

Miniaturisierte Affinitätsanalytik



Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion

DISSERTATION

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

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

1999

**vorgelegt von
Ivo Stemmler**

Tag der mündlichen Prüfung:	26.10.1999
Dekan:	Prof. Dr. U. Nagel
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gauglitz
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und den großen Freiraum bei der Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Brecht danke ich für seine hilfsbereite und motivierende Art. Herrn Dr. Michael Steinwand und der Perkin Elmer-Crew danke ich für die ausgezeichnete Projektarbeit und Unterstützung.

Meinen Kollegen im Arbeitskreis, vor allem der Biogruppe, danke ich für das gute Miteinander sowohl im wissenschaftlichen als auch privaten Bereich. Besonderer Dank gilt auch Uwe Schobel und Ingrid Coille für die gute Zusammenarbeit im Projekt LINDAU, Dieter Fröhlich für seine nächtlichen Einsätze mit Maple und Bleistift, Jochen Mehne für die vielen Kleinigkeiten im Laboralltag, sowie Hans-Martin Haake und Alexander Jung für ihren unermüdlichen Einsatz für ein funktionierendes Netzwerk, Tilo Weiß (Arbeitskreis Prof. Dr. Göpel) für die Vergoldung meiner SPR-Transducer im UHV, Hans-Joachim Egelhaaf (Arbeitskreis Prof. Dr. Oelkrug) für die Unterstützung bei Fluoreszenzmessungen und Martin Hessling vom Laser Labor Göttingen für die gute interdisziplinäre Zusammenarbeit. Nicht zuletzt möchte ich auch dem BMBF und der EU danken, ohne deren Förderung die Projekte LINDAU, RIANA und LIBRARIAN nicht möglich gewesen wären.

Inhaltsverzeichnis

1	MOTIVATION	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit	5
2	EINLEITUNG UND GRUNDLAGEN	6
2.1	Biopolymere und affine Wechselwirkung	6
2.1.1	Antikörper	6
2.1.2	Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung	8
2.1.3	DNA	9
2.1.4	Thrombin	13
2.1.5	Biotin-Avidin	13
2.1.6	Affinitätsassays, heterogene Immunoassays.....	15
2.2	(Ortsaufgelöste) Oberflächenmodifikation für die Affinitätsanalytik	22
2.2.1	Reinigung und Beschichtung	22
2.2.2	Einsatz und Modifikation von Polymeren	23
2.2.3	Kupplungs-Chemie	25
2.2.4	Immobilisierung von DNA	30
2.2.5	Ortsaufgelöste Oberflächenmodifizierung und Mikrodosierung	32
2.3	Optische Detektion	36
2.3.1	Maxwellgleichungen und Brechungsindex	36
2.3.2	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)	38
2.3.3	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIFS)	43
2.3.4	Absorption, Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung.....	45
3	MATERIAL UND METHODEN.....	49

3.1	Chemikalien und Biochemikalien.....	49
3.1.1	Lösungen	51
3.2	Sonstiges Material.....	51
3.3	Modifizierung von (Bio-)Polymeren.....	52
3.3.1	ACA-NHS-Aktivester	52
3.3.2	PSS-ACA-Konjugat	53
3.3.3	Aminodextran.....	54
3.3.4	Pestizid-BSA-Konjugate	55
3.3.5	Cy5-Antikörper-Konjugate	55
3.3.6	Trennung mit Sephadex-Säule	55
3.4	Oberflächenmodifikation	56
3.4.1	Gold- und Graphitschichten.....	56
3.4.2	Quenchen auf Graphit und Gold	58
3.4.3	Polyelektrolyte	59
3.4.4	Grundreinigung oxidischer Oberflächen	59
3.4.5	Aminosilanisierung von Glas.....	60
3.4.6	Photolinker-Oberflächen.....	60
3.4.7	Epoxid-Oberflächen	60
3.4.8	Carboxy-Oberflächen	61
3.4.9	NHS-Aktivester-Oberflächen.....	61
3.4.10	DNA-Oberflächen	62
3.4.11	Oberflächenmodifikation für PSFIA.....	65
3.5	Mikrodosierung.....	67
3.5.1	OF-Microdrop	67
3.5.2	NTP-Microdrop.....	68
3.5.3	NTP-GeSiM.....	70
3.5.4	NTP-Platten.....	71

3.5.5	Klebefolie	73
3.6	Fluoreszenzdetektion	74
3.6.1	Fluoreszenzfarbstoff Cy5	74
3.6.2	Küvetten-Fluoreszenz-Spektrometer LS50B	75
3.6.3	MTP-Fluoreszenzleser LSR200	76
3.6.4	NTP-Fluoreszenzleser BioScan	77
3.6.5	Auswertung der Fluoreszenzintensitäten	78
3.7	RIfS, SPR und FIA.....	79
3.7.1	Optik und Lichtquelle	79
3.7.2	Spektrometer	80
3.7.3	FIA-Systeme.....	80
3.7.4	Software.....	81
3.7.5	SPR-Transducer	81
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	85
4.1	SPR	85
4.1.1	Optische Eigenschaften.....	85
4.1.2	Biospezifische Wechselwirkung.....	88
4.2	Mikrodosierung als Werkzeug.....	95
4.2.1	Charakterisierung des Mikrodosiersystems	95
4.2.2	Charakterisierung mikrodosierter Oberflächenbeschichtung mit Modellprotein.....	98
4.2.3	Mikrodosierung in die NTP	102
4.2.4	Referenzierung des detektierten Fluoreszenzsignals.....	104
4.3	Oberflächenmodifizierung	107
4.3.1	Polyelektrolyte	107

4.3.2	Charakterisierung der Aminodextrane.....	110
4.3.3	Photolinker mit AMD	111
4.3.4	Epoxide mit AMD.....	115
4.3.5	Aktivester mit AMD.....	116
4.3.6	Immobilisierung von DNA-Oligomeren.....	117
4.3.7	DNA-Oligomere als Hilfsligandensystem	124
4.4	Phasenseparations-Fluoreszenz-Immunoassay (PSFIA)	126
4.4.1	Allgemeines.....	126
4.4.2	Theoretisches Signal	128
4.4.3	PSFIA in der MTP.....	140
4.4.4	PSFIA in der NTP: Strategie und Quenchen an Oberflächen	147
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	155
6	LITERATUR	161
7	ANHANG.....	176
7.1	Verwendete Abkürzungen.....	176
7.2	Publikationen.....	178
7.3	Akademische Lehrer	179

1 Motivation

Ein stetig wachsendes Umwelt- und Gesundheitsbewußtsein bringt eine zunehmende Anzahl zu analysierender Proben mit sich. Die *Analytik von biologisch wirksamen Komponenten* wird häufig über deren spezifische Wechselwirkung mit einem biologischen Rezeptor bewerkstelligt („*Affinitätsanalytik*“) und erstreckt sich von der

- Wirkstoffsuche für Pharmazeutika über
- Wechselwirkungsuntersuchungen auf DNA/RNA-Ebene bis hin zur
- Trinkwasser- bzw. Umweltanalytik.

Über 130 Liter *Trinkwasser* werden alleine in deutschen Haushalten pro Tag und Einwohner verbraucht. Eine große Gefahr für das Trinkwasser wird in dem Einsatz von *Pflanzenschutzmitteln* auf konstant hohem Niveau gesehen. Der Weltmarkt für Pflanzenschutzmittel liegt nach Angaben des Industrieverband Agrar (IVA) von 1995 bis 1998 weitgehend konstant bei 28.5 Mrd US\$. Der Verbrauch an *Pestiziden*¹ in den USA lag 1995 bei etwa 440 000 t (11.3 Mrd US\$), davon 56% für Herbizide. EU-weit liegt der Pestizidverbrauch derzeit bei 340 000 t/a, in der deutschen Landwirtschaft bei 30 000 t². Für Deutschland entspricht dies einem Eintrag von knapp 2 kg/ha landwirtschaftlich genutzter Fläche – mehr als das 20-fache der benötigten Menge eines modernen Pestizids.

Simazin (1990: 500-1000 t) und vor allem das daraus weiterentwickelte *Atrazin* (1990: >2000 t) sind aufgrund ihres flächendeckenden Einsatzes in der EU von hohem Interesse für die Trinkwasseranalytik³ [Fielding1992]. Sie sind zwei wichtige Vertreter der sogenannten s-Triazin-Klasse und zählen damit zu den selektiven systemischen *Herbiziden*, welche die Photosynthese von Unkräutern und Ungräsern hemmen. Nach ihrer Einführung Ende der 50er Jahre von Ciba-Geigy fanden sie steigende Verwendung z.B. im Maisanbau. In den USA ist

¹ Unter Pestiziden versteht man neben den Pflanzenschutzmitteln auch beispielsweise Wirkstoffe für den Hygieneschutz, z.B. gegen Flöhe etc.

² Nach Angaben des Deutschen Naturschutzrings bzw. des Umweltbundesamtes. Für Haus und Garten beträgt der entsprechende Wert etwa 800 t/a.

³ Für Trinkwasser sind in Europa dreimal so viele Schadstoff-Grenzwerte festgelegt wie für Mineralwasser. Für Mineralwasser existiert z.B. kein Grenzwert für Pestizide.

Atrazin (Abbauprodukt Desethylatrazin) mit mehr als 30 000 t/a (1995) Spitzenreiter unter den Herbiziden.

Als Grundlage für die Trinkwasser-Grenzwerte der Weltgesundheitsorganisation WHO und der USEPA (United States Environmental Protection Agency) dient der ADI-Wert (acceptable daily intake) für jedes bekannte Pestizid. Dieser liegt um den Sicherheitsfaktor 10^{-2} unter dem NOEL (no effect level), für den im langfristigen Tierversuch kein Effekt erkennbar ist [Barceló1993], [Fielding1992], [Cohen1990]. Unabhängig von diesen Werten darf das Trinkwasser in Deutschland seit dem 1.10.1989 nicht mehr als $0.1 \mu\text{g/L}$ eines einzelnen Pflanzenschutz-Wirkstoffes enthalten bzw. maximal $0.5 \mu\text{g/L}$ bei mehreren Wirkstoffen. Mit dieser Trinkwasserverordnung (TrinkwV) wurde eine bereits 1980 verabschiedete EG-Richtlinie in deutsches Recht übernommen. Die Grenzwerte liegen um 10^{-2} bis 10^{-3} unter denen der WHO und dienen damit der Vorsorge. Eine neue Trinkwasserdirektive der EU vom 3.11.98, die bis Ende 2000 in nationales Recht umgesetzt sein muß, setzt für bestimmte Pestizide im Trinkwasser noch niedrigere Grenzwerte von $0.03 \mu\text{g/L}$ fest.

Von den über 400 in Deutschland eingesetzten Pflanzenschutz-Wirkstoffen sind längst nicht alle in der erforderlichen Genauigkeit nachweisbar. Aufwendige Probenvorbereitungen, wie die Aufkonzentrierung oder Derivatisierung des nachzuweisenden Analyts sind für konventionelle Analytik in Umweltlabors notwendig, um die vorgeschriebene Nachweisgrenze zu erreichen. *Immunologische Verfahren* versprechen in mancherlei Hinsicht, die konventionellen Verfahren abzulösen [Hennion1998]. Für jeden zu untersuchenden Analyt wird dazu ein spezifischer biologischer Rezeptor (Antikörper) verwendet, der den Analyt gewissermaßen aus der Probe fischt. Immunologische Nachweis-Kits werden bereits kommerziell vertrieben und erreichen die Nachweisgrenze von $0.1 \mu\text{g/L}$ ohne aufwendige Probenvorbereitung in etwa einem Drittel der Zeit (ca. 2 h) und bei etwa 5-10% der Kosten (ca. 10 DM pro Wirkstoff) von konventionellen Verfahren. Eine weitere Senkung der Kosten kann bei der wachsenden Nachfrage an Analysen zu enormen Wettbewerbsvorteilen führen, bzw. eine flächendeckende Untersuchung überhaupt erst ermöglichen. Angestrebt werden also Verfahren, die

- möglichst schnell und ohne Probenvorbereitung
- parallel eine möglichst hohe Anzahl von Proben
- bei möglichst geringem Reagenzienverbrauch bewältigen.

Eine Erhöhung der Anzahl an zu untersuchenden Proben bzw. die Kostensenkung pro Analyse ist auch von hohem Interesse für die *Suche nach neuen Wirkstoffen* im pharmazeutischen Bereich. Häufig werden große Bibliotheken mit über 10^6 bekannten Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit einem biologischen Zielmolekül hin überprüft. Bei diesem „Massen-Screening“ (High Throughput Screening, *HTS*) kommt es aus Kosten- und Zeitgründen zunächst weniger auf eine quantitative Analyse, als auf einen groben Hinweis auf eine Wechselwirkung an. Eine Erhöhung um ein bis zwei Größenordnungen auf 10^6 Proben pro Jahr und Gerät (2/min) soll in den nächsten Jahren mit solchen parallelen Verfahren bewältigt werden können. Aufgrund der Kostbarkeit der eingesetzten Substanzen besteht außerdem ein hohes Interesse an einer Reduzierung der einzusetzenden Probenmengen [Lebl1995].

Analoge Überlegungen treffen auch auf die Untersuchungen der Wechselwirkung von DNA mit Zielmolekülen zu [Wallace1997]. Sogenannte *DNA-Chips*, auf welchen eine hohe Anzahl bekannter DNA-Sequenzen immobilisiert sind, sollen bisherige Methoden ablösen. Mit 50 Millionen US\$ öffentlicher Gelder wird beispielsweise das 1992 gegründete Genosensor Consortium in seinem Vorhaben unterstützt, solche Microarray-Technologien voranzutreiben. Ein Ziel ist beispielsweise, alle 4^8 möglichen Sequenzen (65536) eines 8-mer DNA-Stranges auf einem Chip mit 1 cm^2 Fläche unterzubringen, wodurch genetische Analysen vereinfacht werden können. Aber auch Chips mit einer begrenzten Anzahl von Mutationen eines bestimmten Risikogens sind für die Erkennung einzelner genetischer Risikofaktoren, wie z.B. Alzheimer, interessant. Hohe Integrationsdichten führen neben einfachen Analyseverfahren zu drastisch verkürzten Reaktionszeiten [Ekins1997], [Service1998].

In allen drei Beispielen werden heterogene Verfahren aufgrund einfacher und flexibler Protokolle bevorzugt. Dabei wird eine Komponente auf dem festen Träger immobilisiert und mit der flüssigen Probe (Analyt) in Kontakt gebracht. Nach Beendigung der Gleichgewichtsreaktion wird die Verarmung der Lösung oder die Anreicherung der festen Phase mit Analyt nach der Separation beider Phasen detektiert. Aufgrund der vorzunehmenden physikalischen Trennung der Phasen können keine kinetischen Daten der Bindung aufgezeichnet werden.

Kinetische Daten können über *on-line-Verfahren* ermittelt werden. Auch diese sind meist heterogen. Sie detektieren beispielsweise die Änderung der optischen Eigenschaften einer Oberfläche und kommen im Gegensatz zu anderen gängigen Verfahren häufig ohne Markierung aus [Brecht1996], [Rothmund1997].

Dadurch wird die Beobachtung einer von Markermolekülen unbeeinträchtigten Bindung möglich. Die Unterscheidung, was an die Oberfläche gebunden hat, muß jedoch über die Affinität der Oberfläche eindeutig bestimmt sein. Damit ist die *Beschaffenheit der Oberfläche* hier von größter Bedeutung.

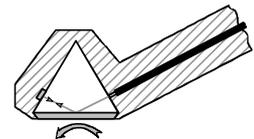
Mehrfachuntersuchungen auf einer sensitiven Oberfläche (Transducer) bringen neben einem reduzierten Aufwand bei der Transducerherstellung eine höhere Glaubwürdigkeit der erhaltenen Daten mit sich. Die relativ harschen Bedingungen bei der *Regeneration* der Transducer-Oberfläche verlangen eine stabile Verankerung der spezifischen Komponenten auf der Oberfläche. Dies wird i.a. über kovalente Bindungen bewerkstelligt.

Eine *Parallelisierung* heterogener Testformate macht eine *orts aufgelöste Immobilisierung* von Komponenten notwendig. Bei gleichzeitiger *Miniaturisierung* in Bereiche $\leq 1 \text{ mm}^2/\text{Probe}$ stoßen konventionelle Techniken der Oberflächenmodifikation schnell an ihre Grenzen. Vielversprechend für diese Aufgabe ist eine seit wenigen Jahren erhältliche Mikrodosiervorrichtung, die auf dem Prinzip eines *Tintenstrahldruckers* arbeitet. Potential für eine miniaturisierte parallele Probenanalytik bieten beispielsweise die spektrale Verfahren, wie *Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)* und *Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)*, aber auch die (markierte) *Totale Interne Reflexions Fluoreszenzanregung (TIRF)* sowie ein weiteres hier vorzustellendes markiertes Verfahren, der Phasenseparations-Fluoreszenz-Immunoassay (*PSFIA*). Die bislang zu Screening-Zwecken eingesetzten markierten Verfahren sind zwar i.a. empfindlicher als markierungsfreie Verfahren, erlauben aber im Gegensatz zum PSFIA gewöhnlich keine zeitaufgelöste Beobachtung von Bindungsereignissen. Zudem läßt dieses Verfahren ein sehr hohes Miniaturisierungspotential erwarten.

