

**Optimierung eines Fluoreszenz-Immunsensors
für den
flexiblen Multianalyt-Nachweis**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Claudia Barzen

Tag der mündlichen Prüfung

25. Februar 2000

Dekan

Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter

Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter

Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe anfertigen zu können, und für sein Interesse und Vertrauen, daß er mir dabei entgegenbrachte.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Dr. Andreas Brecht danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Für die angenehme Zusammenarbeit im RIANA-Projekt danke ich allen Partnern, besonders Herrn Dr. Albrecht Klotz, der mir mit viel Geduld die Physik ein wenig nähergebracht hat. Dr. D. Barceló und Elena Mallat danke ich für die lehrreiche und vergnügliche Zeit in Barcelona. Ein Dankeschön auch an Dr. M. Steinwand und Dr. S. Günther, die bei technischen Schwierigkeiten immer prompte Hilfe geleistet haben.

Jochen Mehne danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft bei der Transducer-Chemie, beim Verschicken von riesengroßen Paketen und anderen Problemen.

Alexander Jung und Hans-Martin Haake danke ich dafür, daß niemals Meßdaten im Netz verloren gingen. Für die Hilfe bei Computer-Fragen möchte ich mich auch bei Armin Schütz bedanken, der außerdem alle Fragen zur Biologie aufklären konnte.

Sämtlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die für eine nette Atmosphäre im Labor gesorgt haben und mir zur Seite standen, bin ich sehr dankbar.

Mein Dank gilt besonders auch allen, die durch ihren nicht-fachlichen, freundschaftlichen Beitrag diese Arbeit immer wieder erleichtert haben!

Ganz besonders herzlich danke ich meinen Eltern für ihre große Unterstützung während dieser Arbeit und meines ganzen Studiums!

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Europäischen Kommission danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	<i>Pestizide in der Umwelt.....</i>	4
1.2	<i>Umweltanalytik und Biosensoren</i>	5
1.3	<i>Die Zielsetzung dieser Arbeit.....</i>	8
2	Grundlagen	10
2.1	<i>Fluoreszenz</i>	10
2.2	<i>Totalreflexion und evaneszentes Feld.....</i>	13
2.3	<i>Wellenleiter</i>	14
2.4	<i>Optische Sensoren.....</i>	14
2.5	<i>Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF).....</i>	15
2.6	<i>Immunologie</i>	16
2.7	<i>Antikörper für die Analytik: Immunoassays</i>	20
2.7.1	<i>Techniken mit und ohne Markierung der Reagenzien.....</i>	21
2.7.2	<i>Heterogene und homogene Assays</i>	22
2.7.3	<i>Reagenz im Überschuß oder in limitierter Konzentration</i>	23
2.8	<i>Oligonukleotide und DNA.....</i>	33
2.9	<i>Oberflächenchemie für Transducer.....</i>	35
2.10	<i>Pestizide als Analyten</i>	37
	Experimenteller Teil.....	44
3.1	<i>Geräte und Materialien</i>	44
3.2	<i>Methoden.....</i>	47
3.2.1	<i>Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS).....</i>	48
3.2.2	<i>Fließinjektionssysteme für immunologische Testverfahren.....</i>	49
3.2.3	<i>Hilfssystem für ‚flexible‘ Transducer</i>	51
3.2.4	<i>Oberflächenchemie.....</i>	53
	<i>Methode 1</i>	54
	<i>Methode 2</i>	55

<i> Methode 3</i>	55
<i> Methode 4</i>	56
3.2.5 <i>Oberflächenchemie mit Oligonukleotiden</i>	57
<i> Methode I</i>	57
<i> Methode II</i>	57
<i> Methode III</i>	58
<i> Methode IV</i>	58
<i> Methode V</i>	59
3.2.6 <i>Konjugate: Analytderivate mit AMD, Antikörpern und Oligonukleotiden</i>	59
3.2.7 <i>Markierung der Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff</i>	62
3.2.8 <i>Laboraufbau und kompakter Prototyp für TIRF-Messungen</i>	65
3.2.9 <i>Regenerationsmethoden</i>	67
3.2.10 <i>TIRF-Messungen und Datenauswertung</i>	68
4 Ergebnisse	71
4.1 <i>Charakterisierung der mit Analytderivat modifizierten Oberflächen</i>	71
4.2 <i>RfS-Charakterisierung der Oligonukleotidoberflächen</i>	78
4.3 <i>Regenerationsmethoden</i>	79
4.4 <i>Immunoassays für einzelne Analyten</i>	80
4.5 <i>Kreuzreaktivitäten</i>	96
4.6 <i>Multianalyt-Immunoassays</i>	98
4.7 <i>Untersuchung von Realproben</i>	101
4.8 <i>Messungen mit Hilfssystem</i>	105
4.8.1 <i>Hilfssystem mit Antigen-Antikörper-Paaren</i>	106
4.8.2 <i>Hilfssystem mit komplementären Oligonukleotiden</i>	119
5 Abschließende Betrachtungen	134
5.1 <i>Zusammenfassung</i>	134
5.2 <i>Ausblick</i>	138
6 Literatur	140
7 Anhang	151

<i>7.1 Abkürzungen und Konventionen</i>	<i>151</i>
<i>7.2 Akademische Lehrer</i>	<i>153</i>
<i>7.3 Lebenslauf</i>	<i>154</i>

1 Einleitung

1.1 Pestizide in der Umwelt

Obwohl in Europa in den letzten beiden Jahrzehnten große Fortschritte im Gewässerschutz erzielt wurden, sind auch heute noch erhebliche Anstrengungen notwendig, um Seen, Flüsse und Grundwasser vor weiterer Verschmutzung zu bewahren. In den 70er Jahren wurden Richtlinien aufgestellt, die Höchstwerte von Umweltschadstoffen im Wasser festlegen und dadurch die Wasserqualität schützen. 1980 wurde von der Europäischen Gemeinschaft eine Trinkwasserrichtlinie erlassen (80/778/EEC), in der Höchstgrenzen für Schwermetalle und organische Verbindungen, wie z. B. Pestizide, definiert wurden. Im nächsten Schritt wurde 1991 in der ‚*Urban Waste Water Directive*‘ festgelegt, daß eine zweite, biologische Stufe in die Abwasserbehandlung aufgenommen werden muß. Die aktuellste Richtlinie ist die im November 1998 von der Europäischen Kommission vorgelegte ‚*Drinking Water Directive*‘ (98/83/EC). Der Grenzwert für ein einzelnes Pestizid ist darin auf 0,1 µg/l festgesetzt, für die Summe aller Pestizide ist eine Konzentration von 0,5 µg/l gestattet. Alle Mitgliedsländer der Europäischen Union sind verpflichtet, diese Werte einzuhalten. Aus diesem Grunde wurde auch in Deutschland das entsprechende Gesetz, die Trinkwasserverordnung (TVO), der EU-Direktive angepaßt.

Durch ein wachsendes Bewußtsein für Umwelt und Gesundheit gibt es in einigen Ländern (z. B. Schweden, Dänemark und den Niederlanden) auch erste Aktionsprogramme, um den Pestizidverbrauch zu reduzieren. Andererseits wurden beispielsweise in Deutschland im Jahre 1995 etwa 20 % mehr Wirkstoffe in der Landwirtschaft verwendet (35.000 Tonnen) als nur zwei Jahre zuvor. Der Gesamtverbrauch in der EU liegt momentan bei 340.000 Tonnen.

Die Auswirkung von Agrochemikalien auf die Umwelt und die Gesundheit des Menschen hängt stark von der jährlich angewendeten Menge, von den toxischen Eigenschaften und der Beständigkeit in Wasser und Boden ab. Besonders chlorhaltige Verbindungen, wie die Triazine, sind sehr langlebig, können sich in Organis-

men anreichern und stehen im Verdacht, Störungen des Immun- und Hormonsystems sowie der Fortpflanzungsfähigkeit hervorzurufen.

Es gibt also Bedarf für weitere, länderübergreifende Initiativen zur Reduktion der Pflanzenschutzmittel. Auch eine Angleichung zwischen EU-Gesetzen und den bisherigen Richtlinien der Nicht-EU-Staaten ist wünschenswert, um dauerhaft und effektiv Umweltprobleme durch Wasserverschmutzung zu vermeiden. Die konsequente und sorgfältige Überwachung der Schadstoffkonzentrationen im Wasser ist ein erster, unerläßlicher Schritt, um gefährliche Veränderungen rechtzeitig zu erkennen, deren Ursachen zu finden und entsprechende Schutzmaßnahmen zu ergreifen. Dies sollte in internationaler Kooperation geschehen, um langfristig eine einwandfreie Wasserqualität sichern zu können.

1.2 Umweltanalytik und Biosensoren

Für die Überprüfung der Pestizidkonzentrationen in Wasser sind empfindliche, schnell und kosteneffizient arbeitende Nachweismethoden erforderlich. Nur so kann die Datensituation verbessert werden und eine rasche Reaktion zur Vermeidung eines weiteren Schadstoffeintrags erfolgen. Im allgemeinen werden zur Analyse von Pestiziden chromatographische Techniken (GC: Gaschromatographie oder HPLC: *high performance liquid chromatography*) in Kombination mit Detektoren wie NPD (*nitrogen-phosphorus detector*), ECD (*electron capture detector*), MS (*mass spectrometry*) oder UV/VIS-Spektrometer verwendet. Solche konventionellen Verfahren erzielen niedrige Nachweisgrenzen, erfordern allerdings eine ausgedehnte Vorbereitung der Proben durch Extraktions- und Konzentrationsschritte (Viana et al., 1993; Viana et al., 1994; Barceló & Hennion, 1997; Hidalgo et al., 1997; Lehotay, 1997). Diese sind nicht nur mit beträchtlichem Zeit- und Kostenaufwand verbunden, es besteht auch das Risiko, daß der Schadstoff durch Adsorptionsvorgänge oder Abbauprozesse der eigentlichen Analyse entzogen wird. Zusätzliche Probleme entstehen bei Schadstoffen, die aufgrund ihrer Struktur mit solchen Standardprotokollen nur schwer nachweisbar sind. Hier muß nach Alternativen gesucht werden. Ein hervorragender Ansatz für diese Fälle sind immunologische Meßmethoden (Van Emon & Lopez-Avila, 1992). Sollen diese dazu noch möglichst einfach und kostengünstig

sein, bieten sich **Biosensoren** als die Methode der Wahl an. Sie bestehen aus einer biologischen Komponente, die der Analyterkennung dient, und einem geeigneten Signalwandler (Transducer), der von der biochemischen Reaktion abhängige Meßsignale liefert. Als biologische Bausteine werden Enzyme, Antikörper oder auch ganze Zellen eingesetzt (Gronow, 1984, Byfield & Abuknesha, 1994). Nach den Vorgaben der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) muß zwischen Biosensoren und biologischen Meßtechniken (Tabelle 1) unterschieden werden (Krämer, 1996).

Tabelle 1: Kriterien für die Unterscheidung von Biosensoren bzw. biologischen Meßtechniken

<i>Biosensor</i>	<i>Biologische Meßtechnik</i>
Biochemische spezifische Analyterkennung	Biochemische spezifische Analyterkennung
Biologisches Material ist auf einem Transducer immobilisiert, der die biochemische Reaktion in ein Meßsignal verwandelt.	Biochemische Reaktion und Detektion erfolgen in zwei getrennten Schritten.
z. B. Immunosensoren: kompakte, automatisierte Meßgeräte, die reversibel arbeiten und mehrere Messungen zulassen	Immunoassays wie z. B. ELISA: externe Detektion, nicht wieder verwendbar

Die Grenzen können allerdings nicht immer so klar festgelegt werden, da es z. B. Einweg-Sensoren oder *Immunoassay-Testkits* gibt, die sich nur zwischen den beiden oben genannten Systemen einordnen lassen.

Biosensoren kommen ohne aufwendige Probenvorbereitung aus, liefern sehr schnell Ergebnisse, sind dabei sehr spezifisch und erreichen die geforderten Detektionsgrenzen (González-Martínez, 1999). Es besteht das Potential zur Miniaturisierung, wodurch tragbare, feldtaugliche Meßgeräte entwickelt werden können.

Im folgenden soll speziell auf diejenigen Biosensoren eingegangen werden, die Antikörper zur Analyterkennung anwenden. Die ihnen zugrunde liegenden immunologischen Testformate (vgl. Kapitel 2.7) wurden ursprünglich für die medizinische

Diagnostik entwickelt und haben dort eine führende Rolle erreicht. Von der starken Weiterentwicklung in der Diagnostik profitierten dann, ab Mitte der 80er Jahre (Krämer, 1996), aber auch die Anwendungen auf dem Gebiet der Umweltanalytik. Immunologische Biosensoren können dort für qualitative und quantitative Bestimmungen verwendet werden. Ihr Einsatz in diesem Bereich nimmt ständig zu und ebenso ihre Akzeptanz (Van Emon & Gerlach, 1995). Gegenüber der klassischen instrumentellen Analytik haben sie bisher in der Regel den Nachteil, keine Multi-analyt-Techniken zu sein. Je Messung kann nur ein Analyt, oder bestenfalls eine Stoffklasse, bestimmt werden. Biosensoren zum Nachweis unterschiedlicher Substanzen und unterschiedlicher Schadstoffklassen sind jedoch von großem Interesse (Brecht & Abuknesha, 1995; Barceló & Hennion, 1997), da die Anzahl nachzuweisender chemischer Substanzen aus Industrie, Landwirtschaft und Haushalten sehr groß ist und ihre oftmals nicht minder schädlichen Abbauprodukte Oberflächen- und Grundwasser zusätzlich belasten. Weitere Gründe für Multianalyt-Biosensoren ergeben sich aus folgenden Tatsachen:

- > Im Falle einer intensiven landwirtschaftlichen Bodennutzung wird eine Vielzahl von Pflanzenschutzmitteln eingesetzt. Neben Monokulturen gibt es Bereiche, in denen Pflanzen in saisonalem Wechsel angebaut werden. Dies bedeutet eine zusätzliche Kontaminierung von Boden und Wasser mit weiteren Pestiziden.
- > Wirkstoffe werden zu Pestizidmischungen verarbeitet, mit Hilfsstoffen versetzt und gelangen in dieser komplexen Form in die Natur.
- > Schadstoffe unterliegen in einem Gewässer ständigen Konzentrationsänderungen in Abhängigkeit von der Zeit und Distanz des Eintrags, von Dispersion, Verdünnung durch nicht-kontaminierte Zuflüsse, Sorption an Sedimenten, biologischem und chemischem Abbau oder Photolyse. Die Analytik sollte flexibel auf diese Situationsänderungen reagieren können.

Die geschilderte Situation verdeutlicht, wie vielfältig und variabel die Wasserbelastung sein kann und zeigt die Notwendigkeit, möglichst viele Parameter gleichzeitig und automatisiert nachweisen zu können. Eine Verbesserung physikochemischer Methoden hinsichtlich dieser Anforderungen geht mit stark steigenden

Ausgaben für Instrumente und hohen Kosten für hochqualifiziertes Personal einher. Immunologische Biosensoren sind hier eine wertvolle Ergänzung, da sie empfindlich und kostengünstig arbeiten. Sie ermöglichen ein schnelles *Screening*, d. h. vor Ort kann ein Überblick über Schadstoffkonzentrationen erhalten werden (Friedman, 1992). Selbst rein qualitative Sensoren tragen zur Verbesserung der Information über ein Gewässer bei: sie bieten den Vorteil, daß negative Proben schnell erkannt und ausgeschlossen werden können. Die Zahl der zeitraubend und teuer im Labor untersuchten Proben kann so auf ein Minimum reduziert werden.

Aus den Detektionsmethoden, die für Biosensoren angewendet werden, treten die optischen Verfahren (vgl. Kapitel 2.4) besonders hervor (Rabbany et al., 1994). Insbesondere fluoreszenzbasierte Systeme sind gut geeignet, um biochemische Wechselwirkungen beobachten und dabei besonders niedrige Nachweisgrenzen erreichen zu können (Hemmilä, 1985). Wenige Schadstoffe fluoreszieren selbst bzw. bilden fluoreszierende Abbauprodukte (Tromberg et al., 1988). In bestimmten Fällen tritt eine selektive Komplexbildung zwischen dem Analyten und einem Farbstoff auf, so daß über die damit verbundenen Fluoreszenzeffekte (Hassoon & Schechter, 1998) detektiert werden kann. In der Regel müssen fluoreszierende Derivate der Analyten synthetisiert bzw. Analyten oder Reagenzien mit Markierungen versehen werden. Bei diesen Markierungsmolekülen (Markern) handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffe oder um Enzyme, die mit fluorogenen Substraten umgesetzt werden (Krämer, 1997; García Sánchez et al., 1999).

1.3 Die Zielsetzung dieser Arbeit

Um den Anforderungen, die durch die Gesetzgebung an die Gewässeranalytik gestellt werden, gerecht zu werden, sollte ein neues, automatisiertes Biosensorsystem entwickelt werden, daß einfach, robust und kosteneffizient arbeitet. Insbesondere sollte es in der Lage sein, in *einer Wasserprobe mehrere Analyten parallel zu detektieren* und zusätzlich das *Analytenspektrum ohne besonderen Aufwand automatisch ändern* zu können.

Zur Realisierung dieses Vorhabens wurde als Meßprinzip die spezifische Wechselwirkung zwischen markierten Antikörpern und Analyten mit empfindlicher Fluores-

zenzdetektion über TIRF (*total internal reflection fluorescence*) kombiniert. Ein planarer Glastransducer sollte als Träger für die notwendigen (bio)chemischen Komponenten dienen und gleichzeitig auch als Wellenleiter für das anregende Laserlicht. Details zum Design der technischen und optischen Gerätekomponenten sind der Dissertation von A. Klotz zu entnehmen (Klotz, 1998).

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die notwendigen chemischen Aspekte zu realisieren. Sie sollte

- ⇒ die simultane immunologische Konzentrationsbestimmung mehrerer Schadstoffe in einer Probe ermöglichen und
- ⇒ die sensitiven Transducerkomponenten so flexibel gestalten, daß die Zielsubstanzen während des analytischen Prozesses austauschbar werden.

Um diese Ziele zu erreichen, konzentrierte sich die Arbeit darauf,

- ⇒ die für eine Multianalyt-Detektion geeignete chemische Modifizierung der Transducer zu entwickeln und zu optimieren,
- ⇒ neue Analytantikörper zu untersuchen,
- ⇒ mit einer geeigneten Auswahl davon Multianalyt-Immunoassays aufzubauen und abschließend in Realwasserproben zu testen und
- ⇒ die Idee des flexiblen Analytenaustauschs durch eine Anpassung der Oberflächenmodifikation und des Assay-Formats optimal zu realisieren.

Die zum Verständnis der Arbeit notwendigen theoretischen Grundlagen aus ‚Optik und Technik‘ werden in den Kapiteln 2.1 bis 2.5, die ‚Chemie‘ in den Kapiteln 2.6 bis 2.10 vorgestellt. Im folgenden dritten Teil der Arbeit werden die eingesetzten Methoden erklärt. Die Ergebnisse nehmen Kapitel 4 ein.

2 Grundlagen

In den folgenden Abschnitten wird auf optische und technische Grundlagen eingegangen. Im Anschluß werden Aspekte der Oberflächenchemie und Immunologie erläutert.

2.1 Fluoreszenz

Lumineszenz im allgemeinen entsteht durch die Photonenemission aus elektronisch angeregten Zuständen. Sie läßt sich in zwei unterschiedliche Vorgänge unterteilen, je nach den Eigenschaften der Grund- bzw. angeregten Zustände. Der Grundzustand bzw. der erste elektronisch angeregte Zustand werden mit S_0 und S_1 bezeichnet. In jedem dieser Zustände können sich Elektronen des Fluorophors in verschiedenen Schwingungsenergieniveaus aufhalten ($v = 1, 2, \dots$).

In einem **Singulettzustand** (S) haben die Elektronen eine antiparallele Spinorientierung, in einem **Tripletzustand** (T) haben sie die gleiche Spinrichtung. Um von einem angeregten Singulettzustand S_1 zum Grundzustand S_0 zurückzukehren, ist also keine Änderung der Spinorientierung notwendig. Der Übergang ist quantenmechanisch erlaubt und erfolgt unter Aussendung eines Photons (**Fluoreszenz, F**). Geht ein Molekül von einem angeregten Singulettzustand S_1 zunächst über in den Tripletzustand T_1 (*intersystem crossing, isc*), so wird die Emission beim nachfolgenden Übergang von T_1 nach S_0 als **Phosphoreszenz (P)** (s. Abbildung 1) bezeichnet und ist quantenmechanisch in erster Näherung verboten. Diese Vorgänge lassen sich übersichtlich im Termschema von Jablonski (Abbildung 1, links) darstellen.

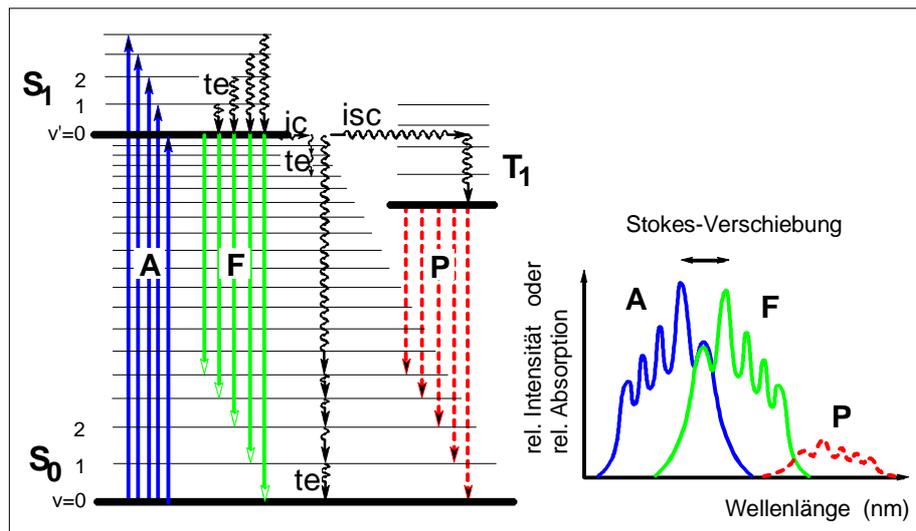


Abbildung 1: Vorgänge im Jablonski-Termschema (links) und die zugehörigen Spektren (rechts)

Wird Licht absorbiert (Absorption A, Dauer etwa 10^{-15} s) und das Molekül in den Zustand S_1 angeregt, können sich anschließend unterschiedliche Prozesse abspielen:

Ein Fluorophor, das sich in einem höher angeregten Zustand von S_1 befindet, kann durch Stöße mit Lösungsmittelmolekülen Energie abgeben und strahlungslos innerhalb von etwa 10^{-12} s in den niedrigsten Schwingungszustand von S_1 relaxieren (te, thermische Äquilibration).

Dabei können auch Änderungen des Elektronenzustandes ohne Energieabgabe erfolgen, die als ‚innere Umwandlung‘ (ic, *internal conversion*) bezeichnet werden.

Die Emission von Strahlung beim Übergang von S_1 nach S_0 erfolgt als Fluoreszenz. Die Form des Fluoreszenzspektrums wird dabei durch die Lage der Schwingungsniveaus im elektronischen Grundzustand bestimmt, die des Absorptionsspektrums durch die Lage der Schwingungsniveaus im elektronisch angeregten Zustand.

Das Emissionsspektrum des Fluorophors ist gegenüber dem Absorptionsspektrum zu höheren Wellenlängen verschoben. Dies wurde von Stokes 1852 erstmals beobachtet (vgl. Abbildung 1, rechts). Der Betrag der Verschiebung entspricht dem strahlungslosen Energieverlust.

Für TIRF-Untersuchungen (*total internal reflection fluorescence*) werden Fluorophore bevorzugt, deren Stokes Verschiebung möglichst groß ist, um Anregungs- und Emissionswellenlänge leichter voneinander trennen zu können und Störung durch

Streustrahlung zu vermeiden. Diese Anforderung wird in besonderer Weise von Eu(III)-Chelaten erfüllt (Wortberg et al., 1994), die eine Stokes Verschiebung von ca. 270 nm haben.

Weitere Parameter, die Fluoreszenzfarbstoffe charakterisieren, sind der Extinktionskoeffizient ϵ , die Quantenausbeute Φ und die Photostabilität.

Der **Extinktionskoeffizient** ϵ (l/ mol cm) ist wellenlängenabhängig und ist ein Maß für die spezifische Absorption einer Fluorophorlösung. Die **Quantenausbeute** Φ ist das Verhältnis der Anzahl der absorbierten (I_A) zu derjenigen der emittierten Photonen (I_F). Φ nimmt Werte zwischen null und eins an, da neben der Emission auch nicht-strahlende Konkurrenzprozesse auftreten. Die Quantenausbeute von Fluorophoren sollte größer als 0,1 sein. Eine ausreichende **Photostabilität** ist wichtig, da sonst schon bei der Anregung durch Zersetzungsprozesse (Photozersetzung, *photo bleaching*) oder Weiterreaktionen nicht-fluoreszierende Verbindungen gebildet werden können.

Bei der Verwendung von Fluorophoren ist darauf zu achten, daß ihre elektronische Struktur durch pH-Wert oder Polarität des Lösungsmittels, durch Moleküle mit löschender Wirkung (*quencher*) oder auch durch ihre Anbindung an Proteine beeinflusst werden kann. Dies kann Auswirkungen auf die oben beschriebenen Eigenschaften und das Spektrum haben (Klotz, 1998).

Die Fluoreszenzintensität einer Lösung ist ihrer Farbstoffkonzentration direkt proportional. Der Zusammenhang läßt sich mit dem Lambert-Beerschen Gesetz beschreiben: Eine verdünnte Lösung der Konzentration c und der Schichtdicke x wird mit Licht der Intensität I_0 bestrahlt. Um die Intensität des transmittierten Lichtes I_T zu berechnen, wird die Abnahme der Intensität dI beim Durchlaufen der Strecke x in infinitesimalen Abschnitten dx betrachtet. Es gilt

$$dI = k c I dx \quad (1)$$

k ist der natürliche Extinktionskoeffizient. Durch Integrieren erhält man das **Lambert-Beersche Gesetz** $I_T = I_0 e^{-k c x}$ bzw.

$$I_T = I_0 10^{-\epsilon c x} \quad (2)$$

Dabei ist ε der dekadische Extinktionskoeffizient. Als Extinktion E wird der Ausdruck $E = \log(I_0/I_T)$ bezeichnet. Damit ergibt sich für das Lambert-Beersche Gesetz

$$E = \varepsilon c x \quad (3)$$

Die Fluoreszenzintensität $I_F = \Phi I_A = \Phi (I_0 - I_T)$ kann mit Gleichung (2) umgeschrieben werden zu

$$I_F = I_0 \Phi (1 - 10^{-\varepsilon c x}) \quad (4)$$

Für $(\varepsilon c x) \leq 0.02$ folgt nach einer Potenzreihenentwicklung von $(1 - 10^{-\varepsilon c x})$

$$I_F = 2,3 I_0 \Phi \varepsilon c x \quad (5)$$

Dieser lineare Zusammenhang von Fluoreszenzintensität und Konzentration wird von analytischen Methoden, beispielsweise von TIRF, zur Konzentrationsbestimmung genutzt.

2.2 Totalreflexion und evaneszentes Feld

Trifft Licht aus einem Medium mit höherem Brechungsindex (n_1) auf ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex (n_2), so wird ein Teil des Lichtes an der Grenzfläche reflektiert und ein Teil gebrochen. Bei einem bestimmten Einfallswinkel Θ_{grenz} (dem Grenzwinkel der Totalreflexion) wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Für den Grenzwinkel gilt

$$\sin \Theta_{\text{grenz}} = n_2 / n_1 \quad \text{mit } n_1 > n_2 \quad (6)$$

Ist der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel Θ_{grenz} , findet Totalreflexion statt: die elektromagnetische Welle wird ins optisch dichtere Medium zurückgebogen.

Der elektrische Feldvektor ist an der Grenzfläche zwischen den beiden Medien am größten (E_0) und klingt im optisch dünneren Bereich exponentiell mit der Entfernung von der Grenze (z) ab. Dieser abnehmende Feldanteil wird als **evaneszentes Feld** bezeichnet.

$$E = E_0 \exp(z/d_p) \quad (7)$$

d_p ist die evaneszente Eindringtiefe und berechnet sich nach

$$d_p = \frac{\lambda / n_1}{2\pi[\sin^2 \Theta - (n_2 / n_1)^2]^{1/2}} \quad (8)$$

Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes nimmt mit steigendem Einfallswinkel ab und nimmt zu, je geringer der Unterschied zwischen den Brechungsindizes n_1 und n_2 ist. Die in das Umgebungsmedium geführte Lichtleistung kann zur Anregung und Detektion von Reaktionen oder Prozessen an der Grenzfläche (Transduceroberfläche) genutzt werden (Eggins, 1996). Dies ist die Grundlage für einige Techniken in der optischen Sensorik (vgl. Kapitel 2.4).

2.3 Wellenleiter

Im Prinzip besteht ein Wellenleiter aus optisch transparenten Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes n_i . Dabei gibt es einen Bereich mit dem Brechungsindex n_1 , für den gilt $n_1 > n_0, n_2$.

n_0 und n_2 sind die Indizes der umgebenden Medien. Im Bereich des hochbrechenden Mediums wird das Licht durch wiederholte Totalreflexion geführt. Licht kann so über große Distanzen und ohne nennenswerte Verluste transportiert werden.

Nimmt der Wellenleiter Dimensionen an, die deutlich größer sind als die Wellenlänge des geführten Lichts ($> 100 \mu\text{m}$), spricht man von *bulk-optischen* Systemen. Sind die wellenleitenden Strukturen hingegen nur $0,1 \mu\text{m}$ bis einige Mikrometer groß, lassen sie sich der *integrierten Optik* zuordnen (Klotz, 1998). Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden bulk-optische Transducer eingesetzt.

2.4 Optische Sensoren

Oberflächensensitive Techniken sind in der biochemischen Analytik von großer Bedeutung. In den vergangenen 20-30 Jahren haben sich einige optische Methoden etabliert, die als Sensoren für Konzentrationsbestimmungen oder zur Beobachtung von Bioaffinitätsreaktionen Anwendung finden. Einer der Reaktionspartner wird auf der Transduceroberfläche immobilisiert. Das Anbinden des zweiten Partners wird über Änderungen optischer Eigenschaften detektiert (Schmid et al., 1997). Es ist zu unterscheiden zwischen markierungsfreien Techniken und solchen, die eine markierte Komponente benötigen. Ohne Markermoleküle kommen Gitterkoppler, Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*), Ellipsometrie,

Refraktometer, Interferometer oder RIfS (Reflektometrische Interferenzspektroskopie) aus (Brecht et al., 1997). Es werden Änderungen der sensitiven Schichten, wie z. B. des Brechungsindex oder der Schichtdicke, beobachtet. Markierungsfreie Methoden sind einerseits einfach anzuwenden, bringen andererseits aber auch Nachteile mit sich, wie beispielsweise geringere Empfindlichkeit oder größere Anfälligkeit für nicht-spezifische Änderungen der biologischen Schichten (Asanov et al., 1998; O'Brien, M. J. et al., 1999).

Evaneszenzfeldtechniken, wie TIRF, verwenden Markierungsmoleküle, z. B. Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe, für die Signalerzeugung. In Kombination mit immunologischen Erkennungsreaktionen werden sie zu attraktiven, einfachen analytischen Mitteln und zählen zu den aussichtsreichsten Sensortechniken (Domenici et al., 1995).

2.5 Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)

Durch Totalreflexion eines Lichtstrahls in einem Wellenleiter wird im Umgebungsmedium ein evaneszentes Feld erzeugt, das zur Anregung fluoreszierender Moleküle an der Grenzfläche genutzt werden kann. Handelt es sich dabei um Antikörper die mit einem Fluorophor markiert sind, so kann die spezifische immunologische Analyt-erkennung mit den kleinen Nachweisgrenzen von Fluoreszenzmessungen vereint werden (Kronick & Little, 1975). Auf dieser Methode beruhen Immunosensoren, die in der Umweltanalytik zur Bestimmung von Pestiziden oder Toxinen eingesetzt werden (Bier et al., 1992; Anis & Eldefrawi, 1993; Oroszlan et al., 1993; Shriver-Lake et al., 1995; Hale et al., 1996; Mosiello et al., 1997; Narang et al., 1997; Meusel et al., 1998). Dabei werden entweder optische Fasern oder planare Wellenleiter als Transducer eingesetzt. Beiden gemeinsam ist, daß ihre Anwendung kaum durch Hintergrundfluoreszenz der Probenlösung gestört wird. Durch das evaneszente Feld werden nur Moleküle an der Transduceroberfläche angeregt. In der vorliegenden Arbeit wurden planare, mit Analytderivaten modifizierte Transducer (1,5×60×15 mm) für TIRF verwendet (Abbildung 2).

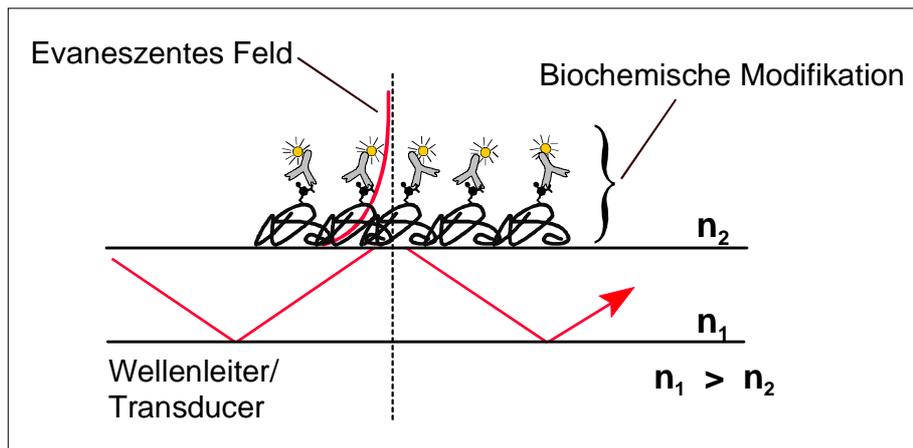


Abbildung 2: Planarer TIRF-Transducer (Dimensionen nicht maßstabsgerecht; $n_1 =$ Brechungsindex des Transducers; $n_2 =$ Brechungsindex der biochemischen Modifikation)

Die Dicke der in Wasser gequollenen biochemischen Schicht beträgt nach ellipsoidometrischen Messungen 30 nm - 60 nm (Piehler, 1997) und liegt somit im Bereich des evaneszenten Feldes. Die Fluoreszenzstrahlung wird mit Lichtleitern von der der Probe abgewandten Seite senkrecht zur Transduceroberfläche aufgenommen und mit Photodioden detektiert.

Ein Vorteil der TIRF-Methode ist ihr Potential für die Multianalyt-Detektion. Prinzipiell können an jedem der Reflexionspunkte unterschiedliche Substanzen gemessen werden. Die Anzahl der Reflexe N ist nach

$$N = (L/T) \cot \Theta \quad (9)$$

abhängig vom Einfallswinkel Θ des Lichtes, von der Transducerlänge L und der Transducerdicke T . Bei den für diese Arbeit eingesetzten Transducern lag die Anzahl der Reflexionen bei sechs bis acht.

2.6 Immunologie

Das Immunsystem aller Wirbeltiere dient dazu, den Körper vor eindringenden Mikroorganismen, Viren oder anderen Fremdstoffen zu schützen. Es wendet dazu zwei verschiedene, zusammenwirkende Mechanismen an: die humorale¹ Immunantwort (bestehend aus Antikörpern) und die zelluläre Immunantwort, bestehend aus T-

Lymphozyten (*T: Thymus*; Entstehungsort dieser Lymphozyten). Im folgenden werden einige Begriffe der Immunologie kurz erläutert.

Antikörper (Immunglobuline) werden als Reaktion auf eine fremde Substanz (**Immunogen, Antigen**) gebildet. Sie gehören zu den Glykoproteinen, kommen in Körperflüssigkeiten und im Serum aller Säugetiere vor und werden von Plasmazellen produziert, die sich aus B-Lymphozyten entwickelt haben (*B: bone marrow*, Knochenmark). Notwendiger Schritt für die Antikörperbildung ist der Kontakt zwischen B-Lymphozyten und einem Antigen. B-Lymphozyten tragen ein membran-gebundenes Immunglobulin, das die gleiche Spezifität besitzt, wie das, welches schließlich von der Plasmazelle gebildet wird.

Proteine, Nukleinsäuren oder Polysaccharide können die Antikörperbildung direkt auslösen. Kleineren Fremdmolekülen (**Haptenen**) gelingt dies nur, wenn sie an ein Makromolekül (*carrier*, Träger) gebunden sind. Ein typischer Träger ist BSA (*bovine serum albumin*, Rinderserumalbumin).

Immunglobuline (Ig) lassen sich in fünf verschiedene Klassen unterteilen: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Sie unterscheiden sich durch Molekülgröße, Aminosäuresequenz, Ladung oder Polysaccharidanteile. Auch innerhalb einer Klasse kommen Heterogenitäten vor, beispielsweise Ladungsunterschiede, welche sich durch Elektrophorese bestimmen lassen. Die Klasse **IgG** (Abbildung 3) macht den größten Anteil im Serum aus. Das Molekulargewicht liegt bei etwa 150 kDa². IgG-Moleküle haben eine Y-förmige Struktur (Abbildung 3) und bauen sich aus zwei identischen leichten („L“ *light*) und zwei identischen schweren („H“ *heavy*) Polypeptidketten auf, die über Disulfidbrücken verknüpft sind. Jede Kette besteht aus einer variablen („V“) und einer konstanten Region („C“).

¹ lat. *humor*: Flüssigkeit

² 1 Dalton (Da) entspricht 1/16 der Masse des ¹⁶O-Atoms (vgl. Byfield & Abuknesha, 1994).

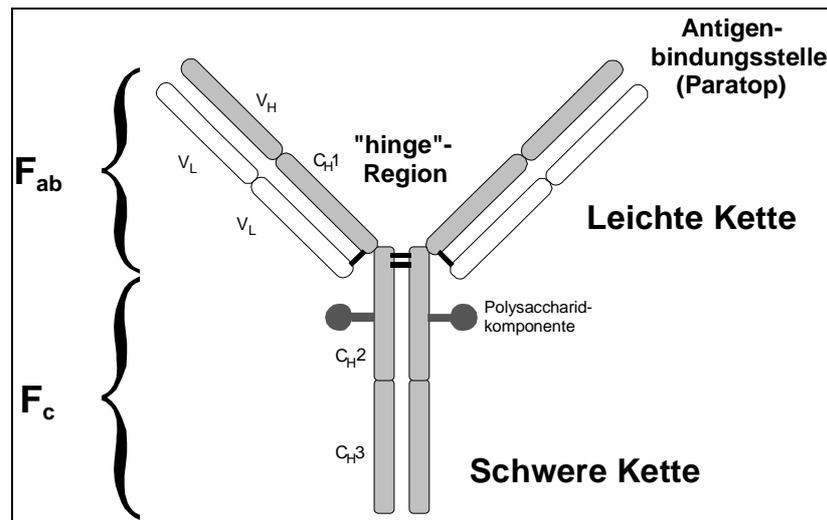


Abbildung 3: Struktur eines IgG-Moleküls

Das Enzym Papain spaltet das Molekül derart, daß zwei sogenannte F_{ab} -Fragmente (ab: **antigenbindend**) und ein F_c -Fragment (c: **constant**) entstehen. Die F_{ab} -Fragmente bestehen aus einer vollständigen leichten Kette und dem aminoterminalen Abschnitt einer schweren Kette. Das F_c -Fragment wird aus den carboxyterminalen Bereichen der beiden schweren Ketten gebildet. Die ‚*hinge*‘-Region ist wie ein Scharnier, das Winkeländerungen zwischen den F_{ab} -Bereichen erlaubt. Dadurch wird das IgG-Molekül sehr flexibel, und die Bindung multivalenter Antigene wird ermöglicht.

Die **Bindung zwischen Antigen und Antikörper** kommt nur dann zustande, wenn das Antigen (bzw. das Epitop des Fremdmoleküls) und die Antigenbindungstasche (Paratop) komplementär zueinander passen. Es liegt keine kovalente Bindung vor, sondern ein Zusammenwirken von

- hydrophoben Wechselwirkungen,
- elektrostatischen Wechselwirkungen,
- Van der Waals-Kräften und
- Wasserstoffbrückenbindungen.

Dabei machen die hydrophoben Wechselwirkungen etwa die Hälfte der Gesamtbindungsenergie aus. Sie sind die primären Anziehungskräfte, die über weitere Distanzen (2 - 3 nm) wirken. Unpolare Seitenketten der Proteine lagern sich zusammen, wobei Wassermoleküle verdrängt werden, was zu einem Entropiegewinn führt. Elektrostatische Kräfte (zwischen den Amino- und Carboxylgruppen der Proteinseitenketten) sind umgekehrt proportional zum Abstand der beiden Ladungen und

hängen von der Ionenstärke der Lösung ab. Nach dieser Annäherung zwischen Epitop und Paratop können nun Van der Waals-Kräfte wirken (welche sich anschaulich als induzierte Dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkung deuten lassen) und Wasserstoffbrückenbindungen (zwischen -OH, -NH₂ und -COOH) ausgebildet werden. Sie können nur zwischen sehr kleinen Distanzen entstehen (0,2 - 0,3 nm).

Das Gleichgewicht zwischen anziehenden und abstoßenden Kräften bestimmt die **Affinität** der Antikörper. Dabei wird lediglich eine einzige Bindungsstelle betrachtet. Im Falle einer multivalenten Bindung zwischen einem Antikörper (Ak) und einem Antigen (Ag) wird von **Avidität** gesprochen. Diese ist größer als die Summe der Energien der beteiligten Einzelbindungen.

Zur Herstellung von **polyklonalen Antikörpern** wird einem Versuchstier das Antigen mehrmals injiziert. Im Falle kleiner Moleküle, wie zum Beispiel der in dieser Arbeit bestimmten Pestizide, muß zuvor das Molekül an einen Proteinträger gebunden werden, um als Immunogen zu wirken. Wenige Monate nach der Injektion können aus dem Serum spezifische Antikörper durch Affinitätschromatographie isoliert werden. Diese entstammen unterschiedlichen Zellklonen, die an das Immunogen gebunden haben: die Antikörper sind polyklonal und haben somit abweichende Charakteristika. Dies kann zu Kreuzreaktivitäten führen, die in der analytischen Anwendung normalerweise unerwünscht sind. Es gibt jedoch auch Methoden, die gerade das kreuzreaktive Verhalten verwenden, um eine Möglichkeit zur Erkennung von ganzen Substanzklassen oder Analyten und ihren Metaboliten zu haben. Kreuzreaktivität kann also zu einer Form der Multianalyt-Detektion sehr positiv genutzt werden (Bjarnason et al., 1997; Van Emon & Lopez-Avila, 1992).

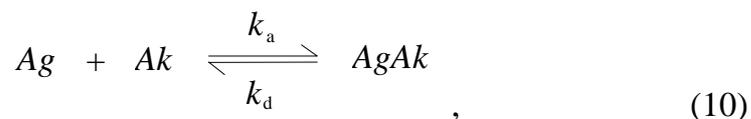
Durch Fusion von antikörperbildenden B-Zellen mit unsterblichen Tumorzellen entstehen Hybridome, die die Eigenschaften ihrer Ausgangszellen vereinen. Es können nun die Klone ausgewählt werden, die Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften bilden. Somit lassen sich einheitliche, **monoklonale Antikörper** in praktisch unbegrenzter Menge herstellen (Köhler & Milstein, 1975). Dies hat Vorteile für ihre Anwendung in der Analytik. Nachteilig sind die anfänglich hohen Kosten der Herstellung und der große Zeitaufwand (Winklmaier et al., 1997). In der Bioanalytik

werden sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper eingesetzt. Dabei werden ganze IgG-Moleküle oder auch nur die F_{ab}-Fragmente verwendet.

2.7 Antikörper für die Analytik: Immunoassays

Die Eigenschaft von Antikörpern, bestimmte Fremdstoffe spezifisch zu erkennen, macht sich die Analytik in Form von **Immunoassays** zunutze (Marco et al., 1995).

Kleine Moleküle können nur gebunden an Makromoleküle eine Immunreaktion auslösen. Sind jedoch die Antikörper einmal gebildet, werden auch die freien kleinen Moleküle von ihnen erkannt und gebunden. Besonders interessant ist, daß diese spezifische Erkennung auch in komplexen Matrices, wie biologischen Proben oder Umweltproben, zuverlässig stattfindet. Die Bezeichnung Immunoassay impliziert nicht nur die Erkennung, sondern auch die quantitative Bestimmung des Analytmoleküls (Price & Newman, 1997). Dabei wird die Reaktionsgleichung der Komplexbildung zwischen Antigen (*Ag*, Analyt) und Antikörper (*Ak*) betrachtet



wobei k_a und k_d die Assoziations- bzw. Dissoziationsratenkonstante der Reaktion darstellen. Über das Massenwirkungsgesetz für diese Reaktion

$$K = \frac{[AgAk]}{[Ag][Ak]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (11)$$

kann die Konzentration des Analyten berechnet werden. Sind hingegen die Gleichgewichtskonzentrationen bekannt, erhält man Auskunft über die Gleichgewichtskonstante K (häufig auch Affinitätskonstante genannt) der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die Entwicklung immunologischer Analysenmethoden begann mit den Radioimmunoassays (RIA), zunächst für die Bestimmung von Insulin (Yalow & Berson, 1959). Problematisch sind dabei die Handhabung, die beschränkte Lagerstabilität und die Entsorgung der radioaktiven Komponenten. Auch der Aufwand und die Kosten für das Auslesen der Signale sind erheblich (Ekins, 1994). Seit Anfang der 70er Jahre wurden zunehmend Enzymimmunoassays (z. B. ELISA, *enzyme linked immuno-*

sorbent assay) in die medizinische Diagnostik eingeführt, haben sich dort bis heute zu einer Routinemethode etabliert und finden auch in der Umweltanalytik Anwendung. Die Enzymmarkierung bringt den Vorteil einer Signalverstärkung mit sich, da ein Enzymmolekül mehrere Substratmoleküle umsetzt. Der Zusatz eines Chromogens führt dann zu einer Farbreaktion, die detektiert wird. Solche Immunoassays sind jedoch mit langen Inkubationszeiten verbunden, so daß sie für dauerhafte Überwachungsanwendungen eher ungeeignet sind. Um also schneller und automatisch arbeitende Analysensysteme zu haben, hat sich ein Trend zu transducer-basierten **Immunsensoren** entwickelt, die laut Definition automatisiert, on-line und reversibel messen (Ekins, 1994 und vgl. Kapitel 1.2).

