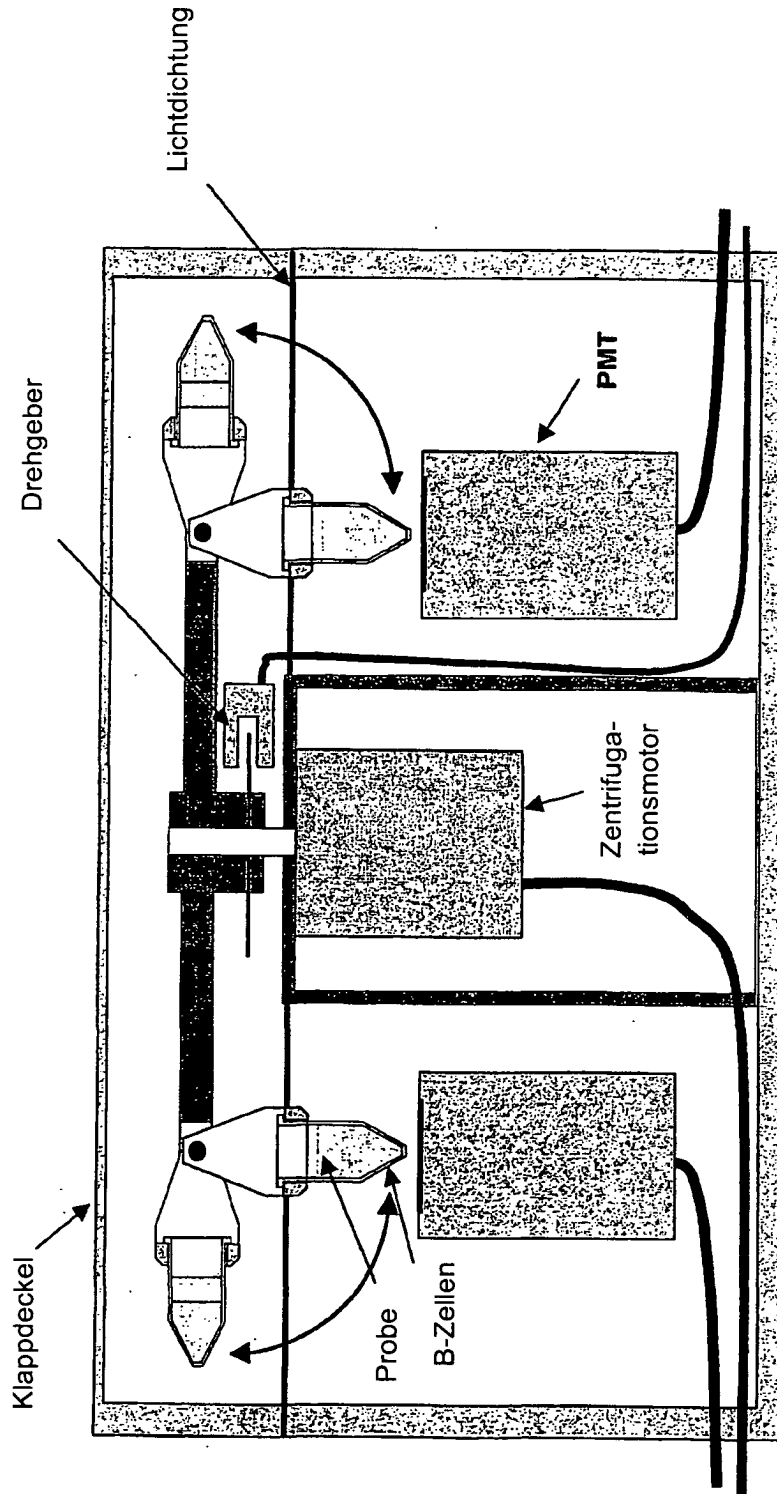




FIG. 18  
**Konzept für