

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
04. Juni 2020 (04.06.2020)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2020/109047 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/081614

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. November 2019 (18.11.2019)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2018 130 134.0
28. November 2018 (28.11.2018) DE

(71) Anmelder: TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN [DE/DE]; Helmholtzstraße 10, 01069 Dresden (DE). UNIVERSITÄT LEIPZIG [DE/DE]; Ritterstraße 26, 04109 Leipzig (DE).

(72) Erfinder: RÖDEL, Gerhard; c/o Technische Universität Dresden, Helmholtzstraße 10, 01069 Dresden (DE). OSTERMANN, Kai; c/o Technische Universität Dresden, Helmholtzstraße 10, 01069 Dresden (DE). DÖRING, Julia; c/o Technische Universität Dresden, Helmholtzstraße 10, 01069 Dresden (DE). DAHMANN, Christian; c/o Technische Universität Dresden, Helmholtzstraße 10, 01069 Dresden (DE). POMPE, Tilo; c/o Universität Leipzig, Johannisallee 21-23, 04103 Leipzig (DE). RETTKE, David; c/o Universität Leipzig, Johannisallee 21-23, 04103 Leipzig (DE). MARTIN, Steve; c/o Universität Leipzig, Johannisallee 21-23, 04103 Leipzig (DE).

(74) Anwalt: KAILUWEIT & UHLEMANN PATENTANWÄLTE PARTG MBB; Bamberger Straße 49, 01187 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

(54) Title: METHOD, SURFACE, PARTICLE AND KIT FOR THE DETECTION OF ANALYTES IN SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN, OBERFLÄCHE, PARTIKEL UND KIT ZUM NACHWEIS VON ANALYTEN IN PROBEN

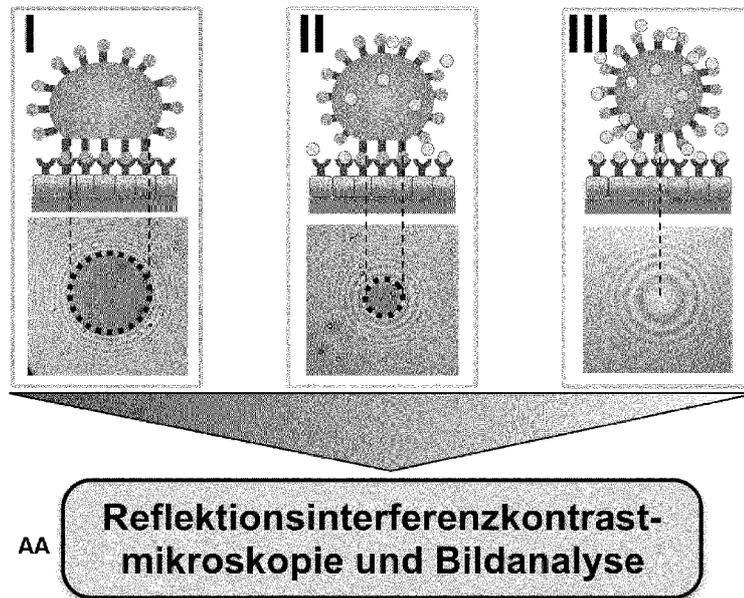


Fig. 1

AA Reflection interference contrast microscopy and image analysis

(57) Abstract: The invention relates to a method, a surface, a particle and a kit for the detection of low-molecular analytes, such as plant protection products, in samples. The invention particularly relates to a method for the detection of glyphosate by means of protein-functionalized surfaces and functionalized particles by way of reflection interference contrast microscopy (RICM).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Oberfläche, einen Partikel sowie ein Kit zum Nachweis von niedermolekularen Analyten, wie etwa Pflanzenschutzmitteln in Proben. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Glyphosat durch protein-funktionalisierte Oberflächen und funktionalisierten Partikeln mittels Reflexionsinterferenzkontrast-Mikroskopie (RICM).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2020/109047 A2

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

Verfahren, Oberfläche, Partikel und Kit zum Nachweis von Analyten in Proben

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Oberfläche, einen Partikel sowie einen Kit zum Nachweis von niedermolekularen Analyten, wie etwa Pflanzenschutzmitteln, in Proben. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Glyphosat durch protein-funktionalisierte Oberflächen und funktionalisierte Partikel mittels Reflexionsinterferenzkontrastmikroskopie (RICM).

Der Nachweis von niedermolekularen Analyten ist aktuell sehr aufwändig. Insbesondere der Nachweis von Pflanzenschutzmitteln in Trinkwasser, Nahrungsmitteln und Bodenproben und deren gesundheitliche Auswirkungen sind aktuell von hohem Interesse. Problematisch erscheint dabei vor allem die Verunreinigung von Nahrungsmitteln inklusive Trinkwasser mit Glyphosat.

Die Detektion von Verunreinigungen mit Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln erfolgt nach der Multimethode DFG S19, wobei zur Probenvorbereitung verschiedene Extraktionsschritte erfolgen und nachfolgend die labortechnische Analyse mittels LC-MS oder GC-MS erfolgt.

Weiterhin ist aus der EP2 752 664 A1 ein Verfahren zur Detektion von Analyten bekannt. Dabei erfolgt die Immobilisierung eines Analyten an Hydrogelpartikel, welche nachfolgend mit einem auf einer Oberfläche immobilisierten Liganden interagieren. Abhängig vom Grad der Interaktion erfolgt eine Deformierung der Hydrogelpartikel durch Anlagerung an die Oberfläche, sodass die Deformierung mittels Reflexionsinterferenzkontrastmikroskopie erfolgt. Dadurch kann eine Detektion bzw. Charakterisierung des Analyten erfolgen.

US 2014/0255916 A1 offenbart ein Verfahren und einen Kit zur Messung der Fähigkeit einer Testprobe, die Bindung eines Pathogen-Rezeptors, bevorzugt ein Sialinsäurerezeptor, zu einem Wirtszellliganden des Pathogens zu inhibieren. Das Verfahren umfasst einen immobilisierten Rezeptor, welcher mit einer Testprobe und einem Partikelreagenz enthaltend den Liganden, bevorzugt Sialinsäure, kontaktiert wird, wobei das Partikelreagenz ein biologisches Reagenz, ausgewählt aus Erythrozyten, Erythrozytenvesikeln, Erythrozytengerüstzellen, Membranfragmenten, Membranvesikeln, Proteinen und Kombinationen, insbesondere in Form von Kolloiden, Beads oder Kombinationen daraus sein kann; wobei der Partikel beschichtet und/oder magnetisch, elektrisch leitfähig und/oder halbleitend sein kann. Anschließend erfolgt die Messung der Menge des an der Oberfläche gebundenen Partikelreagenzes.

Im Stand der Technik sind zudem verschiedene Verfahren zur Bestimmung von Glyphosat bekannt.

So offenbart die CN 102207495 A ein Verfahren zur Bestimmung des Glyphosat-Gehalts in Bodenproben mittels HPLC.

WO 00/14538 offenbart einen Linker-unterstützten Immunoassay für Glyphosat sowie ein Verfahren zur Herstellung von Glyphosat-Antikörpern umfassend die Herstellung von Glyphosat-Konjugaten mit einem Trägermolekül, bevorzugt Schweine-Thyreoglobulin, Rinderserumalbumin, humanes Serumalbumin, Ovalbumin oder Schlitzschnecken-Hämocyanin; und Immunisierung eines Wirts mit dem Konjugat. Der Linker-unterstützte Immunoassay zur Detektion des Analyten in einer Testprobe umfasst die Herstellung eines Linker-Analyt-Konjugats mittels einer Testprobe, das Kontaktieren mit einem Glyphosat-Antikörper und Kontaktieren der Testprobe mit einer Festphase mit einem immobilisierten zweiten Trägermolekül, welches kovalent an Glyphosat, einem Glyphosatderivat oder einem Glyphosatsalz gekoppelt ist. Das zweite Trägermolekül ist aus Schweine-Thyreoglobulin, Rinderserumalbumin, humanen Serumalbumin, Ovalbumin oder Schlitzschnecken-Hämocyanin ausgewählt, aber unterscheidet sich vom ersten Trägermolekül, welches zur Herstellung des Glyphosat-Antikörpers verwendet wird. Anschließend wird auf der Festphase die Menge an gebundenem Antikörper bestimmt, welche indirekt proportional zur Menge an Glyphosat in der Testprobe ist. Bevorzugt erfolgt die Detektion mittels enzymatischem Nachweis, wobei der Antikörper mit Biotin konjugiert ist und ein gelabeltes Enzym dazugegeben wird, welches Biotin bindet. Das Enzym ist bevorzugt alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase.

Auch die WO 2008118899 A1 offenbart ein Verfahren zum Nachweis von Glyphosat mittels LC/GC gekoppeltem MS. Alternativ werden auch Nachweismethoden mittels Biolumineszenz (WO2010104861A1) und ELISA (WO2000014538A1) beschrieben.

Die WO 2018057647 A1 beschreibt einen Assay für einen Biochip, bei dem Pestizide auf einer Sensorplattform detektiert werden können. Der Nachweis basiert dabei auf der Amplifikation von korrespondierenden Nukleinsäuren, was zu deutlich langen Analysezeiten im Bereich mehrerer Stunden führt.

US 2005/0118665 A1 offenbart ein Verfahren zur Bestimmung einer enzymatischen Reaktion, wobei mindestens ein Protein und mindestens eine Substanz auf einem festen Träger in einem Abstand ausreichend für eine enzymatische Reaktion durch kovalente Bindung oder durch Einsatz eines Fusionsproteins, bevorzugt mit einem His-Tag und einer Nickel-beschichteten Oberfläche; immobilisiert werden und unter Bedingungen für eine enzymatische Reaktion

inkubiert werden. Bevorzugt ist die Substanz ein bekanntes Substrat für eine untersuchte enzymatische Reaktion und das Protein wird auf eine enzymatische Aktivität untersucht. Bevorzugt ist das Enzym eine Oxidoreduktase, eine Transferase, eine Hydrolase, eine Lyase, eine Isomerase oder eine Ligase.

