

Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie

Alexander Krauth¹, Peter Fechner¹, Philipp Wagner¹, Johanna Hutterer¹ und Günter Gauglitz¹

¹Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Deutschland
Kontakt: alexander.krauth@uni-tuebingen.de

Einleitung

Heutzutage sind Biosensoren aus dem medizinischen Umfeld nicht mehr wegzudenken. So ist es heutzutage damit möglich, den Blutglukosewert über mehrere Tage bis Wochen überwachen zu können. Durch eine Verknüpfung mit einer automatischen Insulinpumpe können so für den Patienten gefährliche Situationen vermieden werden. [1]

In der klinischen Diagnose werden sie beispielsweise verwendet, um die CRP-Konzentration bei Patienten zu messen. Dies ermöglicht eine schnelle Bestimmung der aktuellen Entzündungswerte und kann so helfen die Ursachen einzugrenzen [2]. Im Bereich der Krebsfrüherkennung wurden verschiedene optische Biosensoren entwickelt, welche eine schnelle und einfache Erkennung ermöglichen sollen [3].

Neben solchen „Point-of-Care“-Tests können Biosensoren in der biomedizinischen Forschung helfen. Zum Beispiel bei der Entwicklung neuer Medikamente spielt die Biomolekulare Interaktionsanalyse eine wichtige Rolle [4]. Diese erleichtert die Suche nach neuen Wirkstoffen und ermöglicht das Testen auf mögliche Kreuzreaktionen. Eine relativ neue Art von Therapeutika sind therapeutische Viren, auch bei deren Entwicklung und Produktion können Biosensoren behilflich sein eine gleichbleibende Qualität für den therapeutischen Einsatz zu gewährleisten [5].

Auch in der Prävention von Krankheiten können Biosensoren eine wichtige Rolle übernehmen, sei es durch die Untersuchung von Nahrungsmittel auf Pestizidrückstände oder Pathogenen [6] oder der Überwachung von Trinkwasser auf Verschmutzung [7].

Für diese sehr unterschiedliche Anwendungen wurden im Laufe der Jahre unterschiedliche Arten von Biosensoren entwickelt. Das Grundprinzip ist jedoch bei allen gleich. Sie bestehen aus einer meist stationären, biologischen Erkennungsstruktur, welche durch die Wechselwirkung mit dem Analyten eine Veränderung ihrer physikochemischen Eigenschaften bewirken. Diese Veränderung wird durch den Transduktor in ein messbares Signal umgewandelt und vom Detektor aufgezeichnet. [8]

In Abb. 1 sind mögliche Erkennungsstrukturen für Biosensoren skizziert. So kann beispielsweise die Interaktion komplementärer DNA-Sequenzen miteinander verfolgt und quantifiziert werden [9]. Ebenso werden häufig Antikörper immobilisiert, welche zur spezifischen Erkennung von Molekülen [10], Proteinen [11], Viren [12] oder sogar ganzen Zellen genutzt werden [13]. Auch immobilisierte Zellen werden in Biosensoren verwendet [14].

Die verschiedenen Erkennungsstrukturen sind sehr unterschiedlich in ihrer Größe. So sind kleine

Moleküle und Peptide im unteren einstelligen Nanometer-Bereich, ebenso Antikörper (≈ 5 nm), Viren ein bis zwei Größenordnung größer (≈ 26 nm bei AAVs [15] und $100 - 200$ nm bei Herpesviren [16]). Zellen hingegen sind von der Dicke im Mikrometerbereich (≈ 10 μ m) [17].