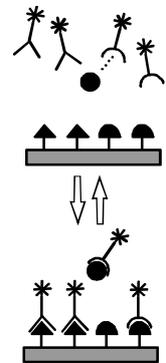
1.1 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung miniaturisierbarer und parallelisierbarer Verfahren für die heterogene Affinitätsanalytik und die Optimierung dafür notwendiger spezifischer Oberflächen. Dabei wurden drei Schwerpunkte gesetzt:

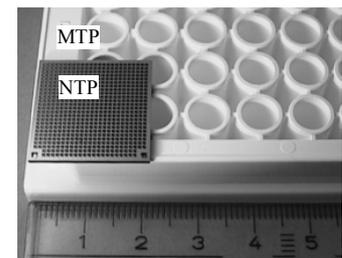
1. Die parallelisierbare *spektrale SPR* sollte hinsichtlich ihres Potentials für die Affinitätsanalytik bzw. ihrer Miniaturisierbarkeit und Einsatz als per Lichtleiter fernabfragbares Detektionssystem untersucht werden.



2. Neue Protokolle zur *Oberflächenmodifikationen* für die Affinitätsanalytik am Beispiel der Immunanalytik und der DNA-Analytik sollten etabliert werden. Das Ziel waren möglichst einfache, flexible Protokolle. Sie sollten eine *reagenziensparende* und/oder *ortsaufgelöste* Modifizierung der Oberflächen ermöglichen, die nach ihrem Einsatz möglichst in situ regenerierbar sein sollten. Eine Anwendung sind Immuno- bzw. DNA-Chips (oxidische Oberflächen), die in die miniaturisierten parallelen Detektionsmethoden TIRF und RfS integriert werden können (Screening). Für eine ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation (flexibel von etwa 0.01 bis mehrere mm²) sollte eine neue Technik etabliert werden.



3. Der Aufbau eines neuartigen waschfreien und heterogenen, sog. Phasenseparations-Fluoreszenzimmunoassays (*PSFIA*) sollte zunächst in der Mikrotiterplatte (MTP, 250 µL je Probe) erprobt und anschließend in die Nanotiterplatte (NTP, 50 nL je Probe) übertragen werden. Zur Dosierung solch kleiner Volumina sollte ein tintenstrahlbasiertes Mikrodosiersystem etabliert werden.



2 Einleitung und Grundlagen

Viele biologische Vorgänge beruhen auf der selektiven Erkennung zweier Komponenten. Der „Induced Fit“, früher auch vereinfachend Schlüssel-Schloß-Prinzip genannt, drückt die Flexibilität eines hochmolekularen biologischen Rezeptors bei der Bindung mit einem geeigneten Liganden aus. Die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor bezieht idealerweise möglichst viele funktionelle Gruppen beider Partner ein, woraus sich zum einen eine hohe Selektivität und zum anderen eine hohe Bindungsenergie bzw. *Affinität* ergeben kann. Dies wird in der *Affinitätsanalytik* ausgenutzt, wo eine Komponente eines solchen Bindungspaares als Sonde für die zweite verwendet wird.

2.1 Biopolymere und affine Wechselwirkung

2.1.1 Antikörper

Die Immunanalytik (IA) macht sich die Affinität eines Antikörpers (AK) zu einem bestimmten Antigen (AG) zunutze, welches es nachzuweisen gilt.

Antikörper sind Glykoproteine, welche (neben dem sog. Komplementsystem) die stoffliche Grundlage der humoralen Immunantwort nach dem Kontakt mit einer körperfremden Substanz (*Antigen*) darstellen. Beim Erstkontakt wird das Antigen von *B-Lymphocyten* (B-Zellen) gebunden, welche einen spezifischen Rezeptor für das Antigen an ihrer Oberfläche tragen (je Zelle ein Rezeptor). Dabei wird die B-Zelle zur Vermehrung und Differenzierung in Plasma- und *Gedächtniszellen* angeregt (*primäre Immunantwort*). Bei einer Folgeimmunisierung mit dem gleichen Antigen sorgen die Gedächtniszellen für eine schnellere Ausschüttung größerer Mengen von Antikörpern (*sekundäre Immunantwort*). Da ein Antigen mehrere *Epitope* (wechselwirkungsfähige Teilstrukturen) aufweist, kann es von unterschiedlichen B-Zellen spezifisch gebunden werden. Da jede B-Zelle einen eigenen Antikörperklon produziert, kommt es zu einem Gemisch von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität (*polyklonale Antikörper*). *Monoklonale Antikörper* weisen hingegen einheitliche Spezifität auf, da sie von erbgleichen Nachkommen einer einzelnen B-Zelle produziert werden. In der Praxis gewinnt man monoklonale Antikörper meist aus Hybriden zwischen Plasmazellen und entarteten Lymphocyten (Hybridom-Zellen), die sich in

Kultur halten lassen [Köhler1975], [Roitt1995]. Zur Auslösung einer Immunantwort muß ein Antigen eine kritische Größe von etwa 2000 g/mol überschreiten. Kleinere Moleküle werden als *Hapten* bezeichnet. Sie zeigen zwar Wechselwirkung, müssen aber zur Auslösung einer Immunantwort an einen hochmolekularen Träger (häufig Rinderserumalbumin, BSA) gebunden werden.

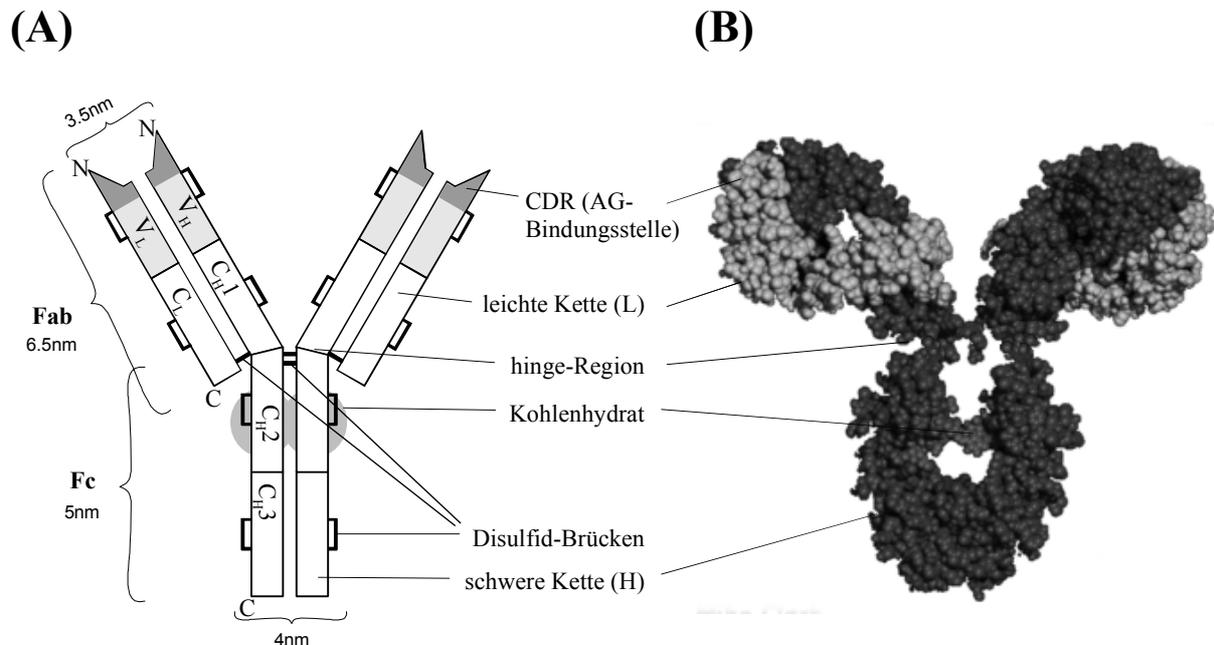


Abb. 1 Aufbau eines IgG-Antikörpers (A) und Strukturmodell (B)⁴.

Hauptvertreter mit 80% aller Immunglobuline ist neben den Typen IgA, IgD, IgE und IgM die sog. IgG-Klasse (Abb. 1). Dieses 150 kg/mol schwere Protein besteht aus je zwei großen (H, heavy, etwa je 450-550 Aminosäuren) und zwei kleinen (L, light, ca. 220 Aminosäuren) Polypeptid-Ketten, welche über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Die H-Ketten sind mit Kohlehydraten verknüpft. Alle Ketten verfügen über einen C-terminalen konstanten Bereich und einen N-terminalen hypervariablen Bereich mit etwa 50 Aminosäuren. Je zwei dieser hypervariablen sogenannten *CDR-Schleifen* (complementary determining regions) bilden eine spezifische Antigen-Bindungsstelle bzw. das *Paratop* (pro IgG also zwei). In der Gelenkregion (hinge region) befinden sich Spaltstellen für die Proteinase Papain (Fab) und Pepsin ((Fab)₂). Abgespaltene spezifische Spaltstücke werden als Fab (fragment antigen binding) bezeichnet und haben nur noch eine spezifische Bindungsstelle und werden daher bevorzugt für kinetische Studien eingesetzt.

⁴ Bild von Mike Clark, Cambridge, UK, <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/home-page.html>.

2.1.2 Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung

Die Bindung zwischen AG und AK steht beispielhaft für die affine Wechselwirkung zwischen einem Ligand und seinem Rezeptor [Roitt1995], [Alberts1990]. Sie gründet sich auf einer Reihe unterschiedlicher Wechselwirkungen, welche in ihrer Gesamtheit die Spezifität ausmachen. Der Begriff *Affinität* bezieht sich in der Immunologie auf die Bindung einer einzelnen Antikörper-Bindungsstelle an eine Antigen-Determinante; bei Wechselwirkungen zwischen multivalenten Antikörpern und multideterminanten Antigenen verwendet man den Begriff der Avidität [Falbe1995]. Bei einer affinen AG-AK-Wechselwirkung werden etwa zwischen 20 und 90 kJ/mol Energie freigesetzt. Von den vier klassischen Bindungstypen (Tab. 1) kommen für die affine Wechselwirkung nur die nicht-kovalenten Bindungstypen

- ionische Wechselwirkung
- Wasserstoffbrückenbindung und
- van-der-Waals-Wechselwirkung

zum Tragen. Außerdem müssen noch berücksichtigt werden:

- hydrophobe Wechselwirkungen (durch Wasserverdrängung),
- abstoßende (repulsive) Kräfte ($\sim d^{-12}$).

Die Verdrängung von Wasser aus der Bindungstasche wirkt sich steigernd auf die elektrostatischen Wechselwirkungen aus (Senkung der Dielektrizitätskonstanten) und der Wasserstoffbrücken-Bindungen aus (Tab. 1).

Bindungstyp	Bindungsstärke im Vakuum [kJ/mol]	Bindungsstärke im Wasser [kJ/mol]	Bindungsstärke in Abhängigkeit vom Abstand d	typischer Ab- stand [pm]
kovalent	380	380	Morse- od. RKR-Potential	150
ionisch	340	12.5	$\sim d^{-2}$	250
Wasserstoffbrücken	17	4	$\sim d^{-10}$	300
van-der-Waals	0.4	0.4	$\sim d^{-7}$	350

Tab. 1 Charakteristika verschiedener Bindungstypen [Alberts1990].

Ein größerer Energiegewinn, nämlich bis zu 50% der Bindungsenergie, ist auf die *hydrophobe Wechselwirkung* zurückzuführen. Die freie Enthalpie dieser

Wechselwirkung kann sowohl überwiegend aus entropischem, wie auch überwiegend aus enthalpischem Energiegewinn bestehen. Der Haupteffekt wird dabei der Neuverteilung des verdrängten Wassers zugeschrieben. Bei vollkommenem Wasserausschluß würde eine theoretische Obergrenze für die Bindungsstärke mit etwa 10^{67} L/mol erreicht werden. Repulsive Kräfte ($\sim d^{-12}$) sind bei sehr kleinen Abständen besonders ausgeprägt und unterstreichen damit die Bedeutung einer genauen Paßform der Epitop-Paratop-Bindung. Weitere Einflüsse auf die Bindungsstärke nehmen z.B. die Ionenstärke (elektrostatische WW), der pH-Wert (elektrostatische WW und reversible Denaturierung) und die Temperatur. Die hydrophobe Wechselwirkung kann auch durch die Zugabe hydrophober organischer Solventien geschwächt werden. Organische Säuren mit geringer Oberflächenspannung (z.B. Propionsäure oder Essigsäure) verringern die van-der-Waals-Wechselwirkungen. Chaotrope Reagenzien, wie z.B. Harnstoff, Guanidin, Halogenide und Pseudohalogenide können zur Dissoziation der AG-AK-Bindung führen. In hohen Konzentrationen führen sie hingegen auch zu einer oft irreversiblen Denaturierung der Antikörper [Dandliker1967].

2.1.3 DNA

Immobilisierte *Desoxyribonucleinsäuren* (DNA) haben ein vielfältiges Einsatzspektrum für bioanalytische Fragestellungen. DNA ist Träger der genetischen Information höherer Lebensformen, aber auch beispielsweise von Viren und Bakterien. Bausteine der DNA sind 2'-Desoxy- β -D-ribonucleoside, die aus je einer Nucleobase und der Pentose 2-Desoxy-D-ribofuranose (bzw. bei RNA: D-Ribofuranose) bestehen⁵. Als *Nucleobasen* kommen bei DNA die Purin-Derivate Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidine Cytosin (C) und Thymin (T)⁶ vor. In DNA sind die einzelnen 2'-Desoxynucleoside über ihre 5'-Hydroxy- und 3'-OH-Gruppe über Phosphodiester-Brücken verknüpft. Das Trägergerüst aus Phosphat und Furanose-Derivat wird Rückgrat (*backbone*) genannt. Die *DNA-Sequenzen* werden mit A, G, C und T in der Reihenfolge so angegeben, daß links das 5'- und rechts das 3'-Ende steht.

⁵ Mit einem Apostroph wird eine Position im Zucker-Rest (Pentose) gekennzeichnet, zur Unterscheidung von Positionen an der Nucleobase.

⁶ Bei RNA: Uracil (U) statt Thymin.

Aufgrund der Biosynthese und der Funktion der DNA kommt sie in der Natur meist als *Doppelstrang-DNA* vor. Diese besteht aus komplementären Einzelsträngen, wobei jeweils gegenüberliegende G und C bzw. A und T sogenannte *Watson-Crick-Basenpaare* bilden [Watson1953]. Der Vorgang der Doppelstrangbildung aus Einzelsträngen wird *Hybridisierung* genannt. Von den drei bekannten Arten der DNA-Doppelhelix ist *B-DNA* die in der lebenden Zelle vorherrschende Form. Es handelt sich dabei um eine rechtsdrehende Schraube von 2.37 nm Durchmesser mit einer größeren und einer kleineren Furche (engl.: major groove bzw. minor groove). Eine vollständige Windung der Helix mit einer Stufenhöhe von 0.34 nm enthält 10 Basenpaare. In der Zelle sind DNA-Doppelhelices nochmals auf eine Spirale höherer Ordnung (Superhelix) gewunden. Die Spiralisierung und Entspiralisierung (z.B. bei Replikation und Transkription) wird enzymatisch gesteuert.

Wegen ihres großen Verhältnisses von Länge zu Durchmesser neigen DNA-Moleküle bei mechanischer Beanspruchung zu *Strangbruch* – wichtig z.B. für Immobilisierung und bei Ultraschallbehandlung. Die chemische Stabilität von DNA-Fragmenten ist für die Untersuchung von Wechselwirkungen ausreichend hoch. Problematisch sind vor allem die enzymatische Spaltung, die z.B. durch Kontamination von DNA-Proben mit Fingerschweiß etc. ausgelöst werden kann. Unter Schmelzen oder Denaturierung einer DNA-Doppelhelix versteht man das Aufbrechen in Einzelstränge, ausgelöst durch Erhöhung von Temperatur oder Ionenstärke. Der *Schmelzpunkt* T_m in °C kann für DNA-DNA-Hybride >500 Basenpaaren über folgende empirische Formel berechnet werden [Ibelgaufts1990], die neben dem Gehalt der Basenpaare G und C (GC-Gehalt) auch noch die Abhängigkeit vom molaren Salzgehalt und Formamid-Gehalt (Massenprozent) beschreibt:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.61 \cdot \log(c_{\text{Na}^+}) + 0.41(\% \text{GC-Gehalt}) - (\% \text{Formamid}) \quad (1)$$

Für kürzerkettige Stränge gilt näherungsweise

$$T_m = 4 \cdot (\text{GC-Gehalt}) + 2 \cdot (\text{AT-Gehalt}), \quad (2)$$

wobei auch ersichtlich wird, daß ein höherer *GC-Gehalt*⁷ zu einer höheren Stabilität des Doppelstranges führt. Dies liegt an der dreifachen Wasserstoff-

⁷ Der Quotient der Basenpaare GC (G und C) zu AT (A und T) ist Organismen-spezifisch und gewöhnlich ungleich 1.

brücke dieser GC-Kombination (freie Bildungsenthalpie $\Delta G^0 = -10$ kJ/mol) im Vergleich zur zweifachen AT-Bindung ($\Delta G^0 = -5$ kJ/mol) [Ackermann1992]. Die Bindung kann auch durch alkalisches oder saures Milieu denaturiert werden [Guthrie1991]. So wird z.B. an den Purinbasen bei pH-Werten über 10 die Hydroxyfunktion deprotoniert. Im sauren Milieu werden die N-Funktionen protoniert. In beiden Fällen wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen unterdrückt. Bei pH-Werten unter eins tritt Depurinierung auf.