DE 10 2011 089 241 B3 beschreibt ein Verfahren zur Beschichtung eines Substrats mit einer Hydrophobinbilage und ein Substrat mit einer Hydrophobinbilagenbeschichtung. Weiterhin offenbart DE 10 2011 089 241 B3 ein mit einem Hydrophobinfusionsprotein beschichtetes Substrat. Bevorzugt umfasst das Hydrophobinfusionsprotein eine funktionelle Domäne, wobei die funktionelle Domäne eine Proteindomäne mit Enzymaktivität sein kann.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten anzugeben, welches die Nachteile im Stand der Technik überwindet.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren nach Anspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zum Nachweis von Analyten vorgeschlagen, umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer Oberfläche mit einem immobilisierten Analytbindungspartner,
- Kontaktieren des Analytbindungspartners mit einer Probe enthaltend den Analyten, wobei der Analyt mit dem Analytbindungspartner interagiert,
- Kontaktieren des Analytbindungspartners mit einem Kompetitor, wobei der Kompetitor an einen Partikel immobilisiert ist und mit dem Analytbindungspartner interagiert,
- Detektion der an den Analytbindungspartner gebundenen Kompetitoren,

wobei der Analyt Glyphosat ist,

wobei der Analytbindungspartner als Analytbindungsstelle das aktive Zentrum des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) aufweist, und

wobei der Partikel deformierbar ausgebildet ist.

Unter niedermolekularen Analyten werden Stoffe oder Moleküle mit einer Molmasse von <800 g/mol verstanden.

In Ausführungsformen der Erfindung erfolgt die Kontaktierung des Analytbindungspartners mit dem Analyten vor der Kontaktierung mit dem Partikel für einen Zeitraum von 1 min bis 30 min, vorzugsweise 1 min bis 20 min, besonders bevorzugt 1 min bis 10 min, ganz besonders bevorzugt 1 min bis 7 min.

In einer alternativen Ausführungsform erfolgt eine gleichzeitige Kontaktierung des Analytbindungspartners mit dem Analyten und dem Partikel.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Partikel ein funktionalisierter Partikel, wobei die Oberfläche des Partikels eine Funktionalisierung aufweist. Die Funktionalisierung dient dabei der Anbindung des Kompetitors. Beispielsweise kann die Funktionalisierung durch chemische Gruppen erfolgen.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Partikel ein Hydrogelpartikel.

In Ausführungsformen der Erfindung hat der Partikel einen Durchmesser von 10 μm bis 100 μm , besonders bevorzugt ein Durchmesser von um 25 μm .

In Ausführungsformen der Erfindung weist der Partikel ein Elastizitätsmodul im Bereich von 10 kPa bis 100 kPa, besonders bevorzugt im Bereich von 15 kPa bis 50 kPa auf. So wird vorteilhaft eine hohe Sensitivität sichergestellt. Gleichzeitig wird so eine ungleichmäßige Deformation der Partikel ausgeschlossen.

Die Ausführungsformen in Durchmesser und Elastizitätsmodul (hier Youngscher Elastizitätsmodul) der Partikel bestimmen unter anderem die Sensitivität und Zuverlässigkeit des Analyseverfahrens, wobei der Durchmesser durch optische Hellfeldmikroskopie und das Elastizitätsmodul aus Kraft-Abstands-Kurven der Rasterkraftspektroskopie bestimmt werden können.

In Ausführungsformen der Erfindung weist der Partikel eine Carboxy-Funktionalisierung auf. Die Synthese und Carboxy-Funktionalisierung der Partikel, insbesondere der Hydrogel-Mikropartikel, erfolgte gemäß der von Pussak et al. (Pussak, *et al.*, 2012) beschriebenen Methode via Emulsions- und radikalischer Fällungspolymerisation von Polyethylenglykol-Diacrylamid oder Polyethylenglykol-Diacrylat mit anschließender radikalischer Pfropfung von Acrylsäuremonomeren, Crotonsäuremonomeren oder weiteren Alkenderivaten mit funktionellen Gruppen wie etwa Aminen zur Einführung der Carboxyl-, Amino- oder anderen funktionellen Gruppen.

In Ausführungsformen erfolgt die Synthese und Carboxy-Funktionalisierung der Partikel mikrofluidisch mittels photoinitiiertem radikalischer Vernetzung von Polyethylenglykol-Diacrylamid

oder Polyethylenglykol-Diacrylat (bevorzugtes Molekulargewicht im Bereich von 500 Da bis 8.000 Da, besonders bevorzugt um 4.000 Da) mit anschließender photoinitiiertes radikalischer Pflropfung von Acrylsäuremonomeren zur Einführung der Carboxylgruppen, wobei monodisperse Partikel mit einem Durchmesser im Bereich von 10 µm bis 100 µm, besonders bevorzugt um 25 µm, erzeugt werden.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Kompetitor über einen Linker an den Partikel immobilisiert. Dabei wird der Linker an die funktionalisierte Partikeloberfläche angebunden.

Das jeweilige Linkermolekül erlaubt dabei die geeignete Immobilisierung des Kompetitors über die Carboxyl- oder die sekundäre Aminogruppe, wobei die Kopplungsgruppe die Funktionalität und Sensitivität des Verfahrens beeinflusst. Des Weiteren kann über die Länge bzw. den Polymerisationsgrad des Linkers die resultierende Affinität des immobilisierten Kompetitors variiert und somit der Arbeitsbereich des Verfahrens eingestellt werden.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Linker ausgewählt aus den Gruppen der homo- und heterobifunktionalen Linker und umfasst exemplarisch Ethylendiamin, Oligo- und Polyethylenglykolbisamine, Peptide wie Pentaglycin und Aminosäuren oder einen bifunktionalen Linker mit weiteren Gruppen wie etwa Thiolen oder Aziden.

In Ausführungsformen der Erfindung weist der Linker eine Konturlänge (L) und einen Polymerisationsgrad (PG) auf. In Ausführungsformen der Erfindung weist der Linker eine Konturlänge (L) im Bereich von 5 Å bis 200 Å, bevorzugt im Bereich von 10 Å bis 50 Å auf.

In Ausführungsformen der Erfindung weist der Linker einen Polymerisationsgrad im Bereich von 1 bis 70, bevorzugt im Bereich von 3 bis 20 auf.

Beispielhaft geeignete Linker sind Ethylendiamin: L=5,3 Å; PG = 1 oder Pentaglycin: L=16,3 Å; PG = 5 oder PEG-Bisamin 3000: L=191 Å; PG = 68.

In Ausführungsformen der Erfindung enthalten die Linker Schutzgruppen. In Ausführungsformen der Erfindung ist die Schutzgruppe ausgewählt aus Fluorenylmethoxycarbonyl-, tert-Butyloxycarbonyl- oder tert-Butyl-Schutzgruppen. Auf diese Weise wird vorteilhaft sichergestellt, dass keine unerwünschte Polymerisierung der Linker-Moleküle oder Quervernetzung der Partikel eintritt.

Erfindungsgemäß ist der Kompetitor ausgebildet zur Interaktion mit dem Analytbindungspartner, wobei der Kompetitor und der Analyt um die Interaktion mit dem Analytbindungspartner konkurrieren.

Dadurch wird eine Kompetition zwischen dem freien Analyten in einer Probe und dem partikelgebundenen Kompetitor erzeugt, wobei sich ein Gleichgewicht in Abhängigkeit der Analytkonzentration einstellt. Je mehr freier Analyt vorhanden ist, desto geringer ist die Bindung der partikelgebundenen Kompetitoren an den Analytbindungspartner. Im Ergebnis verringert sich die Kontaktfläche zwischen Partikel und Oberfläche. Im umgekehrten Fall, wenn wenig Analyt in der zu untersuchenden Probe vorhanden ist, erfolgt eine erhöhte Bindung der partikelgebundenen Kompetitoren an den Analytbindungspartner, wobei sich die Kontaktfläche zwischen Partikel und Oberfläche vergrößert. In Ausführungsformen der Erfindung ist der Kompetitor mit dem Analyten identisch.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Kompetitor ausgewählt aus Phosphoenolpyruvat, Phosametin (Huangcaoling), Substratanaloga des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) oder Glyphosat.

Glyphosat (N-(Phosphonomethyl)glycin) ist ein nicht-selektives Blattherbizid (Breitband- oder Totalherbizid) mit systemischer Wirkung, das über jegliche grünen Pflanzenteile aufgenommen wird. Glyphosat wird in der Landwirtschaft gegen einkeim- und zweikeimblättrige Unkräuter im Acker-, Wein- und Obstbau, beim Anbau von Zierpflanzen, auf Wiesen, Weiden und Rasenflächen sowie im Forst verwendet. Die Blätter nehmen Glyphosat durch Diffusion auf und in der Pflanze wird Glyphosat über das Phloem verteilt. Glyphosat wirkt über die Blockade des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS), das zur Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin über den Shikimatweg in Pflanzen, wie auch in einigen Mikroorganismen, benötigt wird. Durch die Ähnlichkeit des Glyphosats mit dem natürlichen Substrat Phosphoenolpyruvat des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) wird dieses Enzym gehemmt.

Unter dem Begriff „Substratanaloga“ werden Verbindungen verstanden, welche an den Analytbindungspartner, insbesondere das aktive Zentrum des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS), binden. In Ausführungsformen umfassen Substratanaloga Substrate, insbesondere Shikimat-3-phosphat (S3P) oder Phosphoenolpyruvat (PEP); funktionelle Substratanaloga, insbesondere Phosametin; und kompetitive Inhibitoren, insbesondere Glyphosat. Marzabadi et al. und Priestman et al. offenbaren weitere

Substratanaloga des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS), insbesondere (3*R*,4*S*,5*R*)-5-Amino-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)cyclohex-1-en-1-carbonsäure, 1-Carboxy-1-(phosphonoxy)ethan-1-ylum, (3*R*,4*S*,5*R*)-5-((*S*)-1-Carboxy-1-phosphonoethoxy)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)-cyclohex-1-en-1-carbonsäure, (3*R*,4*S*,5*R*)-5-((*R*)-1-Carboxy-1-phosphonoethoxy)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)-cyclohex-1-en-1-Carbonsäure, (2*R*,3*aR*,7*R*,7*aS*)-2-Methyl-7-(phosphonoxy)-3*a*,4,7,7*a*-tetrahydrobenzo[*d*][1,3]-dioxol-2,5-dicarbonensäure, (3*R*,4*S*,5*R*)-5-((Carboxymethyl)-(phosphonomethyl)amino)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)-cyclohex-1-en-1-carbonsäure, (3*R*,4*S*,5*R*)-5-((Carboxymethyl)-(phosphonomethyl)amino)-3,4-dihydroxycyclohex-1-en-1-carbonsäure [3,4].