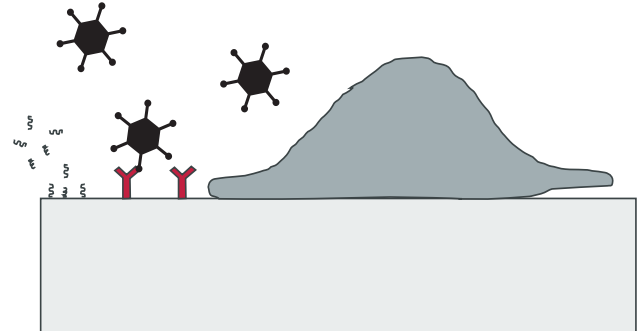


Abb. 1: Verschiedene Erkennungsstrukturen (nicht maßstabgetreu) für mögliche Anwendungen von Biosensoren. Links: DNA für die Untersuchung von DNA-DNA-Interaktionen; Mitte: Antikörper zur Quantifizierung von Viren; Rechts: Zellen zur Untersuchung von Zellinteraktionen mit der Oberfläche.

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich direkt-optische Detektionsmethoden in den verschiedensten Anwendungsfeldern bewiesen. Dies liegt unter anderem daran, dass durch die markierungsfreien Techniken die Probenvorbereitung deutlich geringer ausfällt. Ebenso können mögliche Artefakte durch die Markierung ausgeschlossen werden. [14, 18]

Diese markierungsfreien, direkt-optischen Verfahren können in zwei Gruppen unterteilt werden, je nachdem, ob sie auf der alleinigen Änderung des Brechungsindex oder der Reflektion beruhen. Der wohl bekannteste Vertreter für Erstere ist die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Sie wird aufgrund ihrer niedrigen Nachweisgrenzen und guten Reproduzierbarkeit, der Möglichkeit zur parallelen, markierungsfreien Echtzeit-Messung von Molekül-Interaktionen gerne verwendet. [19]

Ein Nachteil ist jedoch, dass der Brechungsindex stark temperaturabhängig ist und dadurch bereits kleinere Temperaturschwankungen die Messungen negativ beeinflussen können. Reflektometrische Methoden, welche auf der Änderung der optischen Schichtdicke ($n \cdot d$) beruhen, haben dieses Problem nicht. [18]

Da der Brechungsindex n von der Dichte abhängig ist und diese wiederum von der thermischen Ausdehnung, nimmt der Brechungsindex n mit steigender Temperatur ab. Die physikalische Schichtdicke d der Bioschicht hingegen nimmt mit steigender