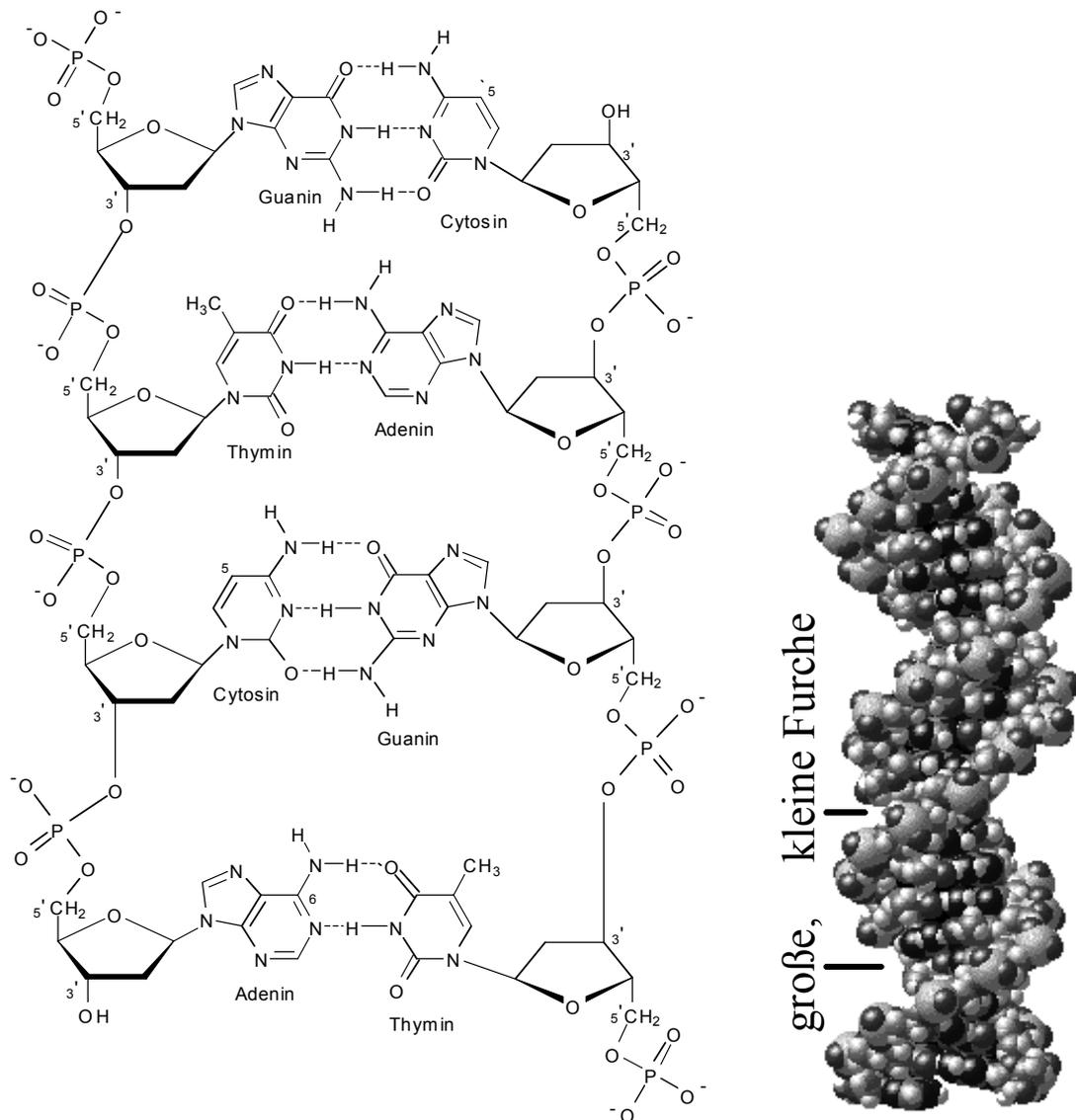


Abb. 2 Beispiel eines 4-mer-Oligonucleotid-Doppelstranges⁸ und einer längerkettigen DNA-Doppelhelix⁹.

⁸ Aus [Falbe1995].

⁹ Entnommen <http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/biochemistry.html>.

Bei *Selbstkomplementarität* (Palindrome) eines Einzelstranges treten passende Basen in spiegelbildlich umgekehrter Reihenfolge auf, so daß der Strang sich zurückfalten und mit sich selbst paaren kann (*Haarnadelschleifen*).

Die chemische Synthese von DNA (*Festphasensynthese*) stellt einen inzwischen automatisierten Prozeß dar. Die unvollständigen Reaktionsabläufe machen in der Regel eine Aufreinigung nötig und limitieren die Länge der Sequenz. Eine enzymatische Vervielfältigung (*amplification*) von DNA wird mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, *PCR*) automatisiert durchgeführt. Mit beiden Verfahren läßt sich während der Reaktion auf einfache Weise ein Marker in die DNA einführen. Eine Hybridisierung zum Doppelstrang läßt sich jedoch auch nachträglich mit einem Doppelstrang-spezifischen Marker nachweisen. DNA kann neben der Replikation auch mit viralen Mechanismen über Reverse Transcriptase¹⁰ gebildet werden, was vor allem in der Gentechnologie Anwendung findet [Stryer1996].

Die Information auf der DNA ist in Gene eingeteilt. Der normale Weg zur Umsetzung des genetischen Programmes geht über eine Zwischenspeicherung der Information in Messenger-RNA (*Transkription*) und ihrer Übersetzung (*Translation*) in Aminosäure-Sequenzen am Ribosom (*Protein-Biosynthese*), wobei dann jeweils 3 aufeinanderfolgende Basen eine Aminosäure bestimmen. Eine komplexe zellspezifische Regulation sorgt dafür, daß nicht ständig alle Gene einer Zelle abgelesen und in Proteine umgesetzt (*exprimiert*), sondern z.B. über Regulatorproteine (*Aktivatoren* oder *Repressoren*) an- bzw. abgeschaltet werden. Nicht zuletzt aus diesen Gründen sind *DNA-Protein-Wechselwirkungen* von großem Interesse (Repressor-Protein, Zink-Finger, etc.) [Neurath1997].

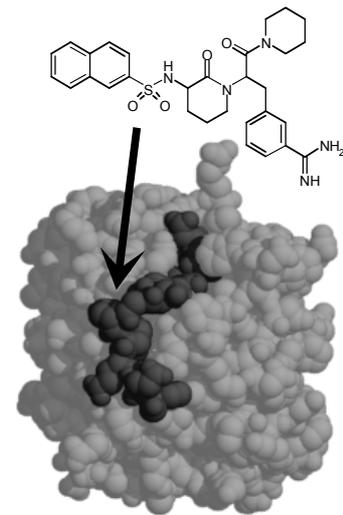
Eine *Sequenz-Analyse* von DNA kann beispielsweise elektrophoretisch mit Sequenziergel, mit markierten Oligomer-Gemischen oder chemisch durch basenspezifische Spaltung, enzymatisch nach Sanger oder im Multiplex-Verfahren durchgeführt werden [Alphay1998]. Besonders elegant ist jedoch die Sequenzierung durch Hybridisierung, wobei man die zu untersuchende DNA auf einem DNA-Chip (definiertes Array immobilisierter DNA-Oligomere mit allen möglichen Sequenzen) hybridisieren läßt [Drmanac1992].

¹⁰ Dieses Enzym katalysiert die Bildung von einsträngiger DNA aus RNA.

2.1.4 Thrombin

Bei Thrombin¹¹ (bzw. Fibrinogenase) handelt es sich um ein Enzym (Serinproteinase) mit einem Molgewicht von 39 kg/mol. In seiner durch Enzymeinwirkung aktivierten Form bildet es einen wichtigen Faktor bei der Blutgerinnung, indem es das lösliche Fibrinogen an zwei spezifischen Sequenzen zum Fibrin-Monomer spaltet, das seinerseits leicht zu einem unlöslichen Fibrin-Gerinnsel polymerisiert. Ein Blockieren oder Deaktivieren der aktiven Bindungsstelle des Thrombins verhindert demnach die Blutgerinnung. Natürliche Inhibitoren sind z.B. Hirudin (Blutegel), Rhodniin und

Ornithodorin. Eine wirksame Inhibierung über eine affine Bindung ist von großem Interesse für pharmazeutische Anwendungen [Stryer1996], [Dodt1995], [Klingler1997]. Die Detektion der Wechselwirkung von Thrombin mit einem potentiellen Inhibitor ist somit auch ein aktuelles Beispiel für die Wirkstoffsuche mit High Throughput Screening (HTS).

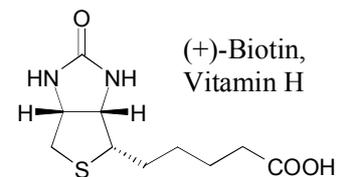


Thrombin mit Inhibitor

2.1.5 Biotin-Avidin

Das System Biotin-Avidin gilt als ein besonders gut charakterisiertes System und wurde ursprünglich für die Verwendung in Immunoassays entwickelt [Berger1993]. Für viele Versuche ist es interessant,

Biotin als eine Art affinen Anker zur Avidin-Komponente zu verwenden. Die Bindungskonstante ist mit 10^{15} L/mol sehr hoch. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Biotinkomponente handelt es sich um ein biotinyliertes Protein-Konjugat (Rinderserumalbumin). Es wurde thermisch vorbehandelt (t-BSA-Bi), also denaturiert und daher „klebrig“. Dies führt zu einer gewissen Aggregation und einer verbesserten Haftfähigkeit auf hydrophoben Oberflächen. Bei einem höheren Markierungsgrad mit Biotin bleiben nach der Anbindung an die Oberfläche stets noch Biotin-Anker frei und man erhält dadurch eine neue, Biotin-reiche Oberfläche.



¹¹ Thrombin 3D-Bild von A. Tulinsky und R. Krishnan 1996, PDB.

Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein (66 kg/mol) aus Hühnereiklar mit vier (lat. avidus = gierig) Bindungsstellen für Biotin. Das bakteriell gebildete Streptavidin (von *Streptomyces avidinii*, 60 kg/mol) weist ebenfalls vier Bindungsstellen zu Biotin mit vergleichbarer Affinität auf. Im Gegensatz zum Avidin ist es nicht glykosyliert und führt zu weniger unspezifischen Bindungsreaktionen. Die Vernetzung mittels Glutaraldehyd führt zu sogenanntem poly-Streptavidin (pSA), welches für heterogene Assays eine erhöhte Stabilität und Schichtdicke aufweist.

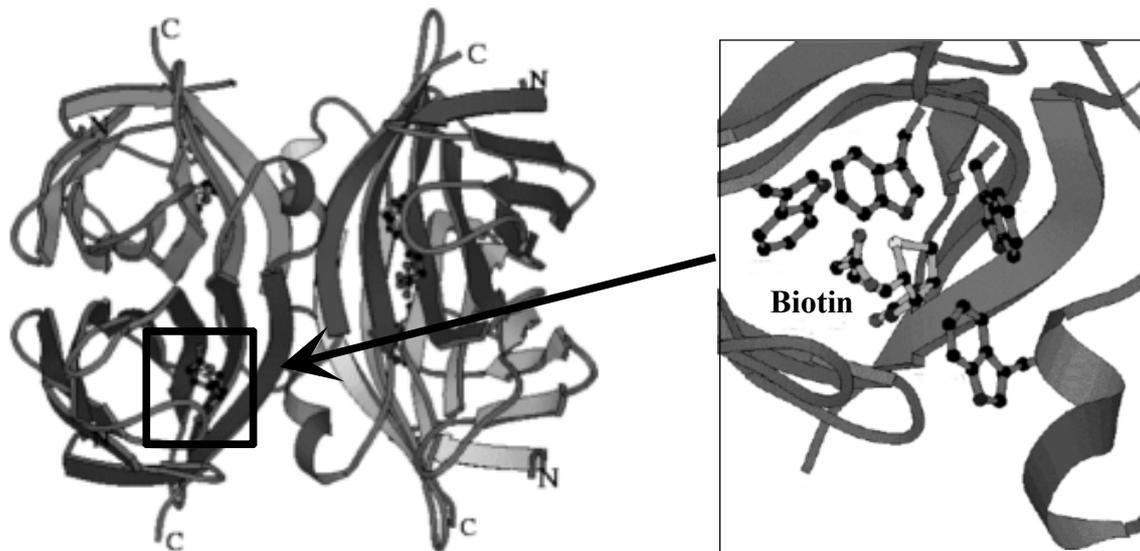


Abb. 3 Tetrameres Streptavidin¹² mit vier gebundenen Biotin-Molekülen und Ausschnittsvergrößerung einer Bindungstasche.

Mit beiden Komponenten t-BSA-Bi und pSA lassen sich alternierende hochstabile Multischichtsysteme erzeugen, welche über einen großen Bereich Doppelschichten mit gleichbleibender Schichtdicke aufweisen, wie z.B. Untersuchungen mit Ellipsometrie und Schwingquarzwage bestätigten [Spaeth1997]. Das System stellt somit ein hervorragendes Werkzeug zur Charakterisierung eines Biosensors dar.

¹² Abbildungen von Dr. S. Freitag, Washington.

2.1.6 Affinitätsassays, heterogene Immunoassays

Der qualitative und quantitative Nachweis eines Analyten kann über einen sogenannten *Affinitätsassay* erfolgen [Price1997]. Dieser nutzt die spezifische Wechselwirkung, beispielsweise zwischen einem Antigen und einem Antikörper (Kap.2.1.2, S.8), einem Ligand und seinem Rezeptor oder zwischen zwei komplementären DNA-Segmenten (Kap.2.1.3, S.9). Antigen bzw. Ligand sind häufig komplexere Biomoleküle (z.B. Proteine), können aber auch niedermolekular sein. Der Vorteil von Affinitätsassays liegt z.B. darin, daß eine aufwendige Aufreinigung und Anreicherung des Analyten entfallen kann, wie sie bei Nachweisverfahren mit chemischen Umsetzungen des Analyten bzw. in der instrumentellen Analytik in der Regel notwendig wären. Diese Selektion zwischen Analyt und Verunreinigung übernimmt gewissermaßen der spezifische Bindungspartner. Affinitätsassays auf der Grundlage der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung werden *Immunoassays* genannt [Hennion1998], [Price1997], [Janeway1997], [Chan1987], [Tijssen1985]. Man unterscheidet markierte und markierungsfreie Verfahren.

Markierungsfreie Verfahren haben in der Regel einen der beiden Bindungspartner an ihrer Oberfläche gebunden, um damit spezifisch den anderen Partner zu detektieren („heterogenes Verfahren“). Aufgrund der direkten Detektion (*Immunosensor*) und der fehlenden Beeinflussung der Affinität durch Marker werden solche Verfahren oft zur Charakterisierung kinetischer oder thermodynamischer Parameter der Wechselwirkung eingesetzt. Vor allem optische Verfahren [Brecht1995, 1997], [Gauglitz1996] haben sich kommerziell etabliert, wie z.B.

- Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, Kap.2.3.2, S.38f) von
 - Biacore, Schweden („BIAcore“),
 - Texas Instruments, Texas („TISPR“) [Woodbury1998] und
 - BioTul, München („Plasmoon“)
- Prismenkoppler (Resonant Mirror) von Affinity Sensors, Cambridge, GB („IASYS“) [Cush1993], [Fortune1993]
- Gitterkoppler von Artificial Sensing Instruments, Zürich, CH („BIOS“) [Tiefenthaler1993], [Polzius1997]

die auf einer Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld beruhen und Änderungen des Brechungsindex nahe der Sensoroberfläche detektieren. Weitere interessante optische Techniken sind z.B.

- Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIFS, Kap.2.3.3, S.43f)
- Ellipsometrie [Striebel1994], [Spaeth1997]
- Mach-Zehnder-Interferometer [Drapp1997].

Verfahren mit markierten Komponenten werden aufgrund ihrer meist geringeren Nachweisgrenzen häufig zur quantitativen Analytik herangezogen. Hierbei trägt mindestens eine der definiert zugegebenen Komponenten des affinen Gleichgewichts einen Marker, der im Anschluß eine quantitative Bestimmung ermöglicht. Bei *homogenen Verfahren* verbleiben alle wechselwirkenden Komponenten in einer (meist flüssigen) Phase. Daher nutzen solche Verfahren, wie z.B. der fluoreszenzbasierte resonante Energietransfer-Immunoassay (FRETIA [Schobel1999b], [Brecht1998b]) oder der Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA) zur Detektion einer affinen Bindung eine Signalmodulation des Markers.

In der Immunanalytik dominieren jedoch aufgrund ihrer einfachen und flexiblen Protokolle *heterogene Verfahren* [Hock1995], bei denen neben der flüssigen Phase zumeist eine feste Phase ins Spiel kommt. Handelt es sich dabei um eine Transduceroberfläche, wie z.B. bei TIRF [Brecht1998a], so kann das Bindungssignal direkt aufgezeichnet werden. Markierte heterogene Verfahren lassen sich unterscheiden in kompetitive und nicht-kompetitive Testformate. *Kompetitiv* sind Verfahren, die ihre maximale Sensitivität im Gegensatz zu nicht-kompetitiven Verfahren mit minimaler AK-Konzentration erreichen [Jackson1986]. Meist wird bei kompetitiven Verfahren eine AK-bindende Substanz (Antigen-/Analyt-Derivat) auf der festen Phase immobilisiert, so daß diese mit der Probe in Konkurrenz um die AK-Bindungsstellen tritt (Inkubation).

Radioaktive Verfahren gehören zu den empfindlichsten immunologischen Testformaten mit einer Nachweisgrenze (nach Vorbehandlung der Probe) von bis zu 10 fmol/L [Chard1990]. Sein klassischer Vertreter ist der heterogene Radioimmunoassay (RIA) [Yalow1960].

Enzymatische Verfahren, wie der ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) [Kemeny1988], aber auch der *Fluoroimmunoassay* (FIA) haben in der Regel Nachweisgrenzen, die um eine Größenordnung höher liegen. Dennoch haben diese Verfahren aus ökonomischen Gründen weitere Verbreitung als

radioaktive Verfahren gefunden. Neben dem sog. „Sandwich-Assay“ ist hier der kompetitive Assay am gebräuchlichsten (s.o.). Das Verfahren beinhaltet üblicherweise mehrere *Spülschritte* oder gar das Überführen der Lösung in eine (nicht-modifizierte) Meßkavität, um den spezifisch an die Wand gebundenen Anteil an Antikörper abzutrennen und den in der flüssigen Phase verbliebenen schließlich über seine Enzymmarkierung (Farbreaktion, ELISA) oder einen Fluorophor (FIA) zu quantifizieren. Der ungebundene AK-Anteil steht in direktem quantitativem Zusammenhang mit dem freien (nachzuweisenden) Analyt, welcher während der Gleichgewichtseinstellung (Inkubation) durch ein Blockieren der Antikörperbindungsstellen die Anbindung des AK an die Wandung verhindert hat. Eine kleinere Nachweisgrenze kann durch *chemiluminisente Verstärkung* (enhanced chemiluminescence, ECL) erzielt werden. So konnte z.B. der Testmittelpunkt (TMP) für einen Atrazin-Assay von 0.8 auf 0.1 µg/L verbessert werden [Samsonova1999]. Schnelltests auf Basis von beschichtetem Papier machen sich die Diffusion der ungebundenen Anteile ins Papierinnere zunutze, sind jedoch gewöhnlich für einzelne Substanzen ausgelegt.

Die zur Trennung zwischen gebundenen und nicht-gebundenen Anteilen verwendeten Waschschrte in all diesen Verfahren bringen verschiedene Nachteile mit sich. Dies ist zum einen die Gefahr der Verschleppung von Substanzen (und damit an Meßsignal) zwischen den Kavitäten. Diese Gefahr wird beim Schritt von der Mikrotiterplatte zu Systemen mit höherer Kavitätendichte („Nanotiterplatte“) immer gravierender. Außerdem entfällt bei einem Transfer der im Gleichgewicht befindlichen Lösungen die Möglichkeit von zeitaufgelösten (kinetischen) Bindungsstudien.

Theoretische Betrachtung eines heterogenen Immunoassays

Die nachfolgenden Betrachtungen lassen sich weitgehend auch auf andere biochemische Systeme, wie z.B. Ligand-Rezeptor übertragen, sollen der Einfachheit halber aber speziell für die Immunanalytik erläutert werden. Eine thermodynamische Betrachtung einer AG-AK-Affinitätsreaktion basiert zunächst auf dem Massenwirkungsgesetz [Bisswanger1994]:



Die Bindungskonstante (Gleichgewichtskonstante) K_{aff} stellt hierbei ein Maß für die Affinität dar und ist mit der Assoziationsratenkonstante (k_{ass}) und der Dissoziationsratenkonstante (k_{diss}) bzw. den Gleichgewichtskonzentrationen des Komplexes c_{AGAK} und der ungebundenen Komponenten $c_{AG,frei}$ bzw. $c_{AK,frei}$ über das Massenwirkungsgesetz verknüpft:

$$K_{aff} = \frac{k_{ass}}{k_{diss}} = \frac{c_{AGAK}}{c_{AG,frei} \cdot c_{AK,frei}} = \frac{c_{AGAK}}{(c_{AG,0} - c_{AGAK}) \cdot (c_{AK,0} - c_{AGAK})} \quad (4)$$

$c_{AG,0}$ und $c_{AK,0}$ sind die eingesetzten Konzentrationen, also vor Einstellung des Gleichgewichts. Die freie Bildungsenthalpie ΔG^0 verhält sich proportional zur Temperatur T und zum Logarithmus der Gleichgewichtskonstante K_{aff} :

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{aff} \quad (5)$$

($R = 8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ist die ideale Gaskonstante). Für biologisch relevante Affinitätsreaktionen liegt ΔG^0 etwa zwischen -20 kJ/mol und -90 kJ/mol. Das entspricht Affinitätskonstanten von 10^4 bis 10^{14} L/mol [Steward1983]. Für kleine Liganden <400 g/mol (z.B. Pestizide) werden aufgrund ihrer geringen Wechselwirkungsfläche nur Affinitätskonstanten bis in die Größenordnung von 10^{10} L/mol beschrieben [Winklmaier1997]. Falls das Antigen über mehrere Epitope gebunden wird, so erhöht sich die Bindungskonstante und man spricht von einer Aviditätskonstanten. Assoziationsratenkonstanten k_{ass} liegen typischerweise zwischen 10^7 und 10^8 L/mol. Dissoziationsratenkonstanten k_{diss} reichen hingegen von 10^{-5} (hochaffin) bis 10^3 L/mol (niedrigaffin) und tragen damit entscheidend zum großen Bereich an Bindungskonstanten bei. Polyklonale Antikörpern weisen als Mischung verschiedener Antikörper-Klone ein verbreitetes Spektrum an Affinitätskonstanten auf. Bei der Interpretation praktischer Ergebnisse mit theoretischen Modellen muß berücksichtigt werden, daß diese Verteilung meist nicht Gauß-förmig, sondern eher einer schiefen oder bimodalen Affinitätsverteilung entspricht. Bei der Bestimmung werden häufig mittlere Affinitäten angegeben [Steward1983].

In Abb. 4 sind in vereinfachter Form alle relevanten Prozesse am Beispiel eines monovalenten Antikörpers (AK, z.B. Fab-Fragment) dargestellt. Für *zeitaufgelöste Verfahren* spielen kinetische Aspekte und somit die Diffusion eine Rolle. Das Meßsignal – z.B. die Anbindung der Antikörper an die Oberfläche – hängt vom Transport der Stoffe durch die Diffusionsschicht ab. Konstante

Konzentrationen oberhalb der Diffusionsschicht (also im Volumen), wie sie durch konstanten Fluß erreicht werden können, vereinfachen diese Betrachtung. Beispiel hierfür ist der Bindungshemmtest, wie er z.B. mit RfS oder SPR praktiziert wird: eine vorinkubierte Lösung aus Analyt (AG) und Antikörper (AK) wird im konstanten Fluß über eine mit Antigen modifizierte Oberfläche gegeben. Aus zeitaufgelösten Messungen lassen sich aufgrund von Bindungsraten und Beladungen thermodynamische Daten wie K_{ass} , kinetische Daten k_{ass} bzw. k_{diss} und natürlich die Analytkonzentration erhalten. Aufgrund der Verfügbarkeit an immobilisiertem Antigen/Analytderivat (AG_{of}) und Rückbindung an die feste Phase sind die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten k'_{ass} und k'_{diss} und damit auch die Gleichgewichtskonstante K_{het} hier im allgemeinen verschieden von denjenigen im Volumen. Detaillierte theoretische Betrachtungen für dieses Verfahren finden sich in [Piehler1997b].

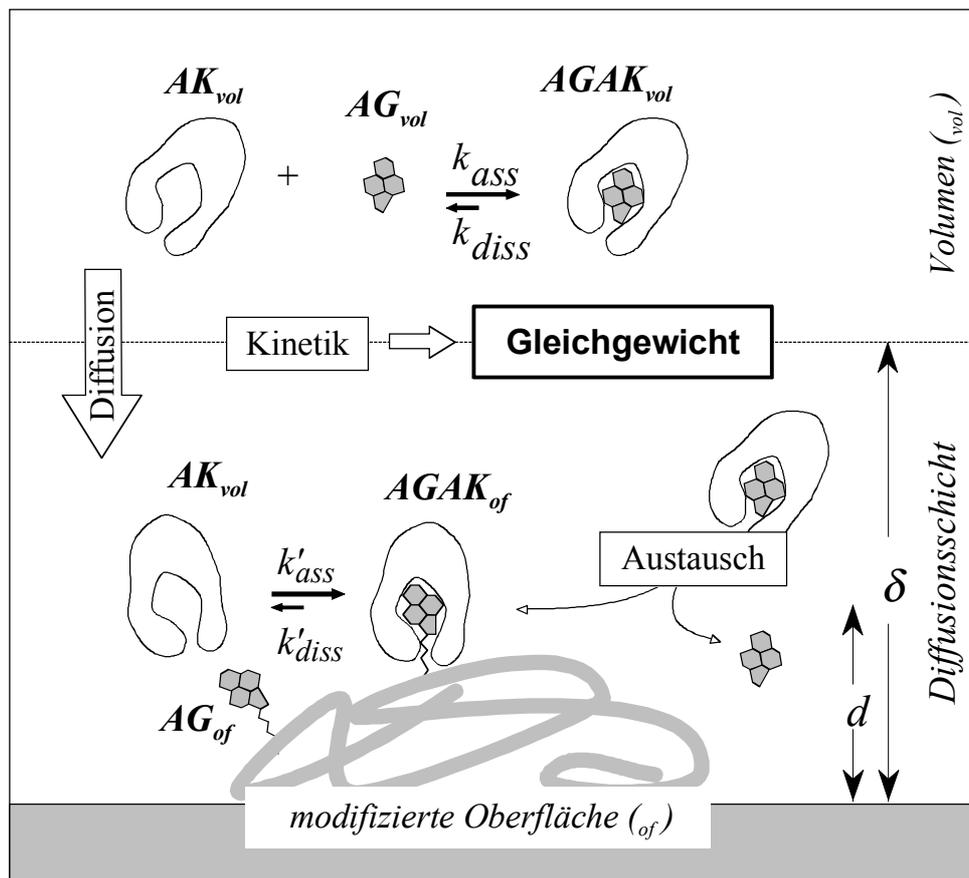


Abb. 4 Schema der Vorgänge bei einem heterogenen Immunoassay.

Für die *fluoreszenzbasierten Untersuchungen* in dieser Arbeit wurden hingegen Systeme im *Gleichgewicht* untersucht. Es handelt sich um ein kompetitives Verfahren analog Abb. 4, bei welchem die (fluoreszenzmarkierten) Antikörper im Volumen detektiert, diejenigen an der Festphase hingegen ausgeblendet

werden. Zur quantitativen Bestimmung eines Analyten mittels eines Immunoassays werden *Kalibrierkurven* der Beziehung von Signal zur Analytkonzentration unter gleichen Bedingungen herangezogen. Bei halblogarithmischer Auftragung haben diese eine sigmoidale Funktion (Abb. 5). Der *Testmittelpunkt* eines Assays gibt die Analytkonzentration an, bei der 50% des Maximalsignals erreicht wird.

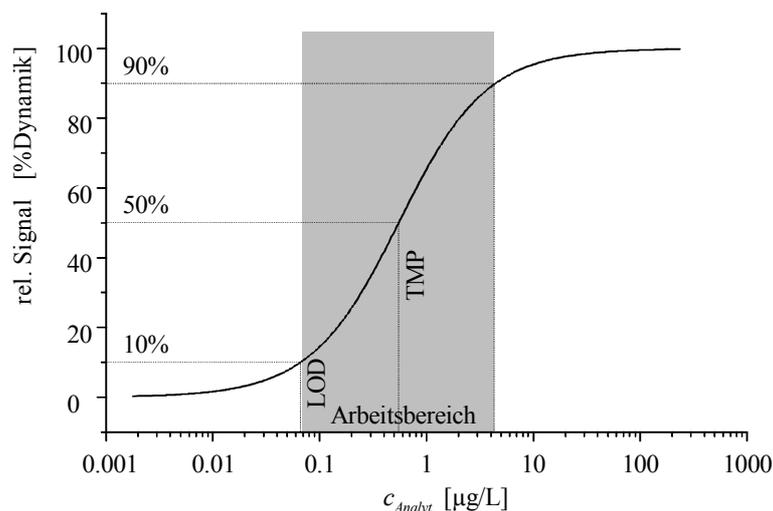


Abb. 5 Beispielhafte Kalibrierkurve des vorgestellten Immunoassays.

Unter dem *Arbeitsbereich* eines Assays versteht man häufig die Analytkonzentrationen im Bereich 10-90% (oft auch 20-80%) des Sensorsignales. Unter der *unteren Nachweisgrenze (limit of detection LOD)* versteht man meist die untere Grenze des Arbeitsbereiches, oft aber auch die Konzentration, die sich auf der Kalibrierkurve aus der dreifachen Standardabweichung (sdv) vom Nullsignal (kein Analyt) ergibt. In dieser Arbeit wird die 10-90%-Definition für den Arbeitsbereich und die 10%-Definition für den LOD verwendet. Unter der *Bestimmungsgrenze* versteht man die 6-fache Standardabweichung des Nullwertes. Zur praktischen Ermittlung des Testmittelpunktes und des Arbeitsbereiches einer Kalibrierkurve bzw. eines Assays, werden die Meßsignale der bekannten Analytkonzentrationen i.a. an eine sogenannte „Logistische Funktion“ [Hock1995] angepaßt:

$$\text{Signal}(\text{Analytkonz.}) = \frac{\text{Min} - \text{Max}}{1 + \left(\frac{\text{Analytkonz.}}{\text{Testmittelpunkt}} \right)^{\text{Steigung}}} + \text{Max} \quad (6)$$

Aus den erhaltenen vier Parametern kann über die Umkehrfunktion der Arbeitsbereich (Signal 10-90%) berechnet werden:

$$\text{Analytkonz.}(\text{Signal}) = \text{Testmittelpunkt} \cdot \left(\frac{\text{Min} - \text{Max}}{\text{Signal} - \text{Max}} \right)^{\frac{1}{\text{Steigung}}} \quad (7)$$

Günstige AK-Konzentrationen liegen bei immunanalytischen Verfahren im allgemeinen bei $1/K_{\text{aff}}$. Kleinere Konzentrationen verschieben den Testmittelpunkt nur noch geringfügig [Hock1995]. In jedem Fall wird durch eine Verringerung der Konzentration an markiertem Antikörper die Dynamik des Tests entsprechend verkleinert. Für eine genauere Analyse der Vorgänge beim verwendeten fluoreszenzbasierten Testformat sei auf Kap.4.4.2 (S.128f) verwiesen.

Assays in Submikrolitervolumina

Ein Assay in Submikrolitervolumina ermöglicht eine hohe Integrationsdichte des Probenträgers. Damit verbunden sind ein hoher potentieller Probendurchsatz bei geringem Reagenzienverbrauch. Im Gegensatz zu konventionellen Techniken für das Mikrotiterplattenformat (MTP, ca. 250 μL) sind die dort üblichen Waschschrte wegen Verschleppung von Substanzen nicht mehr praktikabel. Da Nanotiterplattenformate (NTP) noch keinem Standard entsprechen, müssen auch auf Seiten der Pipettiertechnik, Handhabung und Detektion neue bzw. unkonventionelle Wege eingeschlagen werden. Beim Arbeiten mit Submikrolitervolumina fällt beispielsweise auch eine etwaige Verdunstung beim oder nach dem Befüllen der NTP stark ins Gewicht.