Nasszentrifuge/Kompaktor**

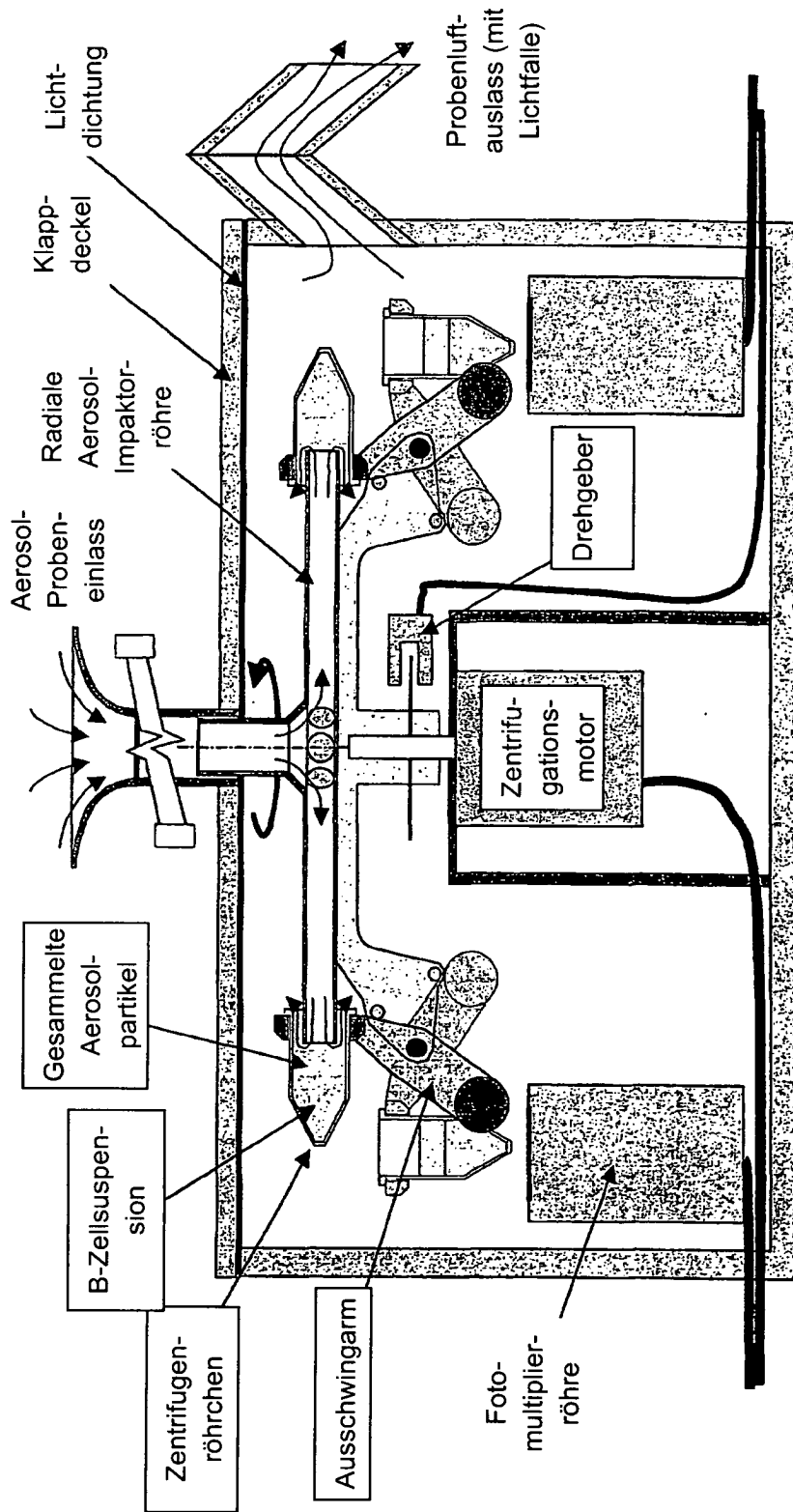