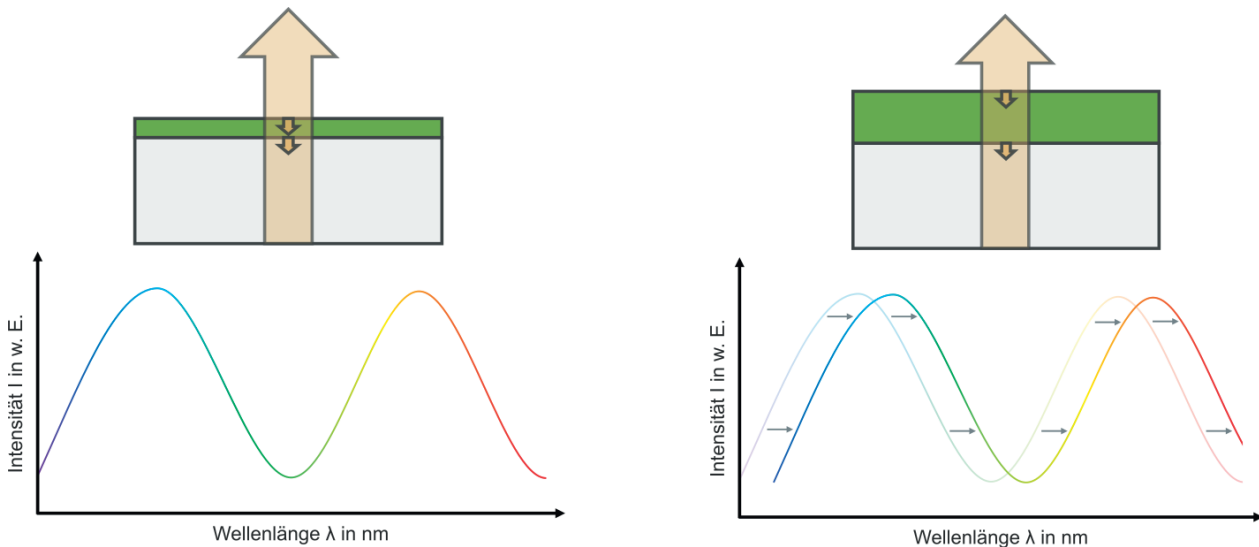


Abb. 2: Das Grundprinzip der Reflektometrie. Links: Licht (gelber Pfeil) wird an den Grenzflächen zwischen Transducer (grau) und Bioschicht (grün) sowie Bioschicht und Medium teilweise reflektiert (oben). Die reflektierten Teilstrahlen interferieren miteinander und erzeugen ein Interferenzspektrum (unten). Rechts: Wenn die optische Schichtdicke der Bioschicht sich verändert, verschiebt sich das Interferenzspektrum in x-Richtung (unten).

Temperatur zu. Dadurch sind Methoden, welche auf der Änderung der optischen Schichtdicke beruhen robust gegenüber Temperaturänderungen. [20]

Verschiedene reflektometrische Methoden wie die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), die Biolayerinterferometrie (BLI) oder die $1-\lambda$ -Reflektometrie haben sich im Laufe der Jahre entwickelt. Sie alle beruhen auf dem gleichen Prinzip, dass Teile von Licht an den Phasengrenzen reflektiert werden. Die reflektierten Teilstrahlen interferieren wellenlängenabhängig konstruktiv oder destruktiv (vergleiche mit Abb. 2, links). Wenn es nun durch die Interaktionen von Erkennungsstruktur und Analyt zu einer Änderung der optischen Schichtdicke kommt, so verschiebt sich das Interferenzspektrum in x-Richtung (vergleiche mit Abb. 2, rechts). [14]

Bei der RIfS wird Weißlicht verwendet. Das reflektierte Licht wird mittels eines Diodenzeilenspektrometers gemessen. So kann über die Verschiebung des

Interferenzspektrums in x-Richtung in Echtzeit die Änderung der optischen Schichtdicken berechnet werden (vergleiche mit Abb. 3, a)). Eine ausführlichere Beschreibung der RIfS ist unter anderem in Referenz [20] zu finden.

Bildgebende Techniken wie die (Imaging-) $1-\lambda$ -Reflektometrie nutzen einfarbiges Licht anstelle von Weißlicht [21]. Wenn die optische Schichtdicke sich ändert, kann mit einem Bildsensor in Echtzeit die lokale Intensitätsänderung des reflektierten Lichts beobachtet werden (vergleiche mit Abb. 3, b)). Da die maximale Intensitätsänderung von der Wahl der Wellenlänge abhängt, kann sie als Maß der Empfindlichkeit der $1-\lambda$ -Reflektometrie verwendet werden. Bei der Wahl der falschen Wellenlänge kann jedoch eine Bestimmung der optischen Schichtdicke unmöglich sein (vergleiche mit Abb. 3, c)). Deshalb ist es wichtig je nach verwendeter Erkennungsstruktur die richtige Wellenlänge zu wählen.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie ist eine Weiterentwicklung der $1-\lambda$ -Reflektometrie, welche durch die alternierende Verwendung mehrerer Wellenlängen und synchronisierter Bildaufnahme für verschiedenste Erkennungsstrukturen und Analyten geeignet ist – besonders bei der parallelen Messung verschiedener Assays. Sie hat eine gute zeitliche Auflösung bei vergleichbaren Signalzu-Rausch-Verhältnissen, ohne Einbußen in der örtlichen Auflösung hinnehmen zu müssen.