Von Interesse ist demnach ein waschfreier fluoreszenzbasierter heterogener Assay, welcher eine Separierung des Meßsignals von fester oder flüssiger Phase erlaubt (*Phasenseparations-Fluoreszenz-Immunoassay, PSFIA*). Seine Entwicklung ist in Kap. 4.3, S.126f beschrieben. Zur Dosierung solch kleiner Volumina bietet sich die Verwendung einer piezobasierten Mikrodosiervorrichtung an (Kap.2.2.5, S.33f). Verdunstungsprobleme beim Pipettieren lassen sich durch Arbeiten am Taupunkt reduzieren.

2.2 (Ortsaufgelöste) Oberflächenmodifikation für die Affinitätsanalytik

Eine Grundvoraussetzung für die Affinitätsanalytik an Oberflächen ist das Vorhandensein einer *affinen Oberfläche*. Markierungsfreie Verfahren wie RI_fS (Kap.2.3.3, S.43f) oder SPR (Kap.2.3.2, S.38f) detektieren Änderungen der gesamten Oberflächenbelegung. Anbindende Teilchen werden dabei zunächst nicht unterschieden. Durch Ausschließen jeder unspezifischen Wechselwirkung (*UWW*) mit der Oberfläche kann bei der beobachteten Anbindung auf eine spezifische Wechselwirkung (*SWW*) geschlossen werden. Da Teilchen mit potentieller *UWW* nicht durch eine Vorbehandlung („Filtrierung“) der Lösung eliminiert werden können bzw. sollen, muß die Oberfläche für diese abweisend sein. Nur über die eingeführten spezifischen Liganden (z.B. Haptene, also niedermolekulare Antigen-Strukturen) soll die Oberfläche eine (spezifische) Wechselwirkung mit einem entsprechenden affinen Rezeptor (z.B. Antikörper) zeigen. Geringe *UWW* zeigen bekanntermaßen Oberflächen, die z.B. aus Proteinen wie Albumin (BSA oder OVA), Trockenmilchpulver, Polyethylenglykol (PEG) oder Dextran bestehen.

Bei der Modifikation einer Transducer-Oberfläche richtet sich die Strategie in der Regel nach den *Erfordernissen der Detektionsseite* (z.B. optische Eigenschaften) und der zu untersuchenden Proben (Materialbeständigkeit und Wechselwirkungen).

2.2.1 Reinigung und Beschichtung

Eine wichtige Voraussetzung für die Oberflächenmodifikation ist eine eingehende *Reinigung* der Oberfläche. Einfache physikalische Prozesse wie elektromagnetische Strahlung (Laser, UV), thermische Behandlung oder Ultraschall ermöglichen je nach Probenträger eine Reinigung *bzw. erste (chemische) Modifikation*. Chemisch inerte Substrate erlauben zudem den Einsatz von organischen Lösungsmitteln, Tensiden, alkalischen/sauren Lösungen bis hin zu aggressiven Lösungen wie alkalisches oder saures Wasserstoffperoxid (Piranha), welches organisches Material bis zum Kohlendioxid oxidieren kann.

Für das Aufbringen von Substanzen auf den Probenträger steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung [Ulman1991], [Fuchs1991]. Bei Feststoffen kann

man neben dem Aufschmelzen verschiedene Gasabscheidungsverfahren heranziehen, wie z.B. thermisches Aufdampfen, Plasma-CVD (Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition, PECVD) [Unger1991], Laserdesorption oder Sputtertechniken [Brett1997]. Gerne werden Substanzen in gelöster bzw. flüssiger Form verwendet. Einfachste Handhabung versprechen gelöste Substanzen, die beim Kontakt mit der Oberfläche spontan selbstorganisierende Schichten ausbilden (Self Assembly, SA), wie z.B. Thiole auf Gold [Bain1989a, 1989b] oder Polyelektrolyte (Kap.2.2.3, S.28f). Sie erlauben das Übertragen der gelösten Substanz durch einfache Tauchvorgänge, verschiedene Dosiertechniken, Pumpen (FIA-System) oder Stempeln. Unter bestimmten Voraussetzungen läßt sich eine gelöste Substanz auch elektrochemisch durch Elektropolymerisation [Honeybourne1987] auf der Oberfläche abscheiden. Im Gegensatz zu den SA-Schichten sind Langmuir-Blodgett-Techniken (LB, Übertragen eines Oberflächenfilmes) mit hohem apparativem Aufwand verbunden [Speakman1998], [Beisswanger1991], [Braun1988], erzeugen aber hochgeordnete Schichten mit besonderen Eigenschaften, wie z.B. nicht-linear optischem Verhalten (NLO) [Ulman1991].

2.2.2 Einsatz und Modifikation von Polymeren

Verschiedene Punkte machen den Einsatz von Polymeren für die Affinitätsanalytik interessant:

- Erhöhung der Signaldynamik
- effektive Abschirmung der Oberfläche
- einfache Handhabung und Übertragbarkeit auf andere Fragestellungen

Bei den angewandten Untersuchungsmethoden wie RIfS (Kap.2.3.3, S.43) oder SPR (Kap.2.3.2, S.38) ist die Signaländerung i.a. proportional zur Änderung der Oberflächenbelegung. Die **Signaldynamik eines Assays** steigt damit proportional zur affinen Bindungskapazität der Oberfläche. Diese ist abhängig von der

- Belegungsichte und der
- Verfügbarkeit an immobilisierten Liganden.

Die maximale *Belegungsichte* einer Oberfläche mit Ligand ist zunächst durch die Größe des Liganden bestimmt. Da jedoch häufig die zu detektierenden Rezeptoren wesentlich voluminöser sind, ist die *Verfügbarkeit* des immobilisierten Liganden entscheidend. Sie läßt sich durch den Einsatz flexibler

(langkettiger) Spacer (z.B. Polyethylenglykole, PEG) erhöhen. Eine weitere Erhöhung verfügbarer Bindungsstellen läßt sich durch das Einbeziehen der dritten Dimension erzielen, also beispielsweise durch die Verwendung modifizierter dreidimensionaler Polymernetzwerke (z.B. Dextrane).

Der Einsatz solcher Polymere kann neben einer erhöhten Signaldynamik auch für eine effektive **Abschirmung** der ursprünglichen Oberflächeneigenschaften sorgen (s.o.). Sehr gebräuchlich sind hydrogelbasierte Schichtsysteme. Chemisch funktionalisiertes *Dextran* z.B. kombiniert die Eigenschaften einer äußerst geringen UWW mit einer hohen Dichte an verfügbaren funktionellen Gruppen (Signal) [Osterberg1995], [Löfås1995], [Piehler1996b]. Ähnliches gilt auch für die Verwendung von *Proteinen*, deren Aminogruppen sich außerdem hervorragend zur kovalenten Anbindung heranziehen lassen. Die amphoteren Eigenschaften der Proteine ermöglichen eine Adsorption auf hydrophilen bzw. polaren Oberflächen, während die unpolaren Polymeranteile für eine gute Adsorption auf hydrophoben Oberflächen sorgen.

Eine geringe unspezifische Maximalbindung läßt auf eine flächige (homogene) Abschirmung der Transducer-Oberfläche (mit hoher UWW) schließen. Die *Homogenität* einer solchen Polymerschicht läßt sich daher direkt aus der unspezifischen Maximalbindung ablesen.

Je nach Anwendung kann für die Verwendung von Polymeren zwischen zwei Strategien gewählt werden:

- Polymer an die Oberfläche kuppeln, dann mit Ligand modifizieren oder
- Polymer mit Ligand modifizieren, dann an die Oberfläche ankuppeln.

Bezüglich ihrer **Handhabung** bieten Polymere vielfältige Vorteile. Polymer-Ligand-Konjugate können in großen Chargen mit gleichen (charakterisierbaren) Eigenschaften zur Verfügung stehen. Das Polymer bietet eine einheitliche chemische Umgebung. Dadurch werden Kupplungsprotokolle leicht übertragbar, Assays mit verschiedenen Liganden besser vergleichbar und hydrophobe Liganden als Konjugat wasserlöslich. Eine Modifikation des Polymers an der Festphase geht durch die Möglichkeit des Abwaschens meist mit einfachen Protokollen einher und bringt eine hohe Dichte an funktionellen Gruppen (Liganden) mit sich. Interessante Polymere sind auch *Polyelektrolyte* (Kap.2.2.3), die einfachste Immobilisierung und Regeneration versprechen und eine Vielzahl funktioneller Gruppen enthalten.

2.2.3 Kupplungs-Chemie

Der Aufbau von der ursprünglichen Materialoberfläche bis zur spezifisch funktionalisierten Oberfläche kann in unterschiedlichster Weise erfolgen. Eine hohe Flexibilität der ausgearbeiteten Protokolle ist durch den schichtweisen Aufbau aus kleineren (oder größeren) Untereinheiten nach Art des Baukastenprinzips möglich. Mindestens der letzte Schritt sollte variabel für unterschiedliche Liganden sein. Für eine Immobilisierung kommen z.B. in Frage:

- Adsorption (Physisorption) und ionische WW (Polyelektrolyte),
- kovalente Bindung
- affine Wechselwirkung.

Auswahlkriterien für eine Immobilisierungsstrategie können z.B. sein:

- Selektivität der Kupplungschemie
- Stabilität der Bindung bzw. Oberflächen
- Handhabung bzw. Kupplungsprotokoll.

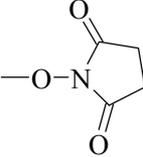
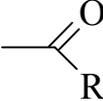
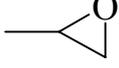
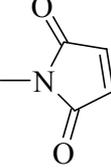
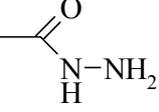
Eine *adsorptive oder ionische Bindung* ist weitgehend unspezifisch und bietet damit einfachste Handhabung und Flexibilität. Unter Regenerationsbedingungen (z.B. Änderung von pH-Wert/Ionenstärke oder der Einsatz chaotroper Lösungsmittel) haben diese Bindungstypen, wie auch die affine Wechselwirkung (s.u.), keine hohe Stabilität.

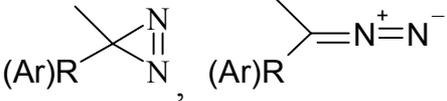
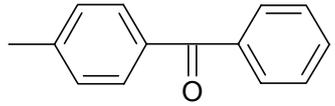
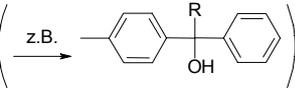
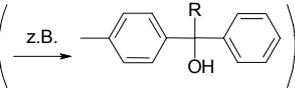
Kovalente Bindungen zeichnen sich in der Regel durch eine besonders hohe Stabilität aufgrund ihrer hohen Bindungsenergie aus (≥ 0.5 eV/Bindung) und bilden die gängigste Variante zur Immobilisierung.

Affine Bindungen setzen sich aus mehreren nicht-kovalenten Bindungstypen zusammen und können aufgrund vieler Wechselwirkungsstellen in ihrer Gesamtstärke einer kovalenten Bindung vergleichbar sein (Kap.2.1.2, S.8). Gleichzeitig zeichnet sich die affine Bindung durch eine im allgemeinen sehr hohe (einstellbare) Selektivität aus. Über eine adsorptive oder affine Bindung (z.B. Avidin/Biotin oder DNA/DNA) kann ein Ligand bequem in situ auf einer (affinen) Oberfläche immobilisiert, regeneriert und wiederum (neu) immobilisiert werden. Die Verwendung affiner Wechselwirkungen zur Immobilisierung ermöglicht durch die große Vielfalt möglicher Bindungspaare (z.B. DNA-Oligomere) die gezielte ortsaufgelöste Belegung eines kompletten affinen Arrays in situ mit unterschiedlichen Liganden in einem einzigen Schritt [Brecht1998c]. Durch selektive Bindungen mittels spezifischer Reaktionen (*affin oder kova-*

lent) besteht außerdem die Möglichkeit einer gezielten *Orientierung* der Liganden.

Durch Festlegen der Rahmenbedingungen gilt es, aus einem nahezu unerschöpflichen Repertoire an Strategien zur Oberflächenmodifikation die praktikablen Wege herauszufiltern und maßzuschneidern. Einige wichtige kovalente Verfahren sind in Tab. 2 zusammengestellt. Eine ausführliche Abhandlung findet sich in [Hermanson1992] und [Hermanson1996].

funktioneller Anker	Reaktionspartner	Reaktion
-SiO ₂ , -TiO ₂ , -HfO ₂	-Si(Cl) _x , -Si(OR) _x	direkt
-Au, -Ag	-SH	direkt
-COOH	-NH ₂	mit Carbodiimid
 (N-Hydroxysuccinimid, NHS)	-NH ₂	direkt
	-NH ₂	reduktive Aminierung mit NaCNBH ₃
-NH ₂	-NH ₂	Glutardialdehyd
 Epoxid	-NH ₂ , -SH, -OH	direkt
 Maleinimid	-SH, -NH ₂	direkt
 Säurehydrazid		direkt
-NH-NH ₂ Hydrazid	mit IO ₄ ⁻ aktiviertes Kohlenhydrat	direkt

funktioneller Anker	Reaktionspartner	Reaktion
—N=N=N^{\pm} Azid,	unspezifisch $\text{—NH, —CH, —OH, —CC, ...}$	$+ \text{UV-Licht/— N}_2$, über Nitren (Singulett oder Triplett)
 Diazirin, Diazoverbindung	unspezifisch $\text{—NH, —CH, —OH, —CC, ...}$	$+ \text{UV-Licht/— N}_2$, über Carben (Singulett oder Triplett)
 Benzophenon	—CH, —CC,  (z.B. )	$+ \text{UV-Licht}$

Tab. 2 Auswahl üblicher kovalenter Kupplungsprotokolle für die Immunanalytik.

Photolinker

Photolinker (vgl. letzten drei Kupplungsmethoden in Tab. 2.) versprechen besonders flexible Immobilisierungsprotokolle, da sie aufgrund ihrer weitgehend unspezifischen Reaktion kaum an das Vorhandensein bestimmter funktioneller Gruppen gebunden sind. Photolinker bieten die Möglichkeit, den Beschichtungsprozeß und die kovalente Verknüpfung mit der Oberfläche zeitlich zu trennen. Speziell bei einer ortsaufgelösten Beschichtung mit verschiedenen Komponenten können diese Eigenschaften von hohem Nutzen sein. Photolinker werden seit etwa 30 Jahren in der Photoaffinitätsmarkierung [Kotzyba-Hibert1995] eingesetzt, um z.B. einen markierten Liganden kovalent an seinen Rezeptor zu binden. Jedoch auch für den Einsatz in der Immunanalytik werden immer wieder Versuche unternommen, Proteine über photoreaktive Gruppen zu immobilisieren [Gao1995], [Barié1998]. Besonders günstig sind Verbindungen, die durch die Anregung mit Licht (oder Wärme) ein inertes Gas wie Stickstoff abspalten, welches sich dem System entzieht. Meistens finden daher *Azide* oder *Diazirine* [Liu1982] Verwendung. Durch Bestrahlung gelangt ein (aromatisches) Azid in einen angeregten Singulettzustand und geht entweder unter Stickstoffverlust in ein Singulett-Nitren über oder durch Interkombination (intersystem crossing, ISC) in ein Triplett-Azid, das sich dann seinerseits unter Stickstoffabspaltung in ein Triplett-Nitren umwandelt. *Singulett-Nitrene* reagieren meist über eine relativ unspezifische Einschubreaktion in NH-, CH-, CC-

Bindungen etc. bzw. mit dem Lösungsmittel. Im Falle einer Umlagerung (Ringerweiterung) werden jedoch auch vergleichsweise selektiv geeignete Nucleophile (z.B. Cystein oder Histidin, nicht aber Hydroxygruppen) an das Azepin gekuppelt. Das *Triplet-Nitren* reagiert über eine kaum vorhersagbare Radikalchemie weiter. Der bevorzugte Reaktionstyp (Triplet oder Singulett) ist abhängig von den Aryl-Substituenten, sowie von der Temperatur (mehr Triplet bei niedrigeren Temperaturen). *Bestrahlt* wird mit Wellenlängen zwischen 300 und 350 nm. Kleinere Wellenlängen führen zur Zerstörung biologischer Proben. So kann es z.B. ab etwa 290 nm zur direkten Quervernetzung einkerniger aromatischer Systeme kommen.

Photolabile Schutzgruppen (z.B. Nitroveratryloxycarbonyl, NVOC) finden z.B. Einsatz in der orts aufgelösten Synthese an Oberflächen, z.B. bei Peptid-Arrays [Fodor1991] oder Nucleotid-Arrays [Lipschutz1999].