FIG. 19

# Konzept für Nasszentrifuge/Kompaktor (b)

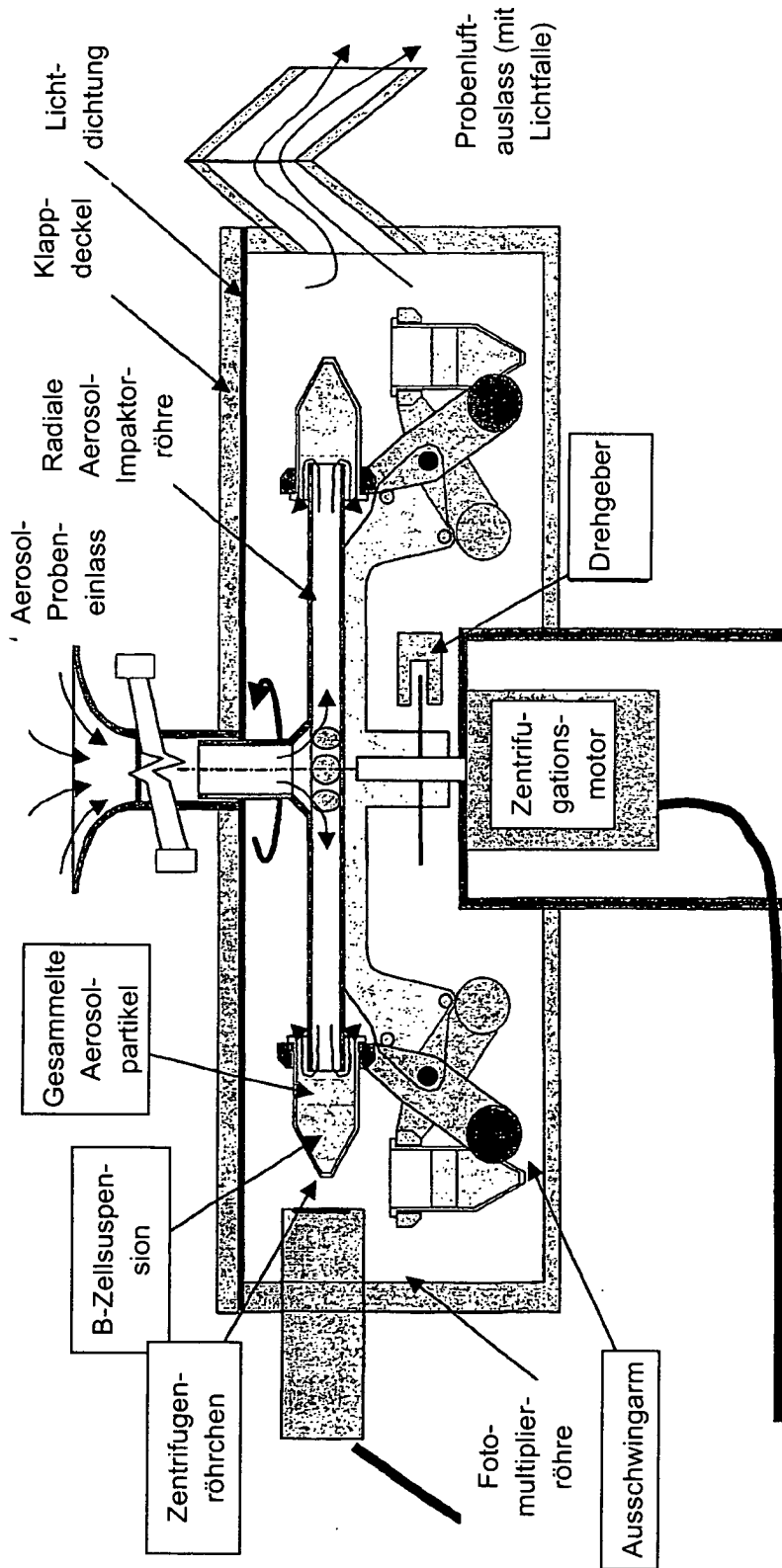
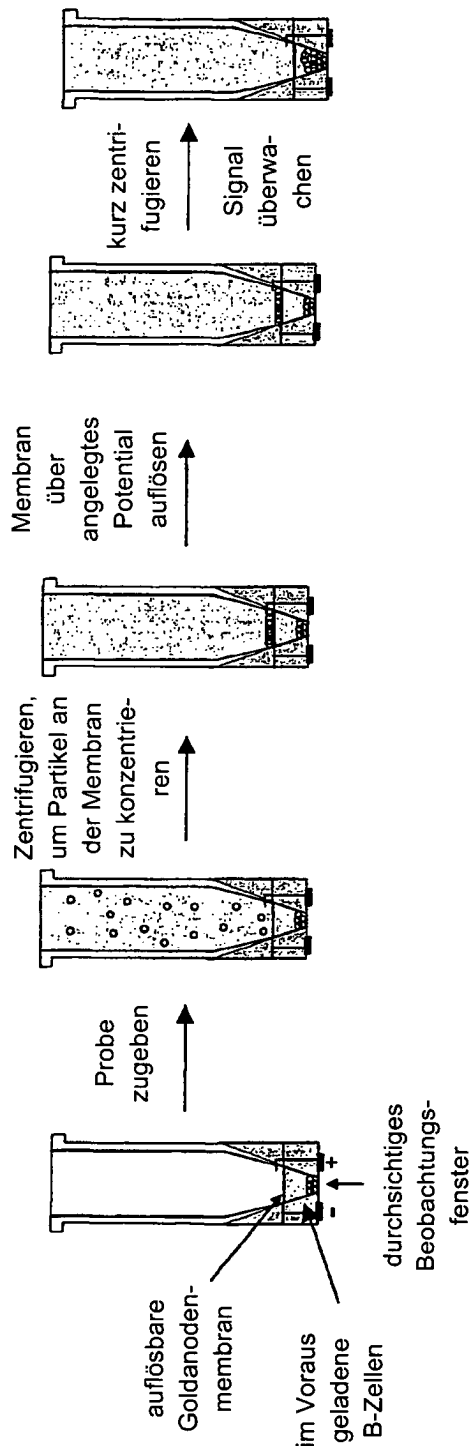