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung sind sowohl Kompetitor als auch Analyt Glyphosat.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Analytbindungspartner als Fusionsprotein ausgebildet. Dabei weist das Fusionsprotein beispielsweise verschiedene Proteindomänen auf, welche unterschiedliche Funktionalitäten aufweisen.

Erfindungsgemäß umfasst der Analytbindungspartner eine Proteindomäne, aufweisend eine Analytbindungsstelle. Die Analytbindungsstelle dient der Anbindung des Analyten an den Analytbindungspartner.

In Ausführungsformen der Erfindung ist die Analytbindungsstelle als Bindungstasche eines Enzyms ausgebildet oder eine allosterische Bindungsstelle für den Analyten.

Erfindungsgemäß weist der Analytbindungspartner als Analytbindungsstelle das aktive Zentrum des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) auf. Die Distanz der Bindungstasche zu Proteinoberfläche in der EPSPS beträgt ca. 10 Å in geschlossener Konformation.

In Ausführungsformen der Erfindung umfasst der Analytbindungspartner eine Proteindomäne, ausgewählt aus Hydrophobinen, ECM-Proteinen, S-Layer Proteinen, Peptidlinkern, und Protein-Tags. Dadurch wird eine gerichtete Immobilisierung an die Oberfläche ermöglicht, wobei zumindest eine Proteindomäne die Anbindung vermittelt und eine weitere Proteindomäne eine weitere Funktionalität aufweist. Bevorzugt weist der Analytbindungspartner eine Hydrophobin-Domäne auf. Vorteilhaft immobilisieren Hydrophobine selbstassemblierend an verschiedenen Materialoberflächen und -geometrien.

In Ausführungsformen der Erfindung weist der Analytbindungspartner eine Hydrophobin-Domäne Ccg2 aus *Neurospora (N.) crassa* auf. Bevorzugt weist der Analytbindungspartner die SEQ. ID. No. 5 auf.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne. Dabei ermöglicht die Hydrophobin-Domäne die Immobilisierung des Analytbindungspartners auf der Oberfläche. In Ausführungsformen der Erfindung weist das Fusionsprotein die SEQ ID No. 6 auf.

In Ausführungsformen der Erfindung wird der Analytbindungspartner in einer Mischung mit Hydrophobinen auf der Oberfläche immobilisiert, wobei die Mischung des Analytbindungspartners mit dem Hydrophobin im Bereich von 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5 liegt. Die angegebenen Mischungsverhältnisse beziehen sich im Sinne der vorliegenden Erfindung auf die molare Masse. Vorteilhaft werden mit Mischungsverhältnissen im Bereich von 1:3 bis 1:8 besonders homogene und wenig raue Oberflächen erhalten, wodurch die Partikelanbindung an die Oberflächen verbessert wird.

In Ausführungsformen der Erfindung erfolgt zur Immobilisierung des Analytbindungspartners eine Mischung aus dem Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne (SEQ ID No. 6) und der Hydrophobin-Domäne Ccg2 aus *Neurospora (N.) crassa* (SEQ ID No. 5) im Verhältnis 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5, ganz besonders bevorzugt 1:5. Durch Variation des Verhältnisses von Fusionsprotein und Hydrophobin auf der Oberfläche kann zusätzlich die Sensitivität gegenüber Glyphosat sehr gezielt eingestellt werden und ermöglicht damit einen Nachweis von Glyphosat über einen weiten Konzentrationsbereich.

In Ausführungsformen der Erfindung ist die Oberfläche im Wesentlichen planar ausgebildet. Beispielsweise kann die Oberfläche ein Glasformkörper oder ein Kunststoffformkörper sein z. B. ein Objektträger, Deckgläschen, Siliziumwafer oder ähnliches. Bevorzugt ist die Oberfläche ein Glasformkörper.

In Ausführungsformen der Erfindung ist die Oberfläche transparent, semitransparent oder opak ausgebildet. Bevorzugt ist die Oberfläche zumindest im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 600 nm transparent ausgebildet.

In Ausführungsformen der Erfindung erfolgt die Detektion mittels Quarzkristallmikrowaage (QCM), Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR), Rasterkraftspektroskopie oder Impedanzspektroskopie.

In Ausführungsformen der Erfindung erfolgt die Detektion mittels Reflexionsinterferenzkontrastmikroskopie (RICM). Dabei werden die Kontaktradien a von Partikel und Oberfläche sowie die Partikelradien R_{HGS} mittels einer eigens dafür entwickelten Software automatisiert ermittelt. Gemäß Johnson-Kendall-Roberts Modell [2] stehen diese Größen mit der Adhäsionsenergie W_{adh} in folgendem Zusammenhang:

$$W_{adh} = \frac{\frac{4}{3} a^3 E_{HGS} / (1 - \nu^2)}{6\pi R_{HGS}^2}$$

Die ermittelte Adhäsionsenergie entspricht der Bindungsdichte der partikelgebundenen Kompetitoren an den Analytbindungspartner und erlaubt die Bestimmung der Analytmenge in der Probe.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Oberfläche aufweisend den erfindungsgemäßen Analytbindungspartner, wobei der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne ist, wobei die Oberfläche zumindest im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 600 nm transparent ausgebildet ist.

In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche ist der Analytbindungspartner als Fusionsprotein ausgebildet. Dabei weist das Fusionsprotein beispielsweise verschiedene Proteindomänen auf, welche unterschiedliche Funktionalitäten aufweisen.

In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche umfasst der Analytbindungspartner eine Proteindomäne, aufweisend eine Analytbindungsstelle. Die Analytbindungsstelle dient der Anbindung des Analyten an den Analytbindungspartner.

In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche ist die Analytbindungsstelle als Bindungstasche eines Enzyms ausgebildet oder eine allosterische Bindungsstelle für den Analyten.

Bevorzugt weist der Analytbindungspartner als Analytbindungsstelle das aktive Zentrum des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) auf. Die Distanz der

Bindungstasche zu Proteinoberfläche in der EPSPs beträgt ca. 10 Å in geschlossener Konformation.

In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche umfasst der Analytbindungspartner eine Proteindomäne, ausgewählt aus Hydrophobinen, ECM-Proteinen, S-Layer Proteinen, Peptidlinkern, und Protein-Tags. Dadurch wird eine gerichtete Immobilisierung an die Oberfläche ermöglicht, wobei zumindest eine Proteindomäne die Anbindung vermittelt und eine weitere Proteindomäne eine weitere Funktionalität aufweist. Bevorzugt weist der Analytbindungspartner eine Hydrophobin-Domäne auf.

In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche weist der Analytbindungspartner eine Hydrophobin-Domäne Ccg2 aus *Neurospora (N.) crassa* auf. Bevorzugt weist der Analytbindungspartner die SEQ. ID. No. 5 auf.

Erfindungsgemäß ist der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne. Dabei ermöglicht die Hydrophobin-Domäne die Immobilisierung des Analytbindungspartners auf der Oberfläche. In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche weist das Fusionsprotein die SEQ ID No. 6 auf.

Vorteilhaft erfolgt durch die Verwendung eines Fusionsproteins aufweisend eine Hydrophobin-Domäne eine gerichtete und kontrollierte Assemblierung des Hydrophobins bzw. Fusionsproteins auf der Oberfläche und die EPSPS-Domäne weist keinen direkten Kontakt mit dem Oberflächenmaterial auf, wodurch die enzymatische Aktivität weitestgehend erhalten bleibt.

In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche ist der Analytbindungspartner in einer Mischung mit Hydrophobinen auf der Oberfläche immobilisiert, wobei die Mischung des Analytbindungspartners mit dem Hydrophobin im Bereich von 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5 liegt. Vorteilhaft wird durch die Nutzung der Mischungsverhältnisse des Analytbindungspartner mit Hydrophobin eine sterische Hinderung des Analytbindungspartner, insbesondere der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne, durch Immobilisierung an die Oberfläche minimiert und die Ansprechbarkeit sowie Sensitivität der Oberfläche bzw. des Assays moduliert.

In Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Oberfläche erfolgt zur Immobilisierung des Analytbindungspartners eine Mischung aus dem Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-

Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne (SEQ ID No. 6) und der Hydrophobin-Domäne Ccg2 aus *Neurospora (N.) crassa* (SEQ ID No. 5) im Verhältnis 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5, ganz besonders bevorzugt 1:5.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein funktionalisierter Partikel aufweisend einen immobilisierten Kompetitor, wobei der Kompetitor über einen Linker an den Partikel immobilisiert ist, wobei der Partikel deformierbar ausgebildet ist, wobei der Kompetitor ausgewählt ist aus Phosphoenolpyruvat, Phosmetin, Substratanaloga des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase oder Glyphosat, wobei der Linker eine Konturlänge im Bereich von 5 Å bis 200 Å, bevorzugt im Bereich von 10 Å bis 50 Å auf und/oder einen Polymerisationsgrad im Bereich von 1 bis 70, bevorzugt im Bereich von 3 bis 20 aufweist.

In Ausführungsformen der Erfindung weist der Partikel eine Carboxy-Funktionalisierung auf. Die Synthese und Carboxy-Funktionalisierung der Partikel, insbesondere der Hydrogel-Mikropartikel, erfolgte gemäß der von Pussak et al. (Pussak, *et al.*, 2012) beschriebenen Methode via Emulsions- und radikalischer Fällungspolymerisation von Polyethylenglykol-Diacrylamid oder Polyethylenglykol-Diacrylat mit anschließender radikalischer Pfropfung von Acrylsäuremonomeren, Crotonsäuremonomeren oder weiteren Alkenderivaten mit funktionellen Gruppen wie etwa Aminen zur Einführung der Carboxyl-, Amino- oder anderen funktionellen Gruppen.