Die Testformate für Immunoassays und -sensoren können nach den folgenden drei Gesichtspunkten eingeteilt werden

- 1) Markierungsfrei oder mit markierten Reagenzien
- 2) Heterogenes oder homogenes Testformat
- 3) Reagenz im Überschuß oder in begrenzter Menge.

Zur vollständigen Beschreibung eines Assays ist aber stets eine Kombination aus diesen drei Kategorien notwendig. So kann beispielsweise ein Assay mit markiertem Reagenz homogen oder heterogen sein und dabei mit begrenzter Reagenzkonzentration oder einem Überschuß durchgeführt werden.

2.7.1 Techniken mit und ohne Markierung der Reagenzien

Es gibt Meßmethoden, die eine direkte markierungsfreie Beobachtung der Antigen-Antikörper-Bindung ermöglichen. Dazu gehören massensensitive (z. B. Quarzmikrowaage, *QMB*) oder optische Verfahren wie Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), Ellipsometrie oder Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).

Radiometrische oder spektroskopische Techniken benötigen hingegen eine Markierung der Reagenzien mit Radioisotopen, Metallionen, Enzymen oder Fluorophoren.

2.7.2 *Heterogene und homogene Assays*

In jedem Immunoassay geht es letztendlich immer darum, freie und gebundene Moleküle voneinander zu unterscheiden. Dies kann an fester Phase durch Separationsschritte geschehen (heterogene Assays), oder durch die signifikante Veränderung einer Meßgröße aufgrund der Antigen-Antikörper-Komplexbildung in Lösung (homogene Assays).

Bei **heterogenen Assays** können entweder Antikörper oder Analytderivate auf einer Oberfläche immobilisiert sein und freie Antigene bzw. Antikörper aus der Probenlösung abfangen, während gebundene Antigene bzw. Antikörper mit bereits besetzten Bindungsstellen weggespült werden. Eine andere Separationsmöglichkeit ist die Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes aus der Lösung oder seine Immobilisierung über Proteine (Protein A, anti-idiotypische Antikörper). Die Vollständigkeit der Bindung an die feste Phase, das Vermeiden unspezifischer Bindung und die Effizienz der Waschvorgänge sind entscheidend für die Leistungsfähigkeit solcher heterogener Immunoassays, die im übrigen sowohl mit markierten als auch unmarkierten Reagenzien durchführbar sind.

Homogene Immunoassays beruhen darauf, daß in Lösung meßbare Effekte auftreten, die im Zusammenhang mit der Komplexbildung stehen. Eine Art markierungsfreier homogener Assay ist die Messung der Trübung einer Lösung (Turbidimetrie) aufgrund der Präzipitation des Komplexes, der sich bei Proteinantigenen bilden kann (Price & Newman, 1997). In der Regel werden homogene Assays mit Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt. Aufgrund der Analyt-Antikörper-Reaktion kann sich die Polarisation der Fluoreszenzstrahlung ändern (FPIA, *fluorescence polarisation immunoassay*; Önnerfjord et al., 1998; Eremin et al., 1998) oder es kann eine Verstärkung (*enhancement*) bzw. eine Löschung (*quenching*) des Signals stattfinden. Eine andere Möglichkeit ist die Signaländerung durch Energietransfer (RFET, *resonant fluorescence energy transfer*), der dann auftritt, wenn Antikörper und Antigen mit einem bestimmten Farbstoffpaar (Donor- und Akzeptorfarbstoff) markiert sind und aneinander binden (Schobel, 1999).

2.7.3 Reagenz im Überschuß oder in limitierter Konzentration

1) Reagenzienüberschuß

Folgendes Beispiel soll das Testformat mit Reagenzienüberschuß veranschaulichen: Analyt aus der Probe belegt proportional zu seiner Konzentration die Bindestellen immobilisierter Antikörper. Mit einem Überschuß eines markierten Zweitantikörpers werden die an die ersten Antikörper gebundenen Antigene detektiert. Das Signal dieses ‚Sandwich Assays‘ ist zur Antigenkonzentration direkt proportional. Er ist nur durchführbar, wenn das Hapten zwei antigene Determinanten besitzt, was bei kleinen Molekülen, wie Pestiziden, eher selten der Fall ist. Vorteilhaft ist, daß Inkubationszeiten kürzer sind als bei kompetitiven Assays (vgl. Abschnitt II) und theoretisch niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden können (Hock & Niessner, 1995; Jackson & Ekins, 1986).

Ia) Bindungshemmtest (BHT)

Der BHT wird bei heterogenen Assays häufig angewendet, so auch in der vorliegenden Arbeit. Hier liegt ein Analytderivat im Überschuß vor, und zwar immobilisiert auf einer Oberfläche.

Die Proben werden mit einer bekannten Menge (markierter) Antikörper vorinkubiert. $[Ak_0]$ bezeichnet dabei die Konzentration der Bindungsstellen (die bei bivalenten Antikörpern oder allgemein polyvalenten Rezeptoren nicht mit der Antikörper- bzw. Rezeptorkonzentration identisch ist!). In Lösung stellt sich zwischen Antikörper $[Ak_{frei}]$, Analyt $[Ag_{frei}]$ und dem Komplex aus beiden $[AgAk]$ ein Gleichgewicht ein:



Das Massenwirkungsgesetz für diese Reaktion lautet

$$K = \frac{[AgAk]}{[Ag_{frei}][Ak_{frei}]} \quad (13)$$

Die Lösung wird anschließend über einen Transducer geleitet. Dieser ist mit einem Überschuß an Analytderivat modifiziert, an welches die unbesetzten Antikörper binden. Folgende Vorgänge sind insgesamt beim BHT zu betrachten:

- Gleichgewichtseinstellung in homogener Phase (Vorinkubation)
- Diffusion der Reaktionspartner an die Oberfläche
- Assoziations- und Dissoziationsvorgänge an der Oberfläche

Die in der Lösung noch nicht besetzten Antikörperbindestellen $[Ak_{frei}]$ binden so schnell an das immobilisierte Derivat, daß die Reaktion am Transducer nur von der Diffusion der Antikörper zur Oberfläche kontrolliert wird. Die Menge dieser noch bindungsfähigen Antikörper wird am Transducer detektiert und ist abhängig von der Konzentration des Analyten in der Probe: je höher diese war, desto mehr Bindestellen der Antikörper wurden bei der Vorinkubation besetzt und desto geringer ist die Zahl derer, die noch am Transducer binden können. Die Antikörperbindung ist ‚gehemmt‘. Das an der Transduceroberfläche gemessene Signal ist also der Analytkonzentration in der Probe umgekehrt proportional.

Das Gleichgewicht in homogener Phase (Gleichung (12)) soll vereinfachend unbeeinflusst von den Vorgängen an der Oberfläche untersucht werden. Dies ist zulässig, da im Durchfluß gemessen wird, d. h. die Interaktionszeiten mit dem Transducer nur sehr kurz sind.

Die im homogenen Gleichgewicht vorliegenden freien Rezeptoren diffundieren an die Transduceroberfläche, werden dort von den immobilisierten Liganden abgefangen und können auf diesem Wege quantifiziert werden. Die so bestimmte Konzentration kann wiederum genutzt werden, um Aussagen über das Gleichgewicht in Lösung zu machen.

Bei der Ableitung der Gleichgewichtskonzentration der freien Antikörperbindestellen $[Ak_{frei}]$ aus dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung (13)) muß beachtet werden, daß IgG-Antikörper bivalente Rezeptoren sind (d. h. zwei Bindungsstellen haben). Die entsprechende Ableitung von $[Ak_{frei}]$ (nach Piehler, 1997) resultiert in Gleichung (14):

$$[Ak_{frei}] = \frac{[Ak_0]}{2} - \frac{\left[\frac{[Ak_0] + [Ag_0] + K^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{([Ak_0] + [Ag_0] + K^{-1})^2}{4} - [Ak_0][Ag_0]} \right]^2}{2[Ak_0]} \quad (14)$$

Die Auftragung eines zu $[Ak_{frei}]$ proportionalen Meßsignals gegen die Antigenkonzentration ergibt Titrationskurven, die für analytische Zwecke als Kalibrierkurven verwendet bzw. aus welchen im Prinzip Affinitätskonstanten bestimmt werden können. Abbildung 4 zeigt simulierte Kalibrierkurven, um den Einfluß der Antikörperkonzentration (oben) bzw. der Affinitätskonstante (unten) auf die Form und Lage der Kurve zu erklären.

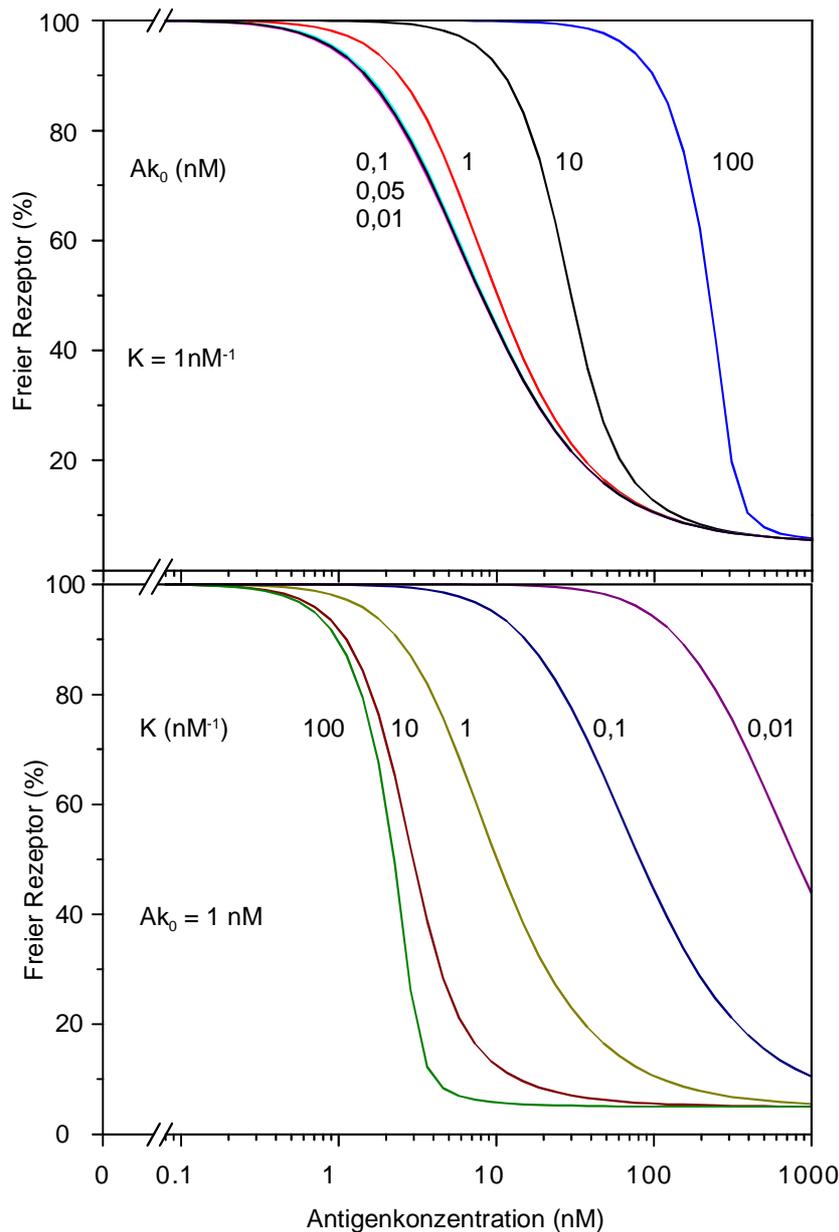


Abbildung 4: Verlauf von Titrationskurven in Abhängigkeit von der Konzentration der Antikörperbindestellen (oben; für $K = 1 \text{ nM}^{-1}$) und der Affinitätskonstante (unten; für $[Ak_0] = 1 \text{ nM}$) nach Piehler, 1997.

Wie sich Titrationskurven bei konstanter $[Ak_0]$ in Abhängigkeit von der Affinitätskonstante ändern, ist in Abbildung 4 (unten) zu sehen. Bei sehr hoher Affinität werden die Kurven sehr steil, so daß nur ein sehr schmaler Arbeitsbereich vorliegt. - Dasselbe Verhalten beobachtet man übrigens auch bei sehr hoher Antikörperkonzentration (oben). - Für die Anwendung in der Analytik sind jedoch möglichst weite Meßbereiche erwünscht, was bei Antikörperkonzentrationen in der Größenordnung von K^{-1} optimal erreicht wird.

Für Analysen ist der **Testmittelpunkt** (t_{mp}) einer Kalibrierkurve ein interessanter Parameter, der oft durch den sogenannten **IC₅₀-Wert** angegeben wird. Dieser entspricht der Analytkonzentration, bei der das gemessene Signal 50 % des maximalen (bei Konzentration null) beträgt, d. h. bei der die Hälfte der Rezeptorbindestellen blockiert ist. Auch hier sieht man aus Abbildung 4, daß bei gegebener Affinität die Antikörperkonzentration für die Lage des Testmittelpunkts entscheidend ist. Wird sie jedoch weiter unter K^{-1} reduziert, ändert sich der Testmittelpunkt nicht mehr.

Für polyklonale Antikörper ist es oft nicht möglich, die gemessenen Werte mit der Funktion nach Gleichung (14) anzupassen. Es kann auf eine logistische Funktion mit 4 Parametern (Gleichung (15); Hock & Nießner, 1995; Winklmaier et al., 1997) ausgewichen werden. Sie gibt einen Wert $[Ag_{0,t_{mp}}]$ für den Testmittelpunkt an.

$$y = \frac{A - D}{1 + ([Ag_0]/[Ag_{0,t_{mp}}])^b} + D \quad (15)$$

mit : $[Ag_0]$ = Analytkonzentration
 A, D = obere und untere Asymptote an die Kurve
 $[Ag_{0,t_{mp}}]$ = Analytkonzentration am Wendepunkt (Testmittelpunkt)
 b = Steigung am Wendepunkt

Die aus der logistischen Funktion oder aus dem Massenwirkungsgesetz bestimmte Gleichgewichtskonzentration des freien Antigens wird zur Berechnung der Affinitätskonstanten in Gleichung (16) eingesetzt.

$$K = \frac{2 + \sqrt{2}}{\sqrt{2}[Ag_{0,t_{mp}}] - [Ak_0]} \quad (16)$$

Die ausführliche Herleitung von Gleichung (16) findet sich bei Schobel, 1999.

Eine konkrete Affinitätskonstante läßt sich jedoch nur für monoklonale Antikörper bestimmen. Polyklonale Antikörper bilden eine heterogene Mischung unterschiedlicher Affinitäten. Zur Beschreibung dieser Antikörper kann folglich nur ein ‚mittleres‘ K angegeben werden. Dieses kann in der Praxis aber wichtige Anhaltspunkte geben, z. B. über die relativen Affinitäten eines Antikörpers gegenüber ver-

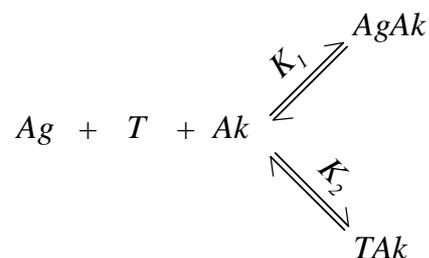
schiedenen Haptenen. Solche Informationen wurden in der vorliegenden Arbeit zur Optimierung der Immunoassays mit Hilfssystem angewendet (vgl. Kapitel 4.8.2).

Die logistische Funktion kann nicht in jedem Falle zur Bestimmung von $[Ag_{0,mp}]$ genutzt werden. Manche Titrationskurven zeigen trotz hoher Analytkonzentration ein deutliches Restsignal ($Offset, S_{offset}$). Dies tritt vermutlich durch eine hohe Dissoziationsratenkonstante des Antigen-Antikörper-Komplexes auf. In der Nähe der Oberfläche stehen dann zusätzliche frei gewordene Rezeptorbindestellen zur Verfügung. Diese binden bevorzugt an der Transduceroberfläche, da dort ein Überschuß an Antigen vorliegt. Durch diese Bindung an den Transducer wird das gemessene Signal erhöht. Die logistische Kurvenanpassung bezieht diesen Wert S_{offset} jedoch nicht in ihre Berechnung mit ein. Die aus ihr erhaltene Konzentration für den Testmittelpunkt bezieht sich nur auf den Wert bei halber Signaldynamik. Bei deutlicher Rückbindung ($S_{offset} \geq 10\%$) ist $[Ag_{0,mp}]$ aber nicht mehr identisch, sondern größer als die Konzentration, die zur Inhibierung von 50 % der Rezeptorbindestellen benötigt wird.

Soll aus einer Titrationskurve eine Affinitätskonstante berechnet werden, darf das Restsignal bei hoher Antigenkonzentration, also das Phänomen der Rückbindung, nicht vernachlässigt werden. Dies würde zu einem falschen Ergebnis führen.

II) Kompetitive Assays mit begrenzter Reagenzienmenge

Für kompetitive Assays wird die Probe, die eine unbekannte Menge Analyt (Ag) enthält, mit einer bekannten Konzentration eines (markierten) Antigenderivats (*tracer*, T) und einer bekannten Konzentration des (markierten) Antikörpers (Ak) gemischt. Es liegt somit eine Konkurrenzsituation zwischen Analytderivat und Analyt vor: beide binden in einer Gleichgewichtsreaktion an die Antikörper.



Oberflächenreaktion, also der Einfluß von K_3 , auf die Gleichgewichte in der Lösung (Gleichungen (17), (18)) vernachlässigt werden.

$$K_1 = \frac{[AgAk]}{[Ag_{frei}][Ak_{frei}]}, \quad K_2 = \frac{[HrAk]}{[Hr_{frei}][Ak_{frei}]} \quad (17), (18)$$

Zur Vereinfachung sollen im folgenden die Affinitätskonstanten des Antikörpers gegenüber dem Analyten bzw. dem Derivat am Hilfsreagenz gleichgesetzt werden ($K_1 = K_2$). Für die Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktionspartner gilt

$$[Ak_0] = [Ak_{frei}] + [AgAk] + [HrAk]$$

$$[Ag_0] = [Ag_{frei}] + [AgAk]$$

$$[Hr_0] = [Hr_{frei}] + [HrAk]$$

Setzt man diese in die Gleichungen (17), (18) ein und löst die sich ergebende quadratische Gleichung nach $[HIHrAk]$ auf, erhält man für den Komplex aus Hilfskonjugat und Antikörper

$$[HIHrAk] = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4K^2([Ag_0] + [Hr_0]) \cdot ([Hr_0]^2[Ak_0])}}{2K^2([Ag_0] + [Hr_0])} \quad (18)$$

mit

$$b = K^2 \times [Hr_0] \times \{K^{-1} + [Ag_0] + [Ak_0] + [Hr_0]\}$$

Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind proportional zu $[HIHrAk]$. Trägt man $[HIHrAk]$ gegen unterschiedliche Analytkonzentrationen auf, erhält man Kalibrierkurven (Abbildung 5, Abbildung 6).

In Abbildung 5 erkennt man den Einfluß sich ändernder Antikörperkonzentration auf die Kalibrierkurven. K_1 und K_2 betragen je 1 nM^{-1} , die Konzentration des Hilfskonjugats 1 nM . Unter diesen Bedingungen zeigt sich, daß sich die Lage der Kurve bei Antikörperkonzentrationen $\leq K^{-1}$ kaum weiter nach links verschiebt (oben), die Signaldynamik hingegen stark abnimmt (unten).

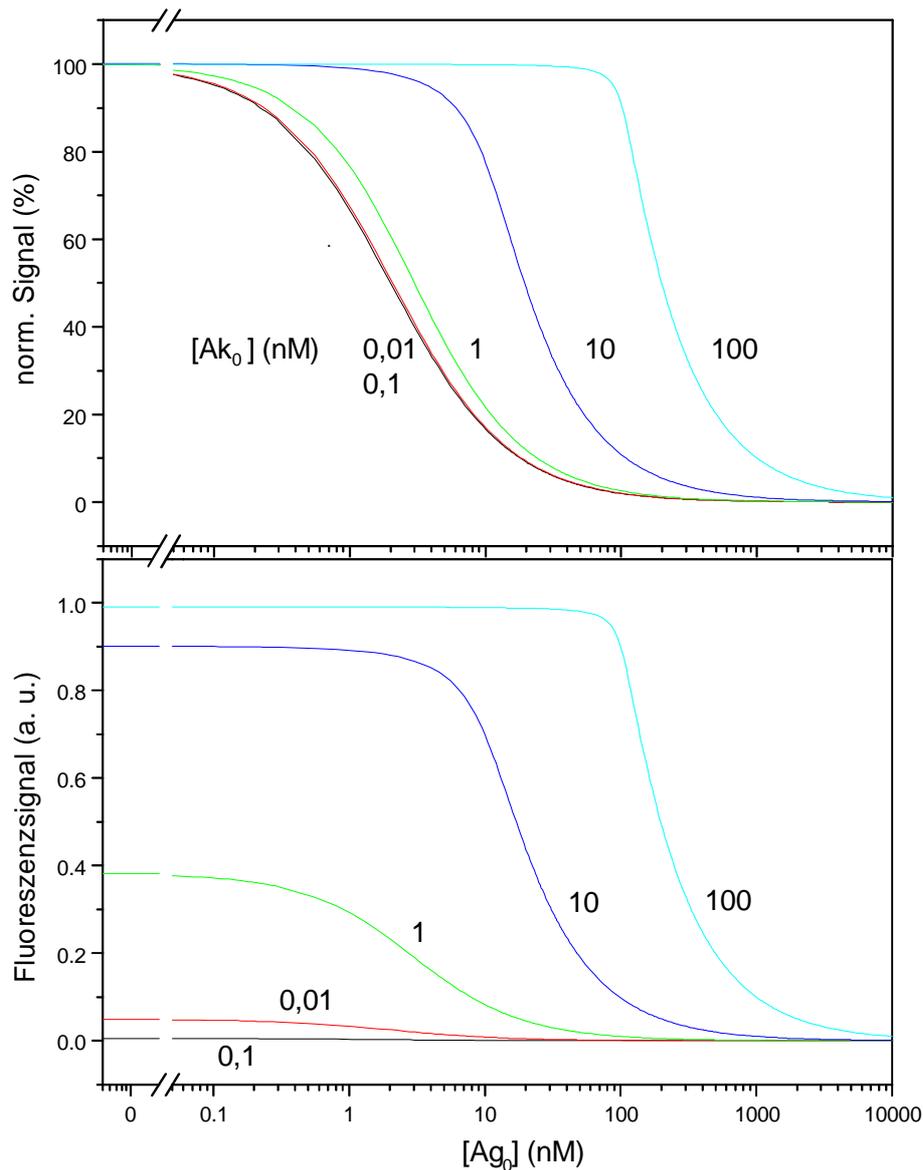


Abbildung 5: Simulierte Kalibrierkurven für variierende Antikörperkonzentrationen und konstante Hilfskonjugatkonzentration (1 nM) und $K_1 = K_2 = 1 \text{ nM}^{-1}$ (oben: auf das Fluoreszenzsignal bei 0 $\mu\text{g/l}$ Analyt normierte Kurven).

In Abbildung 6 ist nun die Antikörperkonzentration konstant (1 nM) und die Hilfskonjugatkonzentration wird variiert. Auch hier zeigt sich wieder, daß ein Kompromiß zwischen Signalintensität und angestrebter Nachweisgrenze erforderlich ist. Günstig ist also eine Konjugatkonzentration zwischen $\frac{1}{K}$ und $\frac{10}{K}$.

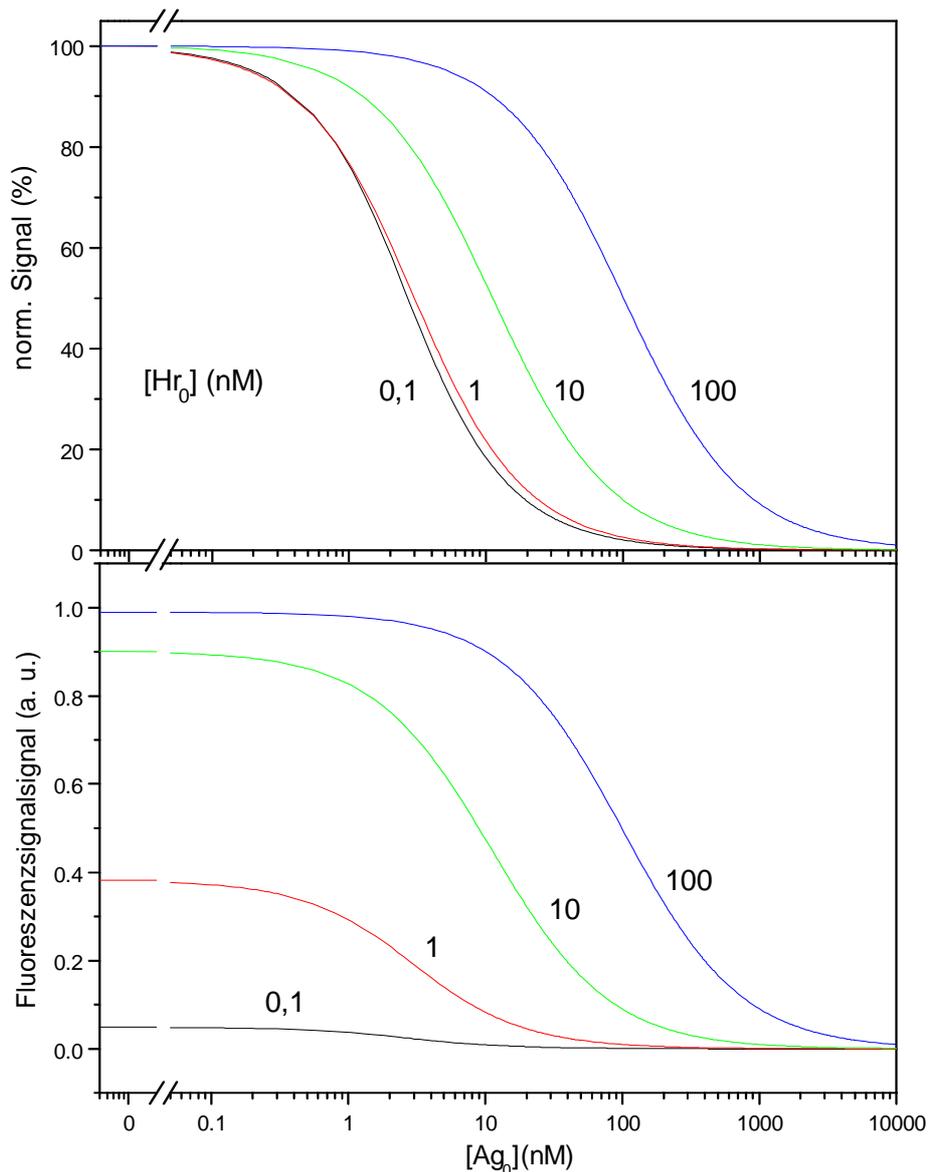


Abbildung 6: Simulierte Kalibrierkurven für variierende Hilfskonjugatkonzentrationen und konstante Antikörperkonzentration (1 nM) und $K_1 = K_2 = \text{nM}^{-1}$ (oben: auf das Fluoreszenzsignal bei $0 \mu\text{g/l}$ Analyt normierte Kurven).

Da die berechneten Kalibrierkurven für den Spezialfall $K_1 = K_2$ gelten, können sie für die Praxis nur Tendenzen zeigen, nach denen sich eine optimale Antikörper- bzw. Konjugatkonzentration richten sollte. Die Affinitätskonstanten haben ebenfalls einen Einfluß auf die Kurven, was durch Experimente belegt wurde (vgl. Kapitel 4.8.2). Der Antikörper sollte eine höhere Affinität zum Analyten als zum Konjugat haben ($K_1 > K_2$), um eine Titration durchführen zu können. Wäre umgekehrt $K_1 < K_2$, würde der Antikörper überwiegend am Konjugat binden, und das Signal könnte nur

durch sehr hohe Analytkonzentrationen unterdrückt werden. Dieses Problem tritt auch schon im Falle von $K_1 = K_2$ auf. Der Absolutbetrag von K_2 darf allerdings auch nicht zu klein sein, weil damit auch die Signaldynamik abnimmt.

2.8 Oligonukleotide und DNA

Oligonukleotide wurden in der vorliegenden Arbeit als ‚Hilfsreagenzien‘ eingesetzt. Wie sie aufgebaut sind und weshalb sie sich für diese Verwendung eignen, soll im folgenden erklärt werden.

In allen pflanzlichen und tierischen Zellen finden sich **Nukleinsäuren**: DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure). Ihre Namen lassen sich von ihren Bausteinen, den **Nukleotiden** ableiten. Sie enthalten einen Zuckerrest (entweder eine Desoxyribose oder eine Ribose), einen Phosphorsäurerest und eine Stickstoffbase. DNA setzt sich aus Nukleotiden mit den vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) zusammen. Im Falle der RNA kommt Uracil (U) anstelle von Thymin vor (Abbildung 7).

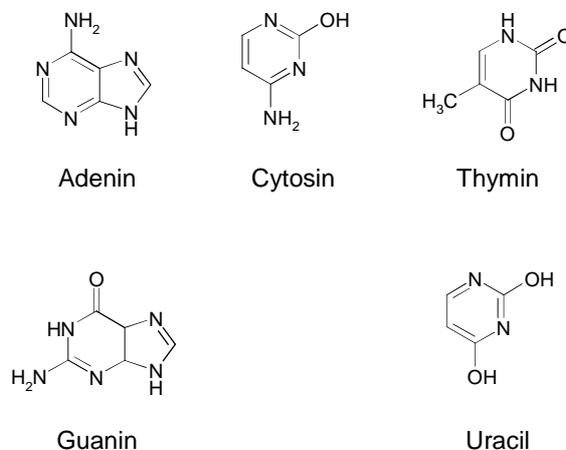


Abbildung 7: Die Basen der Nukleinsäuren

Über ein Stickstoffatom ist eine Base an das C1-Atom eines Zuckers gebunden. Das C5-Atom des Zuckers trägt den Phosphorsäurerest. Die einzelnen Nukleotide reihen sich so zu Ketten auf, die je nach Länge zu Oligo- bzw. Polynukleotiden werden (Abbildung 8).

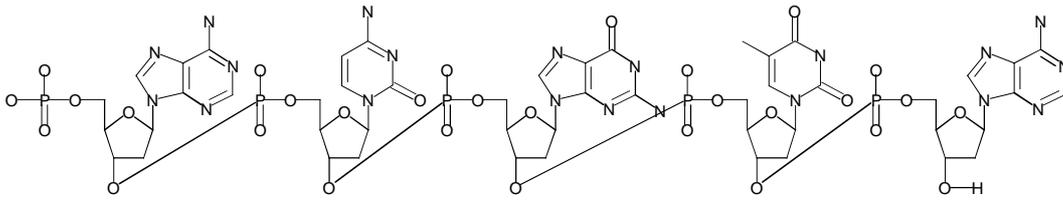


Abbildung 8: Struktur von Nukleinsäuren

Zwei solcher Nukleotidketten können sich in Form einer Helix zu einem Doppelstrang verbinden. Dies geschieht auf äußerst spezifische Weise, da sich nur bestimmte Basenpaare ausbilden können. Der Bindungsvorgang wird als **Hybridisierung** bezeichnet. Adenin bindet an Thymin (oder Uracil) und umgekehrt, Guanin bindet nur an Cytosin. Dieses Modell der komplementären Basen wurde bereits 1953 von Watson und Crick zur Beschreibung der räumlichen Struktur (Doppelhelix) der DNA entwickelt. Zwischen den Einzelsträngen bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus; zwischen A und T je zwei, zwischen G und C je drei, weshalb G-C-Paare eine höhere Hybridisierungsenergie aufweisen. Die Hybridisierung zwischen Nukleotidsträngen bestimmter Sequenz ist so spezifisch, daß schon bei zwei Basenfehlpaarungen (*mismatches*) die Affinitätskonstante um eine Größenordnung herabgesetzt ist (Bsp. eines 20meren-Paares $K = 3,2 \times 10^8$ l/mol, bei zwei nicht komplementären Basen nur noch $K = 3,3 \times 10^7$ l/mol; Sauer et al., 1999). Die Bindung ist reversibel, sie kann durch erhöhte Temperatur („schmelzen“) oder veränderten pH-Wert leicht wieder gelöst werden.

Regenerierbarkeit und hohe Spezifität sind besonders gute Voraussetzungen, um DNA in der Diagnostik und Analytik anzuwenden. Aber auch als „Hilfsreagenz“ für die Oberflächenmodifikation von Biosensoren ist sie sehr attraktiv (s. Kapitel 4). Es lassen sich problemlos verschiedene Sequenzen nebeneinander immobilisieren und die entsprechenden Hybridisierungen durchführen, ohne daß es Querempfindlichkeiten, vergleichbar mit den Kreuzreaktivitäten bei Antikörpern, gibt. Um diese Spezifität zu gewährleisten, reichen schon wenige Sequenzunterschiede aus. Die Vielfalt der Möglichkeiten ist groß, bei der Verwendung von Oligonukleotiden mit 21 Basen (21mere) lassen sich 4^{21} unterschiedliche Sequenzen aufbauen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide (21mere bzw. 23mere) tragen am 5'-Ende* eine Alkylamingruppe (*amino-linker*). Darüber wurden sie mit den Carboxylgruppen der Analytderivate unter Ausbildung einer Amidbindung (Kapitel 3.2.6) modifiziert. Die Alkylamingruppe der komplementären Stränge wurde zur Immobilisierung auf der Transduceroberfläche genutzt (Kapitel 3.2.5).

2.9 Oberflächenchemie für Transducer

Für sämtliche oberflächensensitiven Methoden in der chemischen oder biochemischen Analytik wird einer der Reaktionspartner auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Ein Überblick mit Vergleich der häufigsten Methoden der biochemischen Modifizierung findet sich bei Piehler et al., 1996. Wichtig ist bei der Immobilisierung, daß die entsprechende Komponente auf dem Transducer in angemessener Konzentration vorliegt und für den Reaktionspartner gut zugänglich ist. Die Modifikation soll zudem unspezifische Bindung unterdrücken und chemisch stabil sein.

Transducer können aus Materialien wie SiO₂, Gold, TiO₂ oder Ta₂O₅ bestehen. Generell können sie

- adsorptiv,
- kovalent,
- über Protein-Protein-Interaktionen (z. B. Bindung zwischen Protein A und dem F_c-Abschnitt von Antikörpern; Anderson et al., 1997),
- über Affinitätswechselwirkungen (Biotin-Avidin/ Streptavidin, Antigen-Antikörper, Hybridisierung zwischen komplementären Oligonukleotiden) modifiziert werden.

Die reine **Physisorption** einer Komponente, wie z. B. von Proteinen auf einer hydrophoben Oberfläche, ist die einfachste Möglichkeit, ist aber mit deutlichen Nachteilen behaftet: mangelnde Stabilität, zufällige Anordnung der Proteine, die zu verminderter Bindungsfähigkeit führen kann, und mangelnde Reproduzierbarkeit sind die Hauptprobleme (Löfas et al., 1995).

* carboxyterminales Ende

Kovalente Methoden, wie beispielsweise die Modifizierung von Glasoberflächen mit hydrophilen Polymeren (Piehler et al., 1996), bieten Möglichkeiten für die unterschiedlichsten Oberflächenmaterialien und die verschiedensten zu immobilisierenden Substanzen. Die Reproduzierbarkeit ist wesentlich gesteigert. Die chemisch stabile Modifikation erlaubt es, regenerierbare Transducer herzustellen.

Goldoberflächen lassen sich über Thiole modifizieren, welche selbstorganisierende Monoschichten bilden (SAM, *self-assembled monolayers*). Thiole adsorbieren stark an Gold, da sie kovalente Gold-Schwefel-Bindungen bilden. Zusätzlich treten Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den langen Alkylketten auf. Die so hergestellten Schichten sind regenerationsstabil und damit gut für Sensoranwendungen geeignet. Zwei Beispiele dafür sind bei Rickert et al., 1996 beschrieben. Hier wurden auf Goldoberflächen Peptide als Antigene bzw. supramolekulare Gast-Moleküle über Alkylthiole immobilisiert. Bei Löfas et al., 1995 ist die Immobilisierung von Carboxymethyldextran für SPR-Anwendungen beschrieben, die ebenfalls auf Thiolen basiert.

SiO_2 und Ta_2O_5 lassen sich in ähnlicher Weise chemisch beschichten, meistens beginnend mit einer Aktivierung (Generierung von Hydroxylgruppen an der Oberfläche), gefolgt von einer Silanisierung, über die Amino-, Aldehyd- oder Epoxygruppen eingeführt werden. Diese können dann leicht mit anderen funktionellen Gruppen weiterreagieren. Polzius et al., 1996 beschreiben verschiedene Ansätze zur Modifikation von Ta_2O_5 mit Proteinen für die Anwendung in Gitterkopplern. Neben der Adsorption werden Silanisierungen (mit GOPTS (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan) bzw. APTES (Aminopropyltriethoxysilan)) und nachfolgende Anbindung von Dextranen und biotinyliertem Protein G beschrieben und verglichen. Ein weiteres Beispiel beschreibt die Modifikation von piezoelektrischen Quarzkristallen ebenfalls über APTES. Es hebt die gute Reproduzierbarkeit und Stabilität dieser Oberflächen hervor (Suri & Mishra, 1996).

Die Immobilisierung von Komponenten über **Affinitätswechselwirkungen** wird am Beispiel des Hilfssystems mit Antigen-Antikörper-Paaren und komplementären DNA-Strängen (Kapitel 3.2.3 und 4.8) genauer beschrieben. In der Literatur finden

sich besonders zahlreiche Anwendungen des Biotin-Avidin-Systems. Zur Herstellung von Bioaffinitätssensoren wird oftmals Avidin oder Streptavidin immobilisiert, um eine weitere Komponente in biotinylierter Form binden zu können. Die Avidin-Biotin-Komplexbildung erfolgt mit außerordentlich großer Affinität. Die Affinitätskonstante beträgt $K = 10^{15} \text{ l/mol}$ (Wilchek & Bayer, 1988; Ebersole et al., 1989; Spinke et al., 1993; Kleinjung et al., 1997), wodurch eine spezifische und stabile Bindung ermöglicht wird.

Für die **Immobilisierung von DNA-Sequenzen** gibt es ebenfalls unterschiedliche Verfahren (Yang et al., 1997). An die Oberfläche von Nitrocellulose oder Nylon, Polystyrol oder einigen Metalloxiden können Oligonukleotide rein adsorptiv gebunden werden. Dabei besteht allerdings das Risiko, daß nicht mehr alle Basen der Hybridisierung zugänglich sind. Außerdem kann es unter Hybridisierungsbedingungen zum Ablösen der DNA vom Substrat kommen. Das Einbetten von Oligonukleotiden in Polymere und evtl. Quervernetzung führen zu besseren Ergebnissen. Nachteilig kann sich jedoch die geringe Bewegungsfreiheit der Stränge auswirken. Die Bildung von sich selbst organisierenden Schichten auf Goldoberflächen wurde ebenso untersucht wie die Bindung über Biotin-Avidin-Brücken (Ebersole et al., 1990; Kleinjung et al., 1997). Die kovalente Immobilisierung der Nukleotide über Alkylaminreste bietet den Vorteil besonderer Stabilität. Ferner bleibt den einzelnen Molekülen ausreichend Flexibilität für die Hybridisierung (Henke et al., 1997; Yang et al., 1997; Stemmler et al., 1999).

2.10 Pestizide als Analyten

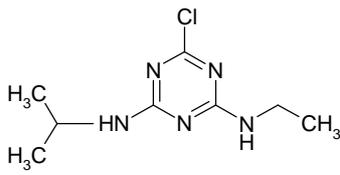
Pflanzenschutzmaßnahmen mit Pestiziden führen zur Belastung des Grund- und Oberflächenwassers. Da 70 % unseres Trinkwassers aus Grundwasser, 18 % aus Flußwasser, 7 % aus Stauseen und 3 % aus natürlichen Seen stammt (Beitz et al., 1994; Matthess, 1994), ist es von großer Bedeutung, Pestizide in der Umwelt bestmöglich zu überwachen und ihr Verhalten zu kennen. Ihre Langlebigkeit im Boden, ihre Lipophilie oder auch ihre Löslichkeit und Beständigkeit in Wasser sind wichtige Charakteristika. Anhand dieser Eigenschaften können erste Aussagen über die akute toxische Wirkung oder Langzeitfolgen gemacht werden.

Pestizide sind synthetische organische Substanzen und lassen sich nach ihrem Wirkungsort in Insektizide, Herbizide, Nematizide, Fungizide und einige weitere Klassen einteilen (Matthess, 1994). Diese wiederum lassen sich nach ihrer chemischen Struktur in Triazine, Harnstoffe, Phenole und andere gliedern.

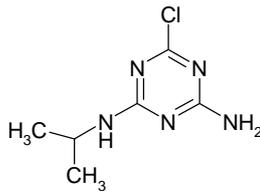
Die meisten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stoffe (Tabelle 2) sind Herbizide. Es wurden aber auch deren Metaboliten sowie Fungizide, Insektizide oder Bakterizide nachgewiesen. Im folgenden werden die Einsatzgebiete, Eigenschaften und Metabolisierung dieser Substanzen kurz erläutert, um einen Eindruck zu vermitteln, auf welchem Wege sie in die Umwelt gelangen bzw. wie sie sich ökologisch auswirken.

Tabelle 2: Übersicht der untersuchten Analyten

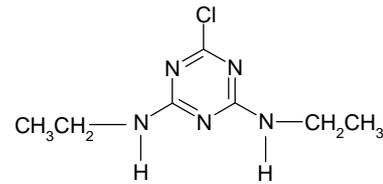
<i>Analyt</i>	<i>Klasse</i>	<i>Molekulargewicht (g/mol)</i>	<i>Verwendung</i>
Atrazin	Triazine	215,7	Herbizid
Desethylatrazin (DEA)	Triazine	187,7	Metabolit
Simazin	Triazine	201,7	Herbizid, Algizid
Irgarol 1051	Triazine	253,17	Algizid
Isoproturon	Phenylharnstoffe	206,3	Herbizid
2,4- Dichlorphenoxy- essigsäure (2,4-D)	Aryloxyalkansäuren	221,0	Herbizid
Methylchlor- phenoxypropion- säure (MCP)	Aryloxyalkansäure	214,7	Herbizid
Pentachlorphenol (PCP)	chlorierte Phenole	266,4	Herbizid, Insektizid, Fungizid
2,4,5- und 2,4,6- Trichlorphenol (TCP)	chlorierte Phenole	197,5	Metaboliten, Bakterizid, Fungizid
Alachlor	Chloracetanilide	269,8	Herbizid
Paraquat	Bipyridiniumsalze	257,2	Herbizid

Atrazin, Desethylatrazin, Simazin

Atrazin



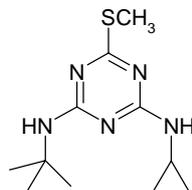
Desethylatrazin



Simazin

Atrazin (2-Chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin) wird als selektives¹ Herbizid angewandt, von Wurzeln und Laub aufgenommen und inhibiert Photosynthese und enzymatische Prozesse. Einsatzgebiete sind der Anbau von Mais, Spargel, Weintrauben und Obstbäumen. Dabei kommt es auch in Mischungen mit Alachlor, 2,4-D oder Simazin vor. In Wasser lösen sich bei 20°C bis zu 33 mg/l. Im Wasser und im Boden baut sich Atrazin hauptsächlich über **Desethylatrazin** und Hydroxyatrazin ab. In unempfindlichen Pflanzen wird es zu Hydroxyatrazin und Aminosäurekonjugaten metabolisiert, die ihrerseits weiter zerfallen.

Simazin (6-Chlor-N²,N⁴-diethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin) ist ein selektives Herbizid, wird über die Wurzeln aufgenommen, in den Blättern akkumuliert und blockiert den Elektronentransport bei der Photosynthese. Seine Einsatzgebiete sind Anbau von Steinobst, Zitrusfrüchten, Weintrauben oder Erdbeeren. Hinzu kommt der Einsatz als Algizid in Teichen. Simazin ist weniger wasserlöslich (6,2 mg/l bei 20°C) als Atrazin und wird hauptsächlich durch UV-Strahlung zersetzt.

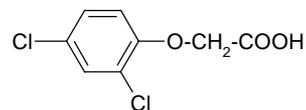
Irgarol 1051

Irgarol 1051 ist der Handelsname für 2-(Methylthio)-4-(*tert*-butylamino)-6-(cyclopropylamino)-*s*-triazin. Es gehört, wie die übrigen Vertreter der *s*-Triazine, zu den Herbiziden. In Schutzanstrichen für Schiffe wirkt es gegen Algenbewuchs und Fäulnis. Es ersetzt damit die für die Umwelt bedenklichen Tributyl-Zinn- und

¹ selektives Herbizid: weist hohe herbizide Aktivität bei guter Verträglichkeit gegenüber bestimmten Kulturpflanzen auf.