FIG. 20

# Konzept für ein speziell angefertigtes Röhrchen



Nach einer Medikamentenabgabevorrichtung geformte, sich auflösende Goldmembran, beschrieben von Langer und Mitarbeitern; Angewandte Chemie Internationale Ausgabe, Volume 39, Seiten 2396-2407 (2000) UND Nature Vol. 397, Seiten 335-338 (1999)



*FIG. 21*  
**Konzept für einen integrierten Trockenimpaktor/Sensor**

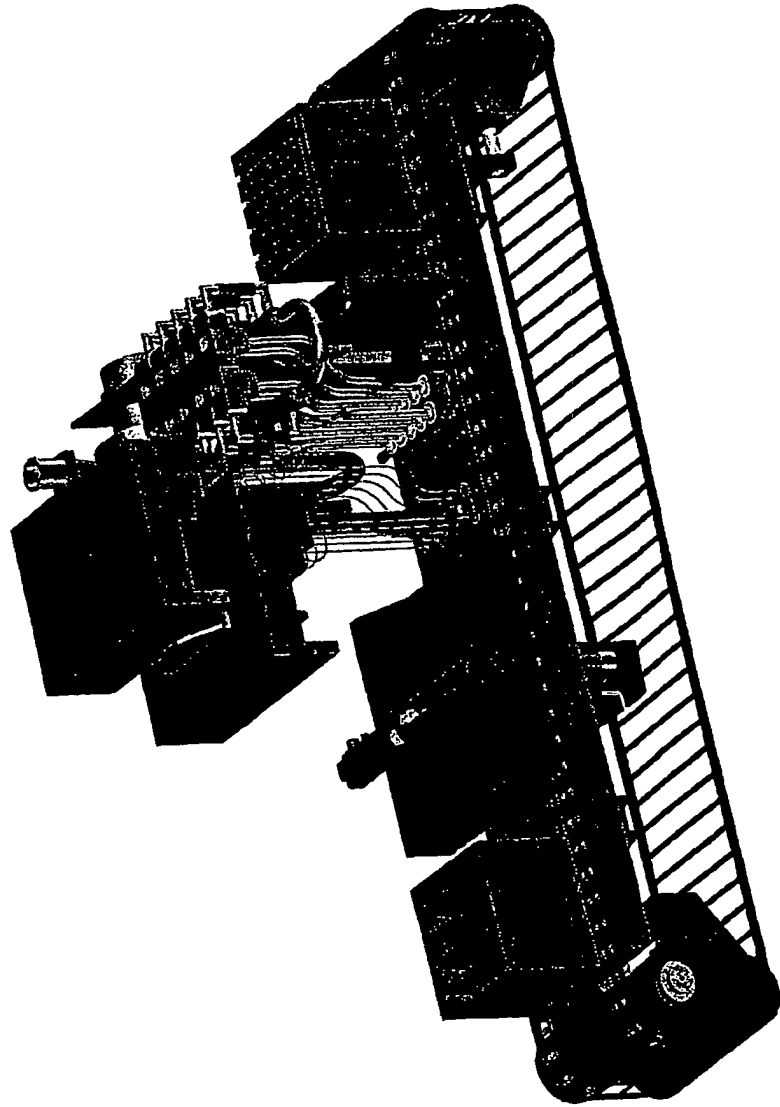


FIG. 22