Polyelektrolyte

Hinsichtlich der Oberflächenmodifikation bzw. der Immobilisierung von Liganden auf einem Transducer (Kap.2.1.4, S.13f) versprechen Polyelektrolyte eine einfache Handhabung bei möglicherweise hoher Stabilität in normalem Medium und leichter Regenerierbarkeit durch Variation von pH-Wert und Salzkonzentration. Polyelektrolyte sind Polymere, die aufgrund ihrer vielen ionisch dissoziierbaren Gruppen wasserlöslich sind. Man unterscheidet *Poly-säuren*, die unter Protonabspaltung zu *Polyanionen* werden und entsprechend *Polybasen* bzw. *Polykationen*. *Polyampholyte*, wie z.B. Proteine, haben sowohl anionische wie auch kationische Gruppen und werden durch ihren isoelektrischen (neutralen) Punkt gekennzeichnet [Kjellander1996].

Polyelektrolyte finden Aufmerksamkeit z.B. in der Oberflächenmodifikation für biomedizinische Anwendungen [Scranton1995] und (Immuno-)Sensoren [Caruso1997b], [Yang1997]. Polykationen können mit Proteinen (z.B. Rinder-serumalbumin, BSA) anionische Komplexe bzw. Mikrokapseln bilden, die zur Proteinimmobilisierung verwendet werden [Dautzenberg1996b], [Akari1996], [Buchhammer1996]. Durch ihre polyvalente Eigenschaften sind Polyelektrolyte hervorragend geeignet zum Aufbau von Multilayer-Systemen [Dahlgren1996], [Laschewski1996], [Sjöström1996], deren Einzelschichtdicken über viele Lagen hinweg konstant sind [Losche1998], [Laschewski1996]. Interessant ist auch die Beobachtung, daß abwechselnde Polykation/Polyanion-Schichten nicht-lineare optische Eigenschaften (NLO) aufweisen können [Roberts1998]. Neben der

Beschichtung hydrophiler bzw. geladener Oberflächen [Schlenoff1996] eignen sich Polyelektrolyte auch z.B. zur Modifikation von Goldoberflächen [Caruso1997a].

Viele Eigenschaften der Polyelektrolyte, wie Form oder Wechselwirkungskräfte lassen sich mit Hilfe von mathematischen Modellen erfassen [Jönsson1995], [Seidel1996], [Patey1996], [Turq1996]. Polyelektrolyte sind in Lösung infolge der elektrostatischen Abstoßung der ionischen Gruppen meist linear (*rod*) ausgerichtet. In nicht-dissoziierter Form liegen sie dagegen als Knäuelmolekül (*coil*) vor [Muthukumar1987], [Stevens1995], [Alince1996], [Sukhorukov1996]. Beide Formen können in einfacher Weise über den *pH-Wert* reversibel kontrolliert werden. Die ionische Abstoßung in der dissoziierten Form kann jedoch auch durch die *Ionenstärke* in der Lösung vermindert werden. Ein quantitativer Zusammenhang ist über den sogenannten *Debyeschen Abschirmradius* gegeben, der den Abstand zur ionischen Gruppe angibt, innerhalb dessen ihr Feld auf $1/e$ abgefallen ist.

Für verdünnte Elektrolyte aus Ladungsträgern der Teilchensorte i und Ladungszahl z (Ladung $z_i \cdot e_0$) und dem elektrostatischen Potential des Zentralions $\varphi(r)$ gilt für deren Dichteverteilung $n_i(r)$ um ein Zentralion der Ladung Q :

$$n_i(r) = n_i \cdot e^{-\left(\frac{z_i e_0 \varphi(r)}{kT}\right)} \quad (8)$$

Hierbei ist r der Abstand zum Zentralion, n_i die entsprechende Teilchendichte im homogenen System (Konzentration), e_0 die Elementarladung, k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur. Das elektrostatische Potential des Zentralions $\varphi(r)$ erhält man aus der Poisson-Gleichung zu

$$\varphi(r) = \frac{Q}{4\pi\epsilon} \cdot \frac{1}{r} \cdot e^{-\left(\frac{r}{D}\right)} \quad (9)$$

wobei ϵ die dielektrische Konstante der gesamten Phase ($\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$) ist. Der exponentielle Term enthält den *Debyeschen Abschirmradius* D . Für reines Lösungsmittel entfällt dieser Term, der für ein schnelleres Abfallen des elektrostatischen Potentials sorgt. Der Debyesche Abschirmradius sinkt mit steigender Ionenstärke I nach:

$$D = \sqrt{\frac{\epsilon kT}{e_0^2 \sum_i n_i z_i^2}} = \sqrt{\frac{\epsilon kT}{e_0^2 2I}} \quad (10)$$

Mehrwertige Gegenionen bewirken bei Polyelektrolyten eine Vernetzung bis hin zur Ausfällung [Drifford1996], [Ludwig1996]. Die streng stöchiometrische Reaktion von Polybasen mit Polysäuren wird z.B. bei der Polyelektrolyttitration ausgenutzt, bei der sie zu unlöslichen Komplexen reagieren. Damit läßt sich zum Beispiel die Ladungsdichte von gelöstem Polyelektrolyt oder bei Feststoffen (Suspensionen) die Oberflächenladung bestimmen (Zeta-Potential-Messungen) [Dautzenberg1996a], [Hermeier1996].

2.2.4 Immobilisierung von DNA

Analytische *Anwendungen mit immobilisierten Nucleinsäuren* nehmen stark zu und haben große Auswirkungen auf Forschung und Industrie [Wallace1997]. Erfolgreich angewendet wird immobilisierte DNA z.B. in der Affinitätschromatographie von DNA-bindenden Proteinen. Die DNA-Diagnostik durch Hybridisierung wird beispielsweise auch zur Untersuchung von genetischen und Infektionserkrankungen angewandt. Zur Aufklärung der Funktion spezifischer Gene kann sogenannte Antisense-DNA verwendet werden, welche komplementär zur Messenger-RNA (mRNA) ist und daher spezifisch hybridisiert und die Translation hemmt [Sauer1998], [Sauer1999]. Attraktiv ist auch eine Anwendung immobilisierter DNA-Oligomere als Hilfsligandensystem [Brecht1998c], [Barzen1999], wobei der zu immobilisierende Ligand an DNA-Oligomer gekuppelt ist und somit in situ spezifisch (und regenerierbar) an einen (ortsaufgelöst) immobilisierten Gegenstrang hybridisiert.

Die Techniken zur *Immobilisierung* haben sich aus einfachen Blotting Protokollen wie dem Southern-Blot¹³ [Southern1975] oder dem Northern-Blot¹⁴ [Alwine1997] heraus entwickelt, wo eine Nucleinsäuresequenz transferiert, auf einer feste Oberfläche immobilisiert und anschließend mit entsprechenden Sonden (DNA-Sequenzen) inkubiert wird. Heutzutage existieren viele Testformate, welche auf einem umgedrehten Testschema basieren. Dabei werden eine oder mehreren Oligonucleotidsonden immobilisiert, oftmals als ein Muster mit verschiedenen SONDENSEQUENZEN. Nach der Hybridisierung mit einer Probe passender Sequenz findet eine Detektion aufgrund von Markern an der Probe oder

¹³ Ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt und anschließend aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine geeignete Trägermembran aus Nitrocellulose oder Nylon übertragen und dort immobilisiert werden.

¹⁴ RNA-Blot, vom Southern-Blot abgeleitet.

durch Doppelstrang-spezifische Fluoreszenzmarker (z.B. Ethidiumbromid) statt [Lottspeich1998]. *Anwendungen immobilisierter Nucleinsäurearrays* sind von hohem Interesse [Service1998] und reichen von der Analyse von genetischem Polymorphismus [Gingeras1998] oder dem Scannen von Mutationen [Hacia1996] bis hin zum Sequenzieren durch Hybridisierung [Drmanac1992]. Arrays mit unterschiedlichen Oligonucleotidsonden erhöhen den Durchsatz an Proben und Ergebnissen durch die Detektion unterschiedlicher Sequenzen aus einer Probe ohne vorhergehenden Auftrennungsschritt. Auch die Aussagekraft von Hybridisierungsassays kann durch die vergleichende Detektion mit mehreren Sondensequenzen verbessert werden. Immobilisierte Nucleinsäuresonden sind lagerfähig und können unter einfachen Bedingungen regeneriert, also mehrfach verwendet werden.

Nur eine relativ kleine Anzahl an Veröffentlichungen befaßt sich mit adsorptiv immobilisierter DNA, wie beispielsweise auf Hydrogelen [Morozov1996]. [Pang1996] zeigt DNA, welche irreversibel adsorptiv auf Gold immobilisiert wurde, wobei jedoch die Hybridisierung mit dem Komplementärstrang stark beeinträchtigt wurde. Der klassische Ansatz für die Immobilisierung von Nucleinsäuren ist ihre Bindung an Polymermembranen, wie z.B. Nitrocellulosefilter oder Nylon [Zhang1991]. In anderen Methoden wird die Immobilisierung auf modifizierte Goldoberflächen [Chrissey1996b] oder oxidischen Oberflächen wie Glas oder Silizium beschrieben. Während eine ungerichtete Immobilisierung von Nucleinsäuren an aktivierte Oberflächen in einigen Anwendungen ausreichend sein kann, wird eine *kovalente und gerichtete Immobilisierung* im allgemeinen sowohl die Hybridisierungskapazität, als auch die Regenerationsstabilität steigern, was für eine Mehrfachverwendung wichtig ist.

2.2.5 Ortsaufgelöste Oberflächenmodifizierung und Mikrodosierung

Zur Steigerung der Effizienz besteht ein hohes Interesse an immer höherem Probendurchsatz (Parallelisierung) bei möglichst niedrigem Reagenzienverbrauch (Miniaturisierung). Sowohl RfS wie auch spektrale SPR bieten Potential zur Parallelisierung und Miniaturisierung [Brecht1996]. Dies erfordert eine ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation. Dazu stehen etablierte *Kontakttransfer-* und *kontaktlose Verfahren* zur Verfügung. Zu ersteren zählen Verfahren wie Siebdruck (screen printing) [Wang1995], Elastomerstempeln [Martin1998], [Mrkisch1997] und Mikrodosierung über Nadelstempel [Sчена1996]. Kontaktlos funktionieren beispielsweise lithographische Verfahren, die über eine ortsaufgelöste Aktivierung (Belichtung) der Oberfläche die ortsaufgelöste Anbindung einer nachfolgend flächendeckend aufgetragenen Substanz ermöglichen [Lipshutz1999]. Häufig ist es vorteilhaft, Substanzen kontaktlos und ortsaufgelöst auf eine reaktive Oberfläche aufzubringen, beispielsweise mit einer piezobasierten Mikrodosieranlage (s.u.). Das Muster einer solchen Oberflächenmodifikation kann aus einzelnen (separierten) oder überlappenden Spots, aber auch größeren homogenen Flächen bestehen (0.01 bis mehrere mm²) – jeweils verbunden mit einem äußerst sparsamen Reagenzienverbrauch (<100 ng/mm²).

Eine interessante Aufgabe für die ortsaufgelösten Oberflächenmodifikation liegt in der Herstellung hochbelegter multifunktionaler **DNA-Arrays**. Diese können durch eine ortsaufgelöste *Synthese auf dem Chip* hergestellt werden, z.B. mittels photolithographischer Technik [Lipshutz1999] (50 µm Rastermaß). Dabei sind pro Nucleotid-Stufe des gesamten Arrays jeweils vier Kupplungsschritte (je Nucleinsäure einer) nötig. Die Synthese basiert auf Phosphoramidit-Nucleotiden mit einer photolabilen Gruppe. Nach einer ortsaufgelösten photolithographischen Aktivierung wird der gesamte Chip mit einem der vier Nucleinsäurederivate in Berührung gebracht. Der unvollständige Verlauf eines Kupplungsschrittes führt zu Fehlsequenzen, die auf dem Chip verbleiben und somit die maximale Sequenzlänge und die Zuverlässigkeit des Prozesses limitieren. Bei einer Kupplungseffizienz von 90% je Nucleobase ergibt sich für ein 20-mer eine Reinheit von nur 12%. Eine weitere Weg zur ortsaufgelösten Synthese basiert auf dem kontrollierten Aufbringen aktivierter Nucleotide in hydrophobe Kavitäten einer strukturierten Oberfläche [Blanchard1996]. Hierbei limitieren

die Geschwindigkeit und die Ortsauflösung des Transfersystems die maximale Synthesegeschwindigkeit und Dichte des Arrays.

Eine interessante Alternative zur „on-Chip“-Synthese stellt die ortsaufgelöste Immobilisierung *vorbereiteter DNA-Stränge* dar. Eine mögliche Einschränkung bei der Verwendung kompletter Stränge könnte in der maximal handhabbaren Anzahl liegen, jedoch erlaubt diese Technik die Verwendung von DNA-Fragmenten aus einem Vorrat. Die Vorteile liegen in der Verwendung reiner Substanzen und einer damit verbundenen Verbesserung der analytischen Zuverlässigkeit und einer ökonomischeren Herstellung kleiner Arrays mit einer begrenzten Anzahl immobilisierter Sonden. Eine photochemische Immobilisierung von Oligonucleotiden auf optischen Fasern mittels photolithographischer Technik ist in [Healey1997] beschrieben. Durch die abbildende Faser hindurch wird selektiv ein Spot am Faserende beleuchtet und damit aktiviert. Eine mit Aminolinker versehene DNA-Sequenz reagiert an dieser Stelle mit der Oberfläche und wird somit immobilisiert. Die Zeitspanne pro Spot wird in diesem Protokoll mit bis zu 4 Stunden angegeben. Obwohl diese Technik speziell für abbildende Fasern vorgestellt wird, sollte sie auch auf planare Oberflächen erweiterbar sein.

Kontakttransfer- und Mikrokontakt-Drucktechniken lassen sich zum Transfer konstanter Mengen von Oligomer-Lösungen auf eine planare Oberfläche verwenden. Der Transfer von Mustern mittels Elastomer-Stempeln erlaubt Ortsauflösungen von 1 μm [Mrkisch1997] für die Ausbildung von selbstausbildenden Monoschichten von Thiolen auf Gold. Die Herstellung von Biomolekül-Mustern mittels hydrophiler Hydrogel-Stempel für eine Auflösung unter 100 μm ist in [Martin1998] beschrieben. Der Transfer von c-DNA im Nanolitermaßstab mit einem Stift-Array von einer Mikrotiterplatte auf Glas beschreibt [Scheda1996], wobei eine Auflösung von 300 μm , jedoch lediglich eine maximale Oberflächenbelegung von 13 fmol/mm² erzielt wurde.

Piezobasierte Mikrodosierung

Eine Alternative zu den Kontakttransfer-Verfahren bzw. Druckmethoden stellen *kontaktlose Tintenstrahltechniken* [Schober1993] dar. Die Immobilisierung von Nucleinsäuremustern auf oxidischen Oberflächen ist aus mehreren Gründen besonders interessant. Die Chemie für oxidische Oberflächen wie Glas und Silizium ist kompatibel mit der Halbleiterherstellung und folglich auch mit Detektionstechnologien. Solche Oberflächen bieten hervorragende Perspektiven

bezüglich der chemischen Modifikation. Viele Protokolle sind hier bereits etabliert, z.B. solche aus der Entwicklung von Chromatographie-Materialien. Neuere Entwicklungen in der Mikromechanik in Glas oder Silizium geben einen Zugang zu miniaturisierten analytischen Bauteilen [Burns1998], welche Einfluß auf die DNA-Technologie nehmen können. Schließlich bieten glasartige Materialien hervorragende optische Eigenschaften und ermöglichen die Verwendung eines weiten Bereiches optischer Auslesetechniken, angefangen bei Fluoreszenzmethoden bis hin zur markierungsfreien optischen Biosensor-Technologie.

Piezobasierte Dosiersysteme sind vom Tintenstrahldrucker her seit langem bekannt. Dabei wird ein mit Flüssigkeit gefülltes Kapillarsystem über einen elektromechanischen Aktor (Piezokristall) mit einem kurzen Druckpuls beaufschlagt. Dieser Druckpuls pflanzt sich durch die Flüssigkeit fort und führt an einer gegen Luft geöffneten Düse (30-100 µm Durchmesser) zu einer Beschleunigung der Flüssigkeit bis zu 100 000 g. Aufgrund der Ausströmung und der geringen Kompressibilität der Flüssigkeit wird diese wieder abgebremst. Trägheit und Oberflächenspannung der Flüssigkeit führen zu einer Abschnürung eines kleinen Tröpfchens mit einer Fluggeschwindigkeit von 2 (bis 5) m/s [Döring1991], [Microdrop1999]. Das Tropfenvolumen hängt neben dem Düsendurchmesser (30-100 µm) auch von Spannungshöhe und Dauer des Spannungspulses am Aktuator und der Viskosität der Flüssigkeit ab. Erzielbare Tropfenvolumina liegen je nach Düse etwa zwischen 15 und 1000 pL. Ein solches System stellt die Basis der Mikrodosierung in dieser Arbeit dar (Kap.3.5.1f, S.67f).