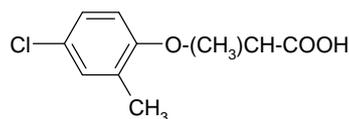
Kupferverbindungen, deren Verwendung 1989 durch europäische Gesetze eingeschränkt worden ist (Ballesteros et al., 1997; Ferrer et al., 1997). Besonders in Nähe von Sporthäfen belastet Irgarol jedoch die Wasserqualität. Seine Löslichkeit in Wasser beträgt 7 mg/ml. Es wirkt in Pflanzen, indem es den Elektronentransport der Photosynthese hemmt. Langzeittests in Aquarien haben ergeben, daß Irgarol das ökologische Gleichgewicht in Küstenzonen vermutlich erheblich stört (Dahl & Blanck, 1996; Ballesteros et al., 1997).

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)

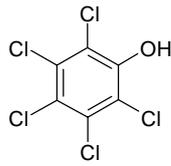


2,4-D ist ein selektives Herbizid, das leicht über die Wurzeln aufgenommen wird. In Form seiner Ester kann es auch über die Blätter absorbiert werden. Es inhibiert das Wachstum und wird beim Anbau von Getreide, Mais, Gras, Reis u. a. eingesetzt. 2,4-D löst sich zu 311 mg/l in Wasser (pH = 1 und 25°C). In Wasser, Boden und Pflanzen wird es über Hydroxylierung, Decarboxylierung, Abspaltung der Seitenkette und schließlich Ringöffnung abgebaut.

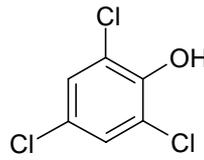
MCPP (Mecoprop)



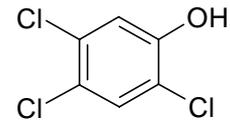
Mecoprop ((*RS*)-2-(4-Chlor-*o*-tolyl-oxy)propionsäure) ist ein Vertreter der selektiven, hormonähnlichen Herbizide und wird über die Blätter aufgenommen. Seine Einsatzgebiete sind der Anbau von Weizen, Gerste, Hafer, Weideland und unter Obstbäumen. Es wird in Mischungen mit vielen anderen Herbiziden angeboten; in Wasser lösen sich bei 25°C 734 mg/l. In Wasser und Boden wird es hauptsächlich von Mikroorganismen zu 4-Chlor-2-methylphenol abgebaut, gefolgt von Hydroxylierung und Ringöffnung. In Pflanzen wird MCPP an der Methylgruppe zu 2-Hydroxymethyl-4-chlorphenoxypropionsäure hydroxyliert.

PCP, 2,4,6- und 2,4,5-TCP

Pentachlorphenol (PCP)

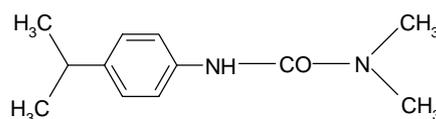


Trichlorphenole (TCP)



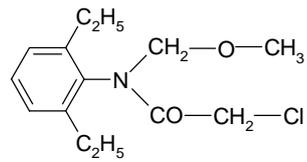
Pentachlorphenol wird als Insektizid, Fungizid und auch Herbizid eingesetzt. Es wirkt gegen Termiten, Pilze und bohrende Insekten und ist ein starkes Gift auch für Fische und Mollusken. Es stört die oxidative Phosphorylierung der Zellen, bei Säugetieren kann es u. a. zu Herzversagen führen. PCP kann durch die Haut oder durch Einatmen aufgenommen werden. 80 mg/l sind in Wasser (30°C) löslich. Es verhält sich in der Umwelt sehr resistent. In Deutschland ist es seit 1989 gemäß der PCP-Verbotsverordnung nicht mehr erlaubt, PCP gewerbsmäßig herzustellen, zu verkaufen oder zu verwenden.

2,4,6-TCP wirkt stark antiseptisch und wird als Fungizid und Bakterizid eingesetzt. **2,4,5-TCP** kann Chlorakne auslösen, da es oft mit Dioxin (2,3,7,8-Tetrachlor-dibenzo-1,4-dioxin, TCDD) verunreinigt ist. Es ist als Pflanzenschutzmittel seit 1988 verboten. Es kommt aber als wichtigstes Abbauprodukt des Herbizids 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure vor (García Sánchez et al., 1999).

Isoproturon

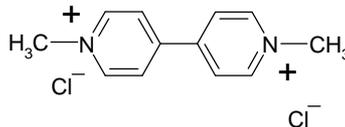
Isoproturon (3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) gehört zu den selektiven Herbiziden und wird von Wurzeln und Blättern absorbiert. Angewendet wird es auf Feldern mit Weizen, Wintergerste oder Winterroggen. Im Boden und Wasser wird es enzymatisch und mikrobiell am Stickstoff demethyliert. Es findet Hydrolyse des Phenylharnstoffs zu 4-Isopropylanilin statt. Die Wasserlöslichkeit von Isoproturon beträgt 65 mg/l (bei 20°C).

Alachlor



Alachlor (2-Chlor-2',6'-diethyl-N-(methoxymethyl)acetanilid) ist ein selektives Herbizid, wird von Wurzeln und keimenden Schößlingen absorbiert und wirkt Proteinsynthese und Wurzelwachstum entgegen. Zum Einsatz kommt es im Baumwoll-, Mais-, Erdnuß-, Soja- und Zuckerrohranbau. In Wasser lösen sich bei 25°C 242 mg/l. In Pflanzen, Wasser und im Boden wird es zu 2-Chlor-2',6'-diethylacetanilid metabolisiert und zu Anilinderivaten abgebaut.

Paraquat



Paraquat wird in Form des Dichlorids (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid) als nicht-selektives Kontaktherbizid eingesetzt. Es wird vom Laub absorbiert. Während der Photosynthese bildet sich ein Superoxid, das Zellmembranen und Cytoplasma zerstört. Es wird gegen ein breites Spektrum von Unkräutern im Anbau von Zitrusfrüchten, Bananen, Kaffee, Oliven, Tee, Wein und vielen anderen Nutzpflanzen eingesetzt. Paraquat ist sehr giftig, die letale Dosis liegt beim Menschen bei 30 mg/kg Körpergewicht. In Pflanzen baut es sich durch photochemische Vorgänge ab (1-Methyl-4-caboxypyridiniumchlorid und Methylaminhydrochlorid). Im Boden wird es stark absorbiert und dadurch deaktiviert. In Wasser löst sich Paraquat bei 20°C zu 700 g/l. Häufig wird es in Mischungen mit anderen Pestiziden wie Diuron, MCPA oder Simazin eingesetzt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte und Materialien

Im Laufe der Arbeit wurde der experimentelle TIRF-Aufbau variiert. Die verwendeten Komponenten sind unten aufgeführt.

- *Lichtquellen*

HeNe-Laser: $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $P_{\text{aus}} = 10 \text{ mW}$, linear polarisiert, Melles Griot, Darmstadt

Laserdiodenmodul: VMB2.3-7-MVP mit Kollimatoroptik, $P_{\text{aus}} = 12 \text{ mW}$, Coherent, Dieburg

- *Transducer*

Kronglas B270: DESAG, Grünenplan, Stirnfläche unter 45° angeschrägt und poliert von Perkin Elmer, Überlingen.

RfS-Transducer: D 263 Glas mit 10 nm Ta_2O_5 u. 330 nm SiO_2 -Schicht, Schott, Mainz

- *Detektoreinheit*

Photodioden: integrierter Vorverstärker, OSI 5-100M/1K u. 50M/2K, Eurodis, Stuttgart

Integrierter Photo-

vervielfacher: H5783-01 Hamamatsu, Herrsching

Polymerlichtleiter: (PMMA), 1 mm Durchmesser, Bungert Technische Optik, Weil der Stadt

DAS 1601: Analog/Digitalwandlerkarte Keithley Instruments, Germering

Lock-In Verstärker: SRS 830, Stanford Instruments, Sunnyvale, CA

Lock-In Verstärker: SciTec 420, SpectroLas, Langenbach

Lock-In Verstärker: sog. „E-Box“ des RIANA-Prototyps: Optoelectronics Research Centre, Southampton, UK unter Dr. J. Wilkinson in Zusammenarbeit mit Perkin Elmer, Überlingen

Bandpaßfilter: DAD 8-2, Schott, Mainz

Langpaßfilter : 700 EFLP, Omega Optical, Wörthsee

Die Komponenten des Meßaufbaus für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie sind ausführlich beschrieben bei Piehler, 1997.

▪ *FIA*

ASIA: Automated Sample Injection Analyzer u. Autosampler, Ismatec, Wertheim

DS 6: Diluter Station u. Autosampler AS 91, Perkin Elmer, Überlingen

▪ *Sonstige Geräte und Komponenten*

Elektronische u. mechanische Komponenten: Conrad, Hirschau; Spindler & Hoyer, Göttingen; Owis, Staufen und Melles Griot, Darmstadt

UV/VIS Spektrometer M500, Carl Zeiss, Jena

Microcon-Mikrokonzentratoren: Trenngrenze 30000 g/mol, Millipore GmbH, Eschborn

▪ *Software*

Testpoint 2.0, graphische Meßsoftware, Capital Equipment, Burlington, USA. Die modulare Benutzeroberfläche zur automatischen Steuerung der FIA-Systeme, Lichtquellen u. Datenerfassung wurde von Dr. A. Klotz programmiert (Klotz, 1998).

▪ *Chemikalien und Biochemikalien*

Standardchemikalien und -biochemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von SIGMA Chemie, Deisenhofen, FLUKA, Neu-Ulm bezogen.

Aminodextran (AMD) wurde aus Dextran hergestellt. Dazu wurden die diolischen Hydroxylgruppen partiell mit Natriumperjodat zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese wurden durch reduktive Aminierung mit Natriumcyanoborhydrid (in Anwesenheit von Ammoniak) zu Aminogruppen umgesetzt (Piehler, 1997).

Diaminopolyethylenglykol 2000 (Diamino-PEG, MG=2000 Dalton): Rapp Polymere GmbH, Tübingen

Pestizidstandards (Referenzmaterial): Riedel de Haën AG, Seelze

Extran MA 01, alkalisch: Merck KGaA, Darmstadt

Oligonukleotide (21mere bzw. 23mere mit C6-Alkylaminrest): Perkin Elmer, USA
und Interactiva Biotechnologie GmbH, Ulm

Cy5.5TM Farbstoff Amersham, Braunschweig

Absorbierende wasserfeste Tinte, 485 23-9: Staedtler, Nürnberg

Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (Tween 20), Sigma, Deisenhofen

▪ *Antikörper*

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich polyklonale Schafantikörper eingesetzt. Sie wurden von Dr. R. Abuknesha (King's College, London) hergestellt, der auch die verwendeten Analytderivate synthetisierte. Die Immunogene wurden durch Kupplung der entsprechenden Derivate an Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt. Für die anschließende Aufreinigung wurde Affinitätschromatographie (Ben-Rejeb et al., 1998) mit Sepharose-Hapten-Gelen angewendet. Dabei binden die spezifischen Antikörper, überschüssige Serumproteine werden mit Puffern hoher Salzkonzentration entfernt. Abschließend werden die spezifischen Antikörper eluiert. Das Eluat wird dialysiert, durch Ultrafiltration konzentriert und über Gelfiltration von letzten Unreinheiten befreit.

Monoklonale 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)-Antikörper: Veterinär-Forschungsinstitut, Dr. M. Franek, Brno, Tschechien

Polyklonale anti-Irgarol 1051-Antikörper und kuppelbare Irgarol-Derivate: Dr. M.-P. Marco, CID-CSIC Barcelona, Spanien

▪ *Lösungen*

▪ Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl 150 mM

KH₂PO₄ 10 mM

In bidest. Wasser auflösen und mit 2 N KOH den pH-Wert auf 7,4 einstellen.

▪ PBST:

PBS mit 0,1 % Detergens Tween 20

- Carbonatpuffer:

100 mmol (10,6 g) Natriumcarbonat mit bidest. Wasser auf 1 Liter auffüllen, mit 100 mM (8,4 g auf 1 l bidest. Wasser) Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH = 9,5 einstellen.

- ‚Piranha-Lösung‘:

40 Vol.-% H₂O₂ (30 %ig)

60 Vol.-% H₂SO₄ (96 %ig)

in der angegebenen Reihenfolge mischen und heiß verwenden.

- HCl-Regenerationslösung:

Bidest. Wasser so lange mit HCl (2 N) versetzen, bis pH = 1,75 erreicht ist.

- Guadiniumchlorid/ Harnstoff-Regenerationslösung:

Harnstoff und Guadiniumchlorid werden in bidest. Wasser gelöst (je 6 M); pH = 2

- Pepsin-Regenerationslösung:

2 mg/ml Pepsin in bidest. Wasser lösen. PBS mit 2 N HCl auf pH = 1,8 einstellen. Beide Lösungen im Verhältnis 1 : 9 mischen.

- Acetonitril-Regenerationslösung:

bidestilliertes Wasser 50 %

Acetonitril 49 %

Propionsäure 1 %

3.2 Methoden

Zunächst wird die reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) kurz vorgestellt, da sie in der vorliegenden Arbeit zur ersten Charakterisierung von Transducern und Antikörpern diente. Es folgen Kapitel zur Fließinjektionsanalyse (FIA) und sämtlichen Methoden, die für die Durchführung von TIRF-Messungen notwendig waren: ausführliche Beschreibungen der unterschiedlichen Ansätze zur Oberflächenchemie, Herstellung von Konjugaten und Markierung der Antikörper. Abschließend werden der Geräteaufbau für TIRF, das Meßprotokoll und die Datenauswertung erklärt.

3.2.1 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS)

Die reflektometrische Interferenzspektroskopie ist eine Methode zur direkten Detektion von Bindungsvorgängen an einer Transduceroberfläche. Eine ausführliche theoretische Beschreibung von RIFS ist in Brecht et al., 1992 oder Gauglitz et al., 1993 zu finden. Hier soll nur kurz das Prinzip erläutert werden: Weißes Licht trifft auf ein Glassubstrat. An den Grenzflächen Substrat/ chemische Beschichtung (Film) und Film/ Superstrat findet Reflexion statt (Abbildung 9).

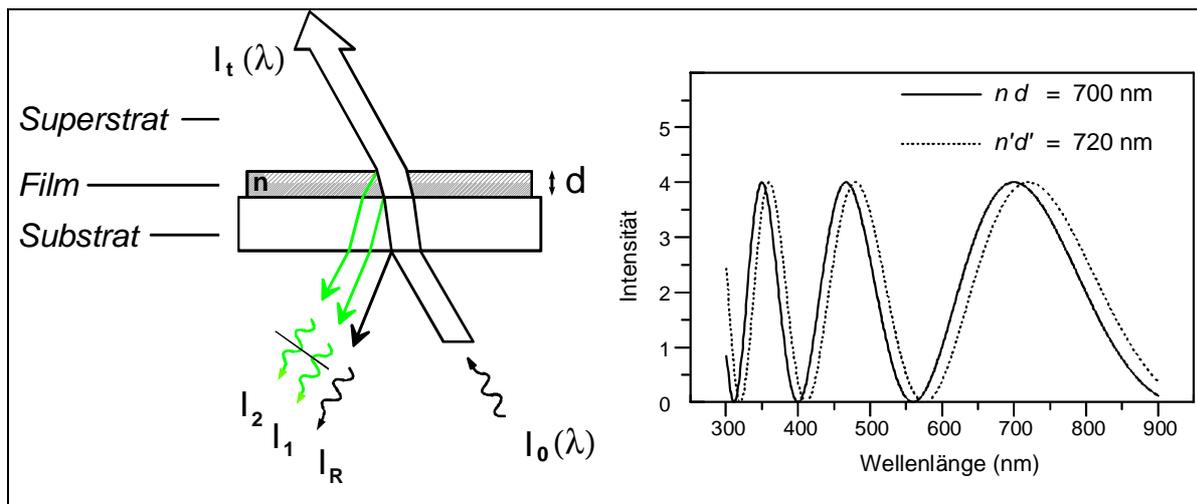


Abbildung 9: Strahlengang der reflektierten Teilstrahlen am optischen Schichtensystem (links) und Interferenzspektrum (rechts)

Es treten wellenlängenabhängig konstruktive und destruktive Interferenzen auf, die spektral detektiert werden. Dabei wird die Amplitude des Interferogramms von den Fresnelschen Reflexionskoeffizienten und die Phase vom Gangunterschied des Lichtes im Film zu dem an der Grenzfläche Glas/ Film reflektierten Licht bestimmt. Der Gangunterschied beträgt dabei ein Vielfaches der optischen Schichtdicke $n_{Film}d$, die als Meßsignal dient (n_{Film} : Brechungsindex, d : geometrische Schichtdicke des Films).

$$n_{Film}d = \frac{m\lambda}{2} \quad (19)$$

λ : Wellenlänge

m: Ordnung des Extrempunktes im Interferenzspektrum

Änderungen von $n_{\text{Film}d}$, z. B. durch die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche, werden auf die Ausgangsschichtdicke normiert, so daß relative Meßwerte erhalten werden.

RIfS erlaubt es also, Bindungsvorgänge direkt und ohne den möglichen Einfluß einer Markierung zu beobachten. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit neue Antigen-Antikörper-Paare und neue Oberflächenmodifikationen zunächst mit dieser Methode charakterisiert.

3.2.2 Fließinjektionssysteme für immunologische Testverfahren

Die Fließinjektionsanalyse (FIA) wird zur Analyse flüssiger Proben eingesetzt. Diese werden in einen Trägerstrom injiziert und zu einer Meßzelle transportiert. Dabei kommt es durch Diffusion und Konvektion zu einer Vermischung von Probe und Träger. Soll hingegen das Fließinjektionssystem ausschließlich zum Transport der Probe verwendet und eine Vermischung vermieden werden, können definierte Luftvolumina Probe und Träger von einander abtrennen (*air segmented stream*).

Die Weiterentwicklung der Fließinjektionsanalyse (Ruzicka & Hansen, 1988) ermöglicht einen kontinuierlichen oder quasi-kontinuierlichen Ablauf vieler Methoden in der klinischen Chemie oder der Umweltanalytik. Dabei sind die Vorteile ein hohes Maß an Automatisierung, hoher Probendurchsatz und eine gute Reproduzierbarkeit.

In der Umweltanalytik wird z. B. die immunologische Pestizidbestimmung mit Fließinjektionstechnik kombiniert (FIIA, *flow injection immunoassay*) und damit für eine kontinuierliche Wasserüberwachung einsatzfähig (Bjarnason et al., 1997). Gegenüber Mikrotiterplatten-Verfahren ist sie besser reproduzierbar, da eine ungleichmäßige Belegung der Plattenkavitäten mit Antikörper und Pipettierschritte als Fehlerquellen entfallen. Ein anderes Beispiel für einen FIIA geben Gascón et al., 1997 zum Nachweis von Atrazin. Diese Methode lieferte, verglichen mit Assays in Mikrotiterplatten, schnellere Ergebnisse bei gleich guter Übereinstimmung mit einer Validierungsmethode. Trau et al., 1997 beschreiben ebenfalls die Vorzüge der Fließinjektion am Beispiel des immunologischen Nachweises von 2,4-D in Trinkwasser. Ein anderer automatisierter Fluoreszenz-Immunoassay (FIRSI, *flow injection renewable surface immunoassay*) wird von Pollema & Ruzicka, 1994 vorgestellt. Antikörper werden auf

Polymerkügelchen immobilisiert. Die Proben werden mittels Fließinjektion mit einer Suspension dieser Kügelchen und einem markierten Reagenz gemischt und anschließend detektiert. Mittels FIA werden immunologische Methoden auch mit klassischen analytischen Verfahren kombinierbar. Entweder wird nach einer chromatographischen Trennung immunologisch detektiert (Oosterkamp et al., 1994; Irth et al., 1995; Lucas et al., 1995), oder es werden Immunosorbens-Säulen zur Anreicherung des Analyten eingesetzt und einer Flüssigkeitschromatographie vorgeschaltet (Bjarnason et al., 1997; Bouzige et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoreszenzimmunoassays mit Fließinjektion kombiniert. Sie diente zum Transport der Proben zur Flußzelle und zur kontinuierlichen Regeneration der Sensoroberfläche. Im Verlauf der Arbeit wurden zwei unterschiedliche FIA-Systeme eingesetzt. Bei dem ersten (Abbildung 10) handelt es sich um eine Anlage mit zwei Peristaltikpumpen für zwei getrennte Kreisläufe, die über ein Scherventil miteinander verbunden werden können. Durch dieses Ventil kann der Proben- dem Trägerstrom zugeschaltet werden. Mit der sogenannten ‚Fixpumpe‘ wird die Probenschleife mit konstanter Pumprate befüllt, während mit der zweiten, der sogenannten ‚Variopumpe‘, mit variabler Pumpgeschwindigkeit injiziert wird.

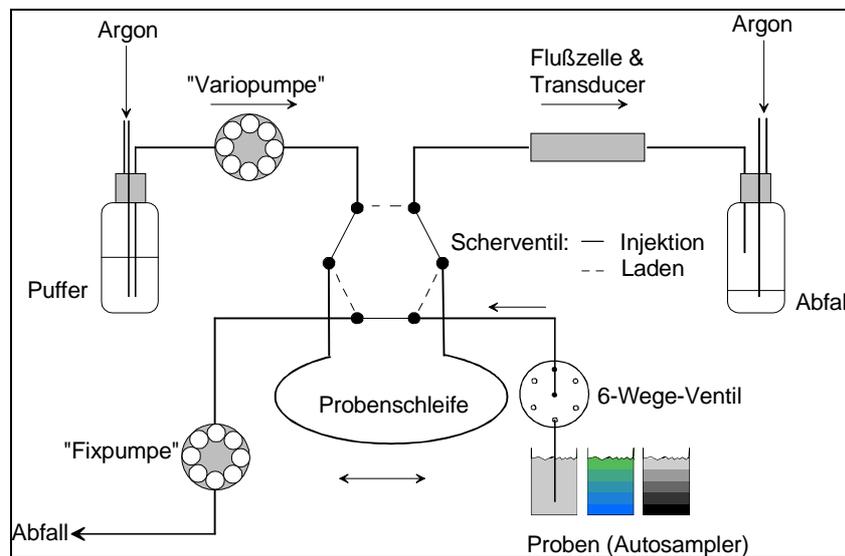


Abbildung 10: Schema der Fließinjektionsanlage mit Peristaltikpumpen

Ein Nachteil von Peristaltikpumpen ist ihre nie vollkommen pulsfreie Arbeitsweise. Dadurch kann es zum Ausgasen der transportierten Lösungen kommen. Es bilden

sich Luftblasen, welche die Meßergebnisse beeinträchtigen. Durch eine Begasung des Trägerpuffers z. B. mit Argon (0,2 bis 0,6 bar) kann dieses Problem vermieden werden.

Eine andere Möglichkeit zur Vermeidung von Luftblasen ist die Verwendung von Kolbenpumpen. Dies wurde in der zweiten Anordnung realisiert. Es handelt sich um ein System mit nur einer Pumpe und nur einem Kreislauf (Abbildung 11). Eine Kolbenpumpe (maximales Spritzenvolumen 1 ml) ermöglicht eine sehr genaue Flüssigkeitsdosierung (bis zu 30000 Schritte pro Hub), arbeitet unter höherem Druck und mit besonders geringen Druckschwankungen. Diese Eigenschaften machen eine Begasung überflüssig, was für ein feldtaugliches Meßgerät sehr wichtig ist.

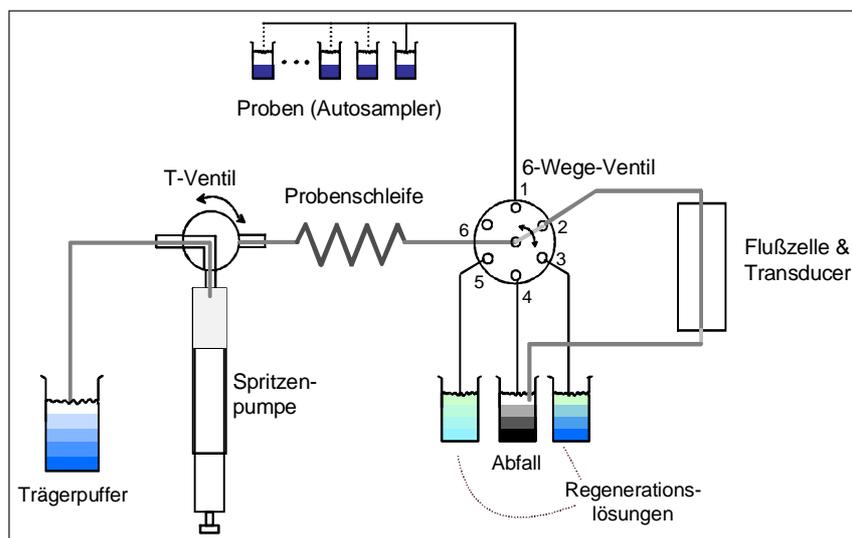


Abbildung 11: Schema der Fließinjektionsanlage mit Kolbenpumpe

Beide FIA-Systeme wurden mit einem *Autosampler* verbunden, um eine automatische Proben- und Reagenzienhandhabung zu ermöglichen.

3.2.3 Hilfssystem für ‚flexible‘ Transducer

Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit war, eine Oberflächenchemie zu etablieren, die mit einer Multianalyt-Detektion kompatibel ist. Zunächst sollten mehrere Stoffe nebeneinander, später dann Gruppen von Analyten sequentiell auf demselben Transducer gemessen werden können (‚flexible Oberflächenchemie‘, Abbildung 12).

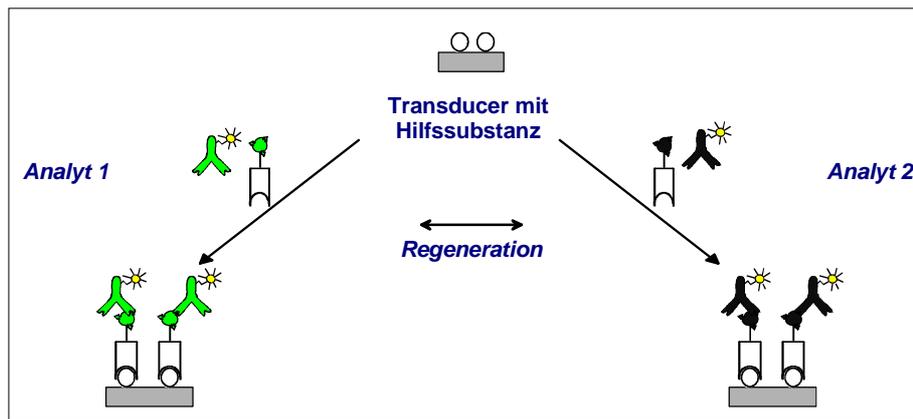


Abbildung 12: Flexibler Analytenaustausch mit Hilfssystem

Dies wurde über ein sogenanntes **Hilfssystem** realisiert (Abuknesha & Brecht, 1997). Es besteht aus zwei Komponenten (Abbildung 13). Die erste wird auf der Transduceroberfläche kovalent immobilisiert (**Hilfsligand**). Die zweite ist mit einem Analytderivat modifiziert und wird der Probenlösung zugemischt (**Hilfsreagenz**; auch als (Hilfs-)konjugat bezeichnet).

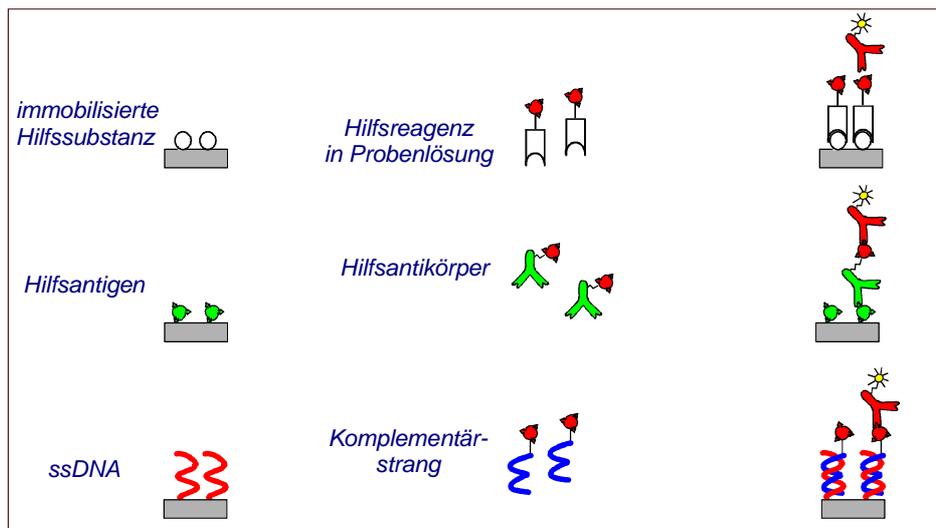


Abbildung 13: Hilfssystem für eine ‚flexible‘ Transducerchemie

Je nach Konzentrationsverhältnis und Affinität des Antikörpers gegenüber Analyt und Konjugat bindet ein Teil des Antikörpers am Hilfskonjugat. Wird dann die Probe mit dem Transducer in Berührung gebracht, binden die beiden komplementären Hilfskomponenten über Affinitätswechselwirkungen. An der Oberfläche befindet sich nun also ein ‚Komplex‘ aus Hilfsreagenzien und Antikörper. Letzterer erzeugt wie gewohnt das Fluoreszenzsignal.

Die für diese flexible Oberflächenmodifikation verwendeten Komponenten müssen eine spezifische Wechselwirkung miteinander eingehen, sich über kovalente Bindungen immobilisieren bzw. mit Derivaten der Haptene konjugieren lassen. Weiterhin sollten sich Hilfsligand und -rezeptor zur Regeneration der Oberfläche wieder voneinander trennen lassen.

Sehr häufig wird das Biotin-Avidin-System als ‚Brücke‘ eingesetzt, um biologische Komponenten zu immobilisieren. Ein Beispiel ist die Anwendung für faser-optische Gensensoren (Kleinjung et al., 1997) oder für Halbleiter-Microchips zur SNP-Bestimmung¹ (Gilles et al., 1999). Zur simultanen Multianalyt-Messung, die darauf beruht, daß ein bestimmter Ort auf dem Sensor mit einer bestimmten Substanz korreliert ist, ist es aber notwendig, unterschiedliche spezifische Ligand-Rezeptor-Paare zu haben. Jedes soll speziell seinen Bereich auf dem Transducer erkennen. Eine Vielfalt solcher Affinitätssysteme bieten Antigene und ihre passenden Antikörper. Noch mehr Möglichkeiten eröffnen sich mit komplementären DNA-Oligomeren. Assays, die auf DNA-Hybridisierung beruhen, gehören zu den spezifischsten Methoden in der Molekularbiologie und sollten somit auch für das Ziel der flexiblen Multianalyt-Detektion gut geeignet sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl der Antigen-Antikörper- als auch der DNA-Ansatz zur Realisierung des Hilfssystems untersucht.

3.2.4 Oberflächenchemie

Sämtliche Glasplättchen, die als Transducer für Messungen mit RfS bzw. TIRF zum Einsatz kamen, wurden nach einem der folgenden Protokolle modifiziert. Alle Methoden basieren auf einer Silanisierung der Oberfläche mit anschließender schrittweiser kovalenter Anbindung eines Polymeres und eines Analytderivates (für Einzelanalyt-Assays), oder eines Polymer-Analyt-Konjugats (für Multianalyt-Assays) oder eines Oligonukleotids für Assays mit Hilfssystem.

¹ SNP: single nucleotide polymorphisms

Methode 1

Silanisierung mit 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan (Piehler, 1997)

a) Vorbereitung und Aktivierung mit ‚Piranha-Lösung‘

Die Transducer wurden mit einem Tuch mit Isopropanol vorgereinigt. Dann wurde mit 20 %iger (pH = 12,5) Extran-Lösung (3 min), Wasser und ‚Piranha-Lösung‘ (vgl. Kapitel 3.1; etwa 20 min) gereinigt und abschließend mit Wasser gespült.

b) Silanisierung

Silanisiert wurde mit 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan (0,5 Vol.-%) in Toluol, dem 0,25 Vol.-% bidest. Wasser zugegeben wurde. Die Glasplättchen verblieben darin über Nacht, wurden mit Methanol und bidest. Wasser gespült und getrocknet.

c) Erzeugung von Carboxylgruppen an der Oberfläche

Die silanisierte Oberfläche wurde mit Bernsteinsäureanhydrid in PBS (2 mg je 10 ml PBS) umgesetzt (pH = 6). Anschließend wurde mit bidest. Wasser gespült und mit N₂ getrocknet.

d) Ankopplung des Polymers

Aminodextran (AMD, 260 kD) wurde in bidest. Wasser gelöst (1 mg in 2 µl), auf die Transducer gegeben (8 µl bei RfS-, 30 µl bei TIRF-Transducern). Eine kleine Menge 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) wurde mit dem AMD vermischt. Die so präparierten Transducer blieben über Nacht in einer feuchten Kammer. Abspülen mit bidest. Wasser entfernte überschüssiges AMD.

e) Reaktion mit dem Analytderivat

Zur Anbindung des Analytderivats wurde dieses in absolutem Dimethylformamid (DMF) gelöst (1 mg in 10 µl), mit N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) versetzt (1 µl je 1 mg Derivat) und auf den Transducer pipettiert. Ein zweiter Transducer wurde mit seiner aktiven Seite auf den ersten gelegt. Beide verblieben so über Nacht in einer geschlossenen, mit DMF-Dampf gesättigten Schale. Zum Abschluß wurden sie mit DMF und bidest. Wasser gespült und mit N₂ getrocknet.

Methode 1.1: Für die orts aufgelöste Immobilisierung mit Mikrodosierer wurde Schritt d) mit dem Konjugat aus AMD und Analytderivat (vgl. Kapitel 3.2.6) und ohne EDC durchgeführt.

Methode 2

Aktiviere Oberflächen

Nach dem Umsetzen mit Bernsteinsäureanhydrid (vgl. Methode 1, Schritt c)) kann die Oberfläche aktiviert werden. Es wurde eine 1 M N-Hydroxysuccinimid-Lösung (NHS) in DMF hergestellt, dazu die 1,5-fache molare Menge DIC gegeben und von dieser Lösung je ca. 3,5 μl auf einen RfS-Transducer pipettiert. Je 2 Glasplättchen wurden aufeinander gelegt und in DMF-Atmosphäre gelagert (ca. 4-5 h). Dann wurde mit DMF gewaschen und mit N_2 getrocknet.

Da ein Aktivester sehr leicht hydrolysiert, wurde das AMD-Konjugat unmittelbar nach Herstellung des Aktivesters aufgetragen. Zwei so präparierte Transducer wurden aufeinander gelegt und in einer feuchten Kammer über Nacht aufbewahrt. Abschließend wurde mit bidest. Wasser gespült und getrocknet.

Methode 3

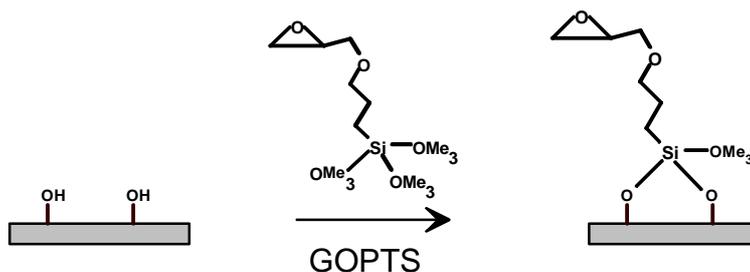
Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS)

a) Vorbereitung

Die Transducer wurden wie unter Methode 1, Schritt a) gereinigt.

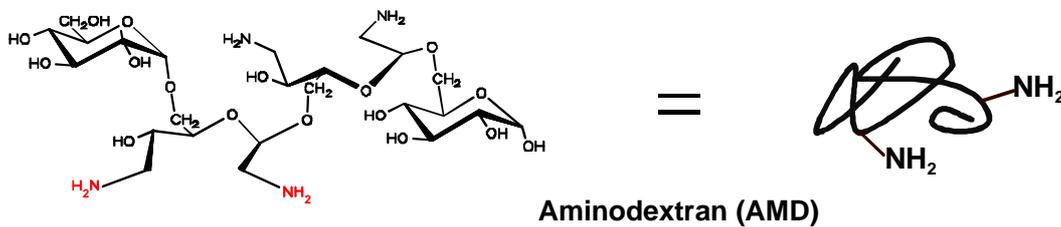
b) Silanisierung

GOPTS wurde zur Silanisierung direkt eingesetzt (8 μl je RfS-, 30 μl je TIRF-Transducer). Die Glasplättchen verblieben eine Stunde in einer geschlossenen Schale. Mit wasserfreiem Aceton wurde abgespült und sofort mit N_2 getrocknet.



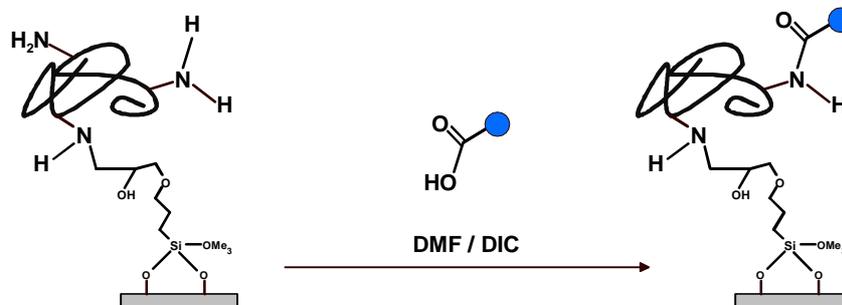
c) Anbindung des Polymers

Die Glasplättchen wurden mit AMD, wie unter Methode 1, Schritt d) beschrieben, modifiziert.



d) Ankopplung des Analytderivats

Das Analytderivat wurde wie oben beschrieben (Methode 1, Schritt e)) an das AMD gekuppelt.



Methode 3.1: Für die orts aufgelöste Immobilisierung mit Mikrodosierer wurde in Schritt c) das Konjugat aus AMD und Analytderivat aufgetragen.

Methode 4

Carboxyliertes Dextran

Um unspezifische Proteinbindung zu verhindern und gleichzeitig eine größere Anzahl funktioneller Gruppen für die Anbindung des Analytderivats zu haben, wurde die Oberfläche zunächst mit AMD belegt (Methode 3). Dieses wurde dann mit Bernsteinsäureanhydrid (siehe Methode 1, Schritt c)) zu einem Carboxyldextran umgesetzt. Die Carboxylgruppen wurden mit NHS/ DIC aktiviert (vgl. Methode 2) und mit einem AMD-Analyt-Konjugat umgesetzt. Die Darstellung dieser Konjugate wird in Kapitel 3.2.6 beschrieben.

3.2.5 Oberflächenchemie mit Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden über Amidbindungen zwischen primären Aminogruppen, die sich am alkylamin-modifizierten 5'-Ende der Nukleotide befinden, und den Carboxylgruppen an der Oberfläche immobilisiert.

Methode I

Aktivierung eines Dextrans

Zunächst sollte die Möglichkeit untersucht werden, ein Dextran mit Carboxylgruppen in Lösung zu generieren, diese dann zu aktivieren und mit einem Oligonukleotid mit Aminogruppe umzusetzen. Dazu wurde AMD mit Glutarsäureanhydrid (,GA-AMD') und anschließend mit NHS/ DIC umgesetzt. Als zweite Möglichkeit wurde ,GA-AMD' in wäßriger Lösung mit NHS/ EDC umgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Dextrane mit einem Überschuß Methanol ausgefällt, gewaschen und mit N₂ getrocknet.

Methode II

Modifikation mit Aminohexansäure und Aktivierung für die Immobilisierung von Dextran-Oligo-Konjugaten

a) Vorbereitung

Die Transducer wurden gereinigt (Methode 1) und mit je 12 µl GOPTS eine Stunde in einer geschlossenen Kammer inkubiert, mit Aceton gespült und getrocknet.

b) Umsetzen mit Aminohexansäure

Von einer Aminohexansäure (AHS)-Lösung (1 mg AHS + 1,25 mg H₂O) wurden je 3 µl auf einen Transducer pipettiert und sofort mit einem zweiten abgedeckt. Über Nacht wurde in einer feuchten Kammer inkubiert, dann mit bidest. Wasser und HCl (0,1 M) gespült und getrocknet (Sauer et al., 1999).

c) Aktivierung

Mit 5 µl einer NHS/ DIC-Lösung (1 M/ 1,5 M) wurde 4 Stunden aktiviert (in DMF-Kammer), mit DMF und Aceton gespült und getrocknet.

d) Immobilisierung der Oligonukleotide

Die wäßrige Oligonukleotid-Lösung (2 mg/ml) wurde mittels Mikrodosierer aufgetropft.

Methode III

In dieser Variante der Oberflächenmodifizierung wurde AHS aufgeschmolzen (Stemmler, 1999). Anschließend wurde nach Methode 2c) und d) weiterverfahren.

Methode IV

Oligonukleotide auf AMD (Abbildung 14)

Die Transducer wurden mit AMD modifiziert (vgl. Methode 2).

a) Umsetzen mit Glutarsäureanhydrid

Es wurde eine Lösung von 2 mg Glutarsäureanhydrid je 1 µl DMF vorbereitet, davon 8 µl auf RfS-, 30 µl auf TIRF-Transducer aufpipettiert und sofort mit einem zweiten bedeckt. Die Transducer wurden mindestens 6 Stunden in einer geschlossenen Kammer mit DMF-Atmosphäre inkubiert. Dann wurde mit DMF und Wasser abgespült und mit N₂ getrocknet.

b) Aktivierung

Die unter a) gebildeten Carboxylgruppen wurden mit NHS/ DIC (vgl. IIc) aktiviert.

c) Immobilisierung der Oligonukleotide

Die 21mer Oligonukleotide wurden in bidest. Wasser gelöst (2 mg/ml) und mit dem Mikrodosiersystem auf die aktivierten Transducer aufpipettiert.

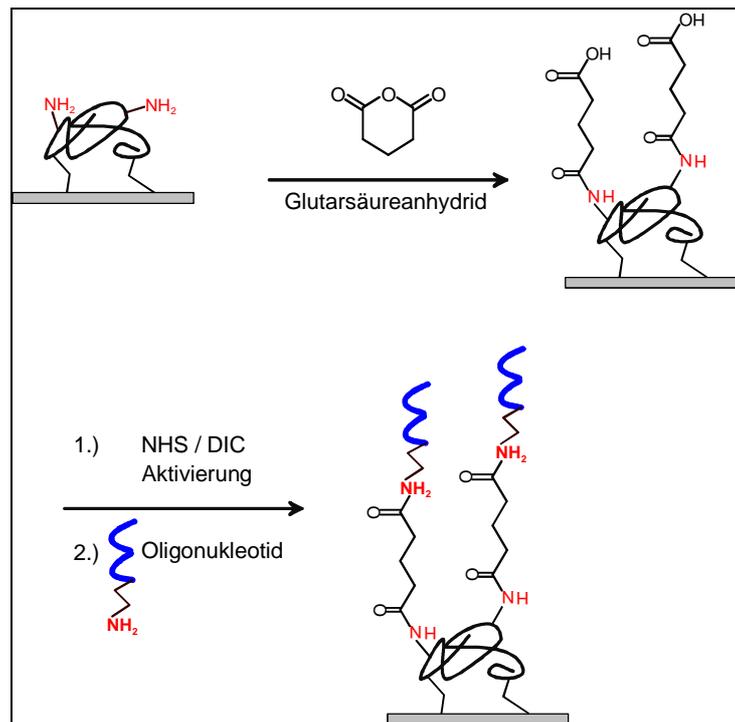


Abbildung 14: Immobilisierung von Oligonukleotiden auf eine AMD-Oberfläche

Methode V

Modifikation der Oberfläche mit Polyethylenglykol (PEG)

Die Transducer wurden gereinigt (Methode 1, Schritt a)), anschließend mit GOPTS silanisiert, mit Aceton gespült und getrocknet (Methode 1, Schritt b)). Dicarboxy-PEG 2000 wurde in Dichlormethan gelöst (4 mg/ml). 30 μl dieser Lösung wurden je Transducer aufgetragen. Nach Verdunstung des Lösungsmittels wurden die Transducer über Nacht bei 70°C gelagert. Schließlich wurde mit bidest. Wasser gespült und getrocknet. Es folgte Aktivierung und Immobilisierung der Oligonukleotide (vgl. Methode II).

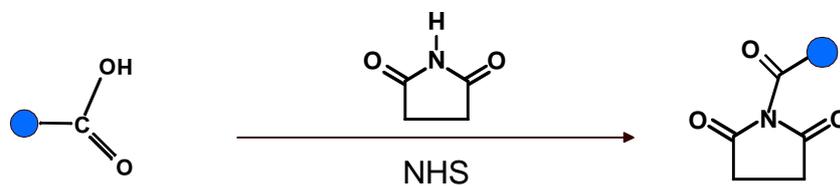
3.2.6 Konjugate: Analytderivate mit AMD, Antikörpern und Oligonukleotiden

Für die orts aufgelöste Modifikation von Multianalyt-Transducern wurden AMD-Analytderivat-Konjugate benötigt, deren Herstellung nun beschrieben wird. In gleicher Weise wurden die Analytderivate auch an Hilfsantikörper und Oligonukleotide konjugiert, um die flexible Oberflächenmodifikation zu realisieren (Kapitel 3.2.3). Die Konjugationen erfolgten mittels NHS-Aktivester-Chemie. Aktivierte Carboxylgruppen der Analytderivate wurden mit primären Aminogruppen

des Dextrans bzw. der Antikörper oder Oligonukleotide zu Peptidbindungen verknüpft (Hermanson, 1996).