In Ausführungsformen erfolgt die Synthese und Carboxy-Funktionalisierung der Partikel mikrofluidisch mittels photoinitierter radikalischer Vernetzung von Polyethylenglykol-Diacrylamid oder Polyethylenglykol-Diacrylat (bevorzugtes Molekulargewicht im Bereich von 500 Da bis 8.000 Da, besonders bevorzugt um 4.000 Da) mit anschließender photoinitierter radikalischer Pfropfung von Acrylsäuremonomeren zur Einführung der Carboxylgruppen, wobei monodisperse Partikel mit einem Durchmesser von 10 µm bis 100 µm, besonders bevorzugt 25 µm, erzeugt werden.

Erfindungsgemäß ist der Partikel ein deformierbar ausgebildeter Partikel. Der Partikel weist bevorzugt ein Elastizitätsmodul im Bereich von 10 kPa bis 100 kPa auf, besonders bevorzugt im Bereich von 15 kPa bis 50 kPa. So wird vorteilhaft eine hohe Sensitivität sichergestellt. Gleichzeitig wird so eine ungleichmäßige Deformation der Partikel ausgeschlossen.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Partikel ein Hydrogelpartikel.

In Ausführungsformen der Erfindung hat der Partikel einen Durchmesser von 10 μm bis 100 μm , besonders bevorzugt einen Durchmesser von etwa 25 μm .

Erfindungsgemäß ist der Kompetitor ausgewählt aus Phosphoenolpyruvat, Phosametin (Huangcaoling), Substratanaloga des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) oder Glyphosat. Bevorzugt ist der Kompetitor Glyphosat.

Erfindungsgemäß ist der Kompetitor über einen Linker an den Partikel immobilisiert. Dabei wird der Linker an die funktionalisierte Partikeloberfläche angebunden.

Das jeweilige Linkermolekül erlaubt dabei die geeignete Immobilisierung des Kompetitors, etwa Glyphosat, über die Carboxyl- oder die sekundäre Aminogruppe, wobei die Kopplungsgruppe die Funktionalität und Sensitivität des Verfahrens beeinflusst. Des Weiteren kann über die Länge bzw. den Polymerisationsgrad des Linkers die resultierende Affinität des immobilisierten Kompetitors variiert und somit der Arbeitsbereich des Verfahrens eingestellt werden.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Linker ausgewählt aus den Gruppen der homo- und heterobifunktionalen Linker und umfasst exemplarisch Ethylendiamin, Oligo- und Polyethylenglykolbisamine, Peptide wie Pentaglycin und Aminosäuren oder ein bifunktionaler Linker mit weiteren Gruppen wie etwa Thiolen oder Aziden.

In Ausführungsformen der Erfindung weist der Linker eine Konturlänge (L) und einen Polymerisationsgrad (PG) auf. Erfindungsgemäß weist der Linker eine Konturlänge (L) im Bereich von 5 Å bis 200 Å, bevorzugt im Bereich von 10 Å bis 50 Å auf.

Erfindungsgemäß weist der Linker einen Polymerisationsgrad im Bereich von 1 bis 70, bevorzugt im Bereich von 3 bis 20 auf.

Beispielhaft geeignete Linker sind Ethylendiamin: L=5,3 Å; PG = 1 oder Pentaglycin: L=16,3 Å; PG = 5 oder PEG-Bisamin 3000: L=191 Å; PG = 68.

Vorteilhaft kann über die Länge bzw. den Polymerisationsgrad des Linkers die resultierende Affinität des immobilisierten Kompetitors für den Analytbindungspartner variiert und somit der Arbeitsbereich des Sensors eingestellt werden.

In Ausführungsformen der Erfindung enthalten die Linker Schutzgruppen. In Ausführungsformen der Erfindung ist die Schutzgruppe ausgewählt aus Fluorenylmethoxycarbonyl-, tert-Butyloxycarbonyl- oder tert-Butyl-Schutzgruppen. Auf diese Weise wird vorteilhaft sichergestellt, dass keine unerwünschte Polymerisierung der Linker-Moleküle oder Quervernetzung der Partikel eintritt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Kit umfassend:

- zumindest einen immobilisierten Analytbindungspartner oder einen Analytbindungspartner und ein Hydrophobin, wobei der Analytbindungspartner zur Interaktion mit einem Analyten ausgebildet und auf einer Oberfläche immobilisiert ist, wobei der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne ist, und wobei die Oberfläche zumindest im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 600 nm transparent ausgebildet ist;
- zumindest einen Partikel, aufweisend einen immobilisierten Kompetitor, wobei der Kompetitor über einen Linker an den Partikel immobilisiert ist, wobei der Partikel deformierbar ausgebildet ist.

In Ausführungsformen werden der im Kit enthaltene Analytbindungspartner sowie das Hydrophobin vorteilhaft zur Immobilisierung im Verhältnis 1:2 bis 1:10, bevorzugt 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt im Verhältnis 1:5 gemischt und auf einer Oberfläche immobilisiert. Dabei stabilisiert das Hydrophobin die Oberfläche während der Analytbindungspartner zur Interaktion mit dem Analyten ausgebildet ist.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist der Kompetitor ausgewählt aus Phosphoenolpyruvat, Phosametin (Huangcaoling), Substratanaloga des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) oder Glyphosat. Bevorzugt ist der Kompetitor Glyphosat.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist der Partikel ein funktionalisierter Partikel, wobei die Oberfläche des Partikels eine Funktionalisierung aufweist. Die Funktionalisierung dient dabei der Anbindung des Kompetitors.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits weist der Partikel eine Carboxy-Funktionalisierung auf. Die Synthese und Carboxy-Funktionalisierung der Partikel, insbesondere

der Hydrogel-Mikropartikel, erfolgte gemäß der von Pussak et al. (Pussak, *et al.*, 2012) beschriebenen Methode via Emulsions- und radikalischer Fällungspolymerisation von Polyethylenglykol-Diacrylamid oder Polyethylenglykol-Diacrylat mit anschließender radikalischer Pffropfung von Acrylsäuremonomeren, Crotonsäuremonomeren oder weiteren Alkenderivaten mit funktionellen Gruppen wie etwa Aminen zur Einführung der Carboxyl-, Amino- oder anderen funktionellen Gruppen.

In Ausführungsformen erfolgt die Synthese und Carboxy-Funktionalisierung der Partikel mikrofluidisch mittels photoinitiiertes radikalischer Vernetzung von Polyethylenglykol-Diacrylamid oder Polyethylenglykol-Diacrylat (bevorzugtes Molekulargewicht im Bereich von 500 Da bis 8.000 Da, besonders bevorzugt um 4.000 Da) mit anschließender photoinitiiertes radikalischer Pffropfung von Acrylsäuremonomeren zur Einführung der Carboxylgruppen, wobei monodisperse Partikel mit einem Durchmesser von 10 bis 100 µm, besonders bevorzugt 25 µm, erzeugt werden.

Erfindungsgemäß ist der Kompetitor über einen Linker an den Partikel immobilisiert. Dabei wird der Linker an die funktionalisierte Partikeloberfläche angebunden.

Das jeweilige Linkermolekül erlaubt dabei die geeignete Immobilisierung des Kompetitors, etwa Glyphosat, über die Carboxyl- oder die sekundäre Aminogruppe, wobei die Kopplungsgruppe die Funktionalität und Sensitivität des Verfahrens beeinflusst. Des Weiteren kann über die Länge bzw. den Polymerisationsgrad des Linkers die resultierende Affinität des immobilisierten Kompetitors variiert und somit der Arbeitsbereich des Verfahrens eingestellt werden.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist der Linker ausgewählt aus den Gruppen der homo- und heterobifunktionalen Linker und umfasst exemplarisch Ethylendiamin, Oligo- und Polyethylenglykolbisamine, Peptide wie Pentaglycin und Aminosäuren oder ein bifunktionaler Linker mit weiteren Gruppen wie etwa Thiolen oder Aziden.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits enthalten die Linker Schutzgruppen. In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist die Schutzgruppe ausgewählt aus Fluorenylmethoxycarbonyl-, tert-Butyloxycarbonyl- oder tert-Butyl-Schutzgruppen. Auf diese Weise wird vorteilhaft sichergestellt, dass keine unerwünschte Polymerisierung der Linkermoleküle oder Quervernetzung der Partikel eintritt.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits weist der Linker eine Konturlänge (L) und einen Polymerisationsgrad (PG) auf. In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits weist

der Linker eine Konturlänge (L) im Bereich von 5 Å bis 200 Å, bevorzugt im Bereich von 10 Å bis 50 Å auf.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits weist der Linker einen Polymerisationsgrad im Bereich von 1 bis 70, bevorzugt im Bereich von 3 bis 20 auf.

Beispielhaft geeignete Linker sind Ethylendiamin: L=5,3 Å; PG = 1 oder Pentaglycin: L=16,3 Å; PG = 5 oder PEG-Bisamin 3000: L=191 Å; PG = 68.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist der Partikel eine Hydrogelpartikel.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist die Partikelgröße ein Durchmesser im Bereich von 10 µm bis 100 µm, besonders bevorzugt um 25 µm.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits weist der Partikel ein Elastizitätsmodul im Bereich von 5 kPa bis 100 kPa, besonders bevorzugt im Bereich von 15 kPa bis 50 kPa auf. So wird vorteilhaft eine hohe Sensitivität sichergestellt. Gleichzeitig wird so eine ungleichmäßige Deformation der Partikel ausgeschlossen.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist die Oberfläche im Wesentlichen planar ausgebildet. Beispielsweise kann die Oberfläche ein Glasformkörper sein z. B. ein Objektträger, Deckgläschen, Siliziumwafer oder ähnliches.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist die Oberfläche transparent, semitransparent oder opak ausgebildet.