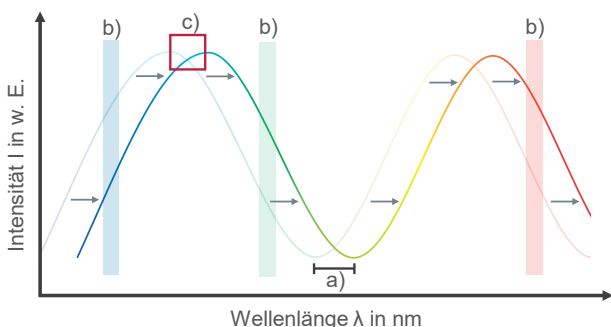


Abb. 3: Die Verschiebung des Interferenzspektrums kann auf unterschiedliche Arten ausgewertet werden. a) Die Verschiebung eines Extrempunktes in x-Richtung. b) Die Intensitätsänderung bei einer bestimmten Wellenlänge wird gemessen. c) Manche Wellenlängen sind für die Auswertung über die Intensitätsänderung geeignet, andere jedoch ungeeignet.

Methoden und Materialien

Aufbau der Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie

Der schematische Aufbau der Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie ist in Abb. 4 gezeigt. Dieser besteht aus einer RGB-LED, bei der die einzelnen Farbkanäle (rot ≈ 635 nm, grün ≈ 540 nm und blau ≈ 460 nm)

einzel gesteuert werden können. Das Licht der RGB-LED wird dann über einen Strahlteiler zum Transducer geleitet. Dort wird das Licht an den Grenzschichten teilweise reflektiert. Das reflektierte Licht fällt dann auf einen CMOS-Sensor und kann als Bild abgespeichert werden.

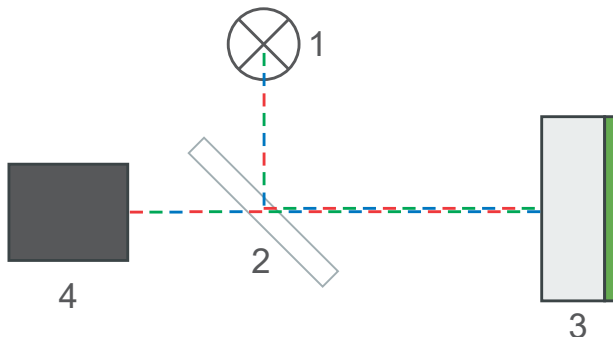


Abb. 4: Schematischer Aufbau der Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie. 1) RGB-LED, 2) Strahlteiler, 3) Transducer mit immobilisierten Erkennungsstrukturen und 4) CMOS-Sensor.

Steuerung

Für die Messungen wurde eine eigene GUI (Eclipse IDE 4.31.0) programmiert, welche die steuerbare RGB-LED mittels RS-232 jede Sekunde weiterschaltet (rot → grün → blau → rot → usw.). Synchronisiert dazu wird die Bildaufnahme gestartet. Die Kamera nimmt jede Sekunde die maximal mögliche Anzahl an Bildern (8-bit) auf, addiert diese zu einem Summenbild und speichert diese Summenbilder nach Farbe sortiert als 16-bit TIFF-Bilder ab.

Um die verschiedenen Prozesse des Schaltens der RGB-LED, der Kameratriggerung und das Summieren und anschließende Abspeichern in immer gleichen Zeitabständen zu gewährleisten, laufen diese Prozesse parallel in verschiedenen Threads. So lädt ein Thread während einer Messung die aufgenommenen Bilder konstant in den Zwischenspeicher. Ein weiterer Thread nimmt, wenn jeweils die maximale Anzahl an Bildern je Sekunden im Zwischenspeicher zusammengekommen sind (die maximale Anzahl an Bildern je Sekunde wird je nach verwendetem Sensor durch den Sensor selbst oder die maximal mögliche Datenübertragung limitiert), werden diese daraus entnommen und zu einem Bild aufaddiert. Anschließend wird das Bild von dem gleichen Thread abgespeichert. Wenn wieder die Anzahl an Bildern für die nächste Farbe im Speicher vorhanden ist, wird der Prozess wiederholt.