Aktivester der Analytderivate

Analytderivat (5 mg) wurde in 100 μ l DMF gelöst und mit der 1,1-fachen molaren Menge NHS und 1,5-fachen molaren Menge DIC oder DCC gemischt. Diese Lösung verblieb über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Am nächsten Tag waren Kristalle (Diisopropyl- bzw. Dicyclohexylharnstoff) zu sehen. Diese wurden durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Aktivester wurde bis zu seiner Verwendung tiefgefroren.

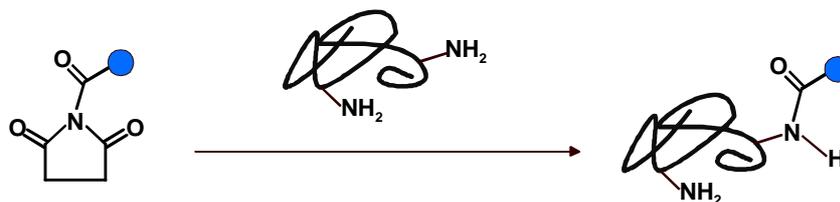


Analytderivat mit Carboxylfunktion

Aktivester

Konjugation von Aminodextran mit Analytderivaten

50 mg AMD (40 kD) wurden in 500 μ l bidest. Wasser und 500 μ l DMF gelöst. Aktivesterlösung des entsprechenden Analytderivats wurde dazugegeben und über Nacht stehengelassen (molares Verhältnis AMD-NH₂-Gruppen : Analytderivat = 1 : 2,5). Das Konjugat wurde mit Methanol bei pH 6 ausgefällt, abzentrifugiert, zweimal mit Methanol gewaschen und getrocknet.



Aktivester

AMD

Konjugat

Für die Immobilisierung mit dem Mikrodosiersystem wurden Konjugate des AMD mit kleinerem Molekulargewicht (40 kD) eingesetzt, da die Lösung des höhermolekularen (260 kD) zu viskos war.

Konjugation von Antikörpern und Oligonukleotiden mit Analytderivaten

Die für das Hilfssystem verwendeten Antikörper wurden in Carbonatpuffer gelöst und mit Analytderivat-Aktivester wie oben beschrieben umgesetzt. Überschüssiger Aktivester wurde durch Zentrifugieren über Membranfilter abgetrennt.

Die Oligonukleotide trugen am 5'-Ende einen C6-Aminorest, an welchen die entsprechenden Analytderivate über eine Amidbindung angeknüpft wurden.

Konjugiert wurde wie folgt:

300 µg ($4,13 \times 10^{-8}$ mol) des Oligonukleotids (in Wasser, 50 mg/ml) wurden in 40 µl Carbonatpuffer gegeben und mit der fünffachen molaren Menge ($2,1 \times 10^{-7}$ mol) Aktivester (in wenigen Mikrolitern DMF) vermischt. Diese Lösung verblieb über Nacht im Kühlschrank. Dann wurde mit 400 µl Isopropanol im Eisbad ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, noch einmal mit Isopropanol gewaschen und getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Oligonukleotidkonjugat in bidest. Wasser gelöst (1 µg/µl) und tiefgefroren.

Sequenzen:

Immobilisiert wurde jeweils ein 21mer. Zur Konjugation wurden die entsprechenden 23mere verwendet. Bei sämtlichen Sequenzen wurde überprüft¹, ob Haarnadelstrukturen oder Palindrome vorliegen.

- H₂N link-5'- gga atg atg tag gtt gta gcg (21mer) „O1“
H₂N link-5'- aa cgc tac aac cta cat cat tcc (23mer) „C1“
- H₂N link-5'- gaa aca cct acc taa acg gct (21mer) „O2“
H₂N link-5'- tt agc cgt tta ggt agg tgt ttc (23mer) „C2“

Alle Sequenzen tragen an beiden Enden Guanin bzw. Cytosin, um bei der Hybridisierung G-C-Paarungen zu erzeugen. Damit wird eine festere Verknüpfung der beiden Nukleotidstränge erzielt.

¹ Cyber Gene AB: DNA-Analysis and Synthesis: http://www.cybergene.se/cgi-bin/primer_design

3.2.7 Markierung der Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff

Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion sind die Antikörper in vielen Fällen mit einem Marker konjugiert. Dies kann beispielsweise ein Enzym, ein radioaktives Isotop oder ein fluoreszierendes Molekül sein. Der Marker muß stabil mit dem Antikörper verbunden sein und darf dessen Aktivität gegenüber dem Antigen nicht beeinträchtigen. Somit ist es günstig, unter milden Reaktionsbedingungen Proteinseitenketten des Antikörpers über ihre terminalen funktionellen Gruppen zu konjugieren. Solche funktionellen Reste können Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino- oder Thiolgruppen sein (Steiner & Edelhoch, 1962; Tijssen, 1985). In der vorliegenden Arbeit basierte die Markierung der Antikörper mit dem Farbstoff Cy5.5^{TM, 1} (Abbildung 15) auf der Bildung einer Amidbindung zwischen der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes und dem NHS-Aktivester des Farbstoffs (Southwick et al., 1990).

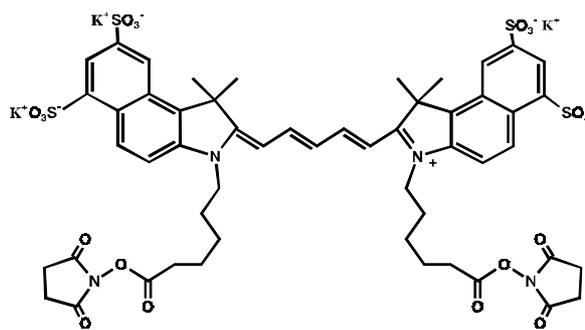


Abbildung 15: Molekülstruktur des Cyaninfarbstoffs Cy5.5

Cy5.5 wird im roten Bereich des Spektrums angeregt, wesentliche weitere Eigenschaften sind in Tabelle 3 aufgelistet.

¹ Cy5.5: 1,1'-bis(ϵ -carboxypentyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-3-H-benzindodicarbocyanin-5,5',7,7'-tetra-sulfonat-trikaliumsalz-di-N-hydroxysuccinimidester

Tabelle 3: Eigenschaften des verwendeten Farbstoffs (Herstellerangaben)

Anregungsmaximum (nm)	674
Emissionsmaximum (nm)	694
Stokes Verschiebung (nm)	20
Extinktionskoeffizient [678 nm] (l/mol cm)	250000
Quantenausbeute	0.3
Molekulargewicht (g/mol)	1312

Farbstoffe, die wie Cy5.5 langwellig angeregt werden und emittieren (Abbildung 16), sind für biochemische Sensoranwendungen sehr attraktiv (Potyraiolo et al., 1998). Sie können mit Laserdioden angeregt und ihre Fluoreszenz mit Halbleiterdetektoren detektiert werden, was Möglichkeiten zur Geräteminiaturisierung bietet. Außerdem haben langwellige Fluorophore den Vorteil, daß die Signale nicht durch Rayleigh-Streuung (an gelösten Molekülen) bzw. Tyndall-Streuung (an Partikeln) gestört werden, die bei der Anregungswellenlänge auftreten. Ob Raman-Streuung interferieren kann, hängt von der Weite des Stokes Shifts ab, die möglichst groß sein sollte. Cy5.5 hat einen Stokes Shift von 20 nm. Hintergrundfluoreszenz durch das Flußzellenmaterial oder die Probe selbst (Verschmutzungen, Proteine, Analytmoleküle im Wasser) tritt in einem Wellenlängenbereich von 320 nm - 500 nm auf und hat somit bei langwellig emittierenden Farbstoffen keinen Einfluß. Cy5.5 ist relativ pH unempfindlich und zeigt außerdem gute photochemische Stabilität (Klotz, 1998).

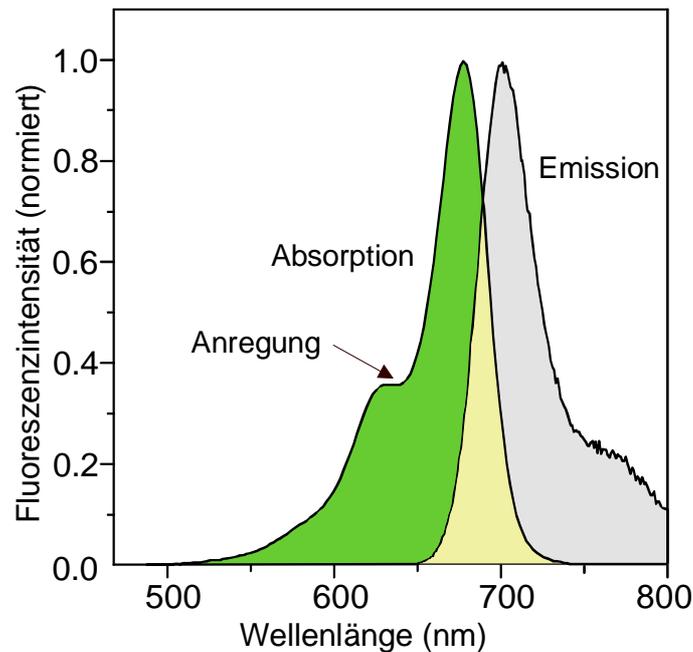


Abbildung 16: Absorptions- und Emissionsspektrum von Cy5.5

Zur Markierung von 1-2 mg Protein wurde ein vorgefertigtes Farbstoffedukt verwendet. Die Antikörper wurden in 500 μl Carbonatpuffer aufgenommen, zu dem Farbstoff gegeben und 30 min gemischt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Waschen über einen Membranfilter (Microcon) bei 12000 Umin^{-1} von den markierten Proteinen getrennt. Der Markierungsgrad (c_F/c_P) wurde durch Absorptionmessungen bestimmt (Mujumdar et al., 1996).

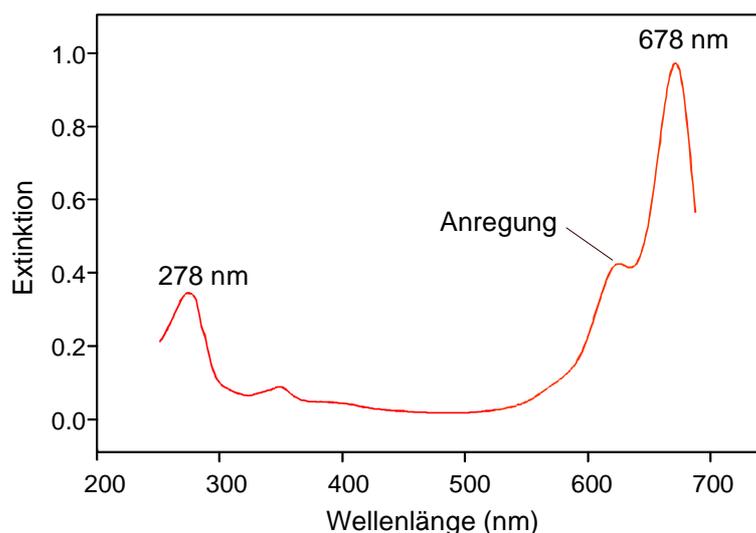


Abbildung 17: UV-VIS-Spektrum eines Antikörper-Cy5.5-Konjugats

Abbildung 17 zeigt das Spektrum eines Antikörper-Cy5.5-Konjugats. Aus den Extinktionen bei 278 nm und 678 nm wird die Antikörperkonzentration und das Ver-

hältnis Farbstoff- zu Antikörpermoleküle (c_F/c_P) berechnet. Bei 278 nm überlagern sich die Extinktion des Antikörpers und des Farbstoffs. Der Anteil des Farbstoffs beträgt 11 % seiner Extinktion bei 678 nm. E' stellt den Proteinanteil dar. Die Weglänge (Dicke der Küvette) beträgt $x = 1$ cm.

$$E'_{278} = E_{278} - 0,11 \times E_{678} \quad (20)$$

Antikörperkonzentration c_P :

$$E'_{278} = \epsilon_{278} \times c_P \times x \quad (21)$$

$$c_P = E_{278} / \epsilon_{278} x \quad (22)$$

Markierungsgrad c_F/c_P :

$$\frac{c_F}{c_P} = \frac{E_{678} \epsilon_{278}}{\epsilon_{678} E'_{278}} \quad (23)$$

Durchschnittlich lag der Markierungsgrad bei 2 - 4 Farbstoffmolekülen pro Antikörper, je nach der bei der Reaktion eingesetzten Proteinmenge.

3.2.8 Laboraufbau und kompakter Prototyp für TIRF-Messungen

Im Verlauf der Arbeit wurde zunächst ein Laboraufbau aus Einzelkomponenten, später dann der Prototyp eines kompakten Gerätes verwendet. Die prinzipielle Anordnung entsprach aber immer der unten gezeigten (Abbildung 18) und soll hier kurz dargestellt werden; Details dazu sind bei Klotz, 1998 beschrieben.

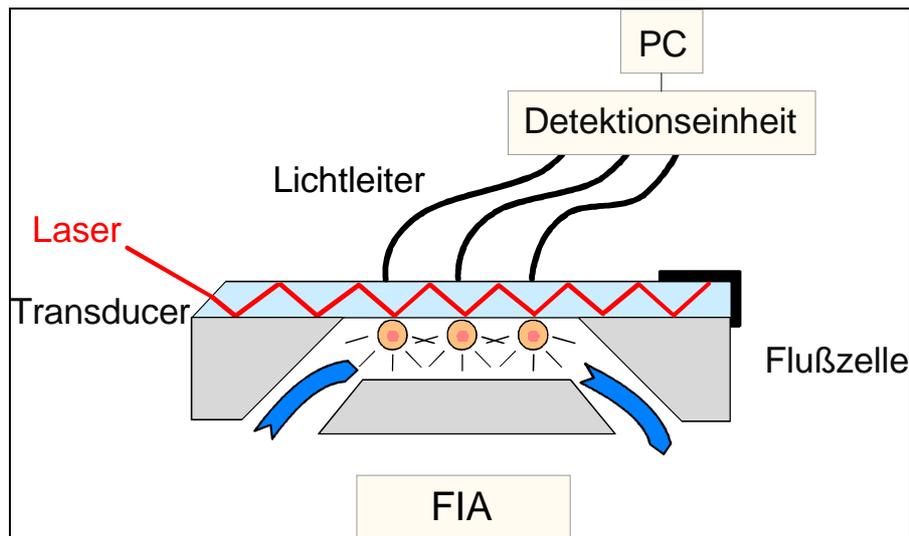


Abbildung 18: Schema der Meßapparatur

Das Kernstück war eine Flußzelle aus Plexiglas (Kanaltiefe 50 μm , Breite 1,5 mm, Länge 40 mm), auf die der chemisch modifizierte Glastransducer aufgesetzt wurde. Ein Laserstrahl wurde über ein Prisma, das mit einer indexangepaßten Immersionslösung aufgesetzt wurde, eingekoppelt und durch Totalreflexion geführt. An den jeweiligen Reflexionsstellen wurden gebundene, fluoreszenzmarkierte Antikörper angeregt. Als Anregungslichtquelle diente ein HeNe-Laser, der mit einem Sektorrad (*chopper*) moduliert wurde und mit einem mechanischen Schließmechanismus (*shutter*) ausgeblendet werden konnte. Am anderen Ende des Transducers mußte das Licht, um Rückreflexionen zu vermeiden, über ein Prisma ausgekoppelt werden. Das Fluoreszenzlicht, das an den Reflexionspunkten im evaneszenten Feld entsteht, wurde mit optischen Fasern senkrecht zur Oberfläche eingesammelt, gefiltert und mit einem Photomultiplier detektiert. Die Meßsignale wurden mit Lock-In-Technik verarbeitet und über einen Computer ausgegeben.

Ziel war die Miniaturisierung des Meßaufbaus. Deshalb wurde später als Lichtquelle eine modulierbare Laserdiode verwendet. Einkoppelt wurde über einen 45°-Schliff an einem Ende des Transducers. Das geführte Licht wurde am anderen Ende von einem schwarzen Lack vollständig absorbiert. Zur Detektion wurden Photodioden eingesetzt. Diesen Vereinfachungen folgte die Herstellung eines Prototyps, der in kompakter Form (20×40×60 cm) sowohl sämtliche optischen Komponenten als auch

FIA-Modul in sich vereint. Die Mehrzahl der später beschriebenen Immunoassays wurden mit diesem Gerät gemessen.

Für die Probenhandhabung wurden sowohl der Laboraufbau als auch das Kompaktgerät an einen *Autosampler* angeschlossen.

3.2.9 Regenerationsmethoden

Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist reversibel. Das Auseinanderbrechen läßt sich durch bestimmte Bedingungen fördern, was für immunologische Biosensoren zur Regeneration der Transduceroberfläche ausgenutzt wird. Eine ausreichend gute Regeneration der sensitiven Beschichtung ist sehr wichtig, aber oftmals auch sehr schwierig. Extreme pH-Werte (außerhalb des Bereichs 6 - 8, Tijssen, 1985), chaotrope Substanzen, hohe Salzkonzentration, elektrochemische Polarisierung (Asanov et al., 1998) oder erhöhte Temperatur dissoziieren den Antigen-Antikörper-Komplex bzw. denaturieren das Protein, so daß unter Umständen das Risiko besteht, daß die Oberfläche ihre biospezifische Aktivität verliert (Santandreu et al., 1998). Um diese mit der Regeneration verbundenen Probleme zu umgehen, wurden auch Einweg-Transducer entwickelt (Pollema & Ruzicka, 1994; Willumsen et al., 1997; Meusel et al., 1998). Dies ist allerdings nicht konform mit der Definition eines Biosensors, der vielfach wieder verwendbar sein sollte.

Um dies zu realisieren, beschäftigte sich die vorliegende Arbeit damit, eine stabile Oberflächenchemie (Kapitel 2.9 und 3.2.4) und eine effiziente Regeneration zu entwickeln. Verschiedene Ansätze dazu werden nun vorgestellt.

Regeneration mit HCl- bzw. Pepsinlösung

Antigen-Antikörper-Komplexe an der Transduceroberfläche können mit sauren oder alkalischen Lösungen gespalten werden. Glasoberflächen erlauben nur eine saure Regeneration, da im Alkalischen die Si-O-R Bindungen (R = Oberflächenmodifikation) durch Si-O-H ersetzt werden würden. Es wurden also Salzsäure- (pH = 1,75) oder Pepsinlösungen (pH = 1,9) eingesetzt. Pepsin hat bei einem pH-Wert um 2 seine maximale enzymatische Aktivität. Es bewirkt eine Verdauung der Antikörper. Die auf diese Weise denaturierten Proteine werden dann durch Spülen entfernt. Dies

kann unter Umständen jedoch problematisch sein, da sich denaturiertes Protein auf der Oberfläche ablagern kann und nur noch schwer zu entfernen ist.

Diese beiden sauren Verfahren wurden auch zur Regeneration der Transducer mit Oligonukleotid-Hilfssystem verwendet.

Regeneration mit organischen Lösungsmitteln

Organische Lösungsmittel stören die hydrophoben Wechselwirkungen, die zur Antigen-Antikörper-Bindung beitragen. So wurde z. B. Methanol zur Regeneration verwendet. Die saure (enzymatische) Regeneration wurde durch einen kurzen Spülen mit einer Mischung aus Acetonitril, Wasser und Propionsäure unterstützt. Die niedrige Oberflächenspannung der Propionsäure bewirkt eine Aufhebung der Van der Waals-Kräfte.

Regeneration mit chaotropen Lösungen

Chaotrope Reagenzien verzerren die dreidimensionale Proteinstruktur und wirken sich auf die Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor aus. Hier wurden Perchlorsäure und Trichloressigsäure getestet.

Harnstoff-Guanidiniumchlorid-Lösung

Harnstoff-Guanidiniumchlorid-Lösung wurde bei den für das Hilfssystem verwendeten Oligonukleotid-Transducern getestet.

3.2.10 TIRF-Messungen und Datenauswertung

Meßprotokoll

Wenn nicht anders angegeben, wurde für die TIRF-Immunoassays folgendes Meßprogramm verwendet:

- 60 s Basislinie (Spülen mit PBS, Geschwindigkeit $25 \hat{=} 1200 \mu\text{l}/\text{min}$ (CAVRO Manual, 1993))
- 300 s Inkubation der Probe am Transducer (Geschwindigkeit $36 \hat{=} 180 \mu\text{l}/\text{min}$; Laserdiode ausgeschaltet)
- 45 s Spülen mit PBS (Geschwindigkeit 25)
- Laserdiode einschalten

- Regeneration mit 600 μl HCl- (bzw. Pepsin-) und 200 μl Acetonitril-Lösung (Geschwindigkeit 27 $\hat{=}$ 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$); Spülen mit PBS (Geschwindigkeit 25)
- Wiederholung der Regeneration (optional)
- 60 s abschließendes Spülen mit PBS (Geschwindigkeit 25)

Ein vollständiger Zyklus dauert etwa 15 min.

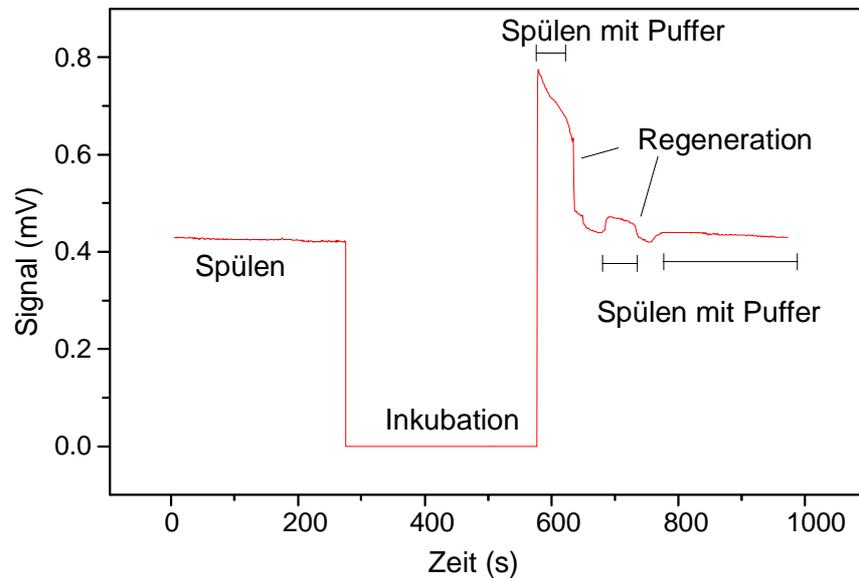


Abbildung 19: Ablauf einer TIRF-Messung

Die Änderung der Differenz zwischen dem Mittelwert am Signalmaximum (6 Meßpunkte) und dem Mittelwert der Basislinie (20 Meßpunkte) dient als Meßgröße.

Datenauswertung

Zur Erstellung von Kalibrierkurven (Titrationskurven) wurden Lösungen konstanter Antikörperkonzentration mit Standardlösungen der Analyten gemischt. Für jede Konzentration wurden drei Meßwerte aufgenommen und die Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Diese wurden auf das Nullsignal (Mittelwert bei 0 $\mu\text{g}/\text{l}$ Analyt) normiert und gegen den Logarithmus der Standardkonzentration aufgetragen. Es ergibt sich ein sigmoidaler Verlauf der Meßpunkte, der im Falle monoklonaler Antikörper mit einer auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden Funktion (Gleichung (14)), bei polyklonalen Antikörpern mit einer logistischen Funktion mit 4 Parametern (Gleichung (15)) angepaßt werden kann (vgl. Kapitel 2.7.3).

Zur Bestimmung des Arbeitsbereichs wird das sogenannte Präzisionsprofil herangezogen (Ekins, 1997). Ein Beispiel, für eine 2,4-D-Kalibrierung, zeigt Abbildung 20.

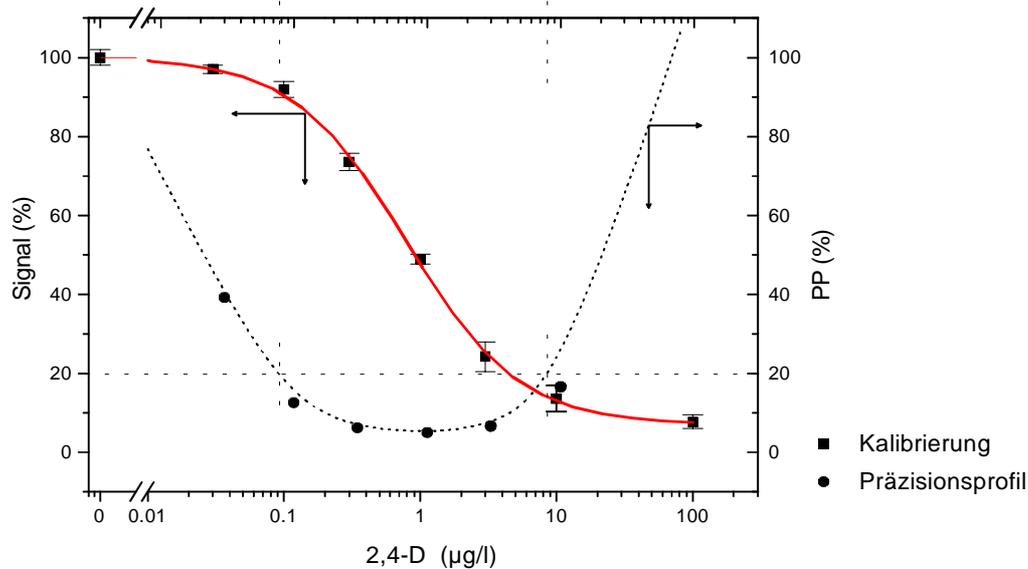


Abbildung 20: Bestimmung des Arbeitsbereichs aus dem Präzisionsprofil

Aus den Standardabweichungen der Mittelwerte werden die Standardfehler berechnet, auf die jeweils dazugehörige Analytkonzentration bezogen (PP%) und gegen diese aufgetragen. In Abbildung 20 ist sowohl eine Kalibrierkurve als auch das Präzisionsprofil aufgetragen. Analytisch sinnvoll ist eine Präzision von mindestens 20 %¹. Die Schnittpunkte des Präzisionsprofils mit der 20 %-Linie definieren so die obere und untere Grenze des Arbeitsbereichs. Übertragen auf die Kalibrierkurve sind das alle Konzentrationen zwischen 20 % und 80 % des Nullsignals. Dieser Bereich wurde in den folgenden Immunoassays als Meßbereich angegeben.

Die Nachweisgrenzen wurden als dreifache Standardabweichung vom Nullwert definiert.

¹ Für diesen Wert gibt es keine Definition. Ob 20 % oder ein anderer Wert gewählt wird, liegt im Ermessen des Analytikers (Ekins, 1997).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der mit Analytderivat modifizierten Oberflächen

RIfS- und TIRF-Transducer wurden nach denselben Methoden (beschrieben in Kapitel 3.2.4) modifiziert. Die Oberflächenchemie wurde mit RIfS grundlegend charakterisiert, da dieses Verfahren die Bindung von Proteinen an der Oberfläche direkt sichtbar macht, ohne den eventuellen Einfluß von Markierungsmolekülen.

Kriterien für die Qualität einer Transducerbeschichtung waren unspezifische Proteinbindung, spezifische Bindung der Antikörper, Regenerierbarkeit und Stabilität.

- Unspezifische Bindung wurde mit einer Lösung von 1 mg/ml Ovalbumin (OVA) getestet.
- Die maximale spezifische Bindungskapazität eines Transducers wurde mit 50 µg/ml Antikörper überprüft.
- Standard-Regenerationsverfahren war das Spülen mit HCl- bzw. Pepsin-Lösung gefolgt von Acetonitril-Lösung.
- Um die Schichtstabilität zu überprüfen, wurden die Transducer mit Lösungen hoher Ionenstärke (1 M NaCl) und kleinen pH-Werts (1 M HCl) und Alkohol (Methanol) behandelt (je eine Stunde auf einem Schüttler).

Die folgenden Ergebnisse (von je zwei gleichzeitig modifizierten Glasplättchen) zeigen das Verhalten der nach den verschiedenen Methoden modifizierten Transducer. Zur Demonstration wurden alle mit Atrazincapronsäure (ACA) bzw. AMD-ACA-Konjugat modifiziert und entsprechend mit Atrazin-Antikörper untersucht. Eine Zusammenfassung der Meßwerte findet sich in Tabelle 4.

Methode 1: Schrittweise Modifikation mit AMD und ACA auf silanisiertem, carboxyliertem Transducer

Die unspezifische Bindung von OVA war sehr gering (maximal 0,01 nm), während mit Antikörper eine Zunahme der optischen Schichtdicke von 6 - 8 nm erzielt wurde. Diese Ergebnisse sind positiv zu bewerten, aber Methode 1 ist so nicht mit einer Mikrodosierung für die orts aufgelöste Beschichtung kompatibel. Sie dient hier nur

zum Vergleich. Im folgenden sind die Ergebnisse der abgewandelten Form, mit einem Konjugat aus AMD und ACA, vorgestellt:

Methode 1.1: AMD-ACA-Konjugat auf silanisiertem, carboxyliertem Transducer

Das AMD-ACA-Konjugat wurde direkt auf die silanisierten, carboxylierten Transducer aufgetropft (mittels Mikrodosierer). Die Charakterisierung mit RfS ergab eine recht hohe unspezifische Bindung von 0,11 - 0,18 nm, was etwa 2,6 % der mit Antikörper erreichten Maximalbelegung von 5,5 - 5,6 nm entspricht. Die mit Konjugat modifizierten Transducer waren also sowohl bezüglich der Abschirmung unspezifischer Bindung als auch der spezifischen Bindungskapazität schlechter als die schrittweise beschichteten Transducer.

Methode 2: Aktivester auf dem Transducer

Die Reaktion der Oberflächen-Carboxylgruppen mit den AMD-Aminogruppen sollte durch die Aktivierung der Oberfläche verbessert werden. Die üblichen vier Versuche zur Charakterisierung wurden in diesem Falle um einen weiteren Test ergänzt: die Dauer der Einwirkung des AMD-ACA-Konjugats auf die aktivierte Oberfläche wurde zwischen drei Stunden und zwei Tagen variiert.

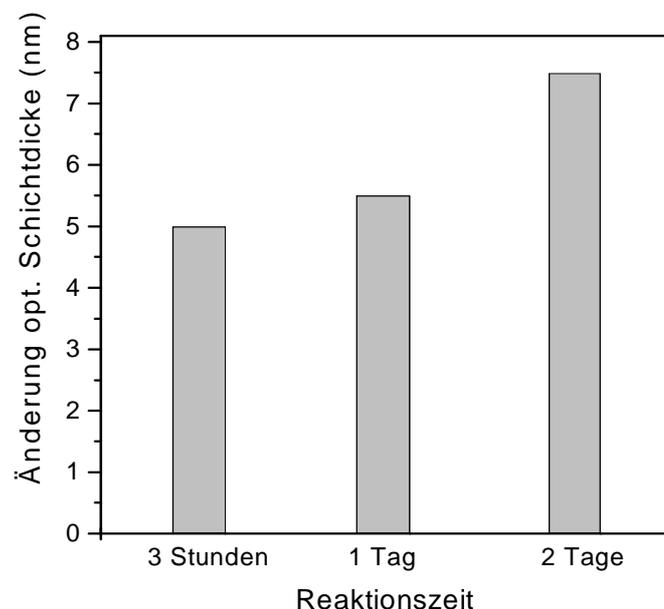


Abbildung 21: Maximalbelegungen der Transducer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit AMD-ACA

Es zeigte sich eine sehr geringe unspezifische Bindung, unabhängig von der Dauer der AMD-ACA-Einwirkung. Die Transducer mit der höheren Einwirkzeit erzielten jedoch eine höhere Maximalbelegung mit Antikörper (Abbildung 21). Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß schon nach drei Stunden genügend AMD gebunden hat, um die Oberfläche effizient gegen unspezifische Bindung abzuschirmen. Bei längerer Einwirkung bindet jedoch noch weiteres AMD, was die Anzahl der spezifischen Bindestellen für Antikörper erhöht.

Insgesamt wurde also durch die Aktivierung der Oberfläche, gegenüber den Transducern nach Methode 1.1, eine leichte Verringerung der unspezifischen Bindung, aber keine wesentliche Erhöhung der spezifischen Bindung bewirkt.

Methode 3.1: Immobilisierung des Konjugats auf GOPTS

AMD-ACA-Konjugat wurde auf die mit GOPTS silanisierte Oberfläche aufgetragen und eine Stunde inkubiert. Die Reaktionszeit zu erhöhen würde sich hier ungünstig auswirken, da GOPTS sehr hydrolyse-empfindlich ist. Die unspezifische Bindung war im Durchschnitt etwas höher als bei dem vorhergehenden Versuch, aber dennoch in einem akzeptablen Bereich. Die Maximalbelegungen mit Antikörper waren deutlich höher (10,4 - 10,8 nm) als bei allen anderen untersuchten Transducern. Zu dieser positiven Beobachtung kommt hinzu, daß Methode 3 diejenige mit dem geringsten Arbeitsaufwand darstellt.

Es wurde noch eine andere, obwohl aufwendigere, Methode untersucht, da eine weitere Verbesserung der Oberfläche nicht von vornherein ausgeschlossen werden konnte:

Methode 4: Vorbelegung der Sensoren mit Carboxyldextran

Um die unspezifische Proteinbindung möglichst ganz zu vermeiden und außerdem eine höhere Zahl funktioneller Gruppen zu erhalten, wurde die Oberfläche erst nach Methode 3 modifiziert. Dann erfolgte eine Umfunktionalisierung und die Immobilisierung des AMD-ACA-Konjugats. Die Werte für unspezifische Bindung waren sehr gering (0,02 - 0,03 nm). Maximale Schichtdickenzunahmen mit Antikörper betragen 6,3 - 6,6 nm, waren also höher als die bei Methode 1 und 2, aber niedriger als die bei Methode 3 erzielten.

Ergebnis

Als Ergebnis der Transducercharakterisierungen mit RIfS kann festgehalten werden, daß die Silanisierung mit GOPTS und nachfolgende Beschichtung mit AMD-ACA-Konjugat (Methode 3) die schnellste und hinsichtlich unspezifischer und spezifischer Bindung die effektivste Möglichkeit der orts aufgelösten Oberflächenmodifikation darstellt.

Stabilitätstests

Sämtliche Transducer wurden nun extremen Bedingungen ausgesetzt, um die Stabilität der Schichten im Hinblick auf mögliche Regenerationsschritte zu untersuchen. Dazu wurden sie nacheinander in NaCl-Lösung, HCl und Methanol gelegt und anschließend wieder charakterisiert. Dieselben Transducer wurden zusätzlich noch viermal mit Pepsin-/ Acetonitril-Lösung regeneriert und abermals charakterisiert. Die Resultate der Versuche sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Änderungen der optischen Schichtdicken aller Transducer vor bzw. nach den Stabilitätstests

<i>Transducer</i>	<i>Unspezifische Bind. 1 mg/ml OVA (nm)</i>	<i>Spez. Bind. 50 µg/ml Antik. (nm)</i>
Methode 1	0 / 0,01	5,85 / 8
mit Behandlung*	0 / -	5,1 / -
mit Behandlung, mit Regeneration	0 / -	6,2 / -
Methode 1.1	0,18 / 0,11	5,5 / 5,6
mit Behandlung	0,1 / 0,06	2,2 / 2,4
mit Behandlung, mit Regegeneration	0,6 / 0,3	2,7 / 2,7
Methode 2.1	0,08 / 0,17	10,4 / 10,8
mit Behandlung	0,06 / 0,11	8,5 / 8,8
mit Behandlung, mit Regeneration	0,02/ 0,07	8,7 / 8,8
Methode 3	0,07 / 0,02	5 / 7,5
mit Behandlung	0,02 / 0,06	4,6 / 5,6
mit Behandlung, mit Regeneration	0,08 / 0,06	4,3 / 5,5
Methode 4	0,02 / 0,03	6,26 / 6,61
mit Behandlung	0 / 0	3,85 / 5,37
mit Behandlung, mit Regeneration	- / 0	- / 5,2

(*) Die Behandlung mit Salzlösung, Säure und Alkohol wird kurz ‚Behandlung‘ genannt, das viermalige Regenerieren mit Pepsin- und Acetonitril-Lösung kurz ‚Regeneration‘. Die Werte hinter den Schrägstrichen bezeichnen das Meßergebnis eines gleichzeitig modifizierten zweiten Transducers.

Ergebnis

In allen Fällen zeigte sich der Einfluß der Behandlungsschritte durch eine mehr oder weniger starke Abnahme der spezifischen Bindungskapazität. Die Abschirmung gegen unspezifische Bindung wurde wenig beeinflusst.

Zusammenfassung der Transducer-Charkterisierungen

Am stabilsten erwiesen sich Beschichtungen, die schrittweise aus AMD und ACA aufgebaut wurden (Methode 1). Die unspezifische Bindung wurde besonders gut

abgeschirmt; nach den Stabilitätstests war die Maximalbelegung so hoch wie vorher. Dies sind positive Ergebnisse, die hier aber nur zum Vergleich mit den übrigen Verfahren dienen können, da Methode 1 nicht mit einer Mikrodosierung kompatibel ist. Glasplättchen, die silanisiert, carboxyliert und mit Konjugat modifiziert waren (Methode 1.1) zeigten nicht nur die höchste unspezifische Bindung, sondern auch die geringste Stabilität bei den Tests unter extremen Bedingungen (Abnahme der spezifischen Bindung um 50 %). Bei allen anderen Transducern war die unspezifische Bindung klein, was auf eine bessere Bedeckung der Glasoberfläche mit AMD-Konjugat schließen läßt. Die über einen Aktivester beschichteten Transducer (Methode 2) zeigten trotz der Belastung mit Säure, Salzlösung und Alkohol nur eine Abnahme der maximalen optischen Schichtdicke von etwa 17 %, waren aber wegen ihrer insgesamt geringeren Maximalbelegungen weniger interessant als die über GOPTS hergestellten Transducer (Methode 3). Diese ermöglichten die höchste maximale Bindungskapazität für spezifische Antikörper und erreichten auch nach den Tests mit Säure, Salzlösung und Alkohol noch mehr als 80 % des Ausgangswerts. Im Falle der mit Carboxyldextran vorbelegten Transducer (Methode 4) konnte eine Abnahme der Meßwerte von 21 % gegenüber den Werten vor den Stabilitätstests festgestellt werden. Hier ist allerdings der Aufwand der Beschichtung am größten.

Für die orts aufgelöste Modifikation erwies sich somit eine Silanisierung mit GOPTS und nachfolgende Immobilisierung des AMD-ACA-Konjugats als beste Lösung, da eine ausreichende Abschirmung unspezifischer Bindung und die höchste spezifische Bindungskapazität festgestellt wurden. Bezüglich der Stabilität war das Verhalten vergleichbar mit den sehr arbeitsaufwendig über Carboxyldextran hergestellten Transducern.

Einsatz der GOPTS-Transducer bei TIRF-Messungen

Für TIRF-Messungen wurden also nur noch nach Methode 3 modifizierte Glasplättchen eingesetzt. Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob sich die Oberflächenbeschichtung für eine große Anzahl von Meßzyklen eignet.

Als Beispiel wurde ein mit einem Konjugat aus AMD und dem Pentachlorphenol-derivat A4 modifizierter Transducer verwendet, auf dem mit Cy5.5-markiertem PCP-Antikörper 32mal gemessen wurde (Abbildung 22).

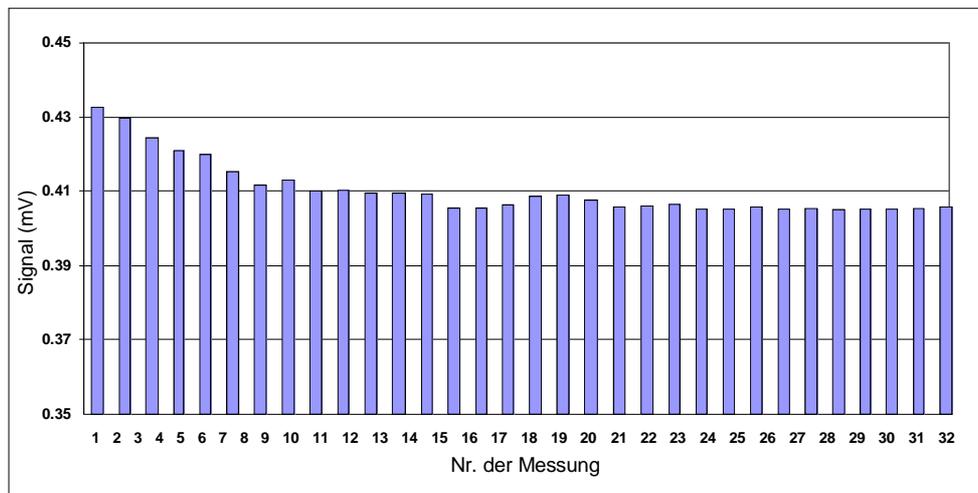


Abbildung 22: Signale aufeinander folgender Messungen auf einem AMD-A4-Transducer mit je 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-PCP-Cy5.5.

Bis zur sechsten Messung wurde ein Signalabfall auf 95 % des ersten Meßwerts beobachtet. Danach stabilisierte sich das Signal.

Das gleiche Ergebnis zeigte auch ein AMD-ACA-Transducer, auf dem 50mal mit je 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-Atrazin-Cy5.5 gemessen wurde. Im Verlauf der ersten Testzyklen wurde wieder eine Signalabnahme bis auf einen Wert von 92 % festgestellt. Danach folgte auch hier eine Stabilisierung des Signals.

Diese beiden Beispiele beschreiben ein Verhalten, daß regelmäßig bei allen Transducern beobachtet wurde. Es deutet darauf hin, daß sich zu Beginn die chemische Modifizierung noch leicht verändert. Möglicherweise wird nicht fest gebundenes Analytderivat abgetragen, oder durch das Quellen der Dextranmatrix findet eine Umorganisation der Bindestellen statt, was zu unterschiedlicher Zugänglichkeit für die Antikörper führt.

Ergebnis

Die mit GOPTS silanisierten und mit AMD-Analytderivat beschichteten Transducer bieten neben ausreichender Bindungskapazität eine gute Stabilität unter Arbeitsbedingungen. Nach einer anfänglichen Signalabnahme von etwa 5 %, war im Verlauf von 30 bis 50 Meßzyklen keine weitere Veränderung mehr festzustellen.

In der Praxis wurden die Transducer dann innerhalb und zwischen den Meßreihen durch zahlreiche Nullwerte immer wieder überprüft. Dabei zeigte sich, daß ein Transducer sogar für etwa 150 Messungen ohne signifikanten Signalverlust verwendet werden konnte.

4.2 RfS-Charakterisierung der Oligonukleotidoberflächen

Die nach Kapitel 3.2.5 mit Oligonukleotiden beschichteten Transducer wurden mit RfS getestet. Dabei sollte überprüft werden, mit welcher Modifizierung die unspezifische Proteinbindung verhindert wird und die Hybridisierungskapazität für das komplementäre Oligonukleotid möglichst hoch ist. In allen Fällen war ein 21mer immobilisiert.

- Unspezifische Bindung wurde mit 1 mg/ml OVA und 5 µg/ml Atrazin-Antikörper untersucht.
- Hybridisiert wurde mit je 10 µg/ml komplementärem Oligonukleotid (23mer).
- Mit je 5 µg/ml Konjugat aus 23mer und ACA wurde ebenfalls hybridisiert.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Charakterisierung der Oligonukleotidschichten. Angegeben sind die mit RIFS bestimmten Zunahmen der optischen Schichtdicke (in nm) bei Bindung der Antikörper, der Oligonukleotide und des Hilfskonjugats.

<i>Transducer</i>	<i>5 µg/ml Antik. (nm)</i>	<i>10 µg/ml Oligo. (nm)</i>	<i>5 µg/ml Konj. (nm)</i>
<i>Methode I: GA-AMD</i>	0,22	0,29	0,36
<i>Methode II: AHS</i>	Es trat relativ hohe unspezifische Bindung der Antikörper auf. Genauere Erörterung bei Stemmler, 1999.		
<i>Methode III: geschmolzene AHS</i>	--	1,04	0,96
<i>Methode IV: AMD, GA, Aktiv.</i>	--	0,60	0,63
<i>Methode V: PEG</i>	0,17	0,60	nicht bestimmt

Auf allen Transducern (außer dem nach Methode II) bewirkte OVA keine unspezifische Schichtdickenzunahme, weshalb auf Angaben in der Tabelle verzichtet wurde. Methode III und IV erzielten bzgl. unspezifischer Antikörperbindung und spezifischer Bindung des Oligonukleotids die besten Ergebnisse. Aus Gründen der einfacheren Durchführung wurde für die später folgenden Untersuchungen schließlich die Beschichtung der Transducer nach Methode IV ausgewählt. Die Praxis zeigte, daß damit auch eine gute Stabilität der Schichten für mindestens 100 Messungen gewährleistet war.

4.3 Regenerationsmethoden

Die effiziente Regeneration der Transduceroberfläche ist für alle Biosensoranwendungen wichtig, um möglichst viele Meßzyklen reproduzierbar durchführen zu können. Für den TIRF-Sensor wurden sämtliche unterschiedlichen Transducer unter dem Gesichtspunkt der Regenerierbarkeit mit den in Kapitel 3.2.9 beschriebenen Methoden getestet. Welche für den jeweiligen Fall der Assays ohne bzw. mit Hilfsystem am günstigsten ist, wird in den entsprechenden Abschnitten in Kapitel 4.4, 4.6 bzw. 4.8 genannt. Hier soll nur das Gesamtergebnis zusammengefaßt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß es kein allgemein gültiges Verfahren für die Regeneration der Transducer gibt. Für jedes Antigen-Antikörper-Paar muß individuell entschieden werden, welche Methode am effektivsten ist. Es kann lediglich festgestellt werden, daß in den meisten Fällen die saure Regeneration - teilweise unterstützt durch das proteolytisch wirkende Enzym Pepsin - und dem Gemisch aus Acetonitril, Wasser und Propionsäure zu den besten Ergebnissen führte.