Erfindungsgemäß ist der Analytbindungspartner als Fusionsprotein ausgebildet. Dabei weist das Fusionsprotein beispielsweise verschiedene Proteindomänen auf, welche unterschiedliche Funktionalitäten aufweisen.

Erfindungsgemäß umfasst der Analytbindungspartner eine Proteindomäne, aufweisend eine Analytbindungsstelle. Die Analytbindungsstelle dient der Anbindung des Analyten an den Analytbindungspartner.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits ist die Analytbindungsstelle als Bindungstasche eines Enzyms ausgebildet oder eine allosterische Bindungsstelle für den Analyten.

Bevorzugt weist der Analytbindungspartner als Analytbindungsstelle das aktive Zentrum des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) auf. Die Distanz der Bindungstasche zu Proteinoberfläche in der EPSPs beträgt ca. 10 Å in geschlossener Konformation.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits umfasst der Analytbindungspartner eine Proteindomäne, ausgewählt aus Hydrophobinen, ECM-Proteinen, S-Layer Proteinen, Peptidlinkern, und Protein-Tags. Dadurch wird eine gerichtete Immobilisierung an die Oberfläche ermöglicht, wobei zumindest eine Proteindomäne die Anbindung vermittelt und eine weitere Proteindomäne eine weitere Funktionalität aufweist. Bevorzugt weist der Analytbindungspartner eine Hydrophobin-Domäne auf.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits weist der Analytbindungspartner eine Hydrophobin-Domäne Ccg2 aus *Neurospora (N.) crassa* auf. Bevorzugt weist der Analytbindungspartner die SEQ. ID. No. 5 auf.

Erfindungsgemäß ist der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne. Dabei ermöglicht die Hydrophobin-Domäne die Immobilisierung des Analytbindungspartners auf der Oberfläche. In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits weist das Fusionsprotein die SEQ ID No. 6 auf.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits wird der Analytbindungspartner in einer Mischung mit Hydrophobinen auf der Oberfläche immobilisiert, wobei die Mischung des Analytbindungspartners mit dem Hydrophobin im Bereich von 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5 liegt.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits erfolgt zur Immobilisierung des Analytbindungspartners eine Mischung aus dem Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne (SEQ ID No. 6) und der Hydrophobin-Domäne Ccg2 aus *Neurospora (N.) crassa* (SEQ ID No. 5) im Verhältnis 1:2 bis

1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5, ganz besonders bevorzugt 1:5.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, der erfindungsgemäßen Oberfläche, des erfindungsgemäßen Partikels und des erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis von Analyten in Proben, wie etwa Gewässer-, Lebensmittel-, Boden-, Trink- und Abwasserproben, bevorzugt in wässrigen Lösungen.

Zur Realisierung der Erfindung ist es auch zweckmäßig, die vorbeschriebenen Ausführungsformen und einzelne Merkmale der Ansprüche zu kombinieren.

Ausführungsbeispiele

Weitere Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den nachfolgenden schematischen Zeichnungen und Ausführungsbeispielen, anhand derer die Erfindung beispielhaft näher erläutert werden soll, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken.

Dabei zeigt:

- Fig. 1:** die schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens beruhend auf der kompetitiven Bindung von Partikel-gebundenem und löslichem Glyphosat an der Protein-funktionalisierten Oberfläche,
- Fig. 2:** Die Abhängigkeit der Adhäsionsenergie zwischen Partikel und Oberfläche von der Konzentration an Glyphosat in Lösung sowie löslichem Glufosinat als Negativkontrolle,
- Fig. 3:** Die Abhängigkeit der Nachweisgrenze und des Arbeitsbereiches des Verfahrens von der Beschichtung der Partikel,
- Fig. 4:** Die relative Adhäsionsenergie der Partikel beschichtet mit über einen Pentaglycin-Linker gebundenem Glyphosat in Abhängigkeit von der Glyphosatkonzentration (löslich),
- Fig. 5:** Der Vergleich der relativen Adhäsionsenergien von mit Pentaglycin-Glyphosat beschichteten Partikeln auf Glyphosat, weiteren Pestiziden sowie Glycin als

Strukturelement von Glyphosat, jeweils getestet mit einer Konzentration von 1 mM, bis auf Atrazin (153 μ M), Chlorpyrifos (4 μ M) und Phosmet (79 μ M).

Das Prinzip der Nachweismethode ist in **Fig. 1** dargestellt. Die immobilisierten Enzyme der Oberfläche wechselwirken attraktiv mit dem Partikel-gebundenen Kompetitor, in dessen Folge sich eine charakteristische Kontaktfläche zwischen Oberfläche und Partikel ausprägt. Der gelöste Analyt konkurriert mit dem Kompetitor um die Bindungsstellen auf der Oberfläche. In Abhängigkeit der Konzentration des Analyten verringert sich dadurch die Kontaktfläche. Ab einer bestimmten Konzentration adhären die Partikel nicht auf der Oberfläche. Die Bestimmung von Kontakt- und Partikelradius zur Ermittlung der Adhäsionsenergie erfolgt mittels Reflexionsinterferenzkontrastmikroskopie.

Zum Nachweis der Spezifität der Methode wurden in **Fig. 2** RCA-gereinigte Glasoberflächen mit einer geeigneten Mischung des Hydrophobins Ccg2 und dessen Fusionsprotein Ccg2_GS_EcEPSPS (SEQ ID No. 6) beschichtet. Anschließend wurden die Oberflächen wahlweise mit 10 mM Glyphosat- oder Glufosinat-Lösungen und danach mit Linker-funktionalisierten Partikeln ohne oder mit Glyphosat-Beschichtung inkubiert. Die aus den jeweiligen Bedingungen resultierenden Adhäsionsenergien wurden anhand eines repräsentativen Datensatzes dargestellt.

In **Fig. 3** wurden zunächst RCA-gereinigte Glasoberflächen mit einer geeigneten Mischung des Hydrophobins Ccg2 und dessen Fusionsprotein Ccg2_GS_EcEPSPS (SEQ ID No. 6) beschichtet. Anschließend wurden die Oberflächen mit Glyphosat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration und danach mit Glyphosat-beschichteten Partikeln mit Ethylendiamin- oder Pentaglycin-Linker inkubiert. Die aus den jeweiligen Bedingungen resultierenden Adhäsionsenergien wurden anhand eines repräsentativen Datensatzes dargestellt.

Ausführungsbeispiel 1: Quantifizierung von Glyphosat mittels kompetitiver Bindung

Für die Erzeugung einer funktionalisierten Oberfläche wurden Fusionsproteine aus dem Hydrophobin Ccg2 (SEQ ID No. 5) aus *Neurospora (N.) crassa* und der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase aus *Escherichia (E.) coli* (EcEPSPS) (SEQ ID No. 4) benötigt. Hierzu wurden die kodierenden Bereiche der jeweiligen Gene, verbunden über die Sequenz für einen flexiblen Glycin-Serin-Linker, in den Expressionsvektor pET28b (Novagen, Deutschland) übertragen. Hierbei liegt die Sequenz des Hydrophobins (SEQ ID No. 2) 5'-seitig und die der EcEPSPS (SEQ ID No. 1) 3'-seitig von der Linkersequenz. Zusätzlich befindet sich 5'-seitig von der Sequenz für

das Fusionsprotein die Sequenz für einen (His)₆-Tag, welcher für die Detektion und Reinigung des Fusionsproteins erforderlich ist. Weiterhin wurde für die Oberfläche das Hydrophobin ohne EcEPSPS benötigt. Die Gensequenz wurde dementsprechend ohne den Linker und die EcEPSPS-Sequenz in den Vektor pET28b übertragen. Die auf diese Weise modifizierten Vektoren wurden nach vollständiger Sequenzierung der eingebrachten Sequenzen, in den *E. coli* Expressionsstamm SHuffle T7 Express *lysY* (New England Biolabs, USA) übertragen. Dieser Expressionsstamm ist vorteilhaft für die Expression der Hydrophobine, da er zusätzlich für eine Disulfidbrückenisomerase kodiert, welche die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken der Hydrophobine begünstigt. Diese spielen eine wesentliche Rolle für die korrekte Faltung des Proteins.

Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) zu *E. coli*-Zellen, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, gestartet. Nach der Induktion wurden die Zellen für 4 weitere Stunden bei 30°C und 180 Umdrehungen in der Minute inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und gewaschen, um sie dann für die Proteinreinigung weiter verwenden zu können. Die angewendete Reinigungsmethode ist abhängig von der Löslichkeit der Proteine. Die löslichen Fusionsproteine (SEQ ID No. 6) wurden mittels Nickel-Affinitätschromatografie unter nativen Bedingungen nach Herstellerangaben gereinigt, während die unlöslichen Hydrophobine mittels denaturierender Nickel-Affinitätschromatografie nach Herstellerangaben gereinigt wurden. Die Hydrophobine wurden vor der Dialyse durch Ultrafiltration konzentriert, für die Fusionsproteine war dies nicht nötig. Nach der Reinigung wurden die Hydrophobine gegen einen Redox-Rückfaltepuffer (10mM Glutathion reduziert, 1mM Glutathion oxidiert; pH 5,4) und die Fusionsproteine gegen den Monsanto-Dialysepuffer (10 mM MOPS, 0,5 mM EDTA, 5% (v/v) 99,9% Glycerin, 1mM DTT, pH 7) dialysiert, anschließend im Kühlschrank gelagert und für die Funktionalisierung von Glasoberflächen eingesetzt.

Die Funktionalisierung der Glasoberflächen erfolgte durch langsames Aufpipettieren der Proteinlösung mit anschließender 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Oberflächen gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und 30 Minuten bei RT getrocknet. Die Glasoberflächen wurden vor der Funktionalisierung mit Hilfe einer RCA-Lösung (50 ml 25 %-ige, wässrige NH₃-Lösung, 50 ml 35% H₂O₂, 250 ml deionisiertes Wasser) gereinigt.