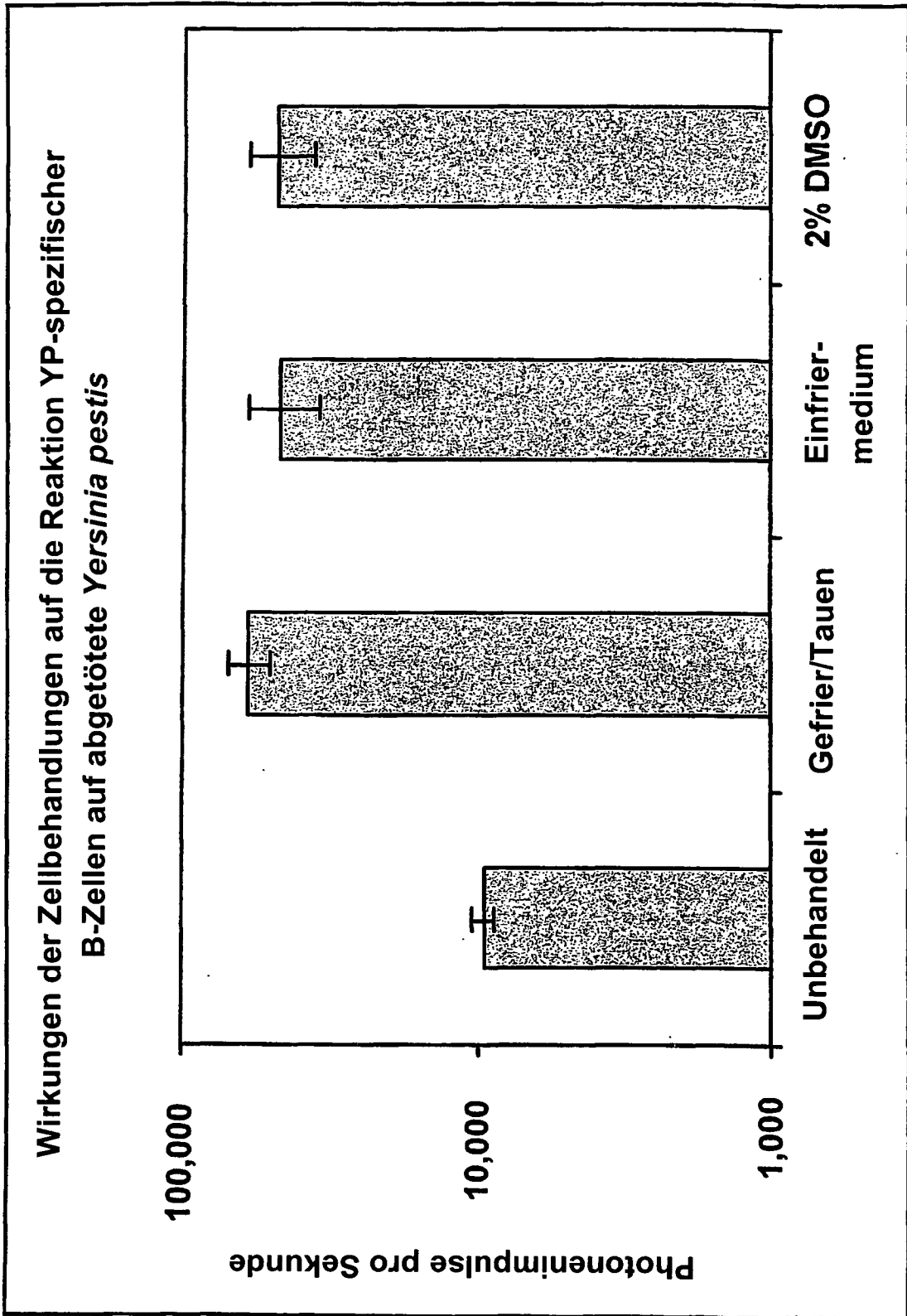
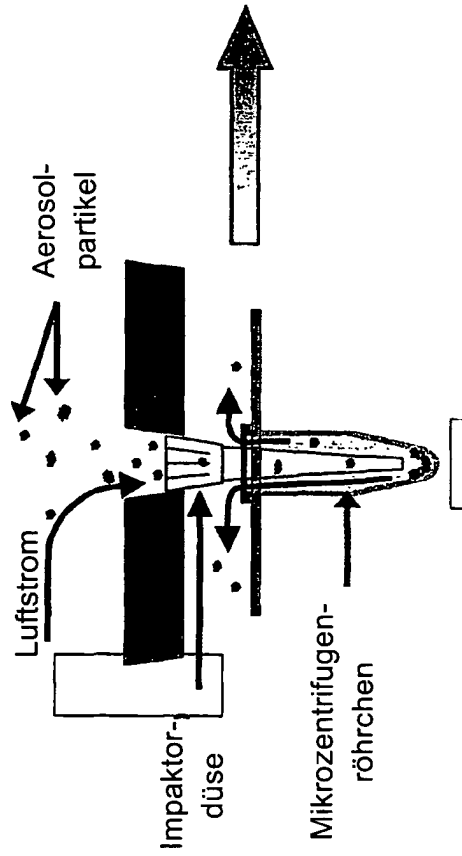


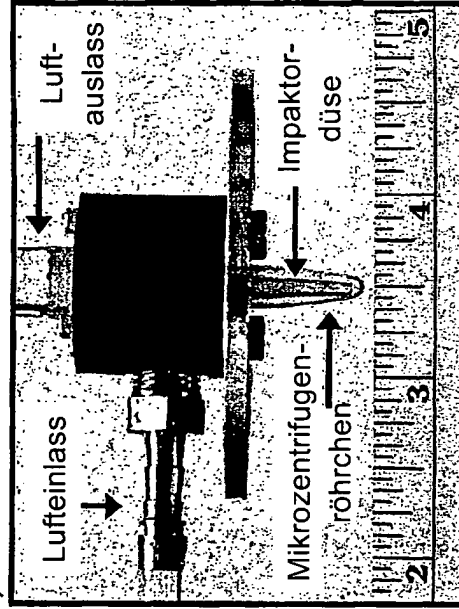
FIG. 23

# Trockene Aerosolsammlung

## Konzept



## Trockenkollektorprototyp



- Impuls der Partikel erzwingt Kontakt mit Röhrchenoberfläche, wo sie zurückgehalten werden
- Beseitigung der Sammelflüssigkeit vereinfacht das System und verbessert die Zuverlässigkeit
- Konstruiert für Mikrozentrifugenröhrchen unter Beachtung der Betriebskosten