Genauere Betrachtungen der Regenerierbarkeit der Oligonukleotid-Transducer mit RIfS zeigte folgendes: Nach der Hybridisierung von Oligonukleotiden konnte die Oberfläche mit HCl (pH=1,75) regeneriert werden. Bei den Hilfskonjugaten aus Oligonukleotid und Analytderivat und den daran gebundenen Antikörpern (bei Assays mit Hilfssystem) reichte die HCl-Regeneration hingegen nicht mehr aus. Versuche mit einer Lösung aus Harnstoff und Guanidiniumchlorid verliefen ebenfalls negativ. Mit Pepsin-Lösung jedoch wurde in nur einem Spülschritt eine nahezu 100%ige Regeneration der Oberfläche erzielt.

4.4 Immunoassays für einzelne Analyten

Zunächst wurden nur Immunoassays für einzelne Analyten durchgeführt, um verfügbare Antikörper und Analytderivate näher zu untersuchen.

Es sollte herausgefunden werden, welche Antikörperkonzentration und welches immobilisierte Derivat einerseits zu einer guten Signaldynamik und andererseits auch zu einer kleinen Nachweisgrenze führen. Mit zunehmender Konzentration des farbstoffmarkierten Antikörpers nimmt das Fluoreszenzsignal nach dem Lambert-Beerschen Gesetz linear zu. Laut Abbildung 4 hängt die Lage und Form einer Immunoassay-Kalibrierkurve von der Antikörperkonzentration ab: je geringer diese ist, desto weiter kann der Testmittelpunkt der Kurve zu kleineren Analytkonzentrationen verschoben werden. Die letztendlich verwendete Antikörperkonzentration kann also nur einen Kompromiß zwischen hoher Signalintensität und gewünschter niedriger Nachweisgrenze darstellen.

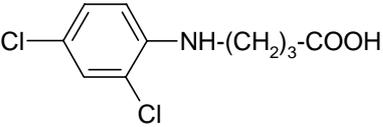
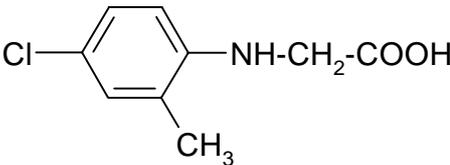
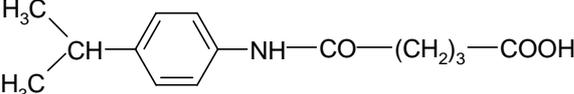
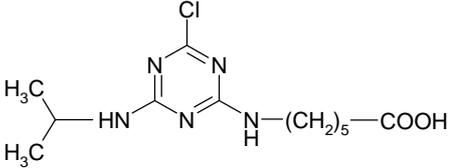
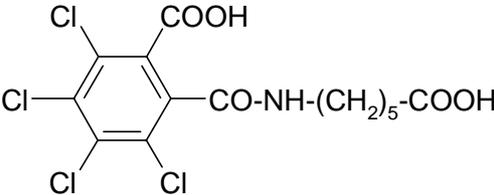
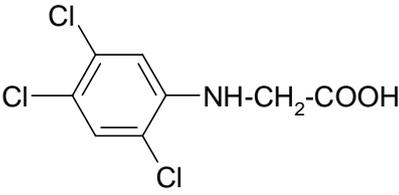
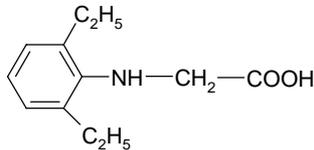
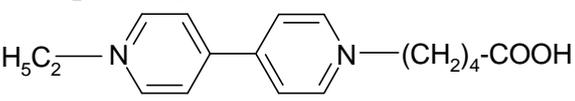
Ein weiteres Ziel der Einzelanalyt-Assays war, effiziente Regenerationsmethoden zu ermitteln. Wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, mußte die Regeneration für jedes Analyt-Antikörper-Paar optimiert werden. Welches Verfahren jeweils zum

Erfolg führte, wird in den entsprechenden Abschnitten, nach Analyten sortiert, genannt.

Insgesamt dienten die Einzelversuche den Vorbereitungen für die simultane Multi-analyt-Detektion.

Für die TIRF-Assays einzelner Analyten wurden nun also Transducer eingesetzt, die mit nur einem Analytderivat beschichtet waren. Gemessen wurde stets nach dem in Kapitel 3.2.10 beschriebenen Programm. Für jeden Analyten wurden, so weit vorhanden, verschiedene Derivate zur Transducerbeschichtung getestet. Solche, die zu den höchsten Meßsignalen führten, wurden schließlich verwendet und sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Derivate für die Transducerbeschichtung

<p>2,4-D:</p>  <p>Dichloranilinglutarsäure (DN1)</p>	<p>MCPP:</p>  <p>4-Chlor-2-methylanilinessigsäure (N8)</p>
<p>Isoproturon:</p>  <p>4-Isopropylanilinhemiglutarat (IP I2)</p>	<p>Atrazin, DEA, Simazin, Irgarol:</p>  <p>Atrazincapronsäure (ACA)</p>
<p>PCP:</p>  <p>Tetrachlorphthalsäureamidocapronsäure (A4)</p>	<p>2,4,5-TCP:</p>  <p>2,4,5-Trichloranilinessigsäure (N6)</p>
<p>Alachlor:</p>  <p>2,6-Diethylanilin-n-essigsäure (ANA)</p>	<p>Paraquat (PQ):</p>  <p>Ethylparaquatvaleriansäure (EtPQ)</p>

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Methylchlorphenoxypropionsäure (MCPP)

Für den Nachweis von 2,4-D wurden Transducer mit DN 1 beschichtet und Immunoassays mit dem verfügbaren monoklonalen Antikörper durchgeführt. Mit HCl/ Acetonitril-Lösung konnte einfach und effektiv regeneriert werden. Abbildung 23 zeigt eine Kalibrierkurve für die Bestimmung von 2,4-D. Die Antikörperkonzentration wurde so gewählt, daß die Bindungsstellenkonzentration ($1,1 \times 10^{-8}$ M) etwa eine Größenordnung über dem reziproken Wert der Affinitätskonstante ($8,9 \times 10^8$ M⁻¹, vgl. Kapitel 4.8.2) liegt. Eine Konzentration von K⁻¹ (entspricht 84 ng/ml Antikörper)

wäre laut Abbildung 4 theoretisch optimal, war aber wegen zu geringer Signaldynamik in der Praxis nicht ausreichend.

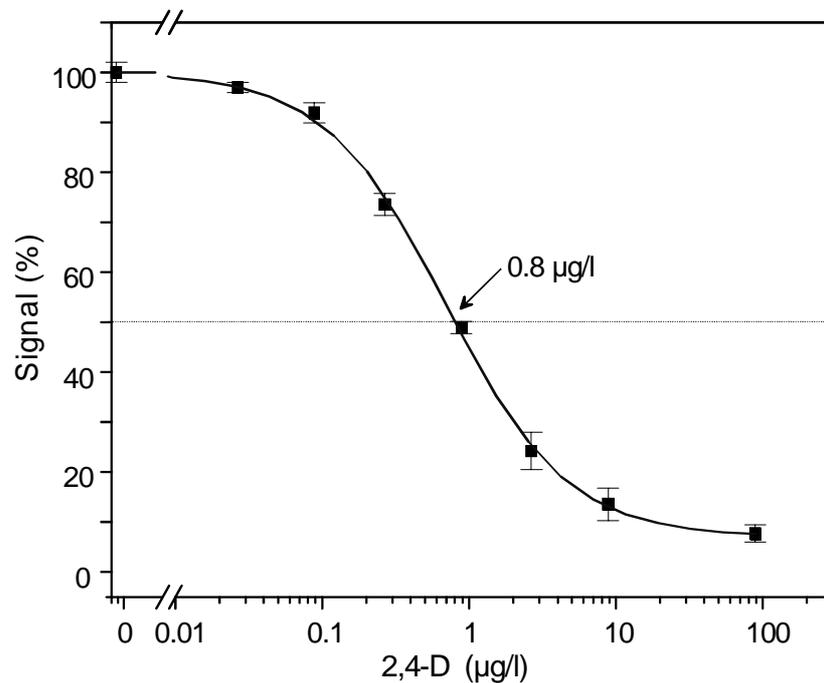


Abbildung 23: Titration von anti-2,4-D-Cy5.5 (860 ng/ml) mit 2,4-D

Der IC_{50} -Wert, die Konzentration bei 50 % Signalinhibierung, liegt bei 0,8 µg/l (Abbildung 23). Bestimmt man den Testmittelpunkt mit Hilfe der logistischen Kurvenanpassung (Gleichung (15)), ergibt sich derselbe Wert. Der 2,4-D-Antikörper verhält sich praktisch ‚ideal‘, was auch daran zu sehen ist, daß sich seine Bindung an der Oberfläche durch hohe Analytkonzentration nahezu ganz unterdrücken läßt.

Die Nachweisgrenze (0,05 µg/l) liegt unter dem EU-Grenzwert von 0,1 µg/l. Dieser TIRF-Immunoassay ist also hervorragend geeignet, um das häufig vorkommende Pestizid 2,4-D in Wasser nachzuweisen.

Ganz anders sieht das Ergebnis für MCPP aus. Die Bindung der Antikörper an der Transduceroberfläche (modifiziert mit N8) war sehr stark, so daß nicht mehr vollständig regeneriert werden konnte. An die Meßpunkte der MCPP-Kalibrierungen konnten weder die auf dem Massenwirkungsgesetz beruhende (Gleichung (14)) noch die logistische Funktion (Abbildung 24) optimal angepaßt werden. Die Fluoreszenzsignale wurden erst durch hohe Konzentrationen MCPP merklich unterdrückt, die

Form der Kurve läßt also auf eine geringe Affinität des Antikörpers zum Analyten schließen.

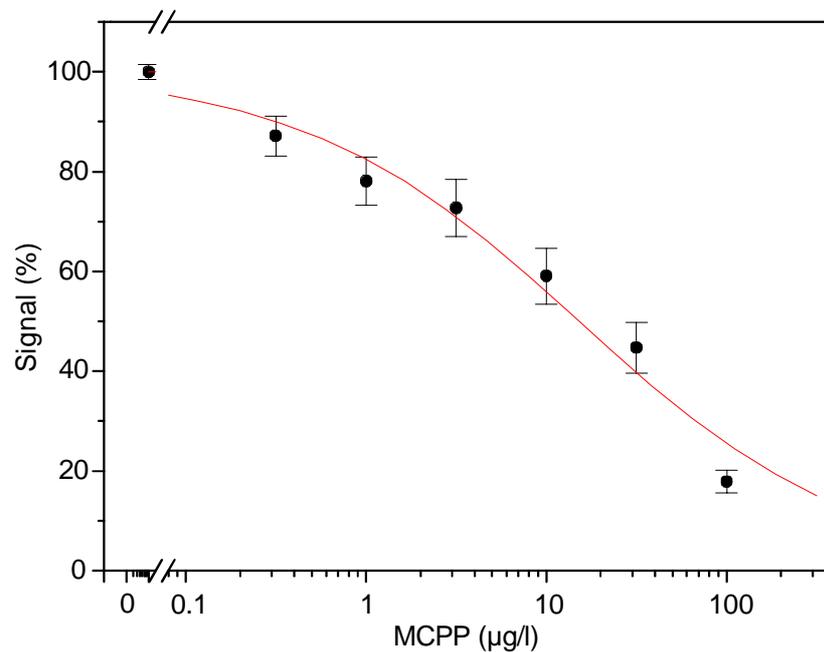


Abbildung 24: Titration mit je 1 µg/ml anti-MCPP-Cy5.5

Für umweltanalytische Ziele müßte der Meßbereich um mindestens eine Größenordnung zu kleineren Analytkonzentrationen verschoben werden, was nur durch höher affine Antikörper erreicht werden kann.

Mit den Antikörpern für 2,4-D und MCPP können die Extremfälle eines Antikörpers mit hoher und niedriger Affinität verdeutlicht werden. Die meisten der noch verwendeten Antikörper zeigen Ergebnisse, die dazwischen liegen.

Isoproturon

Die Immunoassays für Isoproturon wurden auf Transducern mit IP I2 durchgeführt, die sich problemlos durch Spülen mit HCl/ Acetonitril-Lösung regenerieren ließen. Eine Kalibrierkurve ist in Abbildung 25 zu sehen.

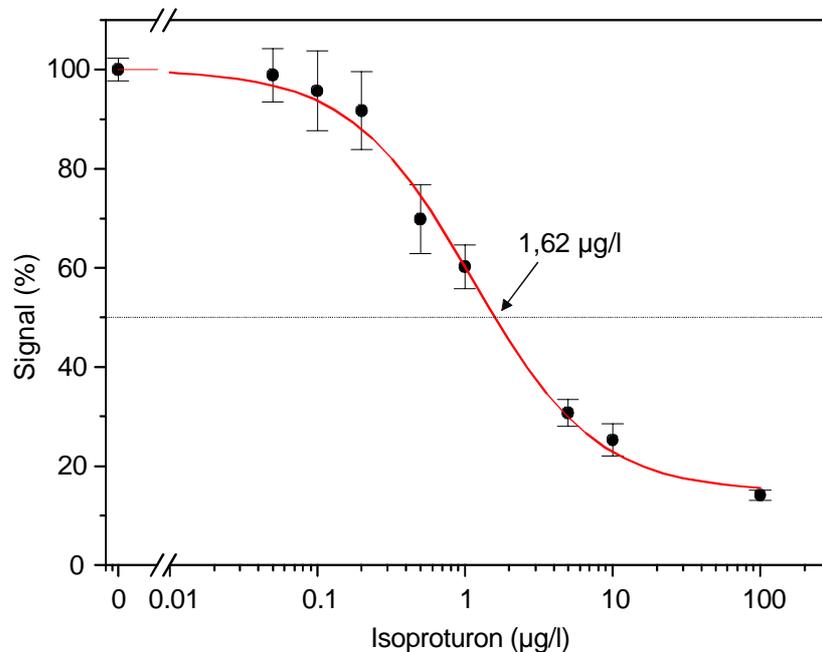


Abbildung 25: Kalibrierkurve für Isoproturon (je 1 µg/ml anti-Isoproturon-Cy5.5)

In diesem Falle entsprach die Antikörper- d. h. die Bindestellenkonzentration dem Wert der reziproken Affinitätskonstante. Der IC_{50} -Wert beträgt 1,62 µg/l Isoproturon. Dieser Wert liegt etwas höher als der aus der logistischen Funktion bestimmte Testmittelpunkt von 1,14 µg/l. Diese Differenz ergibt sich aus den Effekten, die auch das hohe Restsignal (*Offset*) der Kurve bei hoher Analytkonzentration begründen. Bei 100 µg/l Isoproturon bleibt ein Signal von 14 %. Dies kann durch Rückbindung entstehen. Das bedeutet, daß Analyt-Antikörper-Komplexe in der oberflächennahen Lösung zerfallen, zugunsten der Bildung von Analytderivat-Antikörper-Komplexen auf der Oberfläche. Die Triebkraft dafür ist, daß das immobilisierte Derivat im Überschuß vorliegt. Die Wahrscheinlichkeit der Komplexbildung an der Oberfläche wird damit höher als die einer erneuten Komplexbildung in Lösung. Diese Rückbindung wird bei der logistischen Kurvenanpassung nicht mit einbezogen, weshalb der Wert für den Testmittelpunkt zu niedrig berechnet wird.

Irgarol

Für den Analyten Irgarol standen verschieden Derivate zur Transducermodifizierung zur Verfügung. Abbildung 26 zeigt die RfS-Charakterisierungen der entsprechenden Transducer.

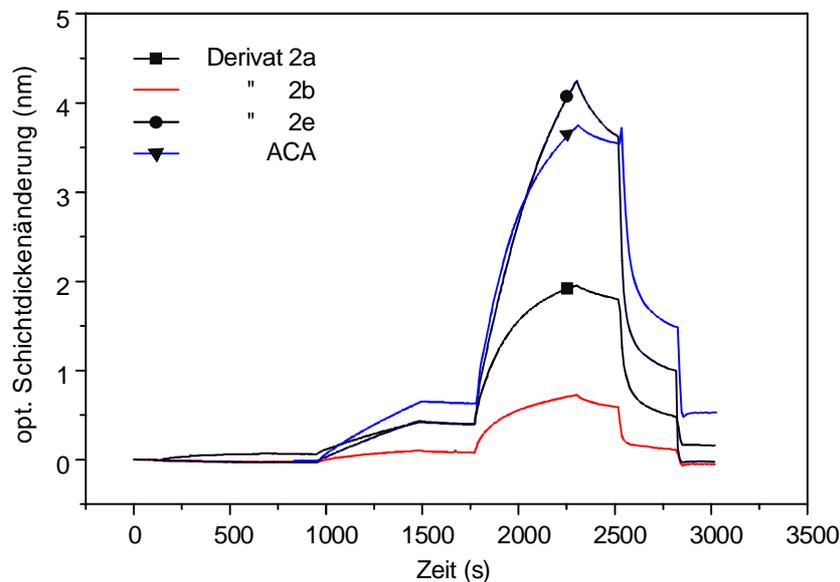


Abbildung 26: RfS-Bindungskurven von OVA, 5 µg/ml u. 50 µg/ml anti-Irgarol (Strukturen der Derivate in Ballesteros et al., 1997)

Die größten Maximalbelegungen (mit 50 µg/ml Antikörper) und größten Steigungen (mit 5 µg/ml Antikörper) wurden bei Derivat ,2e‘ und ACA erzielt.

Warum ACA das geeignetste Derivat ist, soll im folgenden erklärt werden: Es läßt sich erkennen, daß auf den ACA-Transducern mit 5 µg/ml Antikörper eine deutlich größere Steigung erzielt wird als bei allen anderen Transducern, obwohl bei rein diffusionskontrollierter Bindung das Derivat an der Oberfläche keinen so großen Einfluß haben sollte. Die Steigung der Bindungskurve hängt, bei ansonsten konstanten Arbeitsbedingungen, nur von der Antikörperkonzentration ab. Bei den oben gezeigten Bindungskurven wurden immer 5 µg/ml Antikörper eingesetzt. Dies ist eine aus UV-VIS-Absorption bestimmte nominelle Konzentration, die nichts über die Konzentration der wirklich ,aktiven‘ Antikörper aussagen kann. Polyklonale Antikörpern stellen jedoch eine Mischung aus Antikörpern unterschiedlicher Affinitäten dar, so daß die ,aktiven‘ Konzentrationen je nach Analytderivat unterschiedlich sein können. Damit kann im vorliegenden Falle begründet werden, warum auf einer ACA-

Oberfläche eine höhere Steigung erreicht wird, der Hauptanteil der Antikörper hat dazu eine größere Affinität als zu den anderen Derivaten (die aktiven Konzentrationen werden dort kleiner).

Für die Kalibrierkurven wurden alle weiteren Transducer nun mit ACA modifiziert, da sich durch die große Steigung bei kleiner Antikörperkonzentration auch eine große Sensitivität ergibt und die Möglichkeit, mit kleinen Antikörperkonzentrationen zu arbeiten und so die Lage der Kalibrierkurve zu kleinen Analytkonzentrationen zu verschieben.

Die Regeneration funktionierte mit HCl-/ Acetonitril-Lösung am besten. Eine Kalibrierkurve ist in Abbildung 27 zu sehen.

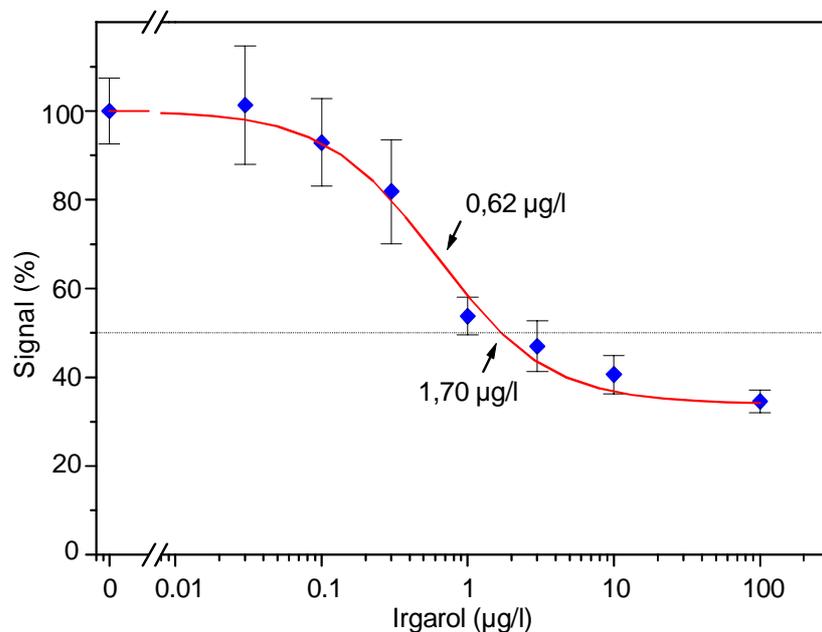


Abbildung 27: TIRF-Kalibrierung für Irgarol 1051 (1 µg/ml Antikörper)

Hier fällt besonders das hohe Signal auf, daß trotz hoher Analytkonzentrationen noch auftritt. Daß sich die Fluoreszenzsignale sich nicht weiter unterdrücken ließen, liegt vermutlich an einer starken Rückbindung der Antikörper.

Bestimmt man nun die Analytkonzentration bei 50 %-Signalinhibition, ergibt sich 1,70 µg/l. Dies ist deutlich mehr als die logistische Kurvenanpassung berechnet (0,6 µg/l), was wiederum an der Rückbindung liegt. Im Vergleich zum Beispiel des Isoproturons sieht man, daß die Angaben für den Testmittelpunkt immer weiter auseinander liegen, je höher der *Offset* der Kurve ist.

Atrazin, DEA, Simazin

Für diese drei Analyten wurden Transducer mit ACA beschichtet. Regeneriert wurde mit HCl. Der polyklonale anti-Atrazin-Cy5.5 bzw. anti-DEA-Cy5.5 wurde zu je 1 µg/ml eingesetzt, im Falle des anti-Simazin reichten 0,65 µg/ml aus, um dieselbe Signalintensität zu erreichen. - Das deutet darauf hin, daß der Anteil an aktivem IgG bei anti-Simazin höher ist als bei anti-Atrazin. Dem entsprechen auch die Affinitätskonstanten (vgl. Kapitel 4.8.2). Abbildung 28 zeigt die drei TIRF-Kalibrierkurven für DEA, Atrazin und Simazin.

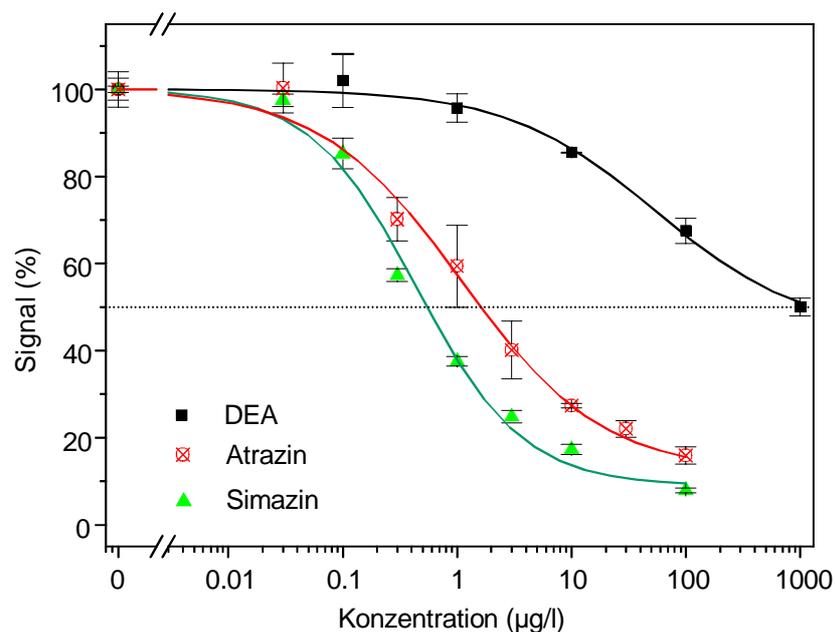


Abbildung 28: Kalibrierkurven von DEA, Atrazin und Simazin

Es treten deutliche Unterschiede auf, die sich hauptsächlich auf die unterschiedlich hohen Affinitäten der Antikörper zurückführen lassen. Der Atrazin-Antikörper ist geringer affin als der Simazin-Antikörper, der DEA-Antikörper erkennt den Analyten nur sehr schlecht. Die Nachweisgrenze für Atrazin (0,08 µg/l) liegt unter dem europäischen Grenzwert für ein einzelnes Pestizid in Trinkwasser. Für Simazin wird dieses Ziel mit einem LOD von 0,03 µg/l sehr gut erreicht.

Pentachlor- und Trichlorphenole (PCP, 2,4,5- und 2,4,6-TCP)

Die verfügbaren PCP-Antikörper gaben ein Beispiel dafür, wie durch Nachimmunisierung die Affinität polyklonaler Antikörper gesteigert werden kann. Um Verwirrungen zu vermeiden, zeigen die nachfolgenden Abbildungen nur Ergebnisse, die mit

den verbesserten Antikörpern erhalten wurden. Zu der ersten Charge PCP-Antikörper sei lediglich angemerkt, daß sie sowohl zum immobilisierten Derivat (A4) als auch zu PCP nur sehr geringe Affinität vorwiesen.

Mit der späteren Antikörpercharge waren die Resultate besser, aber es wurde folgendes beobachtet: Kalibriert wurde mit 0,5 µg/ml anti-PCP-Cy5.5. Es zeigte sich, daß Signale, die nach Proben mit hoher Analytkonzentration gemessen wurden, niedriger waren als solche nach Proben mit nur geringer Analytkonzentration. Dies deutete auf Analytreste im Flußsystem hin. Um sie zu entfernen, wurde zum Spülen PBST verwendet. Damit wurde tatsächlich erreicht, daß sich die Proben nicht mehr untereinander beeinflussen (*memory*-Effekt).

Die Kalibrierung (Abbildung 29) zeigte erst bei hohen Analytkonzentrationen eine deutliche Signalinhibierung (IC_{50} bei ca. 90 µg/l). Es wurde also nach einem Weg gesucht, um den Meßbereich zu kleineren Konzentrationen zu verschieben. Eine Möglichkeit bestand darin, bei leicht saurem pH-Wert zu arbeiten. In PBS bei pH = 7,4 liegen die Phenole (Ph-OH) in deprotonierter Form (Ph-O⁻) vor. Die Antikörper wurden jedoch gegen neutrale Moleküle gebildet, d. h. daß bei saurem pH-Wert (Ph-OH) die Erkennung der Analyten besser als in neutralem Medium verlaufen sollte. Eine entsprechende Kalibrierkurve zeigt Abbildung 29.

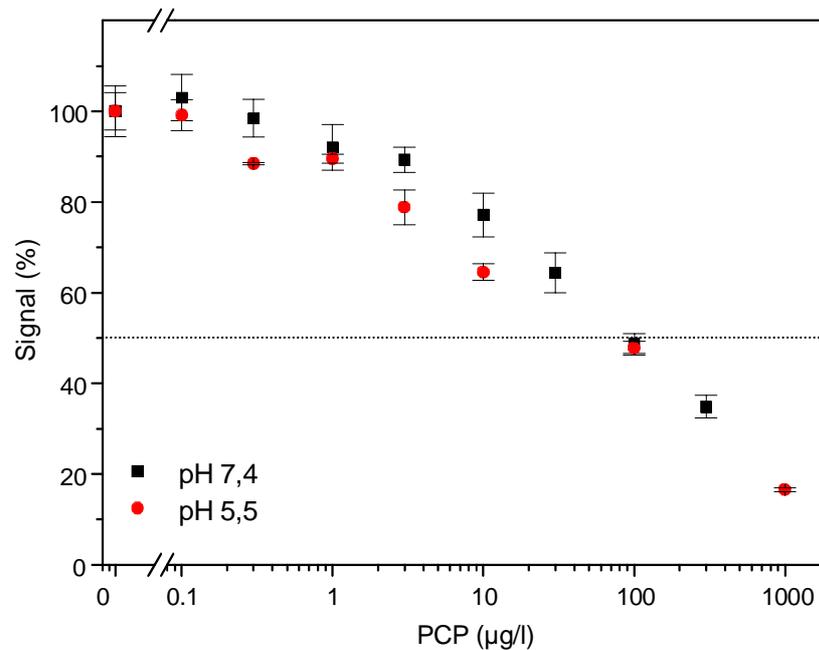


Abbildung 29: Titrations von anti-PCP-Cy5.5 bei zwei verschiedenen pH-Werten.

Im vorderen Konzentrationsbereich lagen die Meßwerte bei pH = 5,5 tatsächlich etwas unterhalb denjenigen bei neutralem pH, bei Konzentrationen ab 100 µg/l fielen die Meßpunkte jedoch wieder zusammen. Es wurde also keine entscheidende Verbesserung erzielt. Um kleinere Nachweisgrenzen zu erreichen, müßten Antikörper mit höherer Affinität entwickelt werden.

Eine ähnliche Problematik zeigte sich bei den Trichlorphenolen. RfS-Messungen mit anti-2,4,6-TCP auf verschiedenen Analytderivaten zeigten die extrem geringe Affinität dieses Antikörpers, weshalb er nicht weiter untersucht wurde. Positivere Ergebnisse wurden mit 2,4,5-TCP-Antikörper erzielt. Wie schon bei PCP wurde auch hier eine Verbesserung der Affinität im sauren Medium erwartet. Abbildung 30 zeigt entsprechende Titrationskurven bei pH-Werten von 7,4 und 5,5.

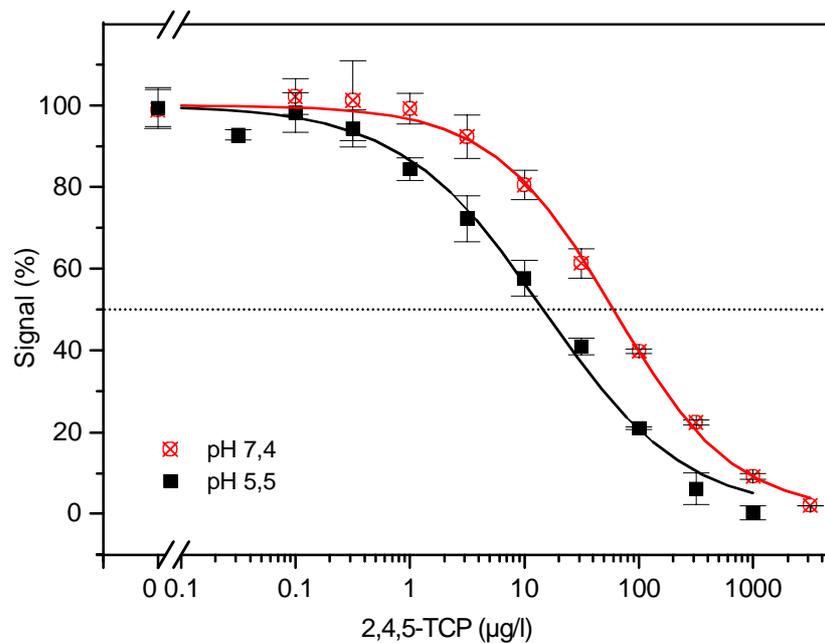


Abbildung 30: Titrations von 1,2 µg/ml anti-2,4,5-TCP-Cy5.5 (Der Transducer war in beiden Fällen mit N6 modifiziert).

Für 2,4,5-TCP wurde bei niedrigerem pH-Wert eine erfolgreiche Verschiebung der Meßwerte beobachtet. Die Testmittelpunkte (aus Gleichung (15)) betragen 60,4 µg/l bzw. 14,5 µg/l, d. h. durch die pH-Änderung wurde eine Verbesserung um das Vierfache erreicht.

Alachlor

Für die Transducermodifizierung wurde das Derivat ANA verwendet. Die Regeneration war auffallend einfach: nur ein Spülschritt mit HCl/ Acetonitril-Lösung reichte aus, um die Oberfläche wieder vorzubereiten. In Kalibrierkurven mit 1 µg/ml polyklonalem Antikörper wurden IC_{50} -Werte von 1,07 µg/l erzielt, was mit dem Testmittelpunkt aus Gleichung (15) übereinstimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,12 µg/l (Abbildung 31).

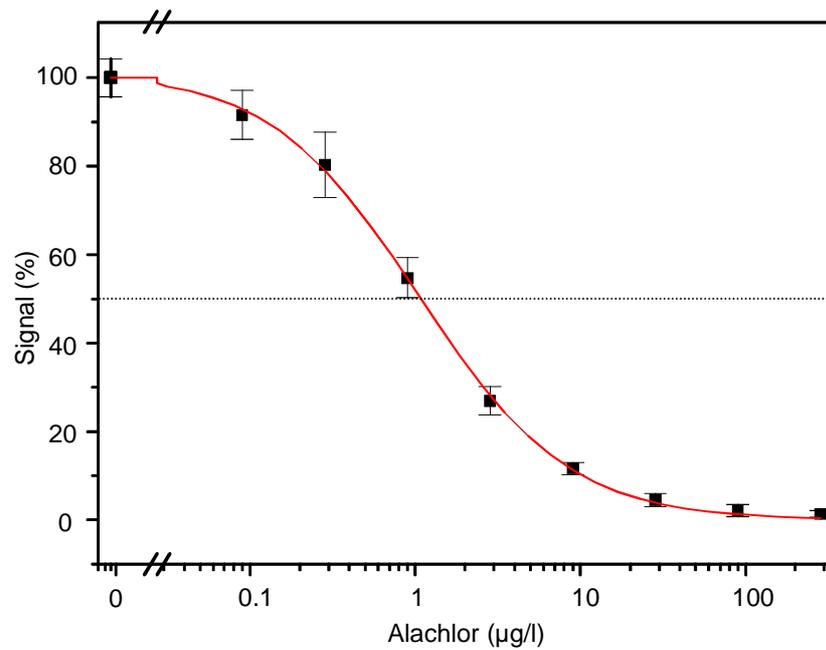


Abbildung 31: Kalibrierkurve für die Bestimmung von Alachlor

Paraquat (PQ)

Die Transducer wurden mit EtPQ modifiziert. Regeneriert wurde jeweils nur einmal mit HCl/ Acetonitril-Lösung, um gebundene Antikörper effizient zu entfernen. Kalibriert wurde sowohl mit RfS als auch mit TIRF (siehe Abbildung 32). Die Testmittelpunkte (aus Gleichung (15)) der beiden Titrationskurven lagen bei einem nahezu identischen Wert. Auffällig war jedoch, daß bei den Fluoreszenzmessungen das Signal auch bei größeren Analytkonzentrationen nicht unter ca. 50 % reduziert werden konnte.

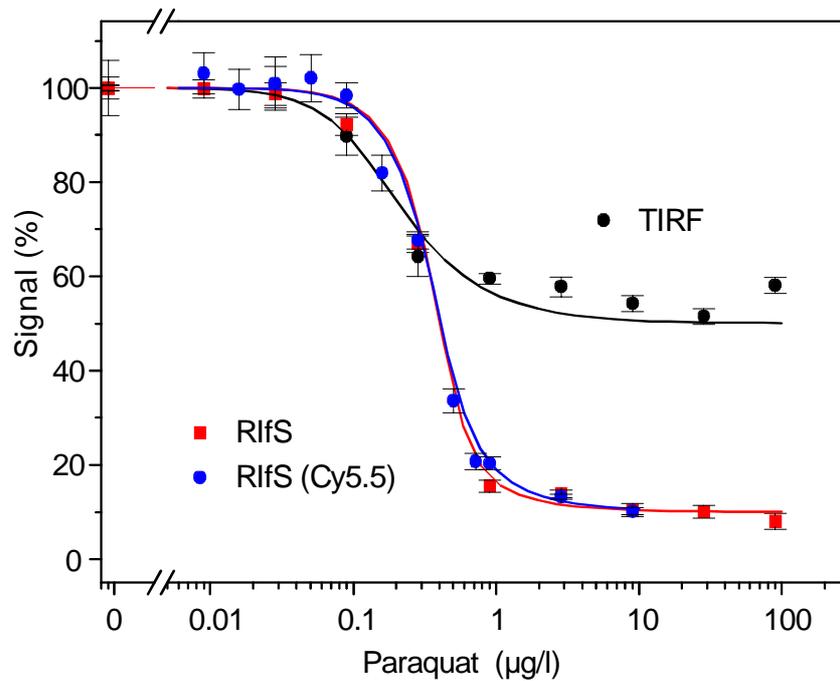


Abbildung 32: Vergleich der RIfS- und TIRF-Kalibrierkurven

Um die Ursache dafür herauszufinden, wurden folgende Versuche unternommen:

a) Anti-Pentachlorphenol-Cy5.5 (1 µg/ml) sollte nicht binden (keine Kreuzreaktivität), außer wenn es unspezifische (evtl. ionische) Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und der PQ-Oberfläche gibt. Anti-PCP-Cy5.5 wurde ausgewählt, da der Markierungsgrad dem von anti-PQ-Cy5.5 zufällig genau entsprach.

Das durchschnittliche TIRF-Signal von anti-PCP-Cy5.5 betrug aber nur 5-7 % des entsprechenden von anti-PQ-Cy5.5. Der bei der Kalibrierung beobachtete *Offset* konnte also nicht durch Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Oberfläche entstanden sein.

b) Mit RIfS wurde untersucht, ob sich der farbstoffmarkierte PQ-Antikörper anders verhält als der nicht-markierte. Dies war nicht der Fall, die Titrationskurven liegen genau aufeinander (Abbildung 32). Damit war bestätigt, daß die Markierung mit Cy5.5 keinen Einfluß auf die Messungen hatte.

c) Anti-PQ-Cy5.5 wurde nun auf AMD-Transducern (ohne Analytderivat!) mit TIRF getestet. Hier ergab sich ein unspezifisches Signal, auch dann, wenn zu den Antikörpern 100 µg/l PQ zur Inhibierung der Bindestellen zugegeben wurde. Das Signal entsprach genau dem *Offset* bei der Titration.

Anti-PCP-Cy5.5 wurde auf derselben Oberfläche untersucht. Hier betrug das unspezifische Signal nur ca. 50 % des mit anti-PQ-Cy5.5 gemessenen. Die beiden IgG-Moleküle scheinen sich unterschiedlich zu verhalten, die unspezifische Bindung des PQ-Antikörpers ist höher.

Der hohe *Offset*, der bei den Kalibrierungen mit TIRF beobachtet wurde, ist also offenbar auf eine unspezifische Adsorption zurückzuführen. Dafür spricht, daß die Signale auf dem mit EtPQ modifizierten Transducer auch bei 100 µg/l Analyt nicht auf einen Wert nahe Null reduziert wurden und bei einem nur mit AMD modifizierten Transducer dasselbe beobachtet werden konnte. Möglicherweise adsorbieren die Antikörper zusätzlich an der Flußzelle. Dies würde erklären, warum nur bei TIRF ein hohes Signal sichtbar ist (Hintergrundfluoreszenz), nicht hingegen bei RfS (an der Wand adsorbierte Proteine tragen nicht zur optischen Schichtdicke bei). Eine andere Erklärung könnten die unterschiedlichen Flußparameter bei TIRF und RfS sein. Allerdings bleibt auch dabei die Frage, weshalb der beschriebene Effekt nur bei PQ auftritt. Trotz dieser Fragestellungen ist der PQ-Antikörper sehr interessant. Der Testmittelpunkt aus der logistischen Kurvenanpassung ist mit 0,46 µg/l sehr klein. Er ist, trotz des unterschiedlichen Kurvenverlaufs, bei RfS- und TIRF-Messungen identisch.

Zusammenfassung

Für insgesamt 11 Pestizide (vgl. Tabelle 7) wurden TIRF-Immunoassays mit Bindungshemmtest-Format etabliert. Dazu gehörte für jeden Analyten zunächst die Auswahl eines geeigneten Analytderivats für die Modifikation der Transducer sowie das Ermitteln einer wirksamen Regenerationsmethode. Kalibrierkurven wurden dann mit Antikörperkonzentrationen zwischen 0,5 und 1 µg/ml gemessen. Diese Werte ergaben sich einerseits aus dem Ziel, möglichst kleine Nachweisgrenzen für die Analyten zu erreichen und andererseits aus der für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis notwendigen Antikörperkonzentration.

Tabelle 7: Ergebnisse der Immunoassays

<i>Analyt</i>	<i>IC₅₀</i> ($\mu\text{g/l}$)	<i>SD_{verf}</i> (%)	<i>LOD</i> ($\mu\text{g/l}$)	<i>Bereich</i> ($\mu\text{g/l}$)
2,4-D	0,79	2,15	0,05	0,19 - 4,8
MCPPP	14,7	1,7	0,11	1,3 - 173
Isoproturon	1,62	4,66	0,23	0,30 - 15,0
Irgarol	1,70	7,41	0,3	0,3 - n.d.
Atrazin	1,60	2,03	0,08	0,19 - 27,6
DEA	1000	3,08	4,7	22 - n.d.
Simazin	0,55	1,63	0,03	0,11 - 3,8
PCP (pH 7,4)	ca. 80	4,06	3	7 - 930
PCP (pH 5,5)	ca. 80	2,1	ca. 0,3	3 - 930
2,4,5-TCP (pH 7,4)	60	2,87	3,2	11,2 - 317
2,4,5-TCP (pH 5,5)	14,6	3,6	0,67	2 - 107
Alachlor	1,07	3,33	0,12	0,27 - 4,6
Paraquat	10	3,09	0,08	0,15 - n.d.

IC₅₀ : Konzentration bei 50 %-Signal.

SD_{verf} : Mittelwert der Standardabweichungen innerhalb einer Kalibrierkurve.

LOD : Konzentration bei Signal, das sich um $3 \times \text{SD}_{\text{verf}}$ vom Nullsignal unterscheidet.

Bereich : Konzentrationen mit Signalen von 80 % bis 20 %.

Die mittleren Standardabweichungen liegen zwischen 1,7 und 4,7 %, nur in einem Falle darüber. Diese geringen Fehler ergeben sich hauptsächlich aus Pipettierungenauigkeiten beim Dosieren der Proben und Antikörperlösungen und den Abweichungen des Fließinjektionssystems. Für die meisten Substanzen werden die meßbaren Konzentrationen den Problemstellungen in der Wasseranalytik gerecht. Für alle Analyten konnte in neutralem Puffer gearbeitet werden, bis auf die chlorierten Phenole. Bei PCP bzw. 2,4,5-TCP wurde die Affinität der Antikörper durch einen pH-Wert von 5,5 etwas bzw. deutlich gesteigert. Dennoch war die Leistung dieser Assays wie auch der für DEA und MCPPP nicht optimal in Bezug auf den analytisch relevanten Arbeitsbereich. In diesen Fällen können nur durch verbesserte Antikörper

niedrigere Nachweisgrenzen erzielt werden. Insgesamt jedoch wurde gezeigt, daß der immunologische Nachweis von Pestiziden mit TIRF eine empfindliche und präzise Alternative zur ‚klassischen‘ instrumentellen Analytik ist.

4.5 Kreuzreaktivitäten

Die Kreuzreaktivität ($\%CR$) eines Antikörpers ist ein Maß für seine Affinität zu Molekülen, die seinem Hapten verwandt sind oder die zumindest ähnliche antigene Determinanten haben. Mit Kreuzreaktivitäten ist besonders bei polyklonalen Antikörpern immer zu rechnen, da sie eine heterogene Mischung von Antikörpern unterschiedlicher Affinitäten darstellen.

Eine erste Abschätzung kann durch Vergleichen der Signale verschiedener Antikörper (in je einer hohen und einer niedrigen Konzentration) auf einem bestimmten Transducer erfolgen. Auf diesem Wege wurden die für das Hilfssystem ausgewählten Antigene/ Antikörper charakterisiert (Kapitel 4.8.1).

In der Regel wird Kreuzreaktivität durch Titration eines Antikörpers mit dem Analyten und der potentiell kreuzreagierenden Substanz bestimmt. Die Meßwerte werden normiert und gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Die Testmittelpunkte werden nach Gleichung (24) verglichen (Abraham, 1969; Hock & Nießner, 1995; Winklmaier et al., 1997):

$$\%CR = c_{mp}/b_{mp} \times 100 \quad (24)$$

mit: c_{mp} : Konzentration des Analyten am Testmittelpunkt

b_{mp} : Konzentration des kreuzreagierenden Haptens am Testmittelpunkt.

Im Hinblick auf den simultanen Nachweis unterschiedlicher Analyten in einer Probe, mußten mögliche Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper vorab charakterisiert werden. Dies wurde mit RIFs durchgeführt, um die Antigen-Antikörper-Reaktionen direkt ohne Markierung beobachten zu können. Die Titrationskurven zeigten klar, daß im relevanten Konzentrationsbereich zwischen der Mehrzahl der Analyten bzw. Antikörper keine Wechselwirkung vorlag. Als Beispiel ist die anti-Atrazin-Titration abgebildet (Abbildung 33).

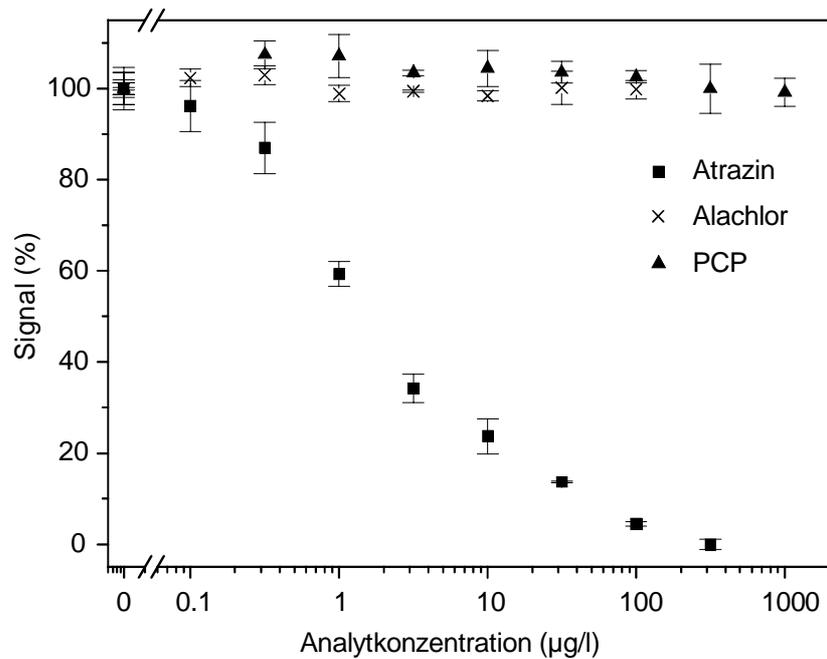


Abbildung 33: Titration von anti-Atrazin mit Atrazin, Alachlor und PCP

Die Signale wurden auch durch große Mengen eines fremden Analyten nicht unterdrückt, so daß keine Testmittelpunkte angegeben werden konnten (%CR = 0).

Nur im Falle des anti-Alachlors wurde eine, allerdings äußerst geringe, Affinität zu PCP detektiert (Abbildung 34).

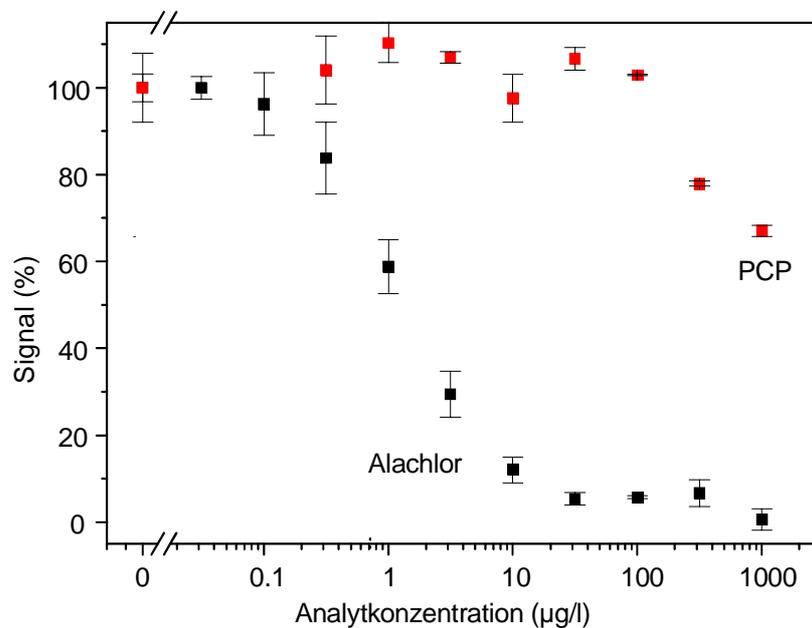


Abbildung 34: Titration von anti-Alachlor mit Alachlor und PCP

Bei PCP-Konzentrationen von mehr als 300 µg/l zeigt der Alachlor-Antikörper eine Signalunterdrückung auf 78 %, was einer Alachlorkonzentration von näherungsweise 0,3 µg/l entspricht. Das bedeutet, daß eine Kreuzreaktivität nur dann in Betracht

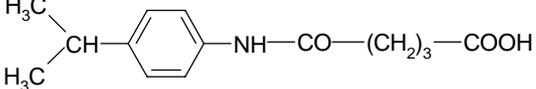
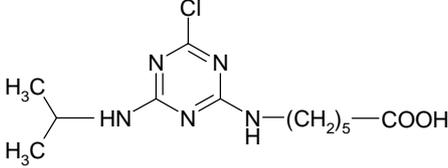
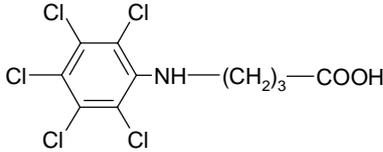
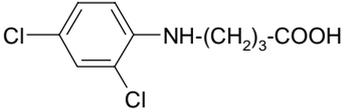
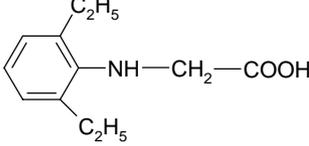
gezogen werden muß, wenn die PCP-Menge das 1000fache der des Alachlors beträgt. Dies wird in der Praxis kaum vorkommen und wird gegebenenfalls von einer gleichzeitigen Messung mit anti-PCP angezeigt.

4.6 Multianalyt-Immunoassays

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war, Multianalyt-Assays zu etablieren. Nachdem eine Reihe von Substanzen einzeln bestimmt werden konnte, sollten nun je drei parallel quantifiziert werden.

Für die orts aufgelöste Multianalyt-Detektion wurden Transducer nach Methode 2.1 (Kapitel 3.2.4) an drei Positionen mit unterschiedlichen Analytderivaten (Tabelle 8) modifiziert. Der Durchmesser jedes modifizierten Bereichs beträgt 3 mm, die Abstände dazwischen 2,5 mm. Jeder modifizierte Fleck trifft mit einem Reflexionspunkt des im Transducer geführten Laserstrahls zusammen. Die dabei durch das evaneszente Feld hervorgerufene Fluoreszenz ist an allen Positionen in derselben Größenordnung (Klotz, 1998).

Tabelle 8: Derivate für die AMD-Konjugation

 <p>4-Isopropylanilinhemiglutarat (IP 5)</p>	 <p>Atrazincapronsäure (ACA)</p>
 <p>Pentachloranilinbuttersäure (N7)</p>	
 <p>Dichloranilinglutarsäure (DN1)</p>	 <p>2,6-Diethylanilin-N-essigsäure (ANA)</p>

Zur Demonstration der simultanen Nachweismöglichkeit sollten Simazin, 2,4-D, Isoproturon und Alachlor, Atrazin, PCP in je einer Probe bestimmt werden. Ein Grund für diese Auswahl war, daß Simazin und 2,4-D bzw. Atrazin und Alachlor in

Pestizidmixturen (vgl. Kapitel 2.10) und somit auch in der Umwelt gemeinsam auftreten. Diesen Paaren wurde jeweils ein dritter Analyt zugefügt (Isoproturon und PCP), der ebenfalls zu den im Wasser sehr häufig vorkommenden Schadstoffen gehört.

Für die TIRF-Messungen wurden je drei Antikörper mit drei Analytlösungen gemischt. Um Kreuzreaktivitäten auszuschließen bzw. genau zu kennen, waren die Antikörper mit Hilfe von RIFs-Untersuchungen charakterisiert worden (vgl. Kapitel 4.5). Nach diesen vorbereitenden Tests wurden die Analyten parallel nach dem in Kapitel 3.2.10 beschriebenen Programm kalibriert. Abbildung 35 zeigt die gleichzeitige Titration von 2,4-D, Simazin und Isoproturon. Die Antikörper wurden dabei in Konzentrationen von $[\text{anti-2,4-D-Cy5.5}] = 860 \text{ ng/ml}$, $[\text{anti-Simazin-Cy5.5}] = 645 \text{ ng/ml}$ und $[\text{anti-Isoproturon-Cy5.5}] = 968 \text{ ng/ml}$ eingesetzt.

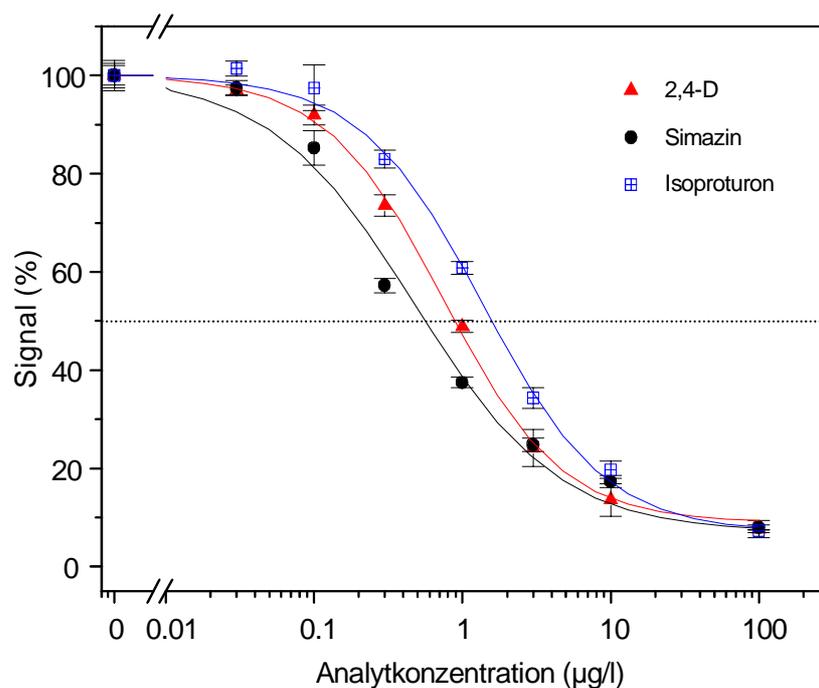


Abbildung 35: Simultane Kalibrierung mit 2,4-D, Simazin und Isoproturon

Die Resultate dieser Multianalyt-Bestimmung stimmen gut mit den Einzelergebnissen überein (Kapitel 4.4).

Die gleichzeitige Messung von Alachlor, Atrazin und PCP in einer Probe ist in Abbildung 36 zu sehen. Die Antikörperkonzentrationen betragen hier $[\text{anti-Alachlor-Cy5.5}] = 570 \text{ ng/ml}$, $[\text{anti-Atrazin-Cy5.5}] = 570 \text{ ng/ml}$ und $[\text{anti-PCP-Cy5.5}] = 570 \text{ ng/ml}$.

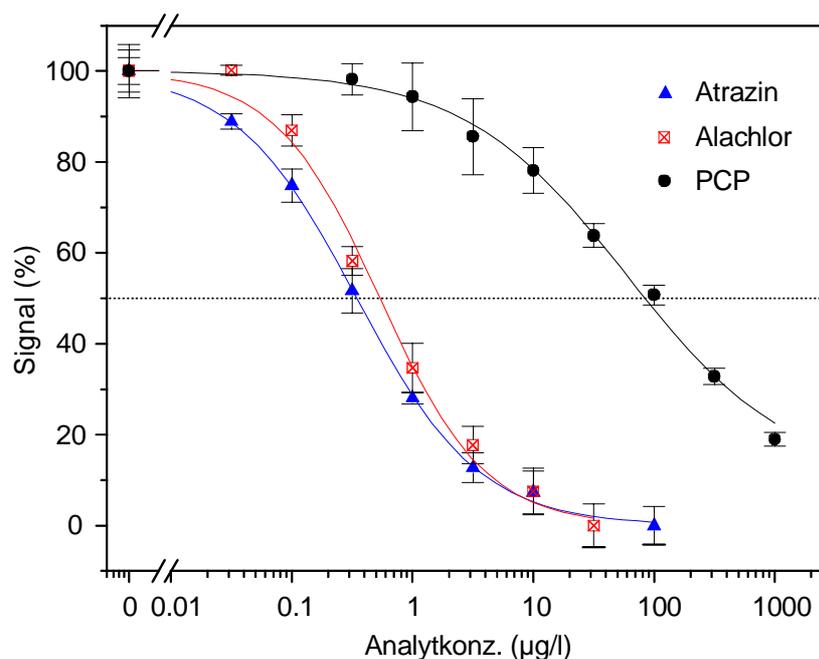


Abbildung 36: Simultane Kalibrierung für Alachlor, Atrazin und PCP

Es wurde, ungeachtet der PCP-Antikörper, bei neutralem pH-Wert gemessen, da eine Verringerung des pH-Werts nur zu einer geringfügigen Verbesserung ihrer Affinität geführt hatte (vgl. Kapitel 4.4). Auch hier findet sich eine gute Übereinstimmung zwischen den einzelnen (Kapitel 4.4) und parallelen Messungen. Detaillierte Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Ergebnisse der Multianalyt-Messungen

<i>Analyt</i>	<i>IC₅₀ (µg/l)</i>	<i>SD_{verf.} (%)</i>	<i>LOD (µg/l)</i>	<i>Bereich (µg/l)</i>
Atrazin	0,35	3,33	0,03	0,07 - 1,78
Simazin	0,54	1,7	0,03	0,11 - 3,92
Isoproturon	1,5	2,08	0,11	0,41 - 7,4
Alachlor	0,53	3,98	0,07	0,13 - 2,16
2,4-D	0,89	2,15	0,07	0,23 - 4,56
PCP	81	4,59	4,23	8,6 - >1000

Die gefundenen Nachweisgrenzen für die Pestizide werden in den meisten Fällen den Anforderungen, die an die Wasseranalytik gestellt werden, gerecht. Nur im Falle des PCPs liegen die Werte zu hoch. Obwohl chlorierte Phenole oft in höheren Konzentrationen von bis zu 60 µg/l vorkommen können, z. B. in Abwässern aus der Textilindustrie (Agrawal et al., 1998), ist eine Verbesserung des PCP-Assays

wünschenswert. Wie schon bei den Einzelbestimmungen erläutert wurde, kann dies nur mit verbesserten Antikörpern erreicht werden. Die übrigen Nachweisgrenzen sind teilweise etwas kleiner als die zuvor bei den Einzelmessungen bestimmten (siehe Tabelle 7), was sich durch die kleineren Antikörperkonzentrationen begründen läßt. Insgesamt sind die Resultate der Einzel- und Multianalyt-Messungen sehr gut vergleichbar. Durch die gleichzeitige Anwesenheit anderer Antikörper und Analyten traten keine negativen Einflüsse auf.

4.7 Untersuchung von Realproben

Ein Ziel dieser Arbeit war, stets möglichst nahe an praktischen Problemstellungen der Wasseranalytik zu arbeiten. Es sollte nicht nur ein Meßgerät aufgebaut und die notwendige Oberflächen- und Immunchemie zur Verfügung gestellt werden, beides sollte auch unter möglichst realistischen Arbeitsbedingungen erprobt werden. Sowohl mit dem Laboraufbau als auch dem ersten kompakten Meßgerät wurden Messungen in realen Wasserproben durchgeführt, teilweise im Labor, teilweise direkt an einem Flußufer bei der Teilnahme am *Technical Meeting: Biosensors for Environmental Monitoring* (TU Berlin, 09/ 1997 und 09/ 1998).

Proben aus Industrie- und Klärwerksabwasser wurden ebenso untersucht wie Flußwasser. Hauptsächlich wurde am Berliner Teltowkanal gemessen, der eine schlechte Qualität aufweist. 50 % der Abwässer Berlins werden in diesen Kanal eingeleitet und fließen damit weiter in die Havel. Entlang des Kanals befinden sich zahlreiche Kraftwerke, Klärwerke und Häfen, die für die Verschmutzung mitverantwortlich sind. Vom Landesumweltamt werden Oberflächen-, Grund- und Abwasser regelmäßig untersucht. An 500 Meßpunkten werden 65 Analyten wöchentlich oder in Abständen von 14 Tagen registriert. Parameter wie pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Temperatur oder Leitfähigkeit werden kontinuierlich überwacht, nicht jedoch organische Schadstoffe, wie z. B. Pestizide.

Das Beispiel dieses Kanals verdeutlicht noch einmal, wie vielfältig die Belastungen sein können, denen Oberflächengewässer ausgesetzt sind und daß es immer noch an Methoden mangelt, alle Parameter, insbesondere auch synthetische organische Stoffe, kontinuierlich beobachten zu können. Damit wird noch einmal die große Bedeutung

von einfachen und flexiblen Multianalyt-Systemen für die Wasserüberwachung gezeigt.

Zielanalyten der TIRF-Messungen beim ersten *Technical Meeting* waren Atrazin und 2,4-D, die zu diesem Zeitpunkt noch einzeln gemessen wurden. Im folgenden Jahr wurden Atrazin, Isoproturon und 2,4-D simultan und zusätzlich PCP bestimmt. Sämtliche Proben wurden entweder direkt verwendet oder lediglich filtriert. Die Antikörper waren in PBS (fünffach konzentriert) und mit 2 mg/ml Ovalbumin vorbereitet. 100 µl dieser Lösung wurden mit 900 µl Standardlösung bzw. Wasserprobe vermischt. Die Standardlösungen wurden mit folgender ‚Standardmatrix‘ hergestellt:

Tabelle 10: Chemische Zusammensetzung der ‚Standardmatrix‘ (pH: 7,2).

<i>Gehalt (mg/l)</i>			
<i>Ca</i>	10	<i>Si</i>	30
<i>Mg</i>	20	<i>Cl</i>	50
<i>Na</i>	30	<i>SO₄</i>	40
<i>K</i>	6		

Abbildung 37 zeigt als Beispiel für die Ergebnisse die Kalibrierkurve und Probenwerte für Isoproturon (bestimmt bei der simultanen Messung von Isoproturon mit 2,4-D und Atrazin). Bis zum Druck dieser Arbeit lagen die genauen Referenzwerte nur für Isoproturon vor. Die Ergebnisse aus beiden Veranstaltungen mit Vergleichswerten (so weit vorhanden) sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

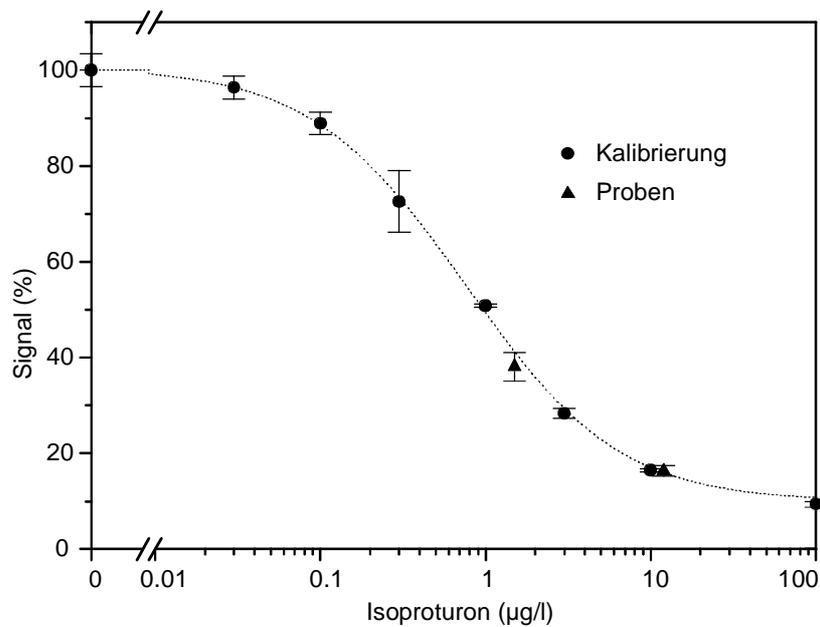


Abbildung 37: Bestimmung von Isoproturon in Realproben (Teltow-Kanal, Berlin)

Tabelle 11: Ergebnisse der Realproben

Atrazin (Laboraufbau, 1997)

$\mu\text{g/l}$ gemessen (10fache Verd.)	$\mu\text{g/l}$ enthalten	Wiederfindung (%)
3	3	100
9	10	90
3	3	100

2,4-D (Laboraufbau, 1997)

$\mu\text{g/l}$ gemessen (10fache Verd.)	$\mu\text{g/l}$ enthalten	Wiederfindung (%)
10	6	166
150	60	250
200	240	83

Isoproturon (Kompaktgerät, 1998)

$\mu\text{g/l}$ gemessen (10fache Verd.)	$\mu\text{g/l}$ enthalten	Wiederfindung (%)
1,49	15,0	99,3
12,0	15,0	80

Proben im Bereich zwischen etwa 1 und 15 $\mu\text{g/l}$ Analyt konnten gut bis sehr gut bestimmt werden. Größere Fehler wurden bei hohen Konzentrationen gemacht. Solche Proben sollten weiter verdünnt werden, um wieder im mittleren Bereich der Kalibrierkurve zu arbeiten. Besonders auffällig waren die Abweichungen bei 2,4-D. Sie

waren aber in Übereinstimmung mit den Ergebnissen eines anderen Immunosensors (Trau, 1997), der mit Antikörpern gleicher Herkunft arbeitete. Dies deutet darauf hin, daß der 2,4-D-Antikörper die Analytkonzentration aufgrund von Matrixeffekten überbestimmt. Diese Annahme wird von Rogers et al., 1997 untermauert. Die Autoren beschreiben einen Fluoreszenz-Immunosensor mit demselben 2,4-D-Antikörper und beobachten ebenfalls eine Überbestimmung des Analyten in Realproben.

Für die Validierung des TIRF-Sensors wurden Realwasserproben zusätzlich mit HPLC untersucht. Das Beispiel des Isoproturons ist in Abbildung 38 gezeigt. Die Steigung der Regressionsgeraden ist größer als eins, die Proben wurden also mit dem Sensor im Vergleich zur Chromatographie insgesamt etwas überbewertet. Doch im unteren Meßbereich bis etwa zum Testmittelpunkt (vgl. Abbildung 37) ist eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem Immunoensensor und der HPLC zu sehen.

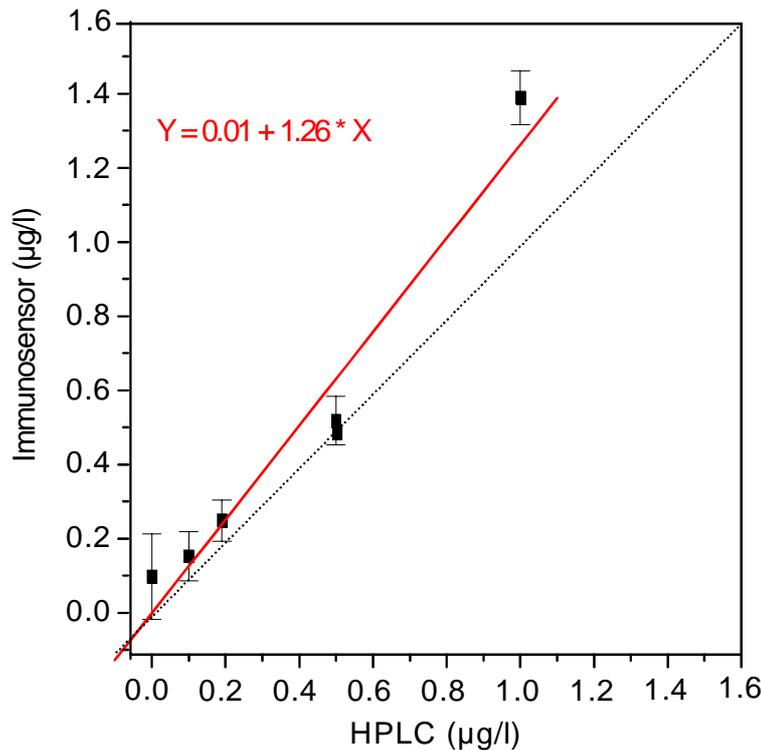


Abbildung 38: Vergleich des Sensors mit HPLC am Beispiel von Isoproturon¹

Zusammenfassung

Die Feldversuche haben gezeigt, daß es mit der TIRF-Methode möglich ist, in unterschiedlichen Wassermatrizes erfolgreich zu arbeiten. Für einen pH-Wert- und Ionenstärke-Ausgleich wurde durch die Verwendung eines konzentrierten Puffers gesorgt. Auf eine Probenvorbereitung konnte verzichtet werden, nur bei sichtbaren groben Verunreinigungen wurde filtriert. Die Wiederfindungsraten lagen in der Regel bei 80 % bis 100 %, nur im Falle des 2,4-D deutlich darüber, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf Matrixeffekte zurückführbar ist.

4.8 Messungen mit Hilfssystem

Durch die orts aufgelöste Oberflächenmodifikation der Transducer wurde der simultane Nachweis mehrerer Analyten ermöglicht. Zur weiteren Verbesserung des Meßverfahrens sollte nun die Möglichkeit geschaffen werden, Analyten im Durchfluß zu wechseln, also ohne den Transducer ausbauen und durch einen anderen ersetzen zu

¹ (Diese Messungen wurden bei dem RIANA-Projektpartner Anjou Recherche, Frankreich, durchgeführt.)

müssen. Dies sollte mit einer flexiblen Oberflächenchemie (vgl. Kapitel 3.2.3) realisiert werden. Als ‚Hilfsliganden‘ werden bestimmte Antigene bzw. Oligonukleotide immobilisiert. Die entsprechenden Antikörper bzw. Komplementärsequenzen werden mit Analytderivaten konjugiert und den Proben als ‚Hilfsreagenzien‘ zugesetzt.

Da sich in einer Probe nun gleichzeitig Hilfsreagenz und Analyt befinden, liegt gegenüber den Antikörpern eine Konkurrenzsituation vor. In diesem *kompetitiven Testformat* sind die Konzentrationen der Reaktionspartner und die Affinität der Antikörper zu dem Analytderivat bzw. dem Analyten von großer Bedeutung für die erreichbaren Nachweisgrenzen (vgl. Kapitel 2.7.3). Es muß also ein geeignetes Konzentrationsverhältnis bestimmt werden und eine sorgfältige Auswahl der Derivate erfolgen, die an das Hilfsreagenz konjugiert werden sollen.

Zu diesem Zweck wurden die Antikörper mit verschiedenen Derivaten titriert (mit RIfS) und die dabei gefundenen Testmittelpunkte zur Abschätzung der Affinität miteinander verglichen. Wegen des kompetitiven Testformats sollte zum Derivat eine niedrigere Affinität (Testmittelpunkt höher) vorliegen als zu dem eigentlichen Analyten. Andererseits muß die Affinität aber noch ausreichend hoch sein, um eine Bindung des Antikörpers hervorzurufen und damit ein Meßsignal zu erhalten. Ausführliche Untersuchungen dazu werden in Kapitel 4.8.2 vorgestellt.

4.8.1 Hilfssystem mit Antigen-Antikörper-Paaren

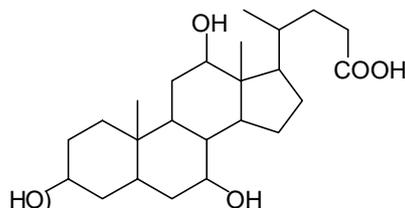
Das erste Hilfssystem basiert auf Antigenen und Antikörpern. Nicht-spezifische Interaktionen zwischen diesen und den Analyten bzw. Analytantikörpern (auch als Detektionsantikörper bezeichnet) müssen dabei natürlich vermieden werden. Folglich wurden Hilfsantigene ausgewählt, die anderen Substanzklassen als die Analyten angehören: Cholsäure (CS), Desoxycholsäure (DCS), Bis-4-Hydroxyphenylvaleriansäureglycylglycin (HPVAG), Desthiobiotin (DB) und Progesteronhemisuccinat (ProgHS).

In RIfS-Vorversuchen wurde mit je 5 µg/ml und 50 µg/ml verschiedener Hilfs- und Detektionsantikörper die Bindung auf jedem Transducer beobachtet. Damit sollten

mögliche Kreuzreaktivitäten abgeschätzt werden. Die Ergebnisse dieser und weiterer Messungen sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Cholsäure (CS) und Desoxycholsäure (DCS) als Hilfsstoffe

Cholsäure kommt gebunden an Glycin und Taurin als Hauptbestandteil der Gallensäuren von Rindergalle vor.



RfS-Transducer wurden mit CS bzw. DCS modifiziert und sowohl mit Cholsäure-Antikörpern als auch mit anti-Biotin, anti-2,4-D, anti-Simazin und anti-Atrazin zur Feststellung von Kreuzreaktivitäten charakterisiert (Abbildung 39). Regeneriert wurde dabei mit HCl/ Acetonitril-Lösung.

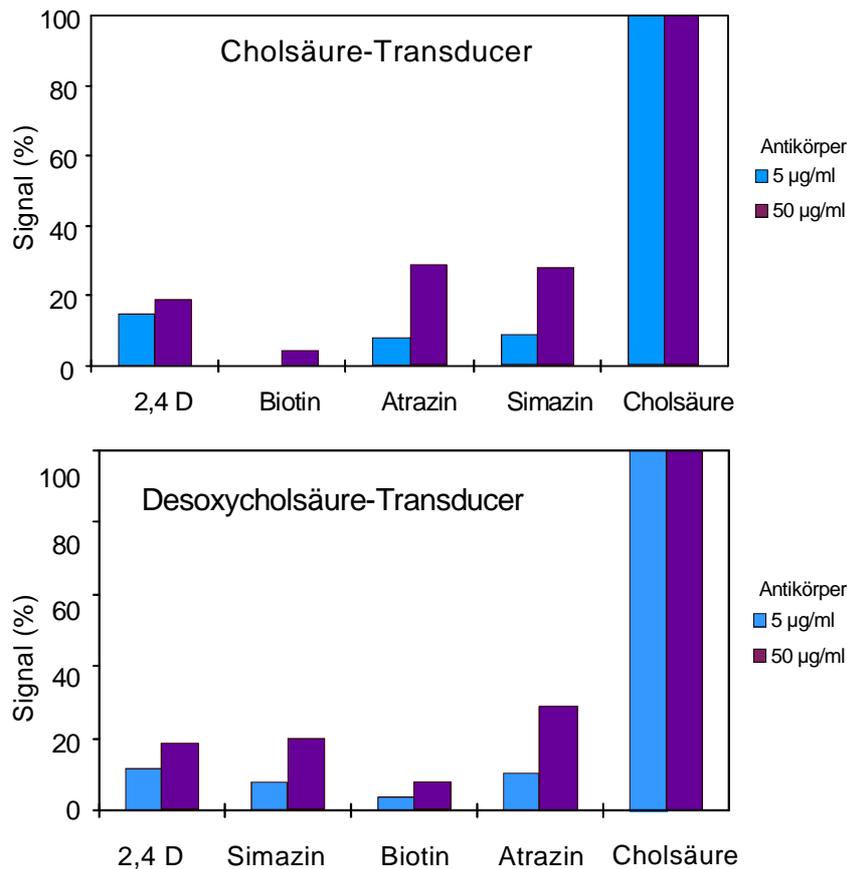


Abbildung 39: Bindung verschiedener Antikörper auf CS- bzw. DCS-Transducern

Die Bindung der Antikörper (bei 5 µg/ml) wurde anhand der Steigung der optischen Schichtdicke verglichen. Bei den Messungen mit hoher Antikörperkonzentration wurden die Maximalbelegungen zum Vergleich mit dem entsprechenden Wert des Cholsäure-Antikörpers herangezogen.

Betrachtet man die Ergebnisse bei der kleinen Konzentration (auf dem CS-Transducer), so ist die Kreuzreaktivität sämtlicher Antikörper durchschnittlich etwa 10 %. Auf DCS sind die Kreuzreaktivitäten ähnlich, insgesamt sogar etwas geringer (Abbildung 39). Unter diesem Gesichtspunkt schienen CS und DCS als Hilfsantigene zwar nicht optimal aber dennoch geeignet zu sein.

Desoxycholsäure-Transducer

Von den Analytantikörpern zeigte anti-Simazin die geringste Querempfindlichkeit zu DCS, so daß das Hilfssystem zunächst zum Simazin-Nachweis eingesetzt werden sollte. Die folgenden Untersuchungen, nun mit TIRF, sollten an dieses Ziel herantreiben.

Mit anti-Simazin-Cy5.5 wurde auf dem DSC-Transducer erwartungsgemäß ein vernachlässigbares Fluoreszenzsignal (Abbildung 40.1) gemessen. Im folgenden Schritt wurde dann das komplette Hilfssystem eingesetzt: anti-CS-ACA und anti-Simazin-Cy5.5 (Abbildung 40.2). Das Signal nahm deutlich zu, was die prinzipielle Machbarkeit dieser flexiblen Modifikationsmethode bewies.

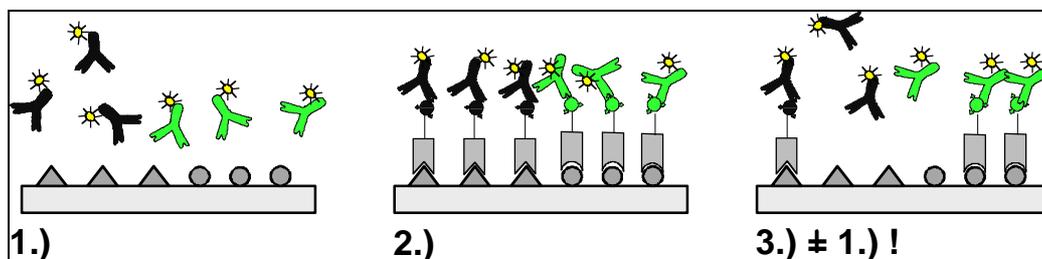


Abbildung 40: anti-Simazin-Cy5.5 und DCS-Hilfssystem. Unzureichende Regeneration führt bei 3) zur Bindung des Detektionsantikörpers.

Als drittes Experiment wurde das erste wiederholt. Das Ergebnis war jedoch völlig anders: Es konnte ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert werden, obwohl die Probe kein Hilfsreagenz enthielt (Abbildung 40.3; Tabelle 12).

Tabelle 12: Signale zu den Versuchen aus Abbildung 40

Reagenzien u. Transducer	Fluoreszenzsignal (mV)	
anti-Simazin-Cy5.5 auf ‚neuem‘ Transducer	0,05	(11 %)
anti-CS-ACA + anti-Simazin-Cy5.5	0,45	(100 %)
anti-Simazin-Cy5.5 auf ‚benutztem‘ Transducer	0,33	(73 %)

Die Fluoreszenz *alleine* des Analytantikörpers bei Versuch 3) betrug über 70 % der Intensität, die *mit* Hilfsreagenz erzielt wurde. Dies kann nur mit einer schlechten Regeneration der Hilfsoberfläche erklärt werden. Reste des Hilfskonjugats, die nach dem Spülen verblieben waren, ermöglichten die unerwünschte Bindung des Detektionsantikörpers (Abbildung 40.3).

Als nächster Analyt wurde Atrazin betrachtet. TIRF-Untersuchungen mit anti-Atrazin-Cy5.5 zeigten, daß auch dieser Antikörper zunächst nicht, dann aber doch bindet, nachdem das anti-CS-ACA-Konjugat verwendet worden war. Diese Beobach-

tungen wurden auch mit RfS bestätigt und entsprechen der schon beim Simazin festgestellten Problematik der Regeneration.

Die Regenerationsschritte sollten deshalb mit RfS näher untersucht und verbessert werden. Dazu wurden folgende Maßnahmen betrachtet (Antikörperkonzentrationen: 5 µg/ml anti-CS-ACA, 2,5 µg/ml anti-Atrazin-Cy5.5):

- HCl und Mischung aus Acetonitril/ Wasser/ Propionsäure

Eine Regeneration mit HCl/ Acetonitril war nicht ausreichend. Um annähernd wieder die ursprüngliche Basislinie zu erreichen, wurde zusätzlich zweimal mit HCl/ Acetonitril und einmal mit Pepsin/ Acetonitril gespült.

- Pepsin- und Acetonitril-Lösung

Spülschritte mit Pepsin/ Acetonitril führten zu einem etwas besseren Ergebnis als mit HCl / Acetonitril.

- Mischung aus Methanol/ Wasser (50/ 50) und HCl/ Glycin/ Tween (0,1 M/ 0,1 M/ 0,1 %)

Mit Methanol und HCl/ Glycin/ Tween war keine Verringerung der optischen Schichtdicke erreichbar (Abbildung 41).

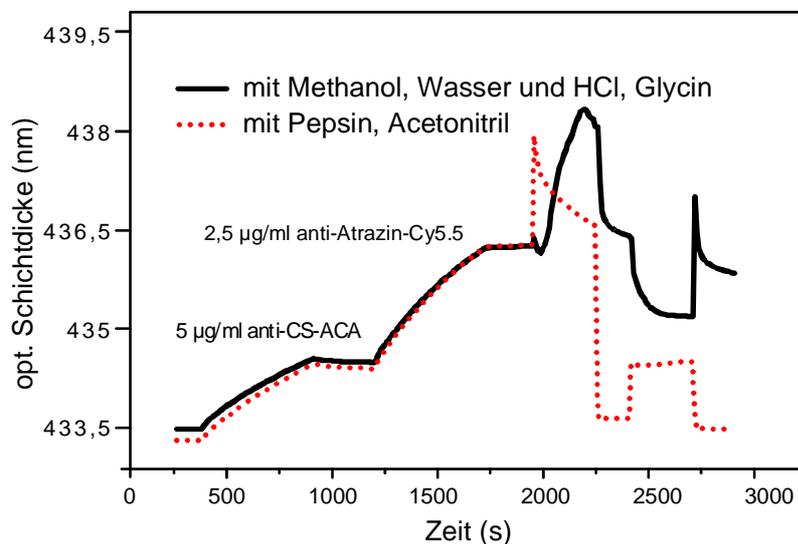


Abbildung 41: Vergleich der Regeneration mit Methanol- bzw. Pepsin-Lösung

Pepsin- und Acetonitril-Lösung waren eindeutig am effektivsten, um den Antigen-Antikörper-Komplex auf DCS-Transducern zu spalten. Wurden Kontrollmessungen nur mit anti-Atrazin-Cy5.5 durchgeführt, ergab sich dennoch eine Bindung. Damit

war bestätigt, daß selbst mit der besten Regenerationsmethode noch ein Rest des anti-CS-ACA-Konjugats auf der Oberfläche verblieben war.

Cholsäure-Transducer

Mit TIRF wurde mit anti-CS-ACA und anti-Atrazin-Cy5.5 gemessen. *Ohne* Hilfsantikörper ergab sich kein Signal, *mit* hingegen ein sehr deutliches. Zur Kontrolle wurde dann wieder anti-Atrazin-Cy5.5 alleine verwendet: Der dabei gemessene Signalanstieg entsprach demjenigen *mit* Hilfsantikörper. Das vorher beschriebene Problem trat also auch hier auf.

Anti-DEA-Cy5.5 zeigte gegenüber Cholsäure-Transducern keine Kreuzreaktivität. Als Hilfsreagenz wurde anti-CS mit DEA-Caprinsäure konjugiert. Das Binden von anti-CS-DEA und anti-DEA-Cy5.5 resultierte in intensiven Fluoreszenzsignalen. Danach allerdings zeigte sich wieder der Effekt, daß, sobald das vollständige Hilfsystem einmal verwendet worden war, der Analyt-Antikörper auch ohne Hilfsreagenz bindet (entspr. Abbildung 40). Daraus läßt sich wiederum schließen, daß die Schichten nicht vollständig regeneriert wurden.

Für die CS-Transducer wurden Regenerationsversuche mit HCl/ Acetonitril, Pepsin/ Acetonitril, Methanol und zusätzlich mit chaotropen Lösungen (Trichloressigsäure und Perchlorsäure) durchgeführt.

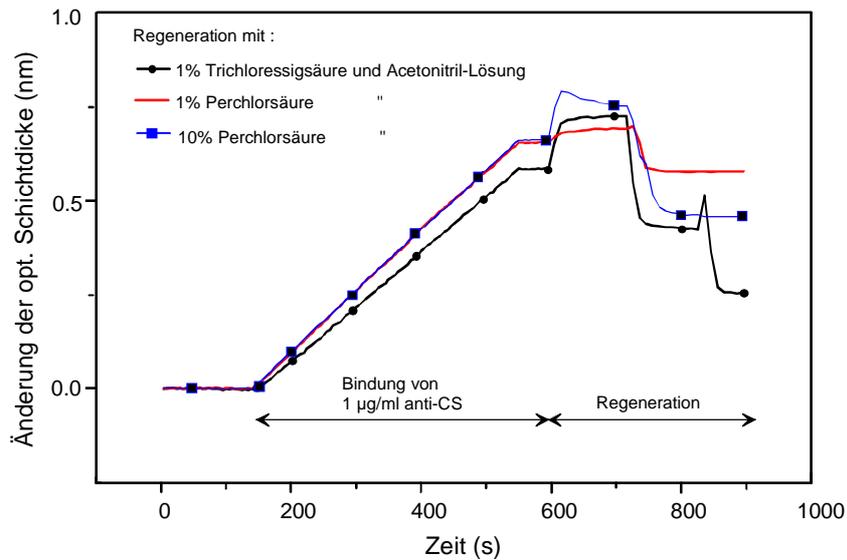


Abbildung 42: Regenerationstests mit chaotropen Reagenzien (nach Bindung von 1 µg/ml anti-Cholsäure auf Cholsäure-Transducer).

Beobachtungen mit RIfS (Abbildung 42) zeigten allerdings keine positiven Resultate. Wahrscheinlich bildete sich ein Niederschlag denaturierter Antikörper auf dem Transducer, der sich nicht mehr entfernen ließ. Mit Pepsin/ Acetonitril konnte die optische Schichtdicke auf etwa die Hälfte vermindert werden (Abbildung 43).

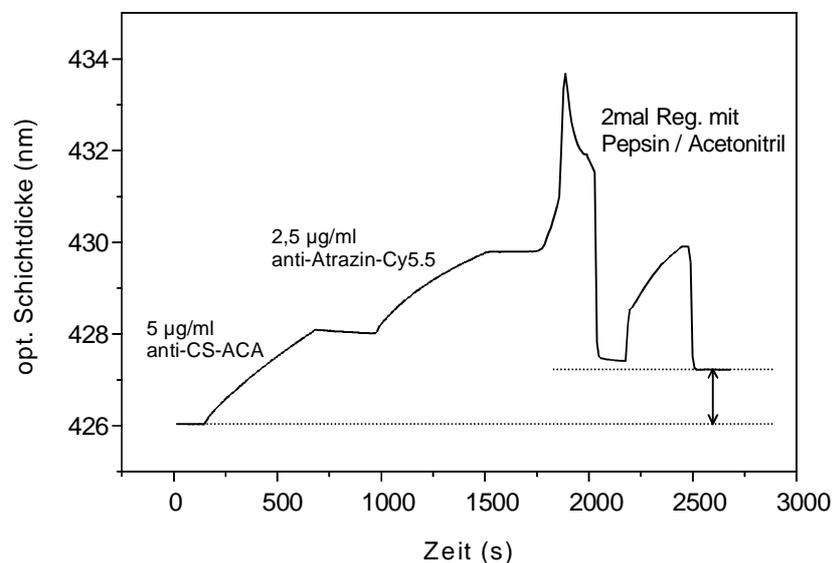


Abbildung 43: Die Regeneration des CS-Transducers mit Pepsin/ Acetonitril ist unvollständig.

Für die Regeneration war das Resultat mit Methanol/ HCl am schlechtesten. Die Regeneration mit HCl (pH 1,75) und Acetonitril-Mischung wirkte für CS-Transducer zwar am besten, führte aber dennoch nicht zu einem optimalen Ergebnis. Nach-

folgende RIfS-Messungen dokumentierten eindeutig die Bindung des Atrazin-Antikörpers, was nur durch einen Rest an Hilfskonjugat auf der Oberfläche erklärt werden kann.

Zusammenfassung: Desoxycholsäure und Cholsäure

DCS-Oberflächen lassen sich am effektivsten mit Pepsin- (pH 1,9) und Acetonitril, CS-Transducer hingegen besser mit HCl- (pH 1,75) und Acetonitril regenerieren. In beiden Fällen ist die Regeneration aber nicht ausreichend, was dazu führt, daß der Detektionsantikörper auch ohne Hilfsreagenz auf dem Transducer bindet und die Meßergebnisse beeinträchtigt.

Progesteron-11-hemisuccinat (ProgHS) als Hilfsreagenz

ProgHS ist ein Derivat des Progesterons (Gelbkörperhormon, eines der wichtigsten weiblichen Hormone). Über die Carboxylgruppe wurde es immobilisiert.

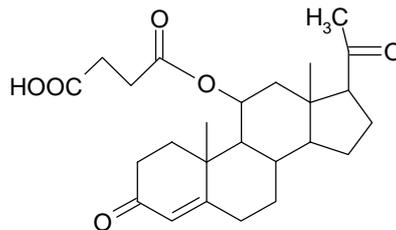


Abbildung 44 zeigt die Bindung unterschiedlicher Antikörper im Vergleich zur Bindung des Progesteron-Antikörpers auf einem mit ProgHS modifizierten Transducer. Regeneriert wurde mit HCl/ Acetonitril-Lösung. Die getesteten Analyt- bzw. Hilfsantikörper binden bei geringer Konzentration weniger als 10 %, ProgHS schien somit als Hilfssubstanz geeignet zu sein.

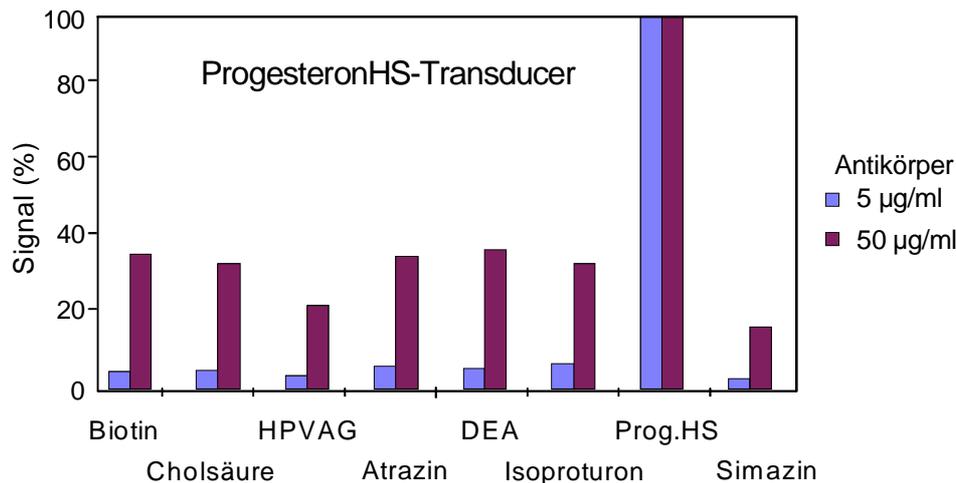


Abbildung 44: Bindung verschiedener Antikörper auf ProgHS-Transducern

Isoproturon wurde als Zielanalyt ausgewählt und anti-ProgHS mit dem Derivat IP I (4-Isopropylanilinhemiglutarat) konjugiert (\rightarrow Hilfsantikörper). Mit anti-Isoproturon-Cy5.5 (\rightarrow Detektionsantikörper) wurde dann folgendes gemessen:

a) und c) Der Hilfs- bzw. Detektionsantikörper wurde in konstanter Konzentration (500 ng/ml) belassen, der jeweils andere Antikörper in steigender Menge (500 ng/ml - 10 µg/ml) eingesetzt. Die beiden Antikörper wurden 30 min vorinkubiert, um ein Bindungsgleichgewicht sicherzustellen.