Die beiden Proteinvarianten wurden benötigt, um für das Verfahren ein optimales Verhältnis zwischen Fusionsprotein (kann Glyphosat binden) und Hydrophobin (zur Stabilisierung der Oberfläche) zu finden. Hierfür wurden die Proteine in verschiedenen Verhältnissen gemischt und

die Funktionalität der EcEPSPS auf der Oberfläche mittels eines Nachweises von anorganischem Phosphat bestimmt. Anorganisches Phosphat ist eines der Reaktionsprodukte bei der Reaktion der EPSPS mit ihren Substraten Phosphoenolpyruvat (PEP) und Shikimat-3-phosphat (S3P) und kann daher für den Nachweis der Enzymaktivität genutzt werden. Das Verhältnis von Ccg2 (SEQ ID No. 5) zu Ccg2_GS_EcEPSPS (SEQ ID No. 6) beeinflusst die Sensitivität und Signalstärke des Assays. Je mehr Fusionsprotein auf der Oberfläche vorhanden ist, desto mehr Glyphosat wird benötigt, um die Bindestellen zu besetzen und damit die Aktivität der Proteine auf der Oberfläche messbar zu hemmen. Dementsprechend ist eine Oberfläche mit einer hohen Konzentration an Fusionsprotein unempfindlicher als eine mit wenig Fusionsprotein. Jedoch führt eine zu geringe Konzentration des Fusionsproteins zu einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis. Aus diesem Grund wurden verschiedene Belegungsverhältnisse getestet, dabei stellte sich ein Verhältnis von 1 μM Ccg2_GS_EcEPSPS (SEQ ID NO. 6) zu 5 μM Ccg2 (SEQ ID No. 5) als für die Anwendung gut geeignet heraus.

Die Synthese und Carboxy-Funktionalisierung der Hydrogel-Mikropartikel erfolgte gemäß der von Pussak et al. beschriebenen Methode via Emulsions- und radikalischer Fällungspolymerisation von Polyethylenglykol-Diacrylamid mit anschließender radikalischer Pfropfung von Acrylsäuremonomeren zur Einführung der Carboxylgruppen [1]. Für die nachfolgend erläuterten Methoden wurden Mikropartikel mit Elastizitätsmoduln von 15 kPa und einem mittleren Radius von 20 μm verwendet.

Um eine durch die Anwesenheit des Analyten modulierbare Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und den Hydrogelpartikeln oder auch Hydrogelsonden (HGS) zu ermöglichen, wurden die Mikropartikel mit Glyphosat beschichtet. Hierzu wurden, ausgehend von den Carboxyl-funktionalisierten HGS, verschiedene Linker an die Partikel gekoppelt. Das jeweilige Linkermolekül erlaubt dabei die geeignete Immobilisierung des Glyphosats über die Carboxyl- oder die sekundäre Aminogruppe, wobei die Kopplungsgruppe die Funktionalität und Sensitivität des Sensors beeinflusst. Des Weiteren kann über die Länge bzw. den Polymerisationsgrad des Linkers die resultierende Affinität des immobilisierten Kompetitors für das Enzym (EPSPS) variiert und somit der Arbeitsbereich des Sensors eingestellt werden.

Die jeweiligen Kopplungsschritte erfolgten unter Anwendung von Aktivester-Chemie. Exemplarisch diente Ethylendiamin als kurze Linkervariante, welches mittels Benzotriazol-1-yl-oxytri-pyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) an die Mikropartikel gekoppelt wurde. Hierzu wurden die Partikel suspendiert und Wasser in mehreren Waschschritten durch Dimethylformamid (DMF) ersetzt. Die Partikel wurden in 2 ml

DMF belassen. Anschließend wurden 146 mg (280 μ mol) PyBOP, 18 mg (140 μ mol) HOBt und 39 μ l (280 μ mol) Triethylamin zur Aktivierung der Carboxylgruppen zugesetzt und die Suspension 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zusatz von 20 μ l (300 μ mol) Ethylendiamin und dreistündiger Reaktion wurden die Partikel bei 1844 x g für 10 min zentrifugiert und je 3mal mit DMF, einer 1 : 1 Mischung aus DMF und Wasser sowie reinem Wasser gewaschen. Zur weiteren Beschichtung wurden 4 mg (24 μ mol) Glyphosat in 2 ml 100 mM Hepes-Puffer (pH = 7,0) im Ultraschallbad gelöst und 46 mg (240 μ mol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) sowie 52 mg (240 μ mol) *N*-Hydroxy-sulfosuccinimid-Natriumsalz (s-NHS) zugesetzt und die Carboxylgruppen für 15 min aktiviert. Die Kopplung des Pestizids an die Amin-funktionalisierten Partikel erfolgte durch Vereinigung von Suspension und Lösung und Reaktion über einen Zeitraum von 1 h. Abschließend wurden die Partikel 3-mal mit einer 100 mM Hepes-Pufferlösung (pH = 7,0) gewaschen.

Alternativ dazu wurden die Partikel mit einem Pentaglycin-Linker funktionalisiert. Hierzu wurden die Partikel 3-mal mit 2 ml 100 mM MES-puffer (pH = 5,3) gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (10 min, 1844 x g) verworfen. 23 mg (120 μ mol) EDC und 26 mg (120 μ mol) s-NHS wurden in 1 ml 100 mM MES-puffer (pH = 5,3) gelöst und die Mikropartikel anschließend in der Lösung suspendiert. Nach einstündiger Aktivierung der Carboxylgruppen unter Schütteln wurden 10 μ l (143 μ mol) Mercaptoethanol zur Inaktivierung des überschüssigen EDC zugesetzt und die Suspension für weitere 15 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Zentrifugation (10 min, 1844 x g) wurde der Überstand verworfen und 0,2 mg (660 nmol) des Peptids gelöst in 1 ml Hepes-Pufferlösung (100 mM) zugesetzt, wobei die Kopplung des Linkers über Nacht erfolgte. Nach weiteren 3 Waschschritten (100 mM Hepes-Puffer) wurden die Carboxylgruppen gemäß der zuvor beschriebenen Prozedur in den s-NHS-Ester überführt, überschüssiges EDC mittels Mercaptoethanol inaktiviert, die Suspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zusatz einer 1 mg / ml 100 mM Hepes-gepufferten Glyphosatlösung (6 μ mol) wurde das Reaktionsgemisch über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur belassen. Abschließend wurden die Partikel 3-mal mit einer 100 mM Hepes-Pufferlösung (pH = 7,0) gewaschen.

Nachdem die Oberfläche, beispielsweise eine Glasoberfläche, und die Partikel beschichtet wurden, konnten sie für die Reflexionsinterferenzkontrastmikroskopie (RICM) eingesetzt werden. Hierzu wurden die erfindungsgemäßen Oberflächen an einen 16-Well-Träger (CS16-CultureWell™, Grace Biolabs) mit selbstklebender Unterseite und einem Volumen von 400 μ l / Well geklebt.

Anschließend wurden je 200 μl / Well Analytlösung (100 mM HEPES-Puffer pH = 7) zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation der Oberflächen wurden 10 μl / Well der mit Glyphosat funktionalisierten Hydrogelpartikel hinzugefügt und die Oberflächen nach Sedimentation der Hydrogelpartikel mikroskopiert.

Die Aufnahme der radialen Intensitätsprofile der HGS auf der funktionalisierten Oberfläche im Reflexionsinterferenzkontrastverfahren erfolgte mittels Inversmikroskopsystem (Olympus IX 73) mit einem 60 x Immersionsobjektiv (Olympus UPlanSAPO 60x Oil Microscope Objective). Aus den aufgenommenen Profilen konnten anschließend Kontaktradien a von Partikel und Oberfläche sowie die Partikelradien R_{HGS} mittels einer eigens dafür entwickelten Software automatisiert ermittelt werden. Gemäß Johnson-Kendall-Roberts Modell [2] stehen diese Größen mit der Adhäsionsenergie W_{adh} in folgendem Zusammenhang:

$$W_{adh} = \frac{\frac{4}{3} a^3 E_{HGS} / (1 - \nu^2)}{6\pi R_{HGS}^2}$$

Mit einem Elastizitätsmodul E_{HGS} der Partikel von 15 kPa und einer Poissonzahl ν von 0,5 kann somit unter Kenntnis des Partikel- und Kontaktradius die korrespondierende Adhäsionsenergie des Systems bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Messungen sind beispielhaft in **Fig. 2** gezeigt. Die Pentaglycin-funktionalisierten Partikel (Negativkontrolle) zeigen lediglich schwache unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche, wohingegen Glyphosat-beschichtete HGS stark adhären. Bei Anwesenheit hoher Konzentrationen des Analyten bewegt sich der Wert im Bereich der Negativkontrolle. Dies ist auf die Konkurrenz um Bindungsstellen der EcEPSPS auf der Oberfläche zwischen freiem Glyphosat in der Analytlösung und an den HGS gebundenem Glyphosat zurückzuführen. Des Weiteren verdeutlicht der vernachlässigbare Einfluss strukturell ähnlicher Verbindungen wie Glufosinat auf die Adhäsionsenergie die Selektivität der Methode gegenüber Glyphosat.

Fig. 3 zeigt exemplarisch die resultierenden Adhäsionsenergien Glyphosat-beschichteter Partikel der Linkervarianten Ethylendiamin und Pentaglycin bei verschiedenen Konzentrationen an löslichem Glyphosat. Mit steigenden Glyphosatkonzentrationen in der Probe sinkt die Adhäsionsenergie der Glyphosat-beschichteten HGS an der funktionalisierten Chip-Oberfläche. Je mehr Glyphosat sich in der Analytlösung befindet, desto stärker ist die Konkurrenz zu gebundenem Glyphosat. Sind viele Bindestellen mit freiem Glyphosat besetzt, können sich die

HGS nicht mehr fest an der Oberfläche anlagern, die Kontaktfläche wird kleiner und dementsprechend nimmt die Adhäsionsenergie ab. Die Nachweisgrenze kann dabei unter anderem über den Linker variiert werden. Diese beträgt im gezeigten Beispiel für Ethylendiamin-Glyphosat-beschichtete HGS 10 μM , für Pentaglycin-Glyphosat-beschichtete HGS liegt die Nachweisgrenze unterhalb 1 μM , wobei das Sensorsystem weitere Möglichkeiten zur Einstellung des Arbeitsbereiches bietet. Die Ergebnisse beweisen, dass ein spezifischer Nachweis sowie eine präzise Quantifizierung von Glyphosat mit Hilfe der Erfindung möglich sind.