Das Schalten der LED wird ebenfalls durch die Anzahl an Bildern im Arbeitsspeicher ausgelöst. Hierbei ist es jedoch entscheidend, dass bereits 90 ms früher der Befehl zum Farbwechsel der LED gesendet werden muss, da diese so lange benötigt, bis der Farbwechsel tatsächlich stattfindet. Das Programm schickt dann entsprechend bereits zu einer früheren Bildanzahl den Befehl an die RGB-LED ab.

Die RGB-LED wird so eingestellt, dass die Intensität des reflektierten Lichts jeder Farbe am Anfang der Messung die gleiche Intensität hat, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewähren.

Messablauf

Für die Imaging-Reflektometrie-Messungen wird der Transducer in eine selbstgebaute Flusszelle eingespannt. Folgende Flüssigkeiten werden von einer Peristaltikpumpe (IsmaTec) mit 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ über den Transducer gepumpt:

- 0 – 200 s: PBS
- 201 – 500 s: Analytlösung
- 501 – 700 s: PBS
- 701 – 800 s: Regenerationslösung
- 801 – 1000 s: PBS

Auswertung

Für die Auswertung wird ein selbstgeschriebenes Matlab-Skript (R2024a) verwendet. Damit werden Bereiche (ROIs) markiert und dort die Intensitätswerte der Bilderserie ausgelesen. Der gemittelte Intensitätswert je ROI wird dann durch den ersten Wert der Messung geteilt. Anschließend werden jeweils ebenso berechnete Intensitätswerte eines gewählten Hintergrunds abgezogen. Man erhält dadurch die prozentuale Änderung der Intensität über die Zeit. So erhaltene Bindungskurven sind in Abb. 6 gezeigt.

Weitere Methoden

Neben der Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie wurde die RfS verwendet, um die Signaländerung für verschiedene Wellenlängen in Abb. 5 zu messen. Eine Bindungskurve in Abb. 6 (schwarze Punkte) wurde mit der $1-\lambda$ -Reflektometrie gemessen. Der Grundaufbau ist gleich zur hier vorgestellten Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie, es wird jedoch eine nichtregelbare, grüne LED ($\approx 530 \text{ nm}$) verwendet.

Materialien

Alle Messungen wurden in PBS (siehe Referenz [22], pH 7,4) durchgeführt. Als Regenerationslösung wurde eine 0,5-prozentige Natriumlaurylsulfatlösung (pH 1,5) verwendet.

Für die Messung der wellenlängenabhängigen Signaländerung wurden streptavidinbeschichtete Polystyrolkugeln (NANOCS, USA) mit den Durchmessern von 20 nm und 10 μm verwendet. Diese wurden über selbstbeschichtete biotinylierte Transducer (β -BSA von Thermo Fisher Scientific) gegeben (siehe Referenz [19]).

Für die Imaging-Reflektometrie-Messungen wurden Glastransducer mit PEG (Rapp, Tübingen) beschichtet und 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim:BSA (Merck) kovalent auf dem Transducer immobilisiert (siehe Referenz [23]). Für die Messungen wurden jeweils 1 mL einer 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-Testosteron (Origene) in PBS verwendet.

Ergebnisse

Wellenlängenabhängige Signaländerung

Das Diagramm in Abb. 5 zeigt die Signaländerungen durch die Interaktion von streptavidinbeschichteten Polystyrolkugeln auf kovalent immobilisiertem Biotin-BSA. Aus den RfS-Rohdaten wurde für jede Wellenlänge die Signaländerung nach der Interaktion berechnet. Es zeigt sich, dass für verschiedene Größen die maximale Intensitätsänderung bei unterschiedlichen Wellenlängen (445 nm für die 20 nm Polystyrolkugeln, 530 nm für die 10 μm Polystyrolkugeln) beobachtet wird.

Außerdem gibt es Wellenlängen, in denen keine Intensitätsänderung zwischen Start der Messung und Ende der Interaktion zu sehen ist. Für die 20 nm Polystyrolkugeln ist das bei etwa 490 und 610 nm, für die 10 μm Polystyrolkugeln bei etwa 470 und 490 nm der Fall.

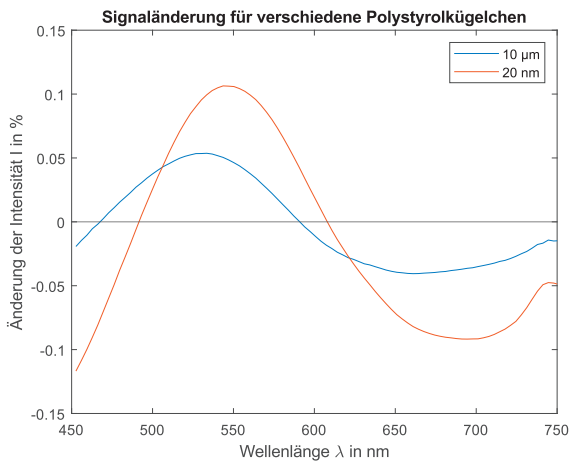


Abb. 6: Die prozentuale Änderung der Intensität je Wellenlänge. Gemessen wurde die Interaktion zwischen streptavidinbeschichtete Polystyrolkugeln (10 μm und 20 nm Durchmesser) und immobilisiertem Biotin-BSA mittels RfS.

Testosteron-/Anti-Testosteron-Assay

Die in Abb. 6 gezeigten Bindungskurven zeigen die Intensitätsänderung während einer Testosteron/Anti-Testosteron-Interaktion. Die stärkste Signaländerung nach der Assoziationsphase wird durch die 1- λ -Reflektometrie und die blaue LED erreicht. Der Verlauf der beiden Bindungskurven ist nahezu gleich. Die grüne LED zeigt ein etwas schwächeres Signal. Am wenigsten erhält man bei diesem Assay von der roten LED. In Tab. 1 sind die Signaländerungen der Bindungskurven nochmals zusammengefasst. Es wurde aus der Differenz der Intensitätsänderung zwischen den Zeitpunkten 0 s und 600 s berechnet. Das Rauschen wurde aus den ersten 20 Messwerten am Anfang berechnet. Hierfür wurde jeweils die Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers berechnet, da dort keine Signaländerung erwartet wird. Das Rauschen ist für alle Bindungskurven ähnlich, für die getriggerte blaue und grüne LED leicht besser und bei der roten LED am schlechtesten.

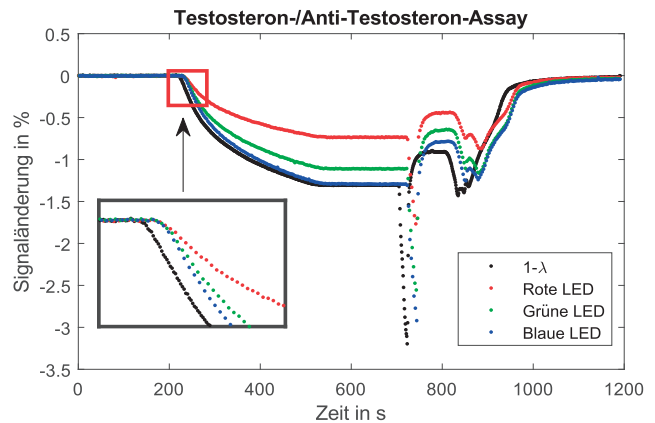


Abb. 5: Bindungskurven eines Testosteron-/Anti-Testosteron-Assays. Die schwarzen Messpunkte wurden mit der klassischen 1- λ -Reflektometrie aufgenommen. Die roten, grünen und blauen entsprechen den jeweiligen LED bei der Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie.