Diese Tests sollten über ein günstiges Verhältnis der Konzentrationen von Hilfskonjugat und Detektionsantikörper Auskunft geben.

b) Der Detektionsantikörper wurde in steigender Konzentration (*ohne* Hilfsantikörper) eingesetzt, um Querempfindlichkeit zu überprüfen.

Ergebnisse

zu a) Mit konstanter anti-Prog-IP I (500 ng/ml) und steigender Konzentration anti-Isoproturon-Cy5.5 (500 ng/ml - 10 µg/ml) wurden steigende Signale gemessen. Ab 6 µg/ml anti-Isoproturon-Cy5.5 blieben die Meßwerte dann etwa konstant. Dies läßt sich damit erklären, daß ab dieser Konzentration alle Hilfskonjugat-Moleküle mit Antikörpern besetzt sind. Weitere Antikörperzugabe führt nicht mehr zu einer Zunahme des Signals.

zu b) Die Fluoreszenzsignale ohne Hilfsantikörper waren bis 6 µg/ml gering. Bei höheren Konzentrationen zeigte sich jedoch, daß anti-Isoproturon-Cy5.5 auf dem

ProgHS-Transducer unspezifisch bindet. Diese Beobachtung stimmt mit dem RfS-Vorversuch überein (Abbildung 44).

zu c) Unter Verwendung einer konstanten anti-Isoproturon-Cy5.5- und steigender anti-Prog-IP I-Konzentration wurde ein sich kaum änderndes Signal registriert. Schon bei kleiner Konjugatkonzentration werden alle Detektionsantikörper gebunden. Eine zunehmende Konjugatkonzentration kann das Signal nicht weiter erhöhen.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die Messungen mit dem kompletten Hilfssystem ein Kompromiß zwischen Signalintensität, erzielbarer Nachweisgrenze und Antikörperverbrauch geschlossen und folgende Konzentrationen ausgewählt: [anti-ProgHS-IP I] = 1 µg/ml; [anti-Isoproturon-Cy5.5] = 0,5 µg/ml.

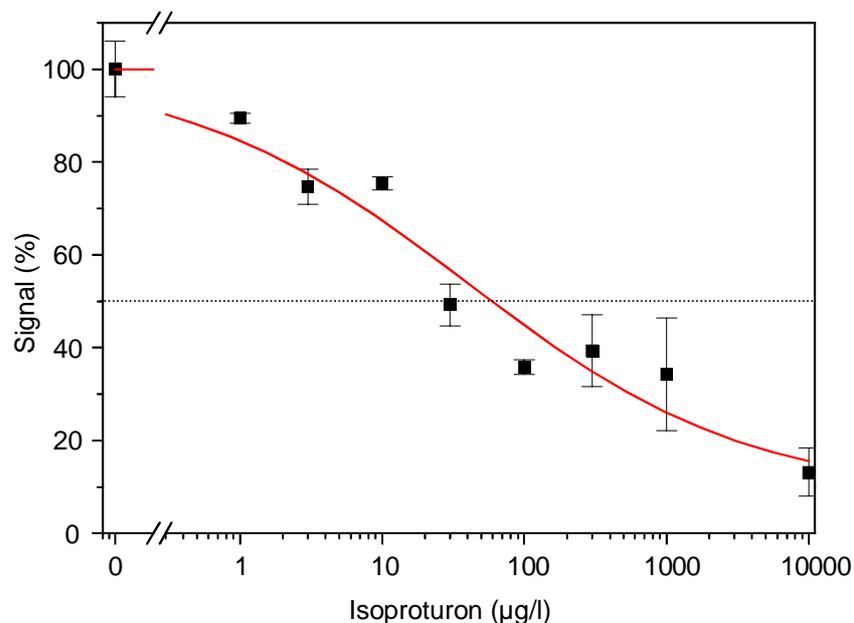


Abbildung 45: Kalibrierung mit ProgHS-Hilfssystem und Isoproturon als Analyt

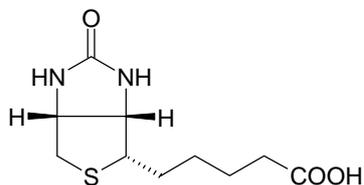
Der IC_{50} -Wert der Isoproturon-Kalibrierung mit ProgHS-Hilfssystem lag bei etwa 20 µg/l (Abbildung 45). Das ist deutlich höher als bei den Assays ohne Hilfssystem und für die Anwendung in der Wasseranalytik kaum geeignet.

Zusammenfassung

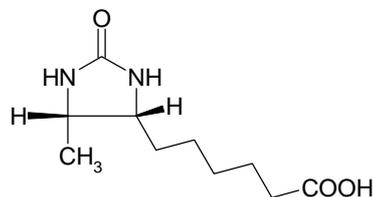
Prinzipiell ist die Idee des Hilfssystems mit Antigen-Antikörper-Paaren realisierbar. Im Falle des ProgHS mit Isoproturon wird jedoch kein ganz zufriedenstellendes Er-

gebnis erzielt. Der Meßbereich ist zu weit zu großen Konzentrationen verschoben, um dieses Verfahren in der Praxis sinnvoll einsetzen zu können.

Desthiobiotin (DB) als Hilfssubstanz



D-Biotin



Desthiobiotin

Nur rechtsdrehendes D-Biotin ist physiologisch aktiv. Es kommt in geringen Mengen in allen lebenden Zellen vor und wirkt als prosthetische Gruppe für Carboxylierungen katalysierende Enzyme. Biotin löst sich nicht in DMF und ist damit für die Oberflächenchemie ungeeignet. Folglich wurde ein Derivat, Desthiobiotin, zur Transducerbeschichtung verwendet.

DB-Transducer wurden mit Biotin- und anderen Antikörpern charakterisiert. In den meisten Fällen trat Kreuzreaktivität von mehr als 10 % auf (Abbildung 46).

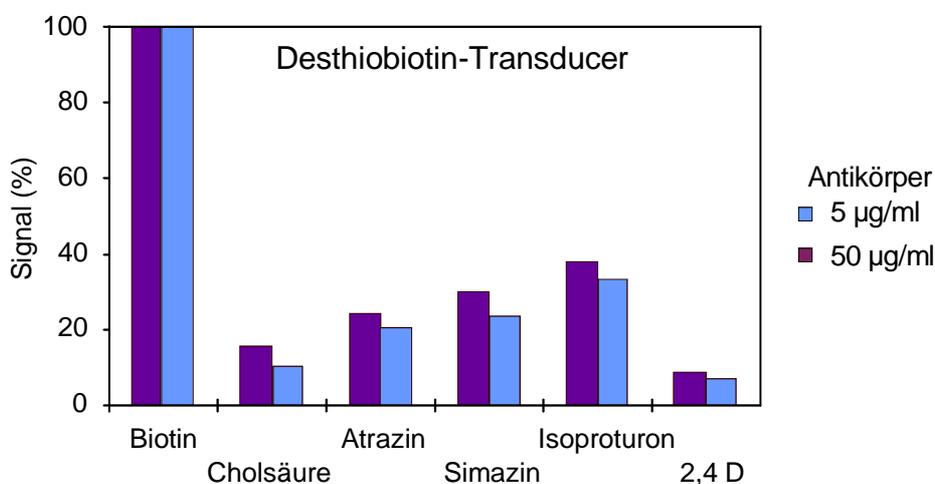
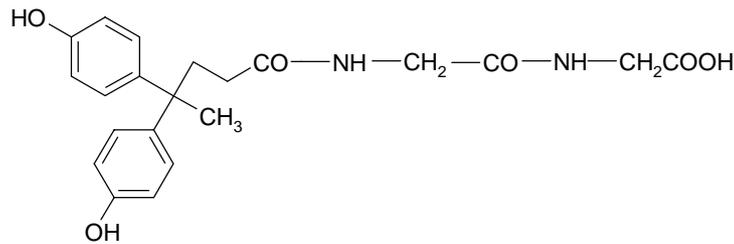


Abbildung 46: Bindung verschiedener Antikörper auf Desthiobiotin-Transducern

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde davon abgesehen, Biotin und seine Antikörper als Hilfsreagenzien für eine flexible Oberflächenmodifikation zu verwenden.

Bis-4-Hydroxyphenyl-valerinsäureglycylglycin (HPVAG) als Hilfsantigen

HPVAG ist ein Derivat der Valeriansäure (Baldriansäure). Hinsichtlich der Querspezifität zu anderen Antikörpern wurden auch hier Voruntersuchungen mit RIfS durchgeführt. Regeneriert wurde mit HCl und Acetonitril-Lösung. Abbildung 47 zeigt die entsprechenden Meßwerte im Vergleich zu den mit anti-HPVAG erreichten. Die geringen Kreuzreaktivitäten zu HPVAG ließen diese Substanz zunächst als geeignet erscheinen, um Assays mit Hilfssystem zu etablieren.

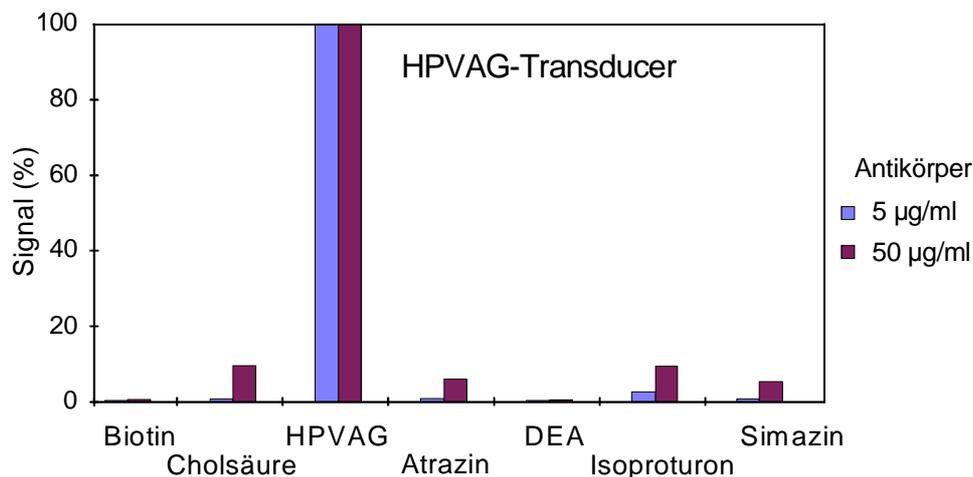


Abbildung 47: Bindung verschiedener Antikörper auf HPVAG-Transducern

Als Hilfsreagenz wurde nun der HPVAG-Antikörper mit ACA konjugiert. Die Transducer waren mit HPVAG modifiziert und wurden mit Atrazin-Antikörpern (1 µg/ml) getestet. Das Konjugat anti-HPVAG-ACA wurde in drei Konzentrationen eingesetzt. Dabei fiel auf, daß die Signale mit 2,5 und 1 µg/ml Konjugat nicht signifikant von jenen ohne Hilfskonjugat unterscheidbar waren. Erst bei 5 µg/ml Konjugat war ein deutlicher Unterschied zu verzeichnen (Abbildung 48).

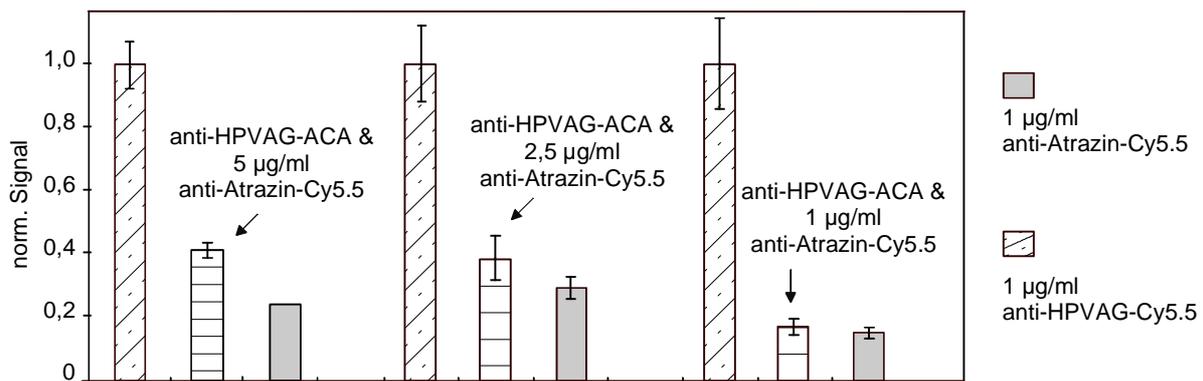


Abbildung 48: Atrazin-Messungen mit HPVAG-Hilfssystem

Um einen empfindlichen kompetitiven Assay aufzubauen, sind sehr hohe Hilfsreakgenzkonzentrationen jedoch ungünstig (vgl. Kapitel 2.7.3). Die folgenden Titrationskurven wurden deshalb, ungeachtet der oben genannten Problematik, mit kleineren Konzentrationen, 0,5 und 1 µg/ml gemessen (Abbildung 49).

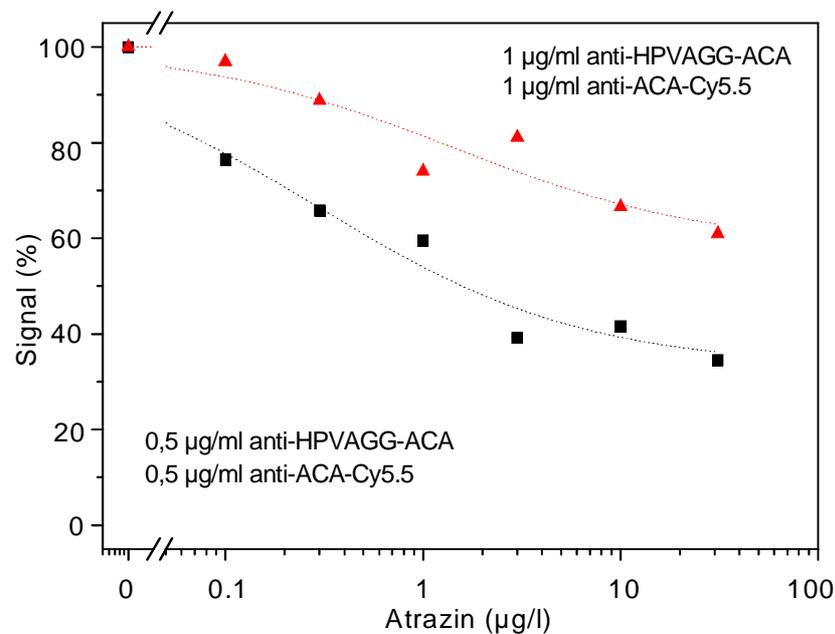


Abbildung 49: Titration mit Atrazin und HPVAG-Hilfssystem (Einfachmessungen)

Bei der niedrigeren Konzentration wird das Signal erwartungsgemäß schneller unterdrückt als bei der höheren. In beiden Fällen nimmt die Fluoreszenz bei Analytzugabe aber nur sehr langsam ab und selbst bei 30 µg/l Atrazin bleibt ein *Offset* von 40 % bzw. 60 %. Vermutlich ist das auch hier wieder eine Folge der ineffizienten Regeneration des Transducers.

Zusammenfassung

Am Beispiel Atrazin konnte gezeigt werden, daß die Verwendung von HPVAG als Hilfsstoff problematisch ist. Aus den Meßergebnissen kann geschlossen werden, daß sich die Bindung zwischen Hilfsantigen und -antikörper an der Oberfläche nicht vollständig spalten läßt. Diese mangelnde Regeneration führt zu unerwünschter Bindung des Detektionsantikörpers.

Antigen-Antikörper-Hilfssystem: Schlußfolgerungen

Die Idee des Hilfssystems für den Austausch von Zielanalyten ohne Austausch des Transducers sollte mit Antigen-Antikörper-Paaren realisiert werden. Die Ergebnisse zeigen, daß dies prinzipiell möglich ist (ProgHS mit Isoproturon; HPVAG mit Atrazin). Allerdings treten Probleme wie Kreuzreaktivitäten und sehr schlechte Regenerierbarkeit auf, die eine breite Anwendung dieser Hilfsmethode erschweren.

Eine weitere Möglichkeit, um die flexible Oberflächenmodifikation über Bioaffinitätswechselwirkungen zu verwirklichen, war aussichtsreicher und wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

4.8.2 Hilfssystem mit komplementären Oligonukleotiden

Es ist bekannt, daß die Hybridisierung zwischen komplementären DNA-Strängen hoch spezifisch erfolgt. Querempfindlichkeiten, so wie bei den Antigen-Antikörper-Systemen, sollten also nicht auftreten. Außerdem sind die Doppelstränge in der Regel leicht wieder zu trennen, d. h. die Transducer sollten einfach regenerierbar sein. Diese beiden Kriterien sprachen somit sehr für eine Realisierung des Hilfssystems mit Oligonukleotiden.

Voruntersuchungen mit RIFS

Im Hinblick auf orts aufgelöste Assays wurden zwei verschiedene Sequenzen (O1, O2) und deren Komplementäre (C1, C2; Sequenzen siehe Kapitel 3.2.6) hinsichtlich Kreuzreaktivität getestet. Jeder Transducer (mit O1, O2) wurde mit 1 mg/ml OVA und 10 µg/ml C1 bzw. C2 charakterisiert (Abbildung 50, Beispiel O1/C1 bzw. C2).

In allen Fällen ergab sich eine vernachlässigbar kleine unspezifische Bindung des Ovalbumins. Mit dem komplementären Oligonukleotid wurden sehr gute Belegungen von 1 - 2 nm erhalten. Querempfindlichkeiten wurden keine beobachtet.

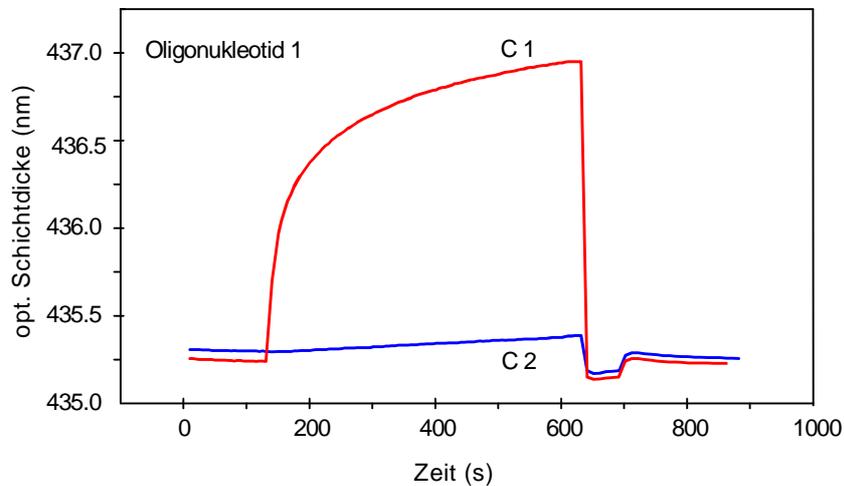


Abbildung 50: RfS-Messungen mit O1-Transducer und 10 µg/ml C1 bzw. C2

Die gewählten Sequenzen eigneten sich also für den gleichzeitigen Einsatz bei orts aufgelösten Messungen. Positiv war außerdem, daß die Transducer mit nur einem HCl-Spülschritt regeneriert werden konnten.

Damit waren gegenüber dem Antigen-Antikörper-Hilfssystem erste entscheidende Vorteile erreicht.

Versuche zur Bestimmung einer geeigneten Konjugatkonzentration

Die Konzentration, mit der das Hilfskonjugat in einem kompetitiven Assay eingesetzt wird, ist erstens für die Signaldynamik und zweitens für die erreichbare Nachweisgrenze von großer Bedeutung. Die folgenden Versuche dienten dazu, das Optimum zunächst unter dem Gesichtspunkt der Signaldynamik zu finden.

Transducercharakterisierung mit RfS

Mit RfS wurde am Beispiel des C1-ACA-Konjugats (ohne bzw. mit 5 µg/ml Atrazin-Antikörper) untersucht, welchen Einfluß die Konjugatkonzentration auf die optische Schichtdicke hat (Abbildung 51).

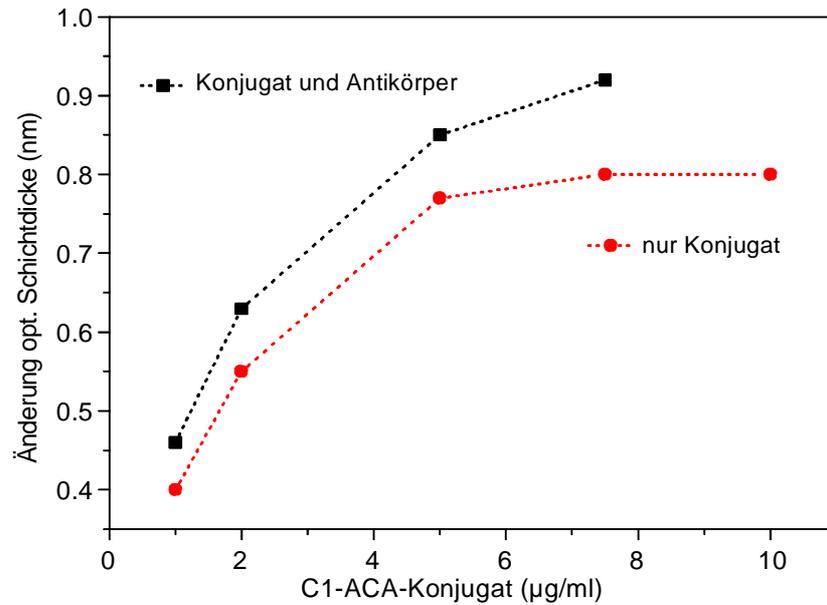


Abbildung 51: Belegung mit Konjugat bzw. ‚Konjugat-Antikörper-Komplex‘

Mit zunehmender Konjugatkonzentration steigt die optische Schichtdicke, bis eine Sättigungsbelegung erreicht ist. Mit Konjugatkonzentrationen von 5 - 6 µg/ml wird also die Bindungskapazität eines Transducers voll erschöpft. Die Meßpunkte der Versuche *ohne* und *mit* Atrazin-Antikörper (der nachfolgend gebunden wurde) zeigen erwartungsgemäß einen weitgehend parallelen Verlauf, da pro gebundenem Hilfskonjugat-Molekül ein Analytderivat-Molekül für die Bindung der Antikörper zur Verfügung gestellt wird.

Bestimmung der optimalen Konjugatkonzentration mit TIRF

Anti-Simazin-Cy5.5 in konstanter (1 µg/ml) und C2-ZABA in variierender Konzentration wurden vorinkubiert und die nachfolgende Bindung am Transducer mit TIRF gemessen (Abbildung 52).

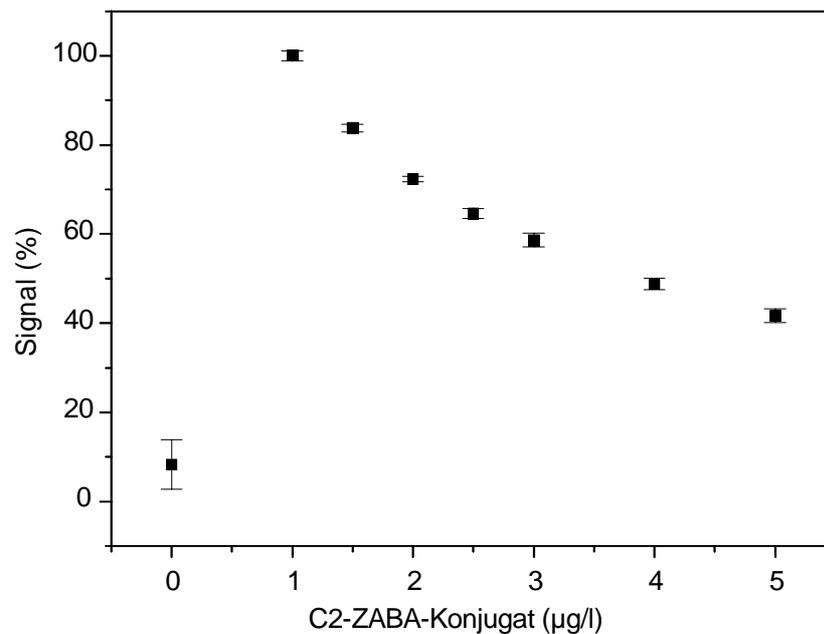


Abbildung 52: Signal in Abhängigkeit von der Konjugatkonzentration; anti-Simazin-Cy5.5 je 1 µg/ml

Zwischen 0 und 1 µg/ml nimmt das Signal mit der Konjugatkonzentration zu, da mehr und mehr ‚Konjugat-Antikörper-Komplex‘ an der Oberfläche bindet. Bei steigender Hilfskonjugatmenge nehmen die Signale wieder ab und nähern sich einem Grenzwert bei etwa 5 µg/ml an. Dieser Wert stimmt in etwa mit jenem überein, der mit RfS für eine Sättigungsbelegung des Transducers bestimmt worden war. In dieser Situation kommen sich die Farbstoffmoleküle auf dem Transducer vermutlich so nahe, daß Fluoreszenzlöschung auftritt (Schobel, 1999). Höhere Hilfskonjugatkonzentrationen zu verwenden, bringt also keinen Gewinn für die Signaldynamik.

Ergebnis

Für die Durchführung der kompetitiven Assays mit Hilfssystem sind Konjugatkonzentrationen um 1 µg/ml günstig, da dabei die intensivsten Fluoreszenzsignale gemessen werden.

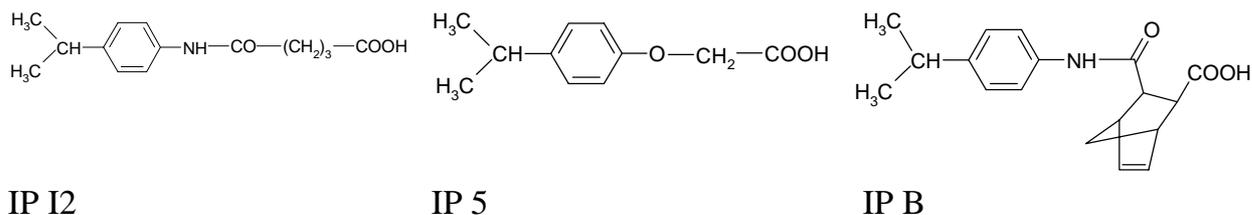
Ob damit auch die kleinstmöglichen Nachweisgrenzen erreicht werden können, hängt mit den Affinitätskonstanten des Antikörpers gegenüber Hilfsreagenz und Analyt zusammen (vgl. Kapitel 2.7.3) und soll im folgenden Abschnitt untersucht werden.

Auswahl der Analytderivate für die Hilfsreagenzien

Es war zu klären, welche Analytderivate an die Oligonukleotide konjugiert werden sollten, um mit den kompetitiven Assays kleine Nachweisgrenzen zu erzielen. Dazu mußten die Affinitäten der Antikörper gegenüber den Analyten und Derivaten abgeschätzt werden. Jeder Antikörper wurde mit den entsprechenden Derivaten titriert und die Testmittelpunkte nach Gleichung (15) bestimmt. Damit wurden dann die Affinitätskonstanten nach Gleichung (16) berechnet. Entscheidend sind hier nicht die Absolutwerte, die für polyklonale Antikörper nur Näherungen sind, sondern die relativen Affinitäten gegenüber Analyt und Derivaten.

Bestimmung von Isoproturon

In Abbildung 53 sind die Titrations des Isoproturon-Antikörpers (250 ng/ml) mit Isoproturon und drei verwandten Substanzen gezeigt. Die Strukturen dieser Derivate sind nachfolgend gegeben.



(IP I2: 4-Isopropylanilinhemiglutarat, IP 5: 4-Isopropylphenoxyessigsäure, IP B: 4-Isopropylanilin-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarboxyanhydrid)

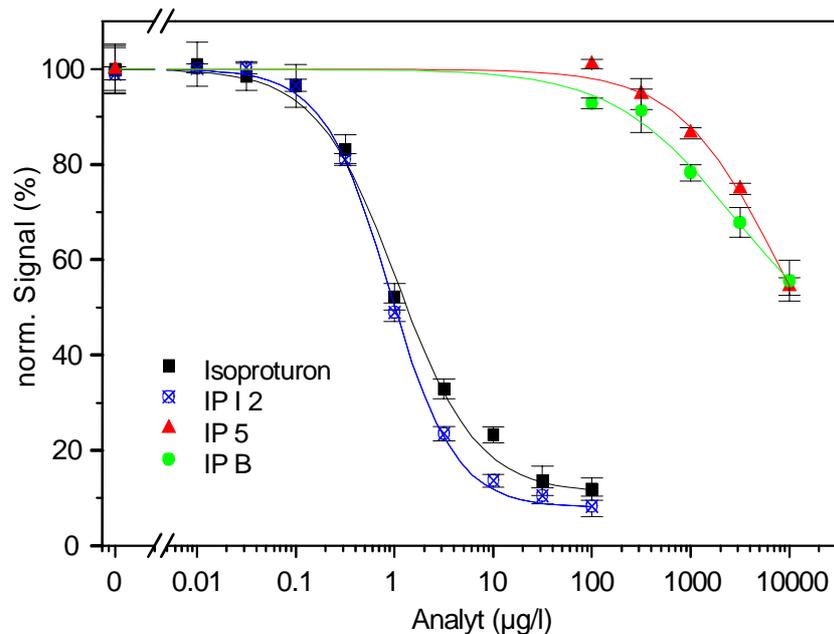


Abbildung 53: Anti-Isoproturon-Titrationskurven (gemessen mit RIfS)

Die geringste Affinität liegt bei dem Derivat IP 5 vor (vgl. Tabelle 13). Anhand der Strukturformeln läßt sich das damit erklären, daß der Antikörper hauptsächlich die Isopropylharnstoff-Gruppierung erkennt. Diese fehlt bei IP 5 und ist durch eine Isopropylphenoxy-Gruppe ersetzt.

Tabelle 13: Ergebnisse der anti-Isoproturon-Titrationsen

Analyt	Testmittelpunkt ($\mu\text{g/l}$)	Affinitätskonst. (l/mol)
Isoproturon	1,05	$0,88 \times 10^8$
IP I2	0,88	$2,05 \times 10^8$
IP 5	7049,9	$0,07 \times 10^6$
IP B	2764,9	$0,26 \times 10^6$

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde IP 5 ausgewählt und an ein Oligonukleotid (C2) konjugiert. Eine Kalibrierkurve mit dem C2-IP 5-Konjugat (750 ng/ml) und 750 ng/ml anti-Isoproturon-Cy5.5 ist in Abbildung 54 gezeigt.

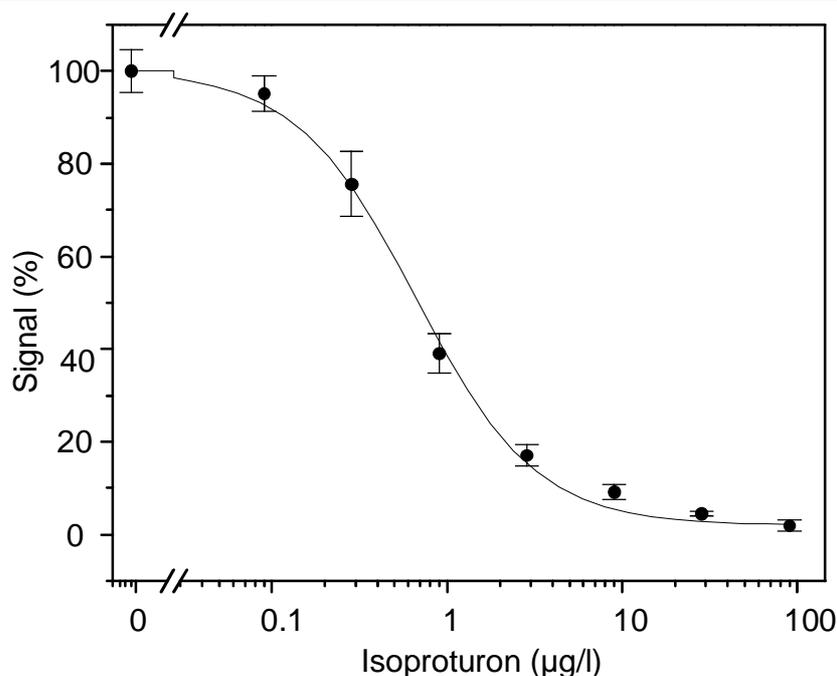
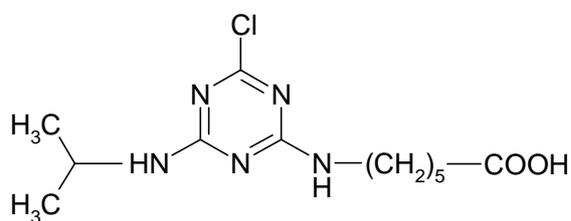


Abbildung 54: TIRF-Titration von anti-Isoproturon-Cy5.5 unter Verwendung des Hilfssystems

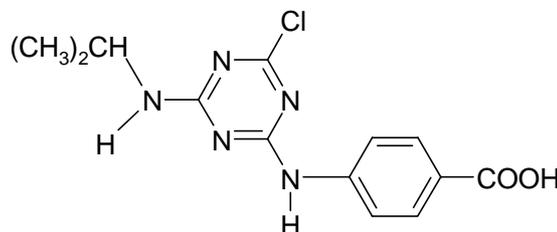
Aus der logistischen Kurvenanpassung läßt sich ein Testmittelpunkt von 0,66 µg/l ablesen. Er ist um ca. 1 µg/ml kleiner als bei dem entsprechenden Assay ohne Hilfssystem (vgl. Abbildung 25). Man sieht außerdem, daß das Signal bei 100 µg/l Analyt vollständig unterdrückt ist, während bei der Titration ohne Hilfssystem ein deutliches Restsignal bleibt. Dort spielen Rückbindungseffekte der Antikörper eine Rolle, während bei Oligonukleotiden diese Effekte nicht vorkommen.

Bestimmung der Triazine

Für Atrazin und Simazin standen Atrazincapronsäure (ACA) und Atrazin-4-amino-benzoessäure (ZABA) als Derivate zur Verfügung.



ACA



ZABA

Für die Vorabmessungen mit RfS wurden jeweils 500 ng/ml Simazin-Antikörper eingesetzt.

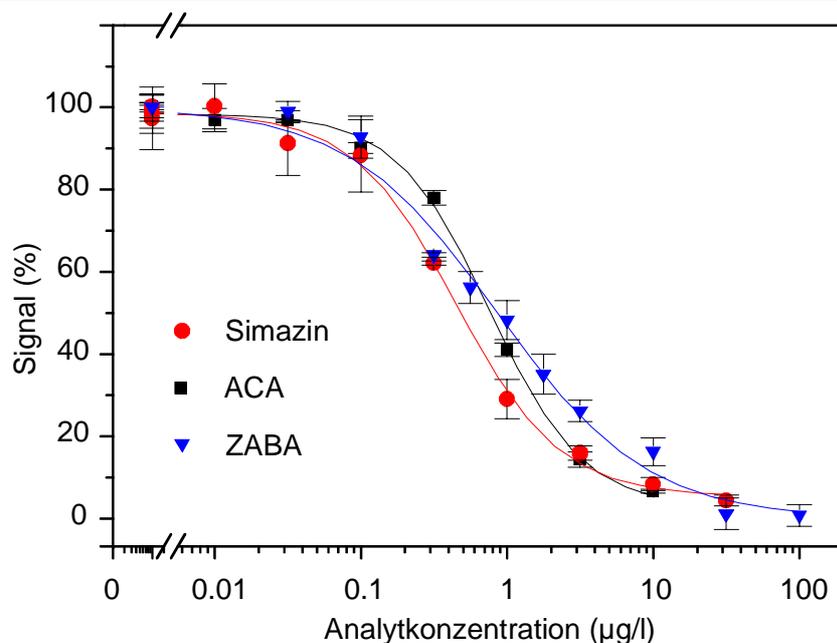


Abbildung 55: Anti-Simazin-Titrationskurven (gemessen mit RIfS)

Die Ergebnisse zeigen (Abbildung 55 u. Tabelle 14), daß die Affinität des Antikörpers zu ACA etwa halb so groß ist wie zu Simazin. Eine um eine Größenordnung geringere Affinität besteht zu ZABA, welches damit für das Hilfsreagenz besonders geeignet ist.

Tabelle 14: Ergebnisse der anti-Simazin-Titrationskurven

Analyt	Testmittelpunkt ($\mu\text{g/l}$)	Affinitätskonst. (l/mol)
Simazin	0,49	$3,20 \times 10^{10}$
ACA	0,77	$1,24 \times 10^{10}$
ZABA	0,88	$4,68 \times 10^9$

Abbildung 56 zeigt nun die Kalibrierkurven mit C2-ZABA-Konjugat (je $1 \mu\text{g/ml}$) und bei zwei verschiedenen anti-Simazin-Konzentrationen. Es ist zu erkennen, daß sich der Testmittelpunkt bei kleinerer Antikörperkonzentration entsprechend der Theorie (Kapitel 2.7.3) nach links verschiebt und damit auch die Nachweisgrenze dieses Assays etwas verbessert werden konnte.

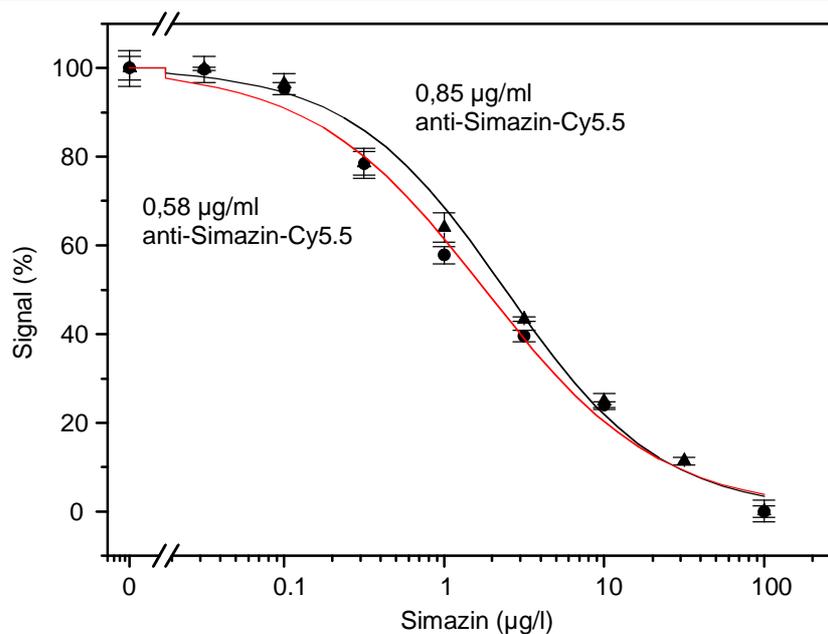


Abbildung 56: TIRF-Titrations von anti-Simazin-Cy5.5 (mit Hilfskonjugat C2-ZABA).

Insgesamt jedoch ist die Leistung des Assays *mit* Hilfssystem etwas schlechter als *ohne*. Die Kalibrierkurve ist zu höheren Konzentrationen verschoben, als Anhaltspunkt kann der Testmittelpunkt dienen, der etwa doppelt so groß ist wie bei den Assays ohne Hilfssystem (vgl. Abbildung 28).

Für die Bestimmung von Atrazin wurde der Atrazin-Antikörper (je 500 ng/ml) ebenfalls mit RIFs mit den beiden Triazinderivaten ACA zu ZABA titriert (Abbildung 57).

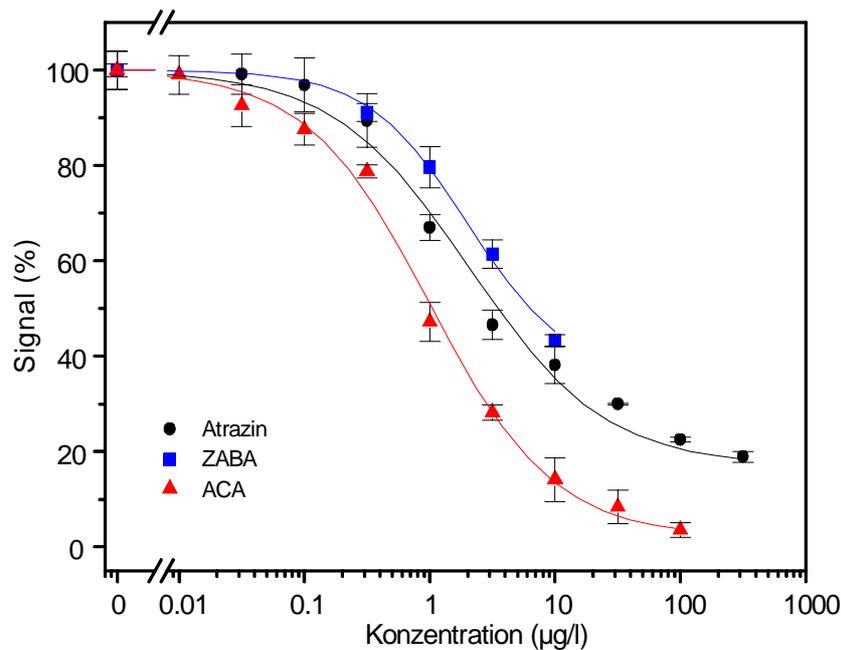


Abbildung 57: Atrazin-Titrationskurven (gemessen mit RfS)

Tabelle 15: Ergebnisse der anti-Atrazin-Titrationsen

<i>Analyt</i>	<i>Testmittelpunkt (µg/l)</i>	<i>Affinitätskonst. (l/mol)</i>
Atrazin	2,08	$0,25 \times 10^9$
ACA	1,00	$0,73 \times 10^9$
ZABA	1,98	$0,37 \times 10^9$

Die Affinität zu ZABA ist geringer als zu ACA, jedoch zu beiden Derivaten geringer als zu Atrazin, was für kompetitive Tests eine ungünstige Voraussetzung ist. Der Unterschied ist aber so gering, daß hier die theoretischen Betrachtungen (Kapitel 2.7.3) unter der Annahme, daß beide K gleich sind, recht gut praktisch umgesetzt werden können. Dort wurde festgehalten, daß eine Konjugatkonzentration von $\frac{1}{K}$ bis $\frac{10}{K}$ zusammen mit einer Antikörperkonzentration in derselben Größenordnung zu den kleinsten Nachweisgrenzen führt. In Abbildung 58 sind nun Titrationsen mit (bzw. ohne Hilfssystem) gezeigt (Konzentrationen: C2-ZABA: 0,8 µg/ml, C2-ACA: 0,97 µg/ml, anti-ACA-Cy5.5: 0,9 µg/ml bzw. 1 µg/ml).

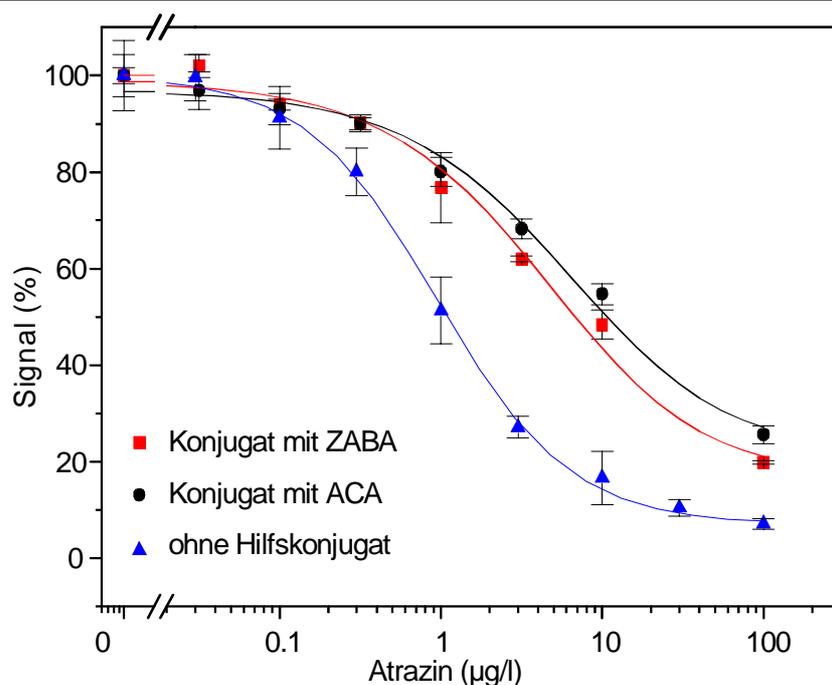


Abbildung 58: TIRF-Titrationen von anti-Atrazin-Cy5.5 ohne bzw. mit Hilfssystem

Tabelle 16: Testmittelpunkte der anti-Atrazin-Kalibrierungen ohne bzw. mit Hilfssystem

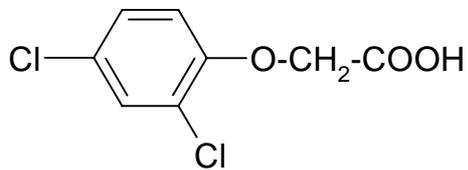
Versuchsbedingung	Testmittelpunkt (µg/l)
Ohne Hilfssys.	1,10
ACA-Konjugat	10,6
ZABA-Konjugat	6,6

Die Antikörperkonzentration entspricht einem Wert von etwa $\frac{3}{K}$, die Konjugatkonzentrationen mußten jedoch höher (nahezu $\frac{100}{K}$) sein, um eine ausreichende Signaldynamik zu erhalten. Der Unterschied der Kurven mit ACA bzw. ZABA-Konjugat ist nur gering, was auf die ebenfalls nur wenig verschiedenen Affinitätskonstanten zurückzuführen ist.

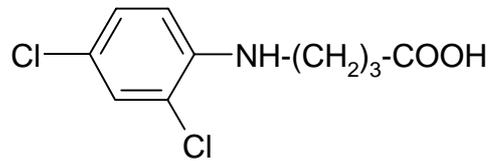
Daß der Meßbereich bei den Assays *mit* Hilfssystem bei größeren Konzentrationen liegt als bei jenen *ohne*, kann damit begründet werden, daß die Affinität zum Analyten in jedem Falle geringer ist als zu den Derivaten. D. h., die Antikörper binden bevorzugt am Hilfsreagenz. Damit wird das gemessene Signal groß und kann nur durch sehr hohe Analytkonzentrationen unterdrückt werden. Außerdem ist, wie oben

beschrieben, das Konzentrationsverhältnis von Hilfskonjugat und Antikörper zu groß, um einen optimalen Meßbereich erhalten zu können.

Bestimmung von 2,4-D



2,4-D



DN 1 (Dichloranilinglutarsäure)

Der Vergleich der Titrationskurven (Abbildung 59) des 2,4-D-Antikörpers (500 ng/ml) mit 2,4-D bzw. mit dem Derivat DN 1 zeigt einen Unterschied der Testmittelpunkte um das 50fache (Tabelle 17). Die Affinität der Antikörper zum Derivat ist also wesentlich kleiner als zum Analyten. Dies ist eine günstige Voraussetzung für einen kompetitiven Immunoassay.

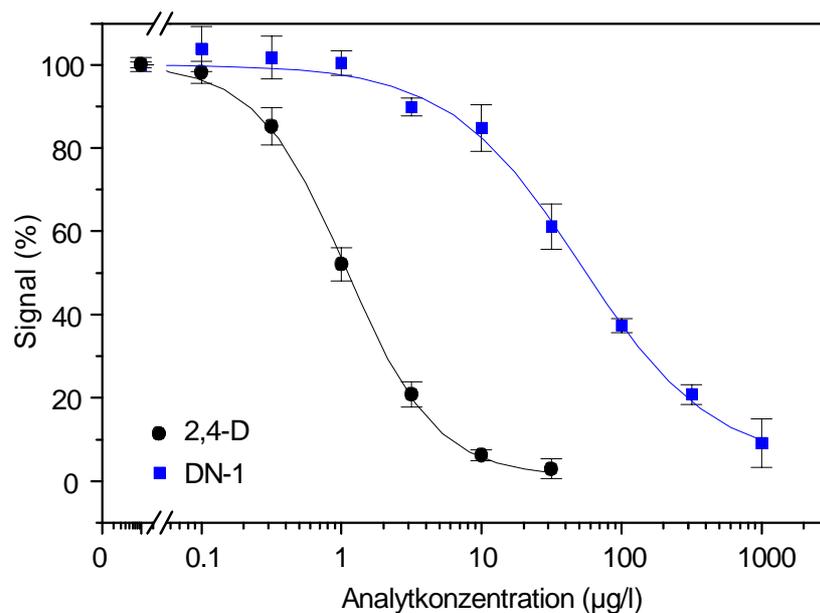


Abbildung 59: Anti-2,4-D-Titrationskurven (gemessen mit RfS)

Tabelle 17: Ergebnisse der 2,4-D-Titrationsen

Analyt	Testmittelpunkt ($\mu\text{g/l}$)	Affinitätskonst. (l/mol)
2,4-D	1,1	$8,92 \times 10^8$
DN 1	51,3	$0,01 \times 10^8$

Um den Einfluß eines so deutlichen Affinitätsunterschieds auf den Assay zu demonstrieren, wurden Konjugate sowohl mit 2,4-D als auch mit DN 1 als Hilfsreagenzien eingesetzt. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ verwendet, das C1-DN 1-Konjugat ebenfalls, das 2,4-D-Konjugat mit $2 \mu\text{g/ml}$. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 60.

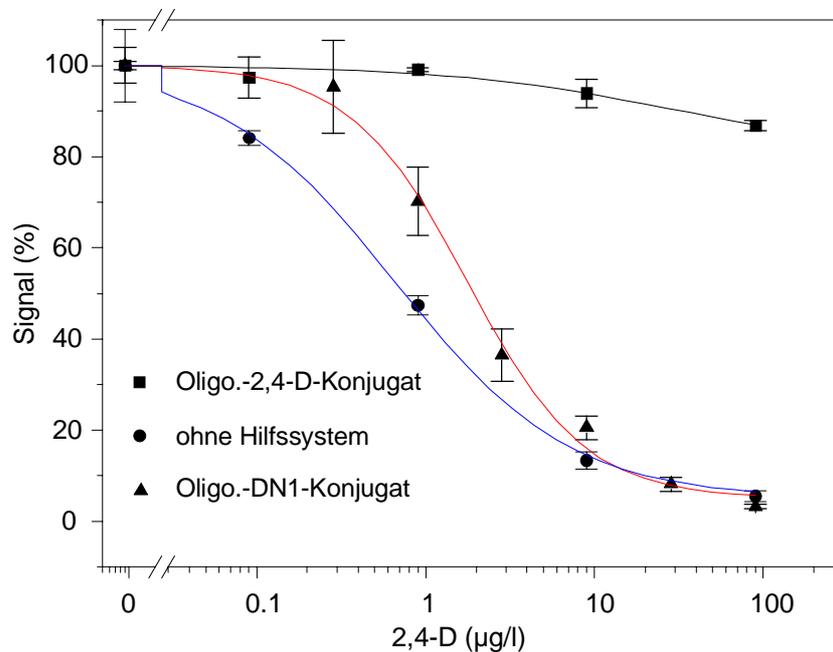


Abbildung 60: Vergleich der Titrationsen von anti-2,4-D-Cy5.5 ohne bzw. mit Hilfssystem (C2-2,4-D- und C2-DN1-Konjugat)

Das Signal ließ sich im Falle des 2,4-D-Konjugats bei Erhöhung der 2,4-D-Konzentration kaum unterdrücken. Der Antikörper besitzt zum Konjugat und Analyten die gleiche Affinität. Bei ca. $60 \mu\text{g/l}$ 2,4-D ($2,8 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$) sind die Konzentrationen von Analyt und Konjugat gleich, d. h. erst bei größeren Analytkonzentrationen kann das Gleichgewicht so verschoben werden, daß weniger Antikörper am Hilfskonjugat bindet und damit das Signal abnimmt. Entsprechendes kann man auch dem Verlauf der Kurve entnehmen. Im Falle des DN1-Konjugats sind die Verhältnisse aufgrund der Affinitätsunterschiede günstiger. Es wird weniger Analyt benötigt,

um das Signal zu unterdrücken. Dennoch ist der Testmittelpunkt, verglichen mit dem Assay ohne Hilfssystem, zu größerer Konzentration verschoben. Das kann daran liegen, daß auch hier, zugunsten der Signaldynamik, auf optimal kleine Konzentrationen von Hilfskonjugat und Antikörper verzichtet wurde.

Parallele und sequentielle Multianalyt-Detektion

Nach den Vorarbeiten sollte nun der automatische Analytenwechsel im Durchfluß an folgendem Beispiel demonstriert werden. Transducer wurden orts aufgelöst mit Sequenz O1 und O2 modifiziert. Die entsprechenden komplementären Sequenzen waren mit je zwei Analytderivaten konjugiert (C1-ACA; C1-DN 1 und C2-ZABA; C2-IP 5). Damit sollten Atrazin und Isoproturon und, nach Regeneration, Simazin und 2,4-D bestimmt werden.

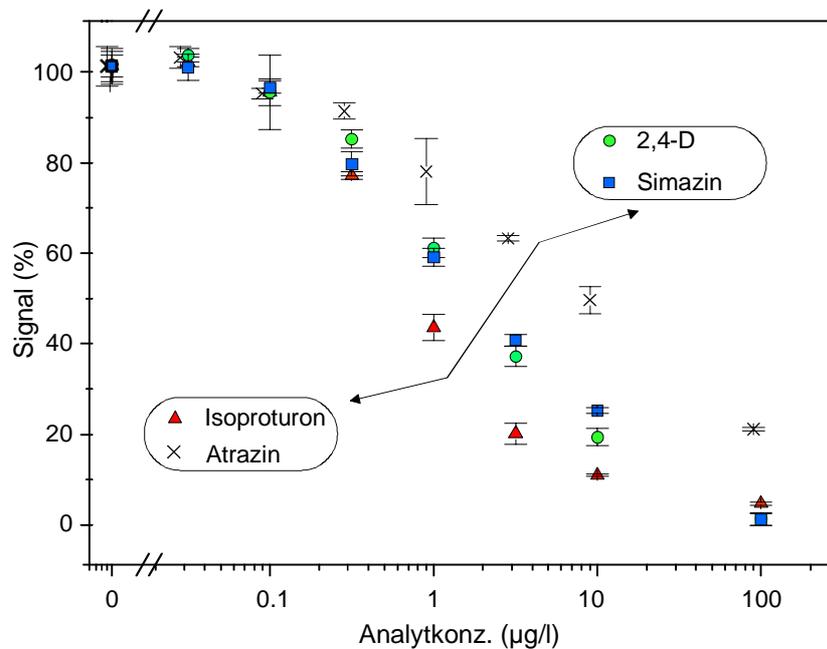


Abbildung 61: Detektion von zwei mal zwei Analyten auf einem Transducer durch orts aufgelöstes Messen mit Hilfssystem

Zunächst wurde das erste Analytpaar gemessen. Durch fließenden Austausch der Oligonukleotidkonjugate war es möglich, das zweite Paar auf demselben Transducer zu detektieren (Abbildung 61). Dank der parallelen Multianalyt-Detektion und des Hilfssystems konnte also ein Transducer zum Nachweis von vier Analyten eingesetzt werden.

Zusammenfassung

Oligonukleotide haben sich als optimale Hilfsreagenzien erwiesen. Das Ziel der variablen Transducermodifikation wurde damit erreicht. Kreuzreaktivitäten unter den Sequenzen wurden nicht gefunden, ebenso fanden keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Oligonukleotiden und Antikörpern statt. Weitere positive Eigenschaften sind die einfache Regenerierbarkeit (nur ein Spülschritt mit Pepsin-Lösung) und die Stabilität der mit DNA beschichteten Oberflächen. Jeder Transducer konnte durchschnittlich für mindestens 100 Messungen eingesetzt werden, ohne daß es dabei zu signifikanten Signalverlusten gekommen ist. Zwischen den Meßreihen konnten die Transducer mindestens einen Monat lang ohne Aktivitätsverlust gelagert werden, was für die Anwendung in der Praxis ebenfalls von Interesse ist.

5 Abschließende Betrachtungen

5.1 Zusammenfassung

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren,

⇒ einen Immunosensor für den *simultanen Nachweis mehrerer Pestizide* in Wasser zu entwickeln und

⇒ diesen dann so zu modifizieren, daß ein *automatischer Analytenwechsel* ermöglicht wird.

Um diese Vorgaben zu erreichen, wurde die spezifische immunologische Analyterkennung durch farbstoffmarkierte Antikörper mit empfindlicher Fluoreszenzdetektion kombiniert. Das Transduktionsprinzip basierte dabei auf *total internal reflection fluorescence* (TIRF). Die Anregung der markierten Antikörper wurde also über innere Totalreflexion und dem damit verbundenen evaneszenten Feld realisiert. TIRF bietet ein großes Potential zur Multianalytdetektion, das nur mit Hilfe einer geeigneten chemischen Modifikation des Transducers genutzt werden kann. Daraus leiteten sich für die vorliegende Arbeit folgende Teilaufgaben ab:

- a) Chemische Oberflächenbeschichtung der Transducer,
- b) Etablierung von Einzel- und Multianalyt-Assays,
- c) Markierung der Reagenzien und
- d) Etablierung von flexiblen Multianalyt-Assays.

a) Chemische Oberflächenbeschichtung der Transducer

Die Modifikation der Transducer sollte die spezifische Antikörperbindung ermöglichen, unspezifische Proteinbindung hingegen abschirmen und regenerationsstabil sein, damit eine Wiederverwendung des Transducers möglich ist. Sämtliche Modifikationsstrategien, die getestet wurden, basierten deshalb auf kovalenten chemischen Bindungen zwischen den immobilisierten Komponenten. Zuerst wurde ein Aminodextranhydrogel aufgebracht, welches dann mit Analytderivaten weiter modifiziert wurde. So beschichtete Transducer eigneten sich optimal für heterogene Durchfluß-immunoassays: Es konnte gezeigt werden, daß unspezifische Proteinbindung sehr effizient abgeschirmt wird und daß die dreidimensionale Aminodextranmatrix eine

hohe Kapazität für die spezifische Antikörperbindung aufweist. Außerdem bewiesen die Schichten eine hohe Stabilität. Trotz der Beanspruchung durch häufige Regenerationsschritte blieben sowohl die abschirmende Wirkung als auch die hohe Bindungskapazität für mindestens 150 Zyklen erhalten.

Um mit TIRF eine Multianalyt-Detektion zu ermöglichen, sollte an jedem Reflexionspunkt des durch Totalreflexion geführten Laserstrahls eine andere Substanz nachgewiesen werden. Dementsprechend mußten die Transducer orts aufgelöst modifiziert werden. Dies konnte mit einem piezoelektrischen Mikrodosierer realisiert werden. Es war allerdings erforderlich, die vorher verwendete Oberflächenpräparation abzuändern, da mit dem Mikrodosierer nur wäßrige Medien pipettiert werden können. Dazu wurde ein Protokoll zur Konjugation von Aminodextran mit Analytderivaten erarbeitet. Ein wichtiger Schritt ist dabei die Darstellung von Aktivestern der Analytderivate. Die aktivierten Carboxylgruppen koppeln über Amidbindungen an das Aminodextran. Das entstandene Konjugat wurde in Wasser gelöst und auf kleine Bereiche (je 3 mm Durchmesser und 2,5 mm Abstand) des silanisierten Transducers immobilisiert.

Auch diese Transducermodifikation profitierte von der Stabilität kovalenter Bindungen, war aber, im Gegensatz zur vorhergehenden Methode, mit der exakten ortsspezifischen Immobilisierung kompatibel. Die Multianalyt-Transducer waren hinsichtlich spezifischer Bindung, Abschirmung gegen unspezifische Bindung und Stabilität mit den schrittweise beschichteten Einzelanalyt-Transducern vergleichbar.

Um das Ziel der variablen Oberflächenchemie zu erreichen, wurden verschiedene Methoden zur Immobilisierung von Oligonukleotiden untersucht. Eine kovalente Anbindung der DNA-Stränge auf eine Aminodextranbasis erwies sich als die am besten geeignete Möglichkeit. So modifizierte Transducer konnten für etwa 100 Messungen eingesetzt werden.

b) Etablierung von Immunoassays

Mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern und Pestizidderivaten wurden zunächst Einzelanalyt-Messungen etabliert. Die Leistungen dieser Assays werden in

den meisten Fällen den Anforderungen der europäischen Umweltgesetzgebung gerecht.

Für einige wichtige Pestizide wurden anschließend Multianalyt-Bestimmungen eingeführt. Dazu wurden die Antikörper, die gleichzeitig verwendet werden sollten, zunächst hinsichtlich möglicher Kreuzreaktivitäten charakterisiert. Der Ausschluß von Querempfindlichkeiten bzw. genaue Kenntnisse darüber sind für simultane Analytbestimmungen von essentieller Bedeutung. Schließlich wurden Parallelmessungen mit insgesamt drei Gruppen von je drei Analyten demonstriert. Die Ergebnisse, wie Meßbereiche oder Nachweisgrenzen, stimmten mit denen der Einzelanalyt-Tests überein und waren durch die weitere Optimierung für manche Pestizide sogar besser. Je nach Antikörper wurden, mit einer Ausnahme, Nachweisgrenzen zwischen 0,03 und 0,11 µg/l erreicht.

Es wurden nicht nur ‚Laborproben‘ untersucht, sondern auch Messungen in realen Wasserproben erfolgreich durchgeführt. Gegenüber Matrixeffekten zeigte sich der TIRF-Immunosensor weitgehend unempfindlich. Hintergrundfluoreszenz durch die Proben konnte zum einen durch Verwendung des langwelligen Farbstoffs Cy5.5, zum anderen durch die Anregung im evaneszenten Feld vermieden werden. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 80 % und 100 %. Bei kleinen Analytkonzentrationen zeigte ein Vergleich von HPLC- und Immunosensor-Daten gute Übereinstimmung. Konzentrationen, die oberhalb des Testmittelpunkts einer Kalibrierung lagen, wurden leicht überbewertet. Die Transportfähigkeit und Robustheit des Sensors wurden durch Feldversuche demonstriert. Vor Ort an einem Fluß konnte gezeigt werden, daß die hier vorgestellte Methode ohne Probenvorbehandlung, wie z. B. Extraktion, auskommt, einfach einsetzbar ist und rasch Ergebnisse liefert.

c) Markierung von Reagenzien

Diese Aufgabe bezog sich nicht nur auf das Markieren der Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff, sondern besonders auf die Reagenzien, die für eine flexible Oberflächenchemie erforderlich waren. Für den ersten Ansatz wurden Antikörper als ‚Hilfsreagenzien‘ mit Analytderivaten kovalent konjugiert. Dazu wurden Carboxylgruppen der Derivate mit N-Hydroxysuccinimid aktiviert und an Aminogruppen der

Antikörper gebunden. Für den zweiten Weg, mit dem das Hilfssystem realisiert werden sollte, wurden Oligonukleotide mit Analytderivaten modifiziert. Es wurde ein Protokoll erarbeitet, das auf der Bildung einer Amidbindung zwischen dem Analytderivat und einer primären Aminogruppe des Oligonukleotids beruht.

d) Etablierung flexibler Multianalyt-Assays

Mit Hilfe der beschriebenen Hilfsantigene/ Hilfsantikörper konnte die Idee des flexiblen Analytaustauschs im Durchfluß prinzipiell realisiert werden. Der Ansatz erwies sich allerdings als sehr problematisch, da Kreuzreaktivitäten zwischen Analyten und Hilfsstoffen auftraten und besonders dadurch, daß die vollständige Regeneration der Transducer in den meisten Fällen nicht möglich war. Hilfsantikörper müssen eine hohe Affinität aufweisen, um für orts aufgelöste Assays einsetzbar zu sein. Daraus ergab sich jedoch der Nachteil, daß sie nicht mehr vollständig von der Oberfläche entfernt werden konnten.

Um diese Problematik zu umgehen, wurden im nächsten Schritt komplementäre Oligonukleotide als Hilfssubstanzen verwendet und gezeigt, daß sie sich sehr gut zu diesem Zweck eignen. Es wurde eine entsprechende stabile, orts aufgelöste Immobilisierung der Oligonukleotide entwickelt. Kreuzreaktivitäten zwischen den einzelnen Sequenzen wurden überprüft und konnten ausgeschlossen werden. Ebenfalls positiv zu bewerten ist, daß sich nach der Hybridisierung die Oberfläche wieder sehr leicht und effektiv regenerieren ließ. Ein Transducer konnte dadurch für mindestens 100 Meßzyklen wiederverwendet werden.

Der Wechsel von Zielanalyten im Durchfluß wurde mit dem Nachweis von *zwei mal zwei* Substanzen auf *einem* Transducer demonstriert. Die Testmittelpunkte der so erhaltenen Kalibrierkurven waren teilweise gegenüber den Assays ohne Hilfssystem zu etwas größeren Konzentrationen verschoben. Das läßt sich damit begründen, daß die Reagenzien in größeren als den theoretisch optimalen Konzentrationen eingesetzt wurden, um ausreichende Signalintensitäten zu erhalten.

5.2 Ausblick

- Weitere Analyten/ Analytklassen aus dem Umweltbereich

In der Umweltanalytik ist nicht nur von Interesse, Einzelsubstanzen nachzuweisen, sondern auch ganze Schadstoffklassen zu erfassen und damit einen Überblick über die Gewässerbelastung zu erhalten. Mit ausgewählt kreuzreaktiven Antikörpern und mathematischen Hilfsmitteln bei der Datenauswertung, wie z. B. neuronale Netze, kann dieses Ziel erreicht werden.

- Integriert-optische Transducer zur Ausweitung der Multianalyt-Detektion

Der Übergang von den einfachen bulk-optischen zu integriert-optischen Transducern kann einen Beitrag zur Erweiterung der Multianalyt-Detektion liefern. Außerdem bestehen Möglichkeiten, die Empfindlichkeit der Methode zu steigern (Klotz, 1998).

- Nachweis von DNA-Hybridisierungen

Es wurden erste Versuche mit Cy5-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei reichten nanomolare Lösungen aus, um Fluoreszenz mit sehr gutem Signal-Rausch-Verhältnis messen zu können. Abbildung 62 zeigt zwei Kalibrierkurven, die zum Oligonukleotidnachweis verwendet werden können.

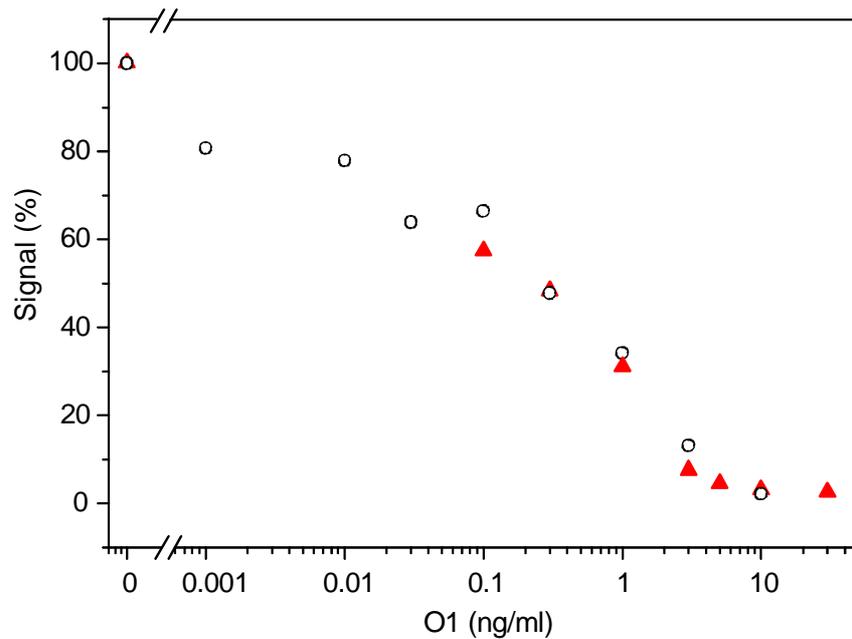


Abbildung 62: Titrations des Cy5-markierten Oligonukleotids der Sequenz C1 mit der Sequenz O1

Die Transduceroberfläche war mit dem Oligonukleotid (Sequenz O1) beschichtet. Mit dem komplementären fluoreszenzmarkierten Strang (Sequenz C1-Cy5; 5 ng/ml) wurde titriert, wobei freies O1 als ‚Analyt‘ diente. Die in Abbildung 62 gezeigten, noch nicht optimierten Kalibrierkurven können demonstrieren, welches Potential das TIRF-Verfahren auch im Bereich der DNA-Analytik besitzt. Es besteht die Möglichkeit, mehrere Sequenzen parallel und mit kleinen Nachweisgrenzen zu bestimmen. Dies kann einen wichtigen Beitrag dazu leisten, daß neben der Umweltanalytik auch das große Aufgabenfeld der medizinischen Diagnostik mit TIRF-Sensoren erschlossen werden kann.

6 Literatur

- Abraham, G. E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *J. Clin. Endo.* **29** (1969) 866-70.
- Abuknesha, R.; Brecht, A.: Multianalyte immunoanalysis: practical aspects of manufacturing transducers. *Biosens. Bioelectron.* **12** (1997) 159-160.
- Agrawal, O.; Sunita, G.; Gupta, V. K.: Sensitive spectrophotometric method for determining pentachlorophenol in various environmental samples. *J. AOAC Int.* **81** (1998) 803-07.
- Anderson, G. P.; Jacoby, M. A.; Ligler, F. S.; King, K. D.: Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **4** (1997) 329-36.
- Anis, N. A.; Eldefrawi, M. E.: Reusable fibre optic immunosensor for rapid detection of imazethapyr herbicide. *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993) 843-848.
- Asanov, A N.; Wilson, W. W.; Oldham, P. B.: Regenerable biosensor platform: A total internal reflection fluorescence cell with electrochemical control. *Anal. Chem.* **70** (1998) 1156-63.
- Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M.P.: Preparation of antisera and development of a direct enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the antifouling agent Irgarol 1051. *Anal. Chim. Acta* **347** (1997) 139-147.
- Barceló, D.; Hennion, M. C.: Sampling of polar pesticides from water matrices. *Anal. Chim. Acta* **338** (1997) 3-18.
- Beitz, H.; Schmidt, H.; Herzel, F.: Occurrence, toxicological and ecotoxicological significance of pesticides in groundwater and surface water. In Börner, H. (Vol. ed.): Pesticides in ground and surface water. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1994.
- Ben-Rejeb, S.; Durand, N. F.; Martel, A.; Le-Poulenec, B.; Lawrence, J. F.; Hennion, M. C.; Le-Goffic, F.: Development of anti-phenylurea antibody

- purification techniques for improved environmental applications. *Anal. Chim. Acta* **376** (1998) 41-48.
- Bier, F.F.; Stöcklein, W.; Böcher, M.; Bilitewski, U.; Schmid, R. D.: Use of a fibre optic immunosensor for the detection of pesticides. *Sens. Actuators B* **7** (1992) 509-512.
- Bjarnason, B.; Bousios, N.; Eremin, S.; Johansson, G.: Flow injection enzyme immunoassay of atrazine herbicide in water. *Anal. Chim. Acta.* **347** (1997) 111-120.
- Brecht, A.; Gauglitz, G.; Nahm, W.: Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors. *Analisis* **20** (1992) 135-40.
- Brecht, A.: Interferenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen. Dissertation, Universität Tübingen, 1993.
- Brecht, A.; Abuknesha, R.: Multi-analyte immunoassays application to environmental analysis. *Trends Anal. Chem.* **14** (1995) 361-371.
- Brecht, A.; Gauglitz, G.: Label free optical immunoprobes for pesticide detection. *Anal. Chim. Acta* **347** (1997) 219-33.
- Bouzige, M.; Pichon, V.; Hennion, M. C.: On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng/l level. *J. Chromatogr. A.* **823** (1998) 197-210.
- Byfield, M. P.; Abuknesha, R. A.: Biochemical aspects of biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **9** (1994) 373-400.
- CAVRO XL 3000 Modular Digital Pump Operator's Manual, March 1993, PIN 724043E. Cavro Scientific Instruments, Inc. Sunnyvale, CA, USA.
- Dahl, B.; Blanck, H.: Toxic effects of the antifouling agent irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Mar. Pollut. Bull.* **32** (1996) 342-350.

- Domenici, C.; Schirone, A.; Celebre, M.; Ahluwalia, A.; De Rossi, D.: Development of a TIRF immunosensor: modelling the equilibrium behaviour of a competitive system. *Biosens. Bioelectron.* **10** (1995) 371-378.
- Ebersole, R. C.; Miller, J. A.; Moran, J. R.; Ward, M. D.: Spontaneously formed functionally active avidin monolayers on metal surfaces: A strategy for immobilizing biological reagents and design of piezoelectric biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 3239-3241.
- Eggins, B. R.: Biosensors: an introduction. Teubner, Stuttgart 1996.
- Ekins, R.: Immunoassay: recent developments and future directions. *Nucl. Med. Biol.* **21** (1994) 495-521.
- Ekins, R.: Immunoassay design and optimisation. In Price, C.; Newman, D. J.: Principles and practice of immunoassay. 2nd Edition. Macmillan Reference Ltd., London 1997.
- Eremin, S. A.; Matveeva, E. G.; Gomez-Hens, A.; Perez-Bendito, D.: Kinetic determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by stopped-flow fluorescence polarization immunoassay. *Int. J. Environm. Anal. Chem.* **71** (1998) 137-146.
- Ferrer, I.; Ballesteros, B.; Marco, M.P.; Barceló, D.: Pilot survey for determination of the antifouling agent Irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme linked immunosorbent assay and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Environ. Sci. Technol.* **31** (1997) 3530-3535.
- Friedman, S. B.: Doing immunoassays in the field. *Chemtech* **12** (1992) 732-737.
- García Sanchez, F.; Navas Díaz, A.; González Díaz, A. F.; Eremin, S. A.: Quantification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by fluorescence enzyme-linked immunosorbent assay with secondary antibody. *Anal. Chim. Acta* **378** (1999) 219-224.
- Gascón, J.; Oubina, A.; Ballesteros, B.; Barceló, D.; Camps, F.; Marco, M.-P.; González-Martínez, M. A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A.:

- Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine. Performance evaluation by flow injection immunoassay. *Anal. Chim. Acta.* **347** (1997) 149-162.
- Gauglitz, G.; Brecht, A.; Nahm, W.: Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers. *Sens. Actuators B* **11** (1993) 21-27.
- Gilles, P. N.; Wu, D. J.; Foster, C. B.; Dillon, P. J.; Chanock, S. J.: Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. *Nature Biotechnology* **17** (1999) 365-370.
- González-Martínez M. A.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Ferrer, I.; Marco, M.-P.; Barceló, D.: Reversible Immunosensor for the automatic determination of atrazine. Selection and performance of three polyclonal antisera. *Anal. Chim. Acta.* **386** (1999) 201-210.
- Gronow, M.: Biosensors. *Trends Biochem. Sci.* **9** (1994) 336-340.
- Hale, Z. M.; Payne, F. P.; Marks, R. S.; Lowe, C. R.; Levine, M. M.: The single mode tapered optical fibre loop immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* **11** (1996) 137-148.
- Hassoon, S.; Schechter, I.: A sensitive fluorescence probe for DDT-type pesticides. *Anal. Chim. Acta* **368** (1998) 77-82.
- Hemmilä, I.: Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clin. Chem.* **31/3** (1985) 359-370.
- Henke, L.; Piunno, P. A.; McClure, A. C.; Krull, U. J.: Covalent immobilization of single-stranded DNA onto optical fibers using various linkers. *Anal. Chim. Acta* **344** (1997) 201-213.
- Hermanson, G. T.: Bioconjugate Techniques. Academic Press, Inc., San Diego 1996.
- Hidalgo, C.; Sancho, J. V.; Hernández, F.: Trace determination of triazine herbicides by means of coupled-column liquid chromatography and large volume injection. *Anal. Chim. Acta.* **338** (1997) 223-229.

- Hock, B.; Nießner, R. (Edts.): Immunochemical Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water Cycle. Research Report Deutsche Forschungsgemeinschaft, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995.
- Irth, H.; Oosterkamp, A. J.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J.: Strategies for on-line coupling of immuno-assays to high-performance liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.* **14** (1995) 355-361.
- Jackson, T. M.; Ekins, R. P.: Theoretical limitations on immunoassay sensitivity. *J. Immunol. Meth.* **87** (1986) 13-20.
- Kleinjung, F.; Bier, F. F.; Warsinke, A.; Scheller, F. W.: Fibre-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers. *Anal. Chim. Acta* **350** (1997) 51-58.
- Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity, *Nature* **256** (1975) 495-497.
- Klotz, A.: Fluoreszenzbasiertes optisches Biosensorsystem: Entwurf, Modellierung und Optimierung. Dissertation, Universität Tübingen, 1998.
- Krämer, P. M.: Biosensors for measuring pesticide residues in the environment: Past, present and future. *J. AOAC Int.* **79** (1996) 1245-1255.
- Krämer, P. M.: Automation of immunochemical analysis - a prototype instrument to determine diuron or atrazine in water. *Lab. Robot. Automation* **9** (1997) 81-89.
- Kronick, M. N.; Little, W. A.: Fluorescent immunoassay employing total reflection for activation. *J. Immunol. Meth.* **8** (1975) 235-240.
- Lehotay, S. J.: Supercritical fluid extraction of pesticides in foods - Review. *J. Chromatogr. A* **785** (1997) 289-312.
- Löfas, S.; Johnsson, B.; Edström, A.; Hansson, A.; Lindquist, G.; Müller Hillgren, R.; Stigh, L.: Methods for site controlled coupling to carboxymethyl-dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors. *Biosens. Bioelectron.* **10** (1995) 813-22.

- Lottspeich, F.; Haralabos, Z. (Hrsg.): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1998.
- Lucas, A. D.; Gee, S. J.; Hammock, B. D.; Seiber, J. N.: Integration of immunochemical methods with other analytical techniques for pesticide residue determination. *J. AOAC Int.* **78** (1995) 585-591.
- Marco, M.-P.; Gee, S.; Hammock, B. D.: Immunochemical techniques for environmental analysis II. antibody production and immunoassay development. *Trends Anal. Chem.* **14** (1995) 415-425.
- Matthess, G.: Fate of pesticides in aquatic environments. In Börner, H. (Vol. ed.): Pesticides in ground and surface water. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1994.
- Meusel, M.; Trau, D.; Katerkamp, A.; Meier, F.; Polzius, R.; Cammann, K.: New way in bioanalysis - one-way optical sensor chip for environmental analysis. *Sensors. Act. B* **51** (1998) 249-255.
- Mosiello, L.; Nencini, L.; Segre, L.; Spanò, M.: A fibre-optic immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid detection. *Sens. Actuators B* **38-39** (1997) 353-359.
- Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S.: Cyanine-labeling Reagents: Sulfo benzindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconj. Chem.* **3** (1996) 356-62.
- Narang, U.; Anderson, G. P., Ligler, F. S.; Burans, J.: Fiber optic-based biosensor for ricin. *Biosens. Bioelectron.* **12** (1997) 937-945.
- O'Brien, M. J.; Brueck, S. R. J.; Perez-Luna, V. H.; Tender, L. M.; Lopez, G. P.: SPR biosensors: simultaneously removing of thermal and bulk-composition effects. *Biosens. Bioelectron.* **2** (1999) 145-154.
- Önnerfjord, P.; Eremin, S.; Emneus, J.; Marko-Varga, G.: Fluorescence polarisation for immunoreagent characterisation. *J. Immunol. Methods* **213** (1998) 31-39.

- Oosterkamp, A. J.; Irth, H.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J.: On-line coupling of liquid chromatography to biochemical assays based on fluorescent-labeled ligands. *Anal. Chem.* **66** (1994) 4295-4301.
- Oroszlan, P.; Duveneck, M.; Ehrat, M.; Widmer, H. M.: Fibre-optic atrazine immunosensor. *Sens. Actuators B* **11** (1993) 301-305.
- Piehler, J.; Brecht, A.; Kramer, K.; Hock, B.; Gauglitz, G.: Multi-analyte determination with a direct optical multi-antibody detection system. *Proc. SPIE* **2504** (1995) 185-194.
- Piehler, J.; Brecht, A.; Geckeler, K. E.; Gauglitz, G.: Surface modification for direct immunoprobes. *Biosens. Bioelectron.* **6/7** (1996) 579-90.
- Piehler, J.: Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern. Dissertation, Universität Tübingen, 1997.
- Pollema, C. H.; Ruzicka, J.: Flow injection renewable surface immunoassay: A new approach to immunoanalysis with fluorescence detection. *Anal. Chem.* **66** (1994) 1825-1831.
- Polzius, R.; Schneider, Th.; Bier, F. F.; Bilitewski, U.; Koschinski, W.: Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxide waveguides. *Biosens. Bioelectron.* **5** (1996) 503-14.
- Potyrailo, R. A.; Hobbs, S. E.; Hieftje, G. M.: Optical waveguide sensors in analytical chemistry: today's instrumentation, applications and trends for future development. *Fresenius J. Anal. Chem.* **362** (1998) 349-373.
- Price, C. P., Newman, D. J. (Hrsg.), Principles and Practice of Immunoassay (Second Edition), Stockton Press, New York 1997.
- Rabbany, S. Y.; Donner, B. L.; Ligler, F. S.: Optical immunosensors. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **22(5/6)** (1994) 307-346.

- Reeves, S. G.; Siebert, S. T. A.; Roberts, M. A.; Durst, R. A.: Liposome immunosensing devices for environmental contaminant screening. *Trends Anal. Chem.* **14** (1995) 351-355.
- Rickert, J.; Weiss, T.; Göpel, W.: Self-assembled monolayers for chemical sensors: molecular recognition by immobilized supramolecular structures. *Sens. Actuators B* **31** (1996) 41-44
- Römpp Chemie Lexikon, Paperback-Ausgabe, Thieme-Verlag, Stuttgart 1995.
- Rogers, K. R.; Kohl, S. D.; Riddick, L. A.; Glass, T.: Detection of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid using a fluorescence immunoanalyzer. *Analyst* **122** (1997) 1107-1111.
- Roitt, I. M.: Essential Immunology, Seventh Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991.
- Ruzicka, J.; Hansen, E. H.: Flow Injection Analysis. Second Edition. John Wiley & Sons, New York 1988.
- Santandreu, M.; Solé, S.; Fàbregas, E.; Alegret, S.: Development of electrochemical immunosensing systems with renewable surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **1** (1998) 7-17.
- 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. *Anal. Chem.* **71** (1999) 2850-2857.
- Schmid, E. L.; Keller, T. A.; Zoltan, D.; Vogel, H.: Reversible oriented surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces. *Anal. Chem.* **69** (1997) 1979-85.
- Schobel, U.: Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines homogenen Fluoroimmunoassays für die Affinitätsanalytik in Nanolitervolumina. Dissertation, Universität Tübingen, 1999.

- Shriver-Lake, L. C.; Golden, J. P.; Gabor, P.; Narayanan, N.: Use of three longer-wavelength fluorophores with the fibre-optic biosensor. *Sens. Actuators B* **29** (1995) 25-30.
- Southwick, P. L., Ernst, L. A.; Tauriello, E. W.; Parker, S. R.; Mujumdar, R. B.; Clever, H. A.; Waggoner, A. S.: Cyanine Dye Labeling Reagents - Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters. *Cytometry* **11** (1990) 418-430.
- Spinke, J.; Liley, M.; Guder, H.-J.; Angermaier, L.; Knoll, W.: Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers. *Langmuir* **9** (1993) 1821-1825.
- Steiner, R. F.; Edelhofer, H.: Fluorescent Protein Conjugates. *Chem. Rev.* **62** (1962) 457-483.
- Stemmler, I.; Sauer, M.; Gauglitz, G.; Brecht, A.: Covalent immobilisation of DNA-microspots by ink-jet printing. *Nucleic Acids Research* (1999) (eingereicht).
- Stryer, L.: Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg 1990.
- Suri, C. R.; Mishra, G. C.: Activating piezoelectric crystal surface by silanization for microgravimetric immunosensor application. *Biosens. Bioelectron.* **12** (1996) 1199-1205.
- Tijssen, P.: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Vol. 15, Elsevier Amsterdam 1985.
- Tomlin, C. (Hrsg.): The Pesticide Manual, British Crop Protection Council and The Royal Society of Chemistry- Information Services, 1994.
- Trau, D.; Theuerl, T.; Wilmer, M.; Meusel, M.; Spener, F.: Development of an amperometric flow injection immunoanalysis system for the determination of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water. *Biosens. Bioelectron.* **12** (1997) 499-510.
- Trau, D: mündliche Mitteilung, Technical Meeting: Biosensors for Environmental Monitoring, Berlin, September 1997.

- Tromberg, B. J.; Sepaniak, M. J.; Alarie, J. P.; Vo-Dinh, T.; Santella, R. M.: Development of antibody-based fiber-optic sensors for detection of a benzo(a)pyrene meatbolite. *Anal. Chem.* **60** (1988) 1901-1908.
- Van Emon, J. M.; Gerlach, C. L.: The right environment for the immunoassay. *Chemtech* **11** (1995) 51-54.
- Van Emon, J. M.; Lopez-Avila, V.: Immunochemical methods for environmental analysis. *Anal. Chem.* **64** (1992) 79-88.
- Viana, E.; Moltó, J. C.; Mañes, J.; Font, G.: Clean-up and confirmation procedures for gas chromatographic determination of pesticides residues in contaminated water: Part I. *J. Chromatogr.* **655** (1993) 285-292.
- Viana, E.; Moltó, J. C.; Mañes, J.; Font, G.: Clean-up and confirmatory procedures for gas chromatographic analysis of pesticides residues: Part II. *J. Chromatogr.* **678** (1994) 109-117.
- Wilchek, M.; Bayer, E. A.: The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* **171** (1988) 1-32.
- Willumsen, B.; Christian, G. D.; Ruzicka, J.: Flow injection renewable surface immunoassay for real time monitoring of biospecific interactions. *Anal. Chem.* **69** (1997) 3482-3489.
- Winklmaier, M.; Weller, M. G.; Mangler, J.; Schlosshauer, B.; Niessner, R.: Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997) 614-622.
- Wortberg, M.; Middendorf, C.; Katerkamp, A.; Rump, T.; Krause, J.; Cammann, K.: Flow-injection immunosensor for triazine herbicides using Eu(III) chelate label fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **289** (1994) 177-186.
- Yalow, R. S.; Berson, S. A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184** (1959) 1648-1649

Yang, M.; McGovern, M. E.; Thompson, M.: Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Anal. Chim. Acta* **346** (1997) 259-275.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen und Konventionen

Englische Begriffe sind *kursiv* gedruckt.

A	obere Asymptote an Meßwerte (Gleichung (15))
A 4	Tetrachlorphthalsäureamidocaprinsäure
ACA	Atrazincaprinsäure
[Ag]	Antigen-, Analytkonzentration
[Ag _{0,tmp}]	Analytkonzentration am Testmittelpunkt
AHS	Aminohexansäure
[Ak]	Antikörper-, Rezeptorkonzentration
ANA	2,6-Diethylanilin-N-essigsäure
AMD	Aminodextran
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
b _{tmp}	Konz. des kreuzreagierenden Stoffes am tmp
Bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
c	Analytkonzentration
%CR	Kreuzreaktivität
CS	Cholsäure
D	untere Asymptote an Meßwerte (Gleichung (15))
d	physikalische Schichtdicke (Gleichung (19))
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCS	Desoxycholsäure
DEA	Desethylatrazin
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DN 1	Dichloranilinglutarsäure
d _p	evaneszente Eindringtiefe
E	elektrischer Feldvektor
E	Extinktion

ϵ	dekadischer Extinktionskoeffizient
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimthylaminopropyl)carbodiimid
EtPQ	Ethylparaquatvaleriansäure
Φ	Quantenausbeute
GOPTS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
HPVAG	Bis-4-Hydroxyphenylvaleriansäureglycylglycin
I	Intensität
IP I 2	4-Isopropylanilinhemisuccinat
IP 5	4-Isopropylphenoxyessigsäure
IP B	4-Isopropylanilin-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarboxyanhydrid
k	natürlicher Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
MCPP	Methylchlorphenoxypropionsäure
n	Brechungsindex
N 6	2,4,5-Trichloranilinessigsäure
N 7	Pentachloranilinbuttersäure
N 8	4-Chlor-2-methylanilinessigsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBST	PBS mit 0,1 % Tween 20
PCP	Pentachlorphenol
PQ	Paraquat
ProgHS	Progesteron-11-hemisuccinat
S_{offset}	<i>Offset</i> -Signal in Kalibrierkurven
TCP	Trichlorphenol
tmp	Testmittelpunkt
x	Schichtdicke (Gleichung (3))
ZABA	Atrazin-4-aminbenzoesäure

7.2 Akademische Lehrer

Ache, Ahrichs, Bärnighausen, Bayer, Boland, Fenske, Freyland, Schindewolf, Gauglitz, Göpel, Hasse, Hoffmann, Hüttinger, Knölker, Koppenhöfer, Kovar, Krebs, Krogmann, Lorenz, Schröder, Schurig, Stegmann, Weisweiler.

7.3 Lebenslauf

<i>Name:</i>	Claudia Barzen
<i>geboren am:</i>	15. Juni 1970 in Bernkastel-Kues
 <i>Ausbildung:</i>	
08/1976 - 06/1980	Grundschule Friedrichstraße, Wittlich
08/1980 - 05/1989	Cusanus Gymnasium, Wittlich
10/1989 - 01/1996	Chemiestudium an der Universität Karlsruhe (TH)
 <i>Diplomarbeit:</i>	 Institut für Instrumentelle Analytik, Prof. Dr. H.J. Ache, Forschungszentrum Karlsruhe „Biosensoren für die klinische Notfalldiagnostik: Spektroskopische Untersuchungen von Enzymen als Rezeptoren“
 08/1996 – 12/1999	 Dissertation im Institut für Physikalische Chemie, Prof. Dr. G. Gauglitz, Universität Tübingen: „Optimierung eines Fluoreszenz-Immunsensors für den flexiblen Multianalyt-Nachweis“
 09/1996 - 01/1998	 DFG Graduiertenkolleg „Quantitative Analyse mit biochemischer und pharmazeutischer Relevanz“
 08/1997	 Aufenthalt im Centro de Investigación y Desarrollo (CSIC-CID), Barcelona, Spanien im Rahmen der RIANA- Kooperation