Ausführungsbeispiel 2: Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der Quantifizierung von Glyphosat

Die Konzentrationsabhängigkeit der Glyphosatbindung ist in **Fig. 4** dargestellt. Zur Bestimmung der Sensitivität wurden zunächst RCA-gereinigte Glasoberflächen mit einer geeigneten Mischung des Hydrophobins Ccg2 und dessen Fusionsprotein Ccg2_GS_EcEPSPS (SEQ ID No. 6) beschichtet. Anschließend wurden die Oberflächen mit Glyphosat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration und danach mit Glyphosat-beschichteten Partikeln mit Pentaglycin-Linker inkubiert. Der untersuchte Konzentrationsbereich umfasst einen Bereich von 10^{-11} M bis 10^{-8} M. Dieser Empfindlichkeitsbereich erreicht den Schwellenwert von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ für Pestizidverunreinigungen im deutschen Leitungswasser.

Die Spezifität wurde durch die Testung von strukturverwandten Verbindungen und häufig eingesetzten Pestiziden in dem erfindungsgemäßen Assay untersucht (**Fig. 5**). Keine der getesteten Verbindungen zeigte eine vergleichbare relative Adhäsionsenergie wie Glyphosat, womit ein spezifischer Nachweis von Glyphosat auch in Gegenwart anderer Pestizide sowie in Gegenwart von Verbindungen mit Strukturelementen aus Glyphosat belegt wurde.

Zitierte Nichtpatentliteratur:

- [1] D. Pussak, M. Behra, S. Schmidt and L. Hartmann, *Soft Matter*, 2012, 8, 1664
- [2] K.L. Johnson, K. Kendall, A.D. Roberts, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A - Math. Phys. Sci.*, 1971, 324, 301
- [3] M.R. Marzabadi, K.J. Gruys, P.D. Pansegrau, M.C. Walker, H.K. Yuen, J.A. Sikorski *Biochemistry*, 1996, 35, 13, 4199
- [4] M.A. Priestman, M.L. Healy, A. Becker, D.G. Alberg, P.A. Bartlett, G.H. Lushington, E. Schönbrunn, *Biochemistry*, 2005, 44, 9, 3241

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Analyten umfassend die Schritte:
 - Bereitstellen einer Oberfläche mit einem immobilisierten Analytbindungspartner,
 - Kontaktieren des Analytbindungspartners mit einer Probe enthaltend den Analyten, wobei der Analyt mit dem Analytbindungspartner interagiert,
 - Kontaktieren des Analytbindungspartners mit einem Kompetitor, wobei der Kompetitor an einen Partikel immobilisiert ist und mit dem Analytbindungspartner interagiert,
 - Detektion der an den Analytbindungspartner gebundenen Kompetitoren, wobei der Analyt Glyphosat ist, wobei der Analytbindungspartner als Analytbindungsstelle das aktive Zentrum des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS) aufweist, und wobei der Partikel deformierbar ausgebildet ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Partikel ein Hydrogelpartikel ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Partikel ein Elastizitätsmodul von 5 kPa bis 100 kPa aufweist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Kompetitor ausgewählt ist aus Phosphoenolpyruvat, Phosametin, Substratanaloga des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase oder Glyphosat.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fusionsprotein die SEQ ID No. 6 aufweist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Analytbindungspartner in einer Mischung mit Hydrophobinen auf der Oberfläche immobilisiert wird, wobei die Mischung des Analytbindungspartners mit dem Hydrophobin

- im Bereich von 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5 liegt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mittels Reflexionsinterferenzkontrastmikroskopie erfolgt.
 9. Oberfläche aufweisend einen Analytbindungspartner, wobei der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne ist, wobei die Oberfläche zumindest im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 600 nm transparent ausgebildet ist.
 10. Oberfläche nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Analytbindungspartner in einer Mischung mit Hydrophobinen auf der Oberfläche immobilisiert ist, wobei die Mischung des Analytbindungspartners mit dem Hydrophobin im Bereich von 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5 liegt.
 11. Oberfläche nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein ist, welches die SEQ ID No. 6 aufweist.
 12. Partikel aufweisend einen immobilisierten Kompetitor, wobei der Kompetitor über einen Linker an den Partikel immobilisiert ist, wobei der Partikel deformierbar ausgebildet ist, wobei der Kompetitor ausgewählt ist aus Phosphoenolpyruvat, Phosametin, Substratanaloga des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase oder Glyphosat, wobei der Linker eine Konturlänge von 5 - 200 Å, bevorzugt 10 - 50 Å auf und/oder einen Polymerisationsgrad von 1 - 70, bevorzugt 3 -20 aufweist.
 13. Kit umfassend:
 - zumindest einen immobilisierten Analytbindungspartner oder einen Analytbindungspartner und ein Hydrophobin, wobei der Analytbindungspartner zur Interaktion mit einem Analyten ausgebildet ist und auf einer Oberfläche immobilisiert ist, wobei der Analytbindungspartner ein Fusionsprotein aufweisend eine Hydrophobin-Domäne und eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase-Domäne ist, und

wobei die Oberfläche zumindest im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 600 nm transparent ausgebildet ist; und

- zumindest einen Partikel, aufweisend einen immobilisierten Kompetitor, wobei der Kompetitor über einen Linker an den Partikel immobilisiert ist, wobei der Partikel deformierbar ausgebildet ist.

14. Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Fusionsprotein die SEQ ID No. 6 aufweist.
15. Kit nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Analytbindungspartner in einer Mischung mit Hydrophobinen auf der Oberfläche immobilisiert ist, wobei die Mischung des Analytbindungspartners mit dem Hydrophobin im Bereich von 1:2 bis 1:10, bevorzugt zwischen 1:3 bis 1:8, besonders bevorzugt um 1:5 liegt.
16. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8, einer Oberfläche nach Anspruch 9 bis 11, eines Partikels nach Anspruch 12 und/oder eines Kits nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zum Nachweis von Analyten in Proben.