Aus Signal und Rauschen lässt sich dann das Signal-Rausch-Verhältnis berechnen. Durch das etwas niedrigere Rauschen erreichen die blaue und grüne LED in der Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie das beste Signal-Rausch-Verhältnis. Nur etwas schlechter ist die 1- λ -Reflektometrie und deutlich schlechter durch das höhere Rauschen und deutlich niedrigere Signal die rote LED.

Alle Bindungskurven erreichen am Ende nach der Regeneration wieder das Anfangssignal.

Tab. 1: Auswertung der Bindungskurven in Abb. 6

	1- λ	Rot	Grün	Blau
Signal in %	1,3	0,74	1,11	1,29
Rauschen in %	0,0036	0,0054	0,0028	0,0032
Signal-Rausch-Verhältnis	361,11	137,04	396,43	403,13

Diskussion

Die wellenlängenabhängige Auswertung der Signaländerung in Abb. 5 bestätigt die in der Einführung genannte Problematik. Unterschiedliche Analyten und Erkennungsstrukturen erfordern eine Anpassung des Schichtsystems für eine maximale Empfindlichkeit. Da dies nicht ohne weiteres für jede Messung zu bewerkstelligen ist, ist es mit der Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie gelungen, durch die synchronisierte Steuerung von Sensor, LED und Datenverarbeitung parallel bei unterschiedlichen Wellenlängen zu messen. Bei guter zeitlicher Auflösung wird dieselbe örtliche Auflösung wie bei der 1- λ -Reflektometrie erreicht. Das erreichte Signal-Rausch-Verhältnis ist in der gleichen Größenordnung. Dadurch ist die Mehrfarben-Imaging-Reflektometrie deutlich anpassungsfähiger an verschiedene Analyten und Erkennungsstrukturen und ist damit bestens geeignet für die parallele Messung unterschiedlichster Assays.

Literatur

- [1] Zhang, Y.; Sun, J.; Liu, L.; Qiao, H. A review of biosensor technology and algorithms for glucose monitoring. *Journal of Diabetes and Its Complications* **2021**, *35* (8), 7929. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.107929>
- [2] Noh, S.; Kim, J.; Kim, G.; Park, C.; Jang, H.; Lee, M.; Lee, T. Recent Advances in CRP Biosensor Based on Electrical, Electrochemical and Optical Methods. *Sensors* **2021**, *21*, 3024. <https://doi.org/10.3390/s21093024>
- [3] Kaur, B.; Kumar, S.; Kaushik, B. K. Recent advancements in optical biosensors for cancer detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2021**, *197*, 113805. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113805>
- [4] Zheng, X.; Zhu, H.; Zhao, X.; Wang, J.; Li, Q.; Zhao, X. Emerging affinity methods for protein-drug interaction analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2024**, *249*, 116371. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116371>
- [5] Leibiger, T. M.; Remmler, L. A.; Green, E. A.; Lee, K. H. Bio-Layer Interferometry for Adeno-Associated Virus CAPSID titer measurement and applications to upstream and downstream process development. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* **2024**, *32* (3), 101306. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101306>
- [6] Narsaiah, K.; Jha, S. N.; Bhardwaj, R.; Sharma, R.; Kumar, R. Optical biosensors for food quality and safety assurance - a review. *Journal of Food Science and Technology* **2011**, *49* (4), 383–406. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0437-6>
- [7] Ejeian, F.; Etedali, P.; Mansouri-Tehrani, H.-A.; Soozanipour, A.; Low, Z.-X.; Asadnia, M.; Taheri-Kafrani, A.; Razmjou, A. Biosensors for wastewater monitoring: A review. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *118*, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.019>
- [8] 'biosensor' in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 3rd ed. International Union of Pure and Applied Chemistry; **2006**. Online version 3.0.1, 2019. <https://doi.org/10.1351/goldbook.B00663>
- [9] Sauer, M.; Brecht, A.; Charissé, K.; Maier, M.; Gerster, M.; Stemmler, I.; Gauglitz, G.; Bayer, E. Interaction of Chemically Modified Antisense Oligonucleotides with Sense DNA: A Label-Free Interaction Study with Reflectometric Interference Spectroscopy. *Analytical Chemistry* **1999**, *71* (14), 2850–2857. <https://doi.org/10.1021/ac981057v>
- [10] Peltomaa, R.; Glahn-Martínez, B.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. Optical biosensors for Label-Free detection of small molecules. *Sensors* **2018**, *18* (12), 4126. <https://doi.org/10.3390/s18124126>
- [11] Choi, H. W.; Sakata, Y.; Ooya, T.; Takeuchi, T. Reflectometric interference spectroscopy-based immunosensing using immobilized antibody via His-tagged recombinant protein A. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2014**, *119* (2), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.017>
- [12] Schwarz, B.; Schweizer, N.; Pörl, F.; Proll, G.; Gauglitz, G. Label-free detection of H1N1 virus for point of care testing. *Procedia Engineering* **2010**, *5*, 906–909. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2010.09.256>
- [13] Möhrle, B. P.; Köhler, K.; Jaehrling, J.; Brock, R.; Gauglitz, G. Label-free characterization of cell adhesion using reflectometric interference spectroscopy (RlFS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *384* (2), 407–413. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0202-7>
- [14] Gupta, N.; Renugopalakrishnan, V.; Liepmann, D.; Paulmurugan, R.; Malhotra, B. D. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *141*, 111435. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111435>
- [15] Wu, D.; Hwang, P.; Li, T.; Piszczek, G. Rapid characterization of adeno-associated virus (AAV) gene therapy vectors by mass photometry. *Gene Therapy* **2022**, *29* (12), 691–697. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00311-4>
- [16] Riediger, C.; Sauer, P.; Matevossian, E.; Müller, M. W.; Büchler, P.; Friess, H. Herpes simplex virus sepsis and acute liver failure. *Clinical Transplantation* **2009**, *23* (s21), 37–41. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2009.01108.x>
- [17] Haghparast, S. M. A.; Kihara, T.; Miyake, J. Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states. *PeerJ* **2015**, *3*, e1131. <https://doi.org/10.7717/peerj.1131>
- [18] Fechner, P.; Gauglitz, G.; Proll, G. Through the looking-glass - Recent developments in reflectometry open new possibilities for biosensor applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2022**, *156*, 116708. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116708>
- [19] Mariani, S.; Minunni, M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406* (9–10), 2303–2323. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7647-5>
- [20] Proll, G.; Markovic, G.; Steinle, L.; Gauglitz, G. Reflectometric Interference spectroscopy. *Methods in Molecular Biology* **2009**, *167*–178. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-567-5_8
- [21] Frank, R.; Mohrle, B.; Frohlich, D.; Gauglitz, G. A label-free detection method of biochemical interactions with low-cost plastic and other transparent transducers. *Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering/Proceedings of SPIE* **2005**. <https://doi.org/10.1117/12.605431>
- [22] Phosphate-buffered saline (PBS). *Cold Spring Harbor Protocols* **2006**, *2006* (1), pdb.rec8247. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec8247>
- [23] Rau, S.; Gauglitz, G. Reflectometric interference spectroscopy (RlFS) as a new tool to measure in the complex matrix milk at low analyte concentration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *402* (1), 529–536. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5470-9>

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das Horizon Europe Projekt „BioProS“ (grant agreement no. 101070120) von der Europäischen Union finanziert. Außerdem ein herzlicher Dank an Prof. Dr. Günther Proll, Fakultät Life Sciences, Hochschule Reutlingen, für die wertvollen Diskussionen.