Kommerzielle Alternativen zu dem System von Microdrop mit einer runden Glaskapillare (Norderstedt) [Schober1993, 1997] stellen das baugleiche System für den Life-Science-Bereich von Canberra-Packard (Dreieich) [Frittrang1998] oder das siliziumgeätzte System der Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme (GeSiM, Großerkmannsdorf, Kap.3.5.3, S.70) [Fischer-Frühholz1997, 1998] dar. Ein piezobasiertes Mikrodosiersystem läßt sich auch als Durchflußsystem konzipieren. Dabei befindet sich die Dosieröffnung in einer Durchflußkammer direkt gegenüber einer vom Piezokristall verformbaren Membran [Nilsson1996], [Önnerfjord1998].

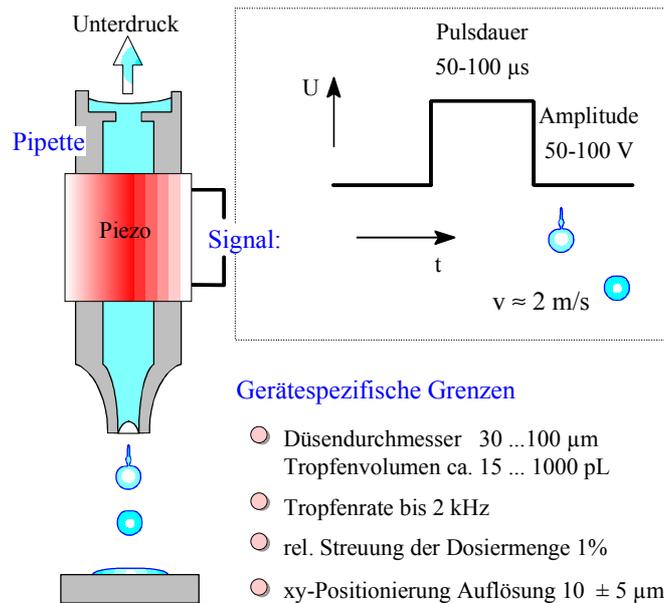


Abb. 6 Schematische Darstellung eines piezobasierten Mikrodosiersystems (am Beispiel der Firma Microdrop, Norderstedt).

Voraussetzung zum Pipettieren mit einer Mikrodosieranlage ist eine *Newtonsche Flüssigkeit*. Das bedeutet, daß die Flüssigkeit sofort bei Krafteinwirkung zu fließen beginnt und ihre Viskosität unabhängig vom Spannungs- bzw. Deformationszustand ist, sowie daß ihr Fließverhalten nicht stark temperaturabhängig ist. Dies ist bei Polymer-Konzentrationen bis 1% (10 mg/mL) in jedem Fall gewährleistet. Sehr kleine Flüssigkeitstropfen erfahren aufgrund ihrer Oberflächenspannung eine *Dampfdruckerhöhung*, die nach der *Kelvin-Gleichung* antiproportional zu ihrem Durchmesser ist. Sie wirkt sich allerdings bei einem Radius von 0.1 μm erst mit 1% aus [Atkins1988]. Die Verdunstung kleiner Tröpfchen auf einer Oberfläche geht zunächst bei konstantem Radius und linear abnehmendem Kontaktwinkel und Tropfenhöhe vonstatten. Dabei tritt aufgrund der Oberflächenspannung ein Fluß von Materie von der Tropfenmitte zur Kontaktlinie ein [Rowan1997]. Die Gravitationskraft spielt bei solchen Tropfenradien, die wesentlich kleiner als die Kapillarlänge sind (2.7 mm für ein Wasser-Luft-System bei 20°C), keine Rolle.

2.3 Optische Detektion

2.3.1 Maxwellgleichungen und Brechungsindex

Die vollständige Beschreibung einer elektromagnetischen Welle ist mit Hilfe der folgenden vier vektoriellen Größen möglich; nämlich des elektrischen Feldes E , der magnetischen Induktion B , der dielektrischen Verschiebung D und des magnetischen Feldes H . Diese vier Größen werden über die Maxwell-Gleichungen verknüpft, welche die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen beschreiben [Bergmann1992], [Kittel1993]. Bei Berücksichtigung der Dielektrizitätskonstanten ε und der magnetischen Permeabilität μ wird außerdem ein Zusammenhang der Größen D und H mit E und B hergestellt:

$$D = \varepsilon \cdot E = E + 4\pi \cdot P \quad (11)$$

$$B = \mu \cdot H \quad (12)$$

mit P als dielektrischer Polarisierung. Beide Größen ε und μ sind materialspezifisch und im Vakuum gleich eins. In isotropen Medien handelt es sich hierbei um Skalare, wohingegen sie in anisotropen Medien als Tensoren beschrieben werden müssen. Letzteres gilt auch für die elektrische Leitfähigkeit σ , die den Zusammenhang zwischen Stromdichte j und elektrischer Feldstärke E beschreibt:

$$j = \sigma \cdot E \quad (13)$$

Im Falle nicht-absorbierender Medien ist $\sigma = 0$ und somit auch die Stromdichte $j = 0$. Aus den Gleichungen (11) und (12) und den Maxwellgleichungen erhält man (Details siehe [Stemmler1995])

$$E = E_0 \cdot e^{i \cdot (k x - \omega t)} \quad (14)$$

$$B = B_0 \cdot e^{i \cdot (k x - \omega t)} \quad (15)$$

Hierbei sind k der komplexe Wellenzahlvektor ($k = \frac{2\pi}{\lambda}$), x der Ortsvektor und ω die Winkelgeschwindigkeit ($\omega = 2\pi \cdot \nu$). Damit läßt sich die sogenannte *Dispersionsrelation* für den Wellenzahlvektor k bestimmen:

$$k^2 = \varepsilon \cdot \mu \cdot \left(1 + i \cdot \frac{4\pi \cdot \sigma}{\varepsilon \cdot \omega} \right) \cdot \frac{\omega^2}{c^2} \quad (16)$$

mit c als Lichtgeschwindigkeit im Vakuum. Eine elektromagnetische Welle wird in der Optik auch über den komplexen Brechungsindex $\tilde{n} = n_{\text{Re}} - i \cdot n_{\text{Im}}$ beschrieben, wobei n_{Re} der Realteil und n_{Im} der negative Imaginärteil sind:

$$\tilde{n}^2 = \varepsilon \cdot \mu + i \cdot \frac{4\pi \cdot \sigma \cdot \mu}{\omega} \quad (17)$$

Auch die Dielektrizitätskonstante ε (DK) ist eine komplexe Größe $\tilde{\varepsilon} = \varepsilon_{\text{Re}} + i \cdot \varepsilon_{\text{Im}}$, für die gilt:

$$\tilde{\varepsilon} = \varepsilon_{\text{Re}} + i \cdot \frac{4\pi \cdot \sigma}{\omega} \quad (18)$$

Daraus folgt $\tilde{n}^2 = \tilde{\varepsilon} \cdot \mu$. Für nicht-ferromagnetische Stoffe läßt sich in sehr guter Näherung $\mu = 1$ setzen, wodurch vereinfacht werden kann:

$$\tilde{n}^2 = \tilde{\varepsilon} \quad (19)$$

Für die komplexe Dielektrizitätskonstante und somit auch für den komplexen Brechungsindex gilt, daß der Realteil die Dispersion beschreibt. Der imaginäre Anteil hingegen ist bei Absorption von Null verschieden und liefert somit ein Absorptionsspektrum. Im Absorptionsfall ist daher auch die Intensität I eines an einer Phasengrenze zum optisch dünneren Medium hin reflektierten Strahls eine Funktion des Imaginärteils der DK:

$$I \sim |E|^2 \sim e^{-\frac{2\omega \cdot \varepsilon_{\text{Im}}}{c} \cdot d} \quad (20)$$

Die Größe $\frac{2\omega \cdot \varepsilon_{\text{Im}}}{c}$ wird häufig als Absorptionskoeffizient β eines Materials bezeichnet, so daß $I \sim e^{-\beta \cdot d}$ ist.

2.3.2 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Einführende Beschreibung des Phänomens

Im Metall können Leitungselektronen zu einer kollektiven longitudinalen Schwingung angeregt werden. Das Quant einer solchen *Plasmaschwingung* wird als Plasmon bezeichnet. Man unterscheidet Volumenplasmonen und die niederenergetischeren Oberflächenplasmonen. Aufgrund der Stetigkeitsbedingung von Feldern an Grenzflächen, fällt das elektrische Feld eines Oberflächenplasmons im Medium nicht sofort auf Null ab, sondern fällt erst im Medium exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche ab. Die Reichweite dieses sogenannten evaneszenten Feldes liegt in der Größenordnung der Wellenlänge. Ein Dielektrikum innerhalb dieser Reichweite führt zu einer Rückkopplung mit dem Evaneszenzfeld der Plasmaschwingung und somit zu einer Änderung der Anregungsbedingung (Resonanzfrequenz) für das Plasmon. Oberflächenplasmonen können unter Lichtabstrahlung oder Umwandlung in Wärmeenergie deaktiviert werden [Hellwege1988].

Bei der Anregung über reflektierte Photonen am Prisma ist der elektrische Feldvektor der ankommenden Welle entscheidend. Dessen evaneszentes Feld kann mit elektrischen Feldern innerhalb seiner Eindringtiefe wechselwirken und somit ein Plasmon anregen. Der charakteristische Intensitätsverlust, den der reflektierte Lichtstrahl hierbei erfährt, wird schließlich detektiert [Orlowski1976], [Raether1977], [Raether1988].

In der Otto-Konfiguration [Otto1968] koppelt das Evaneszenzfeld der Totalreflexion direkt in die Plasmaschwingungen einer etwa 300 nm entfernten Metalloberfläche ein und regt so dort ein Plasmon an. Aufgrund des sub-mikrometerdicken Probenraums ist diese Konfiguration für Bindungsmessungen und kontinuierliche Meßverfahren (Flußzelle) nicht geeignet.

Alle gängigen SPR-Varianten basieren deshalb auf der sogenannten *Kretschmann-Anordnung* [Kretschmann1968, 1971], bei welcher sich ein sensitiver etwa 50 µm dicker Metallfilm direkt auf der Prismenoberfläche befindet (Abb. 7). Ein solcher Transducer, bestehend aus einer goldbeschichteten Glas- oder Kunststoffoberfläche, kann in einfacher Form mit dem Analyt kontaktiert bzw. mit einer Flußzelle kombiniert werden.

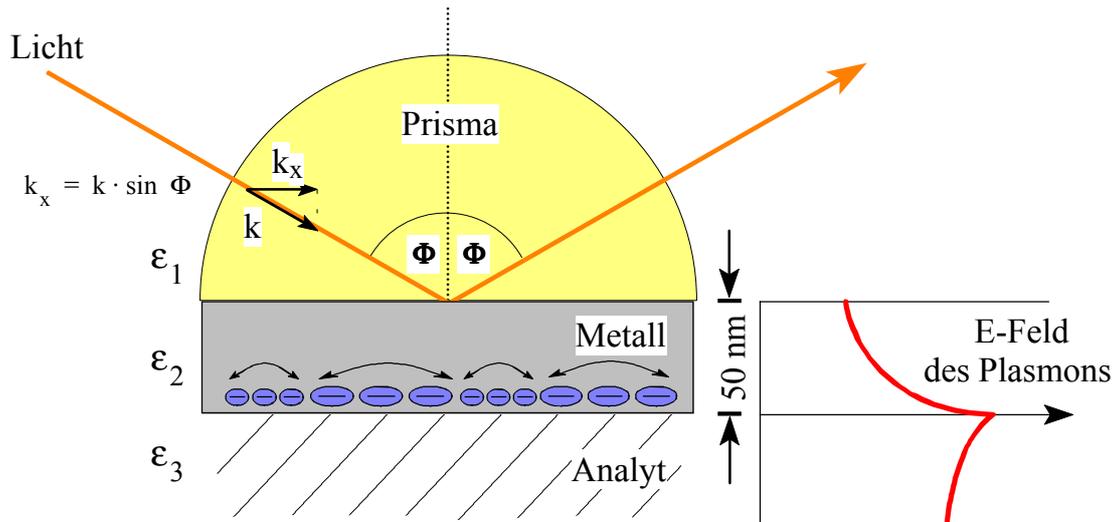


Abb. 7 Kretschmann-Anordnung

Die Notwendigkeit eines Prismas läßt sich aus den Dispersionsrelationen für Licht und Oberflächenplasmonen erklären, also Abhängigkeit des Impulses von der Energie. Die *Dispersionsrelation für Licht* im Vakuum ist definiert durch:

$$\omega = k \cdot c \quad (21)$$

Für die Anregung eines Oberflächenplasmons ist lediglich die Impulskomponente parallel zur Oberfläche (x -Richtung) entscheidend:

$$k_x = k \cdot \sin \Phi = \frac{\omega}{c} \cdot \sin \Phi \quad (22)$$

Für ein Oberflächenplasmon ergibt sich eine Dispersionsrelation, die von der (wellenlängenabhängigen) Dielektrizitätskonstanten (vgl. Gl. 19) des Puffers beeinflusst wird:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_{\text{Metall}} \cdot \epsilon_{\text{Analyt}}}{\epsilon_{\text{Metall}} + \epsilon_{\text{Analyt}}}} \quad (23)$$

Da sich die Dispersionsrelationen für Licht und Plasmon nicht schneiden (Abb. 8), kann aufgrund des Energie- und Impulserhaltungssatzes keine Anregung stattfinden. Im Prisma hat Licht im Vergleich zum Vakuum höhere Impulseigenschaften:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sin \Phi \cdot \sqrt{\epsilon_{\text{Prisma}}} = \frac{\omega}{c} \cdot \sin \Phi \cdot n_{\text{Prisma}} \quad (24)$$

An der Phasengrenze Metall/Prisma ändern sich die Impulseigenschaften von Licht und Plasmon annähernd gleich stark mit dem Brechungsindex des Prismas, weshalb hier kein Plasmon angeregt werden kann. Die außenliegende Metalloberfläche weist hingegen die unveränderte Dispersionsrelation für ein Oberflächenplasmon auf. Die erhöhten Impulseigenschaften des prismengeführtes Licht werden auch in dessen Evaneszenzfeld weitergeführt. Dieses kann somit in die Fluktuationen des elektrostatischen Feldes der Plasmaschwingung auf gegenüberliegenden Metalloberfläche einkoppeln und damit ein Plasmon anregen (Abb. 8). Zur Anregung des Oberflächenplasmons wird dem einstrahlten Energiespektrum eine charakteristische (Resonanz-)Energie entzogen. Durch Dielektika an der Oberfläche verschiebt sich diese Energie aufgrund der Wechselwirkung mit dem Evaneszenzfeld des Oberflächenplasmons. SPR gehört demnach zur Gruppe der *ATR-Methoden* (Attenuated Total Reflection), welche den Intensitätsverlust totalreflektierten Lichtes durch eine Wechselwirkung seines Evaneszenzfeldes detektieren.

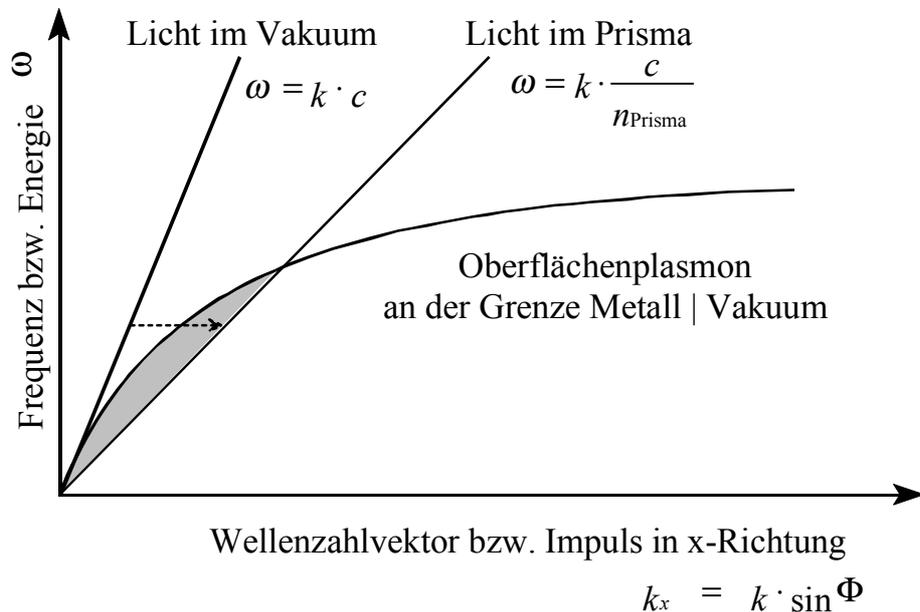


Abb. 8 Dispersionsrelation von Licht und Oberflächenplasmon

Beim Übergang von einer idealen (glatten) zu einer *rauen Oberfläche* kommt es zur Diskretisierung und Verschiebung von Zuständen. Effekte, wie Streulicht, Lichtemission und Dämpfung führen zu einer Verbreiterung des Plasmons und einer Erhöhung der minimalen Reflektivität [Fischer1989].

Oberflächenplasmonen lassen sich über eine Lösung der Dispersionsrelationen oder der Fresnel-Gleichungen quantitativ beschreiben. Letztere beschreiben die Reflexionskoeffizienten an Grenzschichten für polarisiertes Licht. Man erweitert das Problem dabei auf ein Mehrschichtsystem unter Berücksichtigung der imaginären Anteile der Dielektrizitätskonstanten. Der Ansatz ist aufgrund seines einfachen iterativen Aufbaus leicht um entsprechend viele Schichten erweiterbar und man erhält den spektralen Verlauf eines Plasmons.

Die mathematische Beschreibung der Dispersionsrelation für Oberflächenplasmonen orientiert sich an der physikalischen Beschreibung der Plasmonen und ist daher für idealisierte Systeme sehr anschaulich. Resonanz tritt für den Fall auf, daß der Impuls des anregenden Lichtes und der des Plasmons übereinstimmen. Betrachtet wird jedoch nicht der spektrale Verlauf, sondern nur die Resonanzstelle als solche. Kompliziertere Schichtsysteme lassen sich nur noch numerisch lösen. Eine ausführlichere mathematische Beschreibung beider Ansätze findet sich in [Stemmler1995].

SPR-basierte Systeme

Eine der wichtigsten kommerziellen Anwendungen von SPR ist die markierungsfreie Beobachtung biomolekularer Wechselwirkung mit einer modifizierten Sensoroberfläche [O'Shannessy1993]. Der lokalen Brechungsindex erhöht sich während der Anbindung, wodurch der Bindungsvorgang in Echtzeit erfaßt werden kann.

Das marktführende Instrument „BIAcore“ (von Biacore AB, Schweden) arbeitet mit monochromatischer Anregung und winkelaufgelöster SPR [Löfås1991], [Nussenzweig1995]. Die einfallende Strahlung besteht aus einem Winkelsegment monochromatischen Lichtes, das reflektierte Winkelsegment wird auf eine Diodenzeile abgebildet (Abb. 9A).

Aufgrund der Ortsauflösung des Signals ist mit diesem Aufbau keine fernabfragbare Detektion z.B. per Lichtleiter möglich. Das ausgereifte BIAcore 2000 System erreicht unter hochgenauer Temperaturkontrolle eine Detektionsgrenze von etwa 1 RU („resonance unit“) bzw. 10^{-6} für die Änderung des Volumenbrechungsindex. Eine Antwort von 1000 RU bzw. eine Verschiebung des Resonanzwinkels um 0.1° entspricht nach [Pharmacia1995] einer Änderung von 1 ng/mm² bezüglich einer Proteinbedeckung des Sensors bzw. einer Änderung im Volumenbrechungsindex von $9 \cdot 10^{-4}$ [Stenberg1991].

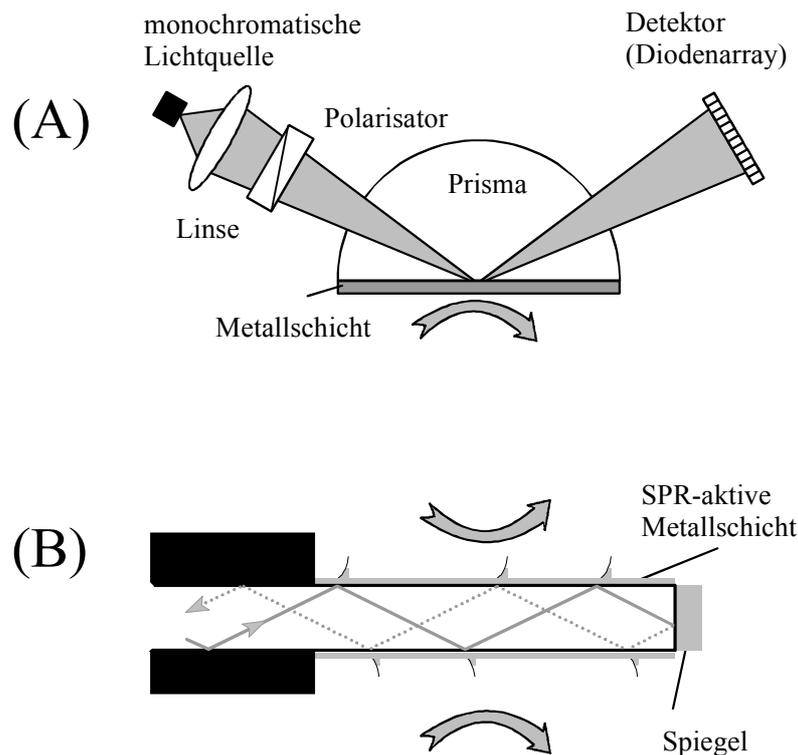


Abb. 9 (A) Winkelaufgelöster SPR-Aufbau mit polarisiertem Licht. Anregungs- und Detektionseinheit können nicht örtlich getrennt werden. (B) Ein Faseroptischer Sensor wird mit polychromatischem Licht betrieben. Die Geometrie des Transducers begrenzt eine effektive, definierte Probenhandhabung.

Bis jetzt ist lediglich ein kommerziell erhältliches System in Form eines Eintauchsensors erhältlich (Abb. 9B) [Jorgenson1991]. Polychromatisches Licht wird in einer Faser geführt, deren Ende verspiegelt ist. Ein abgemanteltes Stück (meist ebenfalls am Ende) ist mit SPR-aktiven Metall beschichtet. Moden, welche unter T_M -Bedingungen auftreten, sind in der Lage Oberflächenplasmonen anzuregen und rufen damit ein charakteristisches Minimum im Spektrum des reflektierten Lichtes hervor. Mit dieser Anordnung wurden Änderungen im Volumenbrechungsindex von $4 \cdot 10^{-5}$ [Katerkamp1995] bzw. eine Detektionsgrenze von $1 \mu\text{g/mL}$ einer Proteinlösung mit hoher Affinität zur entsprechend modifizierten Transduceroberfläche erzielt [Biacore1997]. Pro Faser wird mit diesem Gerät jeweils nicht mehr als ein Bindungsexperiment durchgeführt. Aus geometrischen Gründen wird eine reproduzierbare Probenhandhabung für diesen per Lichtleiter fernabfragbaren Sensor nur schwer erzielt, was auch seine Effektivität begrenzt.

Messungen an Lipidmembranen [Striebel1994] mit Spektraler SPR [Orlowski1976] waren Ausgangspunkt für eine Erweiterung der Meßtechnik auf

biomolekulare Wechselwirkungen mit FIA und einer Charakterisierung des Systems [Stemmler1995]. Der verwendete Laboraufbau (Aufbau I, Abb. 21) basiert auf einer optischen Bank. Linear polarisiertes gebündeltes Licht (T_M) wird unter festem Winkel in ein Halbrundprisma geleitet. Senkrecht polarisiertes Licht (T_E) wird zum Referenzieren verwendet. Bei der Anregung eines Plasmons wird ein Minimum der Reflektivität (T_M/T_E) für eine bestimmte Wellenlänge erhalten (SPR-Wellenlänge). Dieser Grundaufbau weist eine planare Geometrie des Sensors auf, wobei der Einsatz von Lichtleitern eine Trennung des Transducers von Lichtquelle und Detektionseinheit ermöglicht. Obwohl es sich um einen relativ voluminösen Aufbau handelt, vereint er bereits Vorteile von winkelaufgelösten und faserbasierten Ansätzen. In dieser Arbeit soll das Potential bezüglich der Miniaturisierung dieses Aufbaus durch Reduzierung optischer Komponenten in Anzahl und Komplexität in zwei Schritten gezeigt werden (Abb. 21).

2.3.3 Reflektometrische Interferenz Spektroskopie (RIFS)

Ähnlich der SPR kann auch mit RIFS das Anbinden von Substanz markierungsfrei detektiert werden [Gauglitz1993], [Piehler1997a]. Dazu wird weißes Licht durch eine auf einem Glasträger aufgebrachte planparallele Interferenzschicht geschickt (Abb. 10A). Bei senkrechtem Lichteinfall gilt an jeder Grenzfläche nach den Fresnel-Gleichungen ein einfacher Zusammenhang zwischen einfallender (I_0), reflektierter (I_r) und transmittierter (I_t) Intensität und den Brechungsindices n_0 vor und n_1 nach der Grenzfläche, also z.B.:

$$I_{r1} = I_0 \cdot \left(\frac{n_0 - n_1}{n_0 + n_1} \right)^2 \quad \text{bzw.} \quad I_{t1} = I_0 \cdot \left(\frac{2n_0}{n_0 + n_1} \right)^2 \quad (25)$$

Die Dicke der Interferenzschicht liegt im Bereich der Kohärenzlänge des Lichtes. Dadurch können die von Ober- und Unterseite der Interferenzschicht reflektierten Teilstrahlen *interferieren*. Deren Gesamtreflektivität R ergibt sich aus den Fresnel-Gesetzen über die Reflexionskoeffizienten r_1 (Phasengrenze 0|1) und r_2 (Phasengrenze 1|2) der beiden reflektierten Teilstrahlen und der Phasenverschiebung δ zu:

$$R = \frac{r_1 + r_2 e^{-i 2\delta}}{1 + r_1 r_2 e^{-i 2\delta}} \quad (26)$$

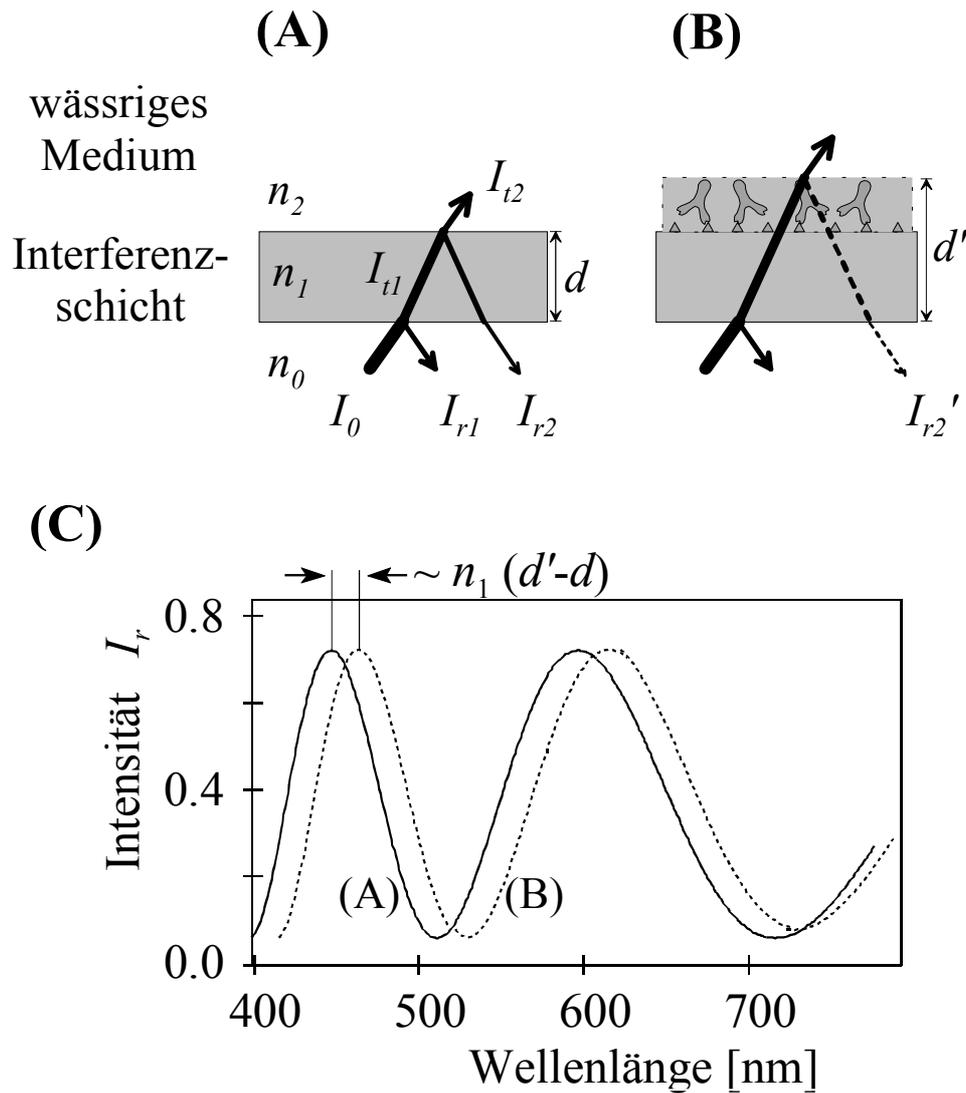


Abb. 10 Reflexion an der Interferenzschicht ohne (A) und mit (B) gebundenem Material und resultierendes Interferenzspektrum (C). Im Standard-Aufbau ist der Lichteinfall senkrecht.

Bei kleinen Reflexionskoeffizienten wird der Nenner näherungsweise 1. Die optische Weglänge durch die Interferenzschicht entspricht im senkrechten Fall genau der zweifachen *optischen Schichtdicke* $n_1 d$. Die Phasenverschiebung ergibt sich zu $\delta = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot n_1 d$ und für die Intensität der reflektierten Strahlung gilt dann

$$I = I_0 (r_1^2 + r_2^2 + 2r_1 r_2 \cos(2\delta)) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} \cdot n_1 d\right) \quad (27)$$

Dadurch ergibt sich eine wellenlängenabhängige Intensitätsmodulation (Abb. 10C). Maxima der Ordnungen $m = \{1, 2, 3, \dots\}$ ergeben sich, wenn die optische Weglänge genau ein vielfaches der physikalischen Weglänge ist, also

$$2 n_1 d = m \cdot \lambda \quad (28)$$

Für Minima gilt entsprechendes mit halbzahlgiger Ordnung $m = \{0.5, 1.5, 2.5, \dots\}$. Zur Bestimmung der optischen Schichtdicke muß demnach die Ordnung eines Extremwertes bekannt sein. Diese läßt sich aus den Wellenlängen zweier benachbarter Extrema berechnen durch

$$2 n_1(\lambda) d = m_1 \lambda_1 = m_2 \lambda_2 = (m_1 + \Delta m) \lambda_1 \quad \text{bzw.} \quad m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)}.$$

Eine immobilisierte (biologische) Schicht (Abb. 10B) mit ähnlichem Brechungsindex wie die Interferenzschicht führt zu einer Erhöhung ihrer optischen Schichtdicke und somit zu einer Verschiebung des Interferenzmusters (Abb. 10C). Aus (28) folgt ein linearer Zusammenhang zwischen einer Änderung der optischen Schichtdicke und der Verschiebung der Extremwertwellenlänge.

Die zeitlich kontinuierliche Aufnahme der Interferenzspektren ermöglicht eine zeitaufgelöste Beobachtung von Bindungsvorgängen. Durch den Verzicht auf Markermoleküle bleibt die bioaffine Wechselwirkung unbeeinflusst. Glas als Grundmaterial der Transducer bietet *einfache Modifikationsmöglichkeiten* mit funktionalisierten Silanen bei einfacher kompletter Regenerierbarkeit (z.B. in saurem Wasserstoffperoxid). Dies ist als Vorteil gegenüber der Oberflächenplasmonenresonanz zu sehen, deren Goldschichten keine vergleichbare Stabilität aufweisen. Zudem besteht bei RIfS *kaum ein Einfluß der Temperatur* auf das Meßergebnis. Die Erniedrigung des Brechungsindex mit steigender Temperatur wird in der Regel kompensiert durch eine Erhöhung der Schichtdicke, so daß die optische Schichtdicke $n \cdot d$ konstant bleibt. So lassen sich mit RIfS auch ohne Thermostatisierung Änderungen von pg/mm^2 detektieren [Piehler1996a].

2.3.4 Absorption, Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung

Trifft Licht geeigneter Wellenlänge auf ein Molekül, so kann es absorbiert werden. Unter gewissen Voraussetzungen emittiert dieses Molekül wieder ein Photon gleicher oder geringerer Energie (Rotverschiebung). Man spricht im allgemeinen Fall von Luminiszenz, die sich je nach Natur des Prozesses in Fluoreszenz (10^{-10} bis 10^{-7} s nach Anregung) und Phosphoreszenz ($>10^{-3}$ s)

unterteilt. Die Gesamtheit der Vorgänge läßt sich im Jablonski-Termschema [Gauglitz1983], [Jablonski1935] verdeutlichen.