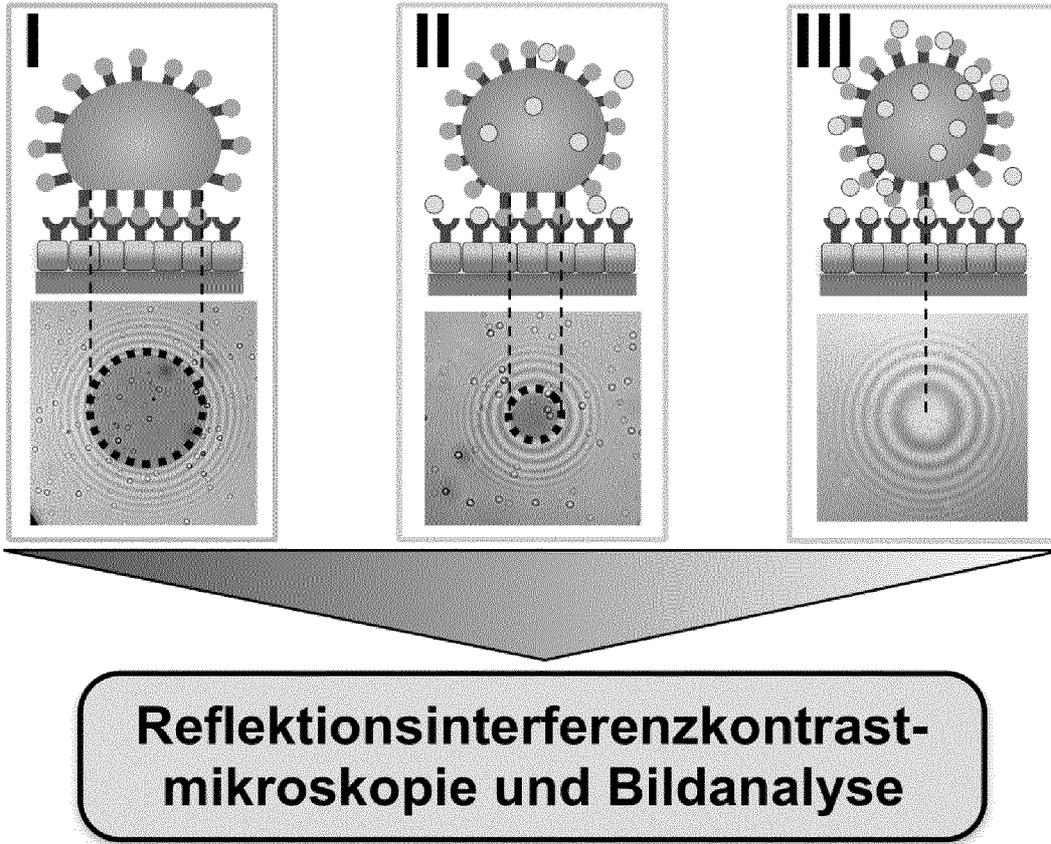


Fig. 1

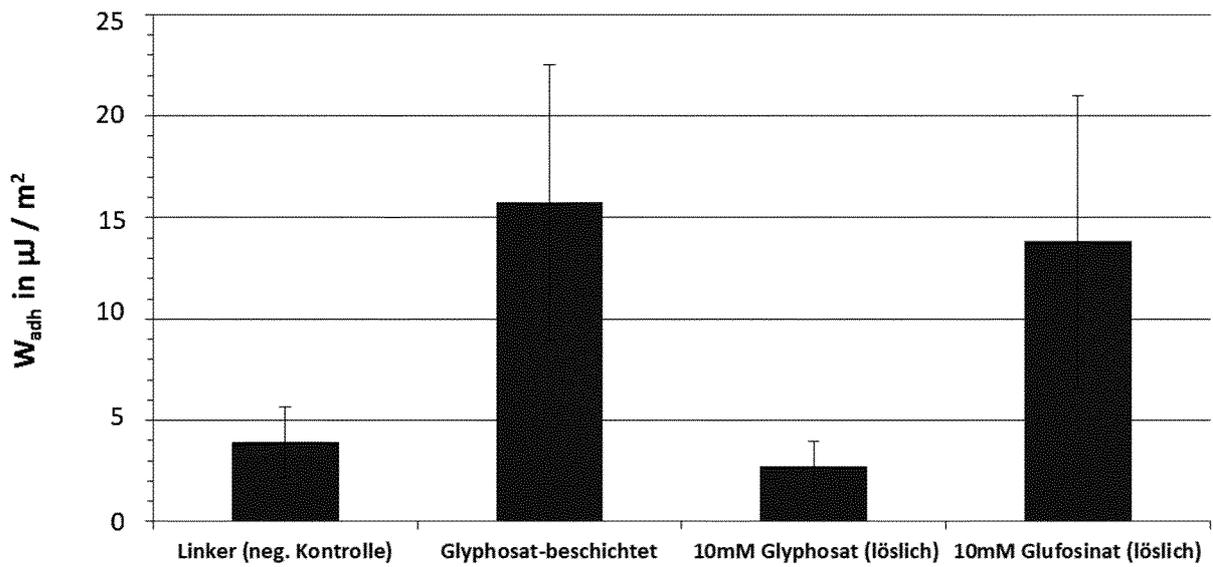


Fig. 2

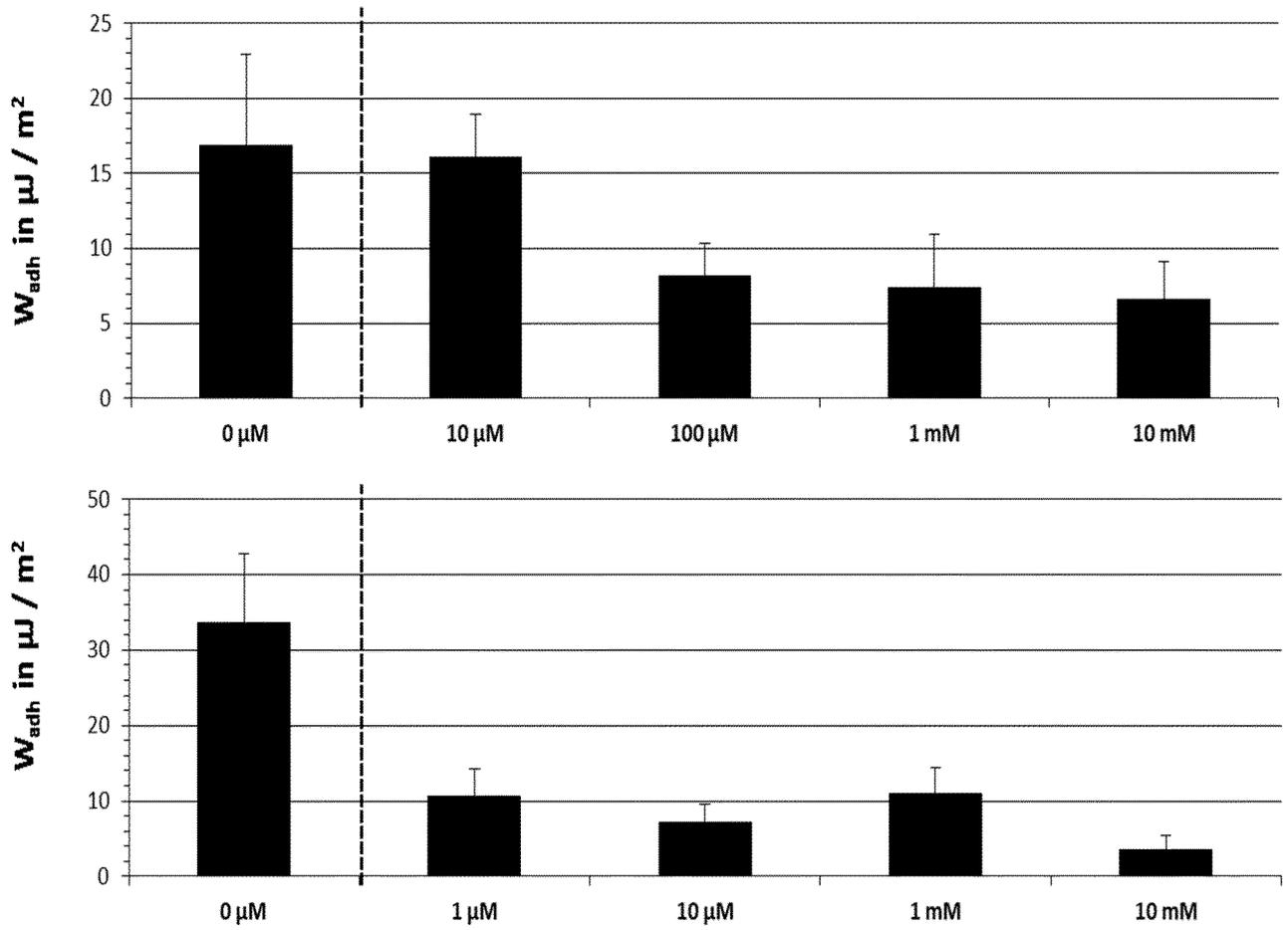


Fig. 3

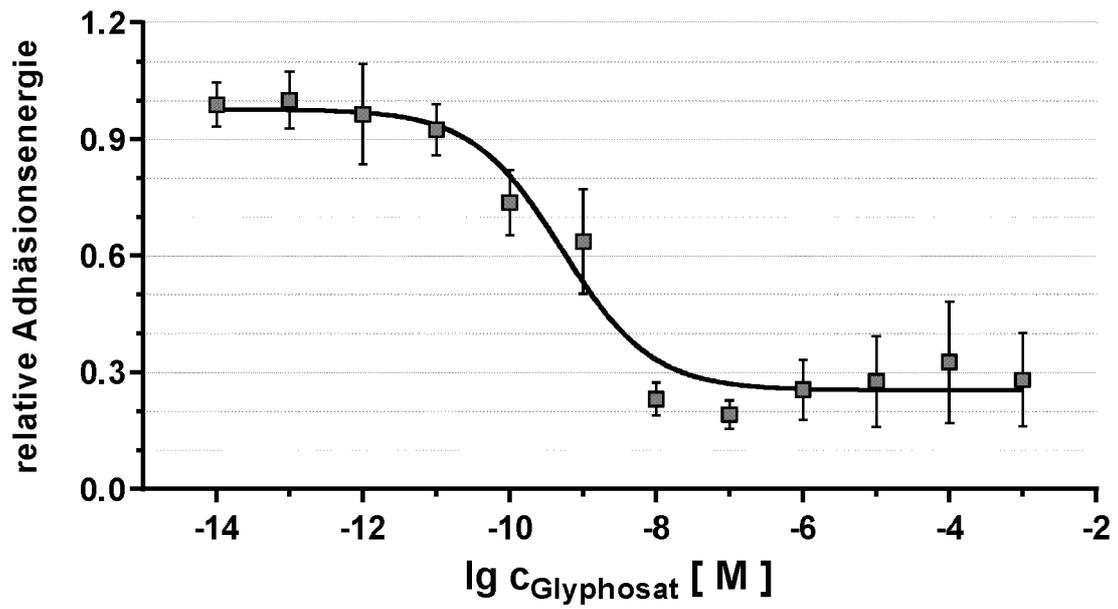


Fig. 4

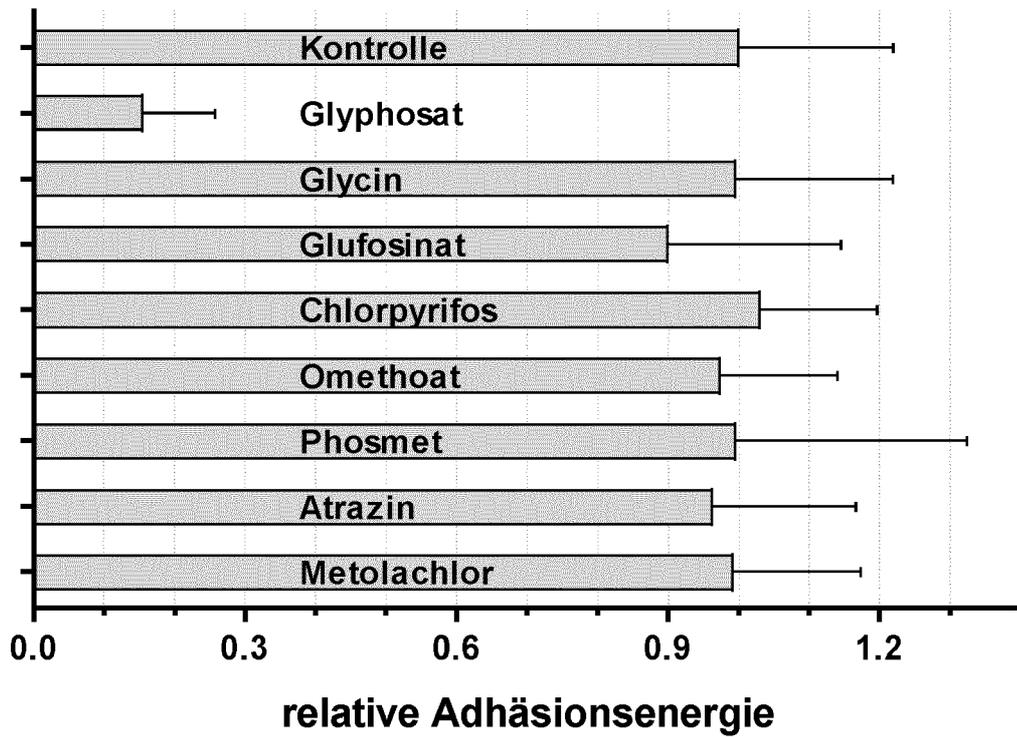


Fig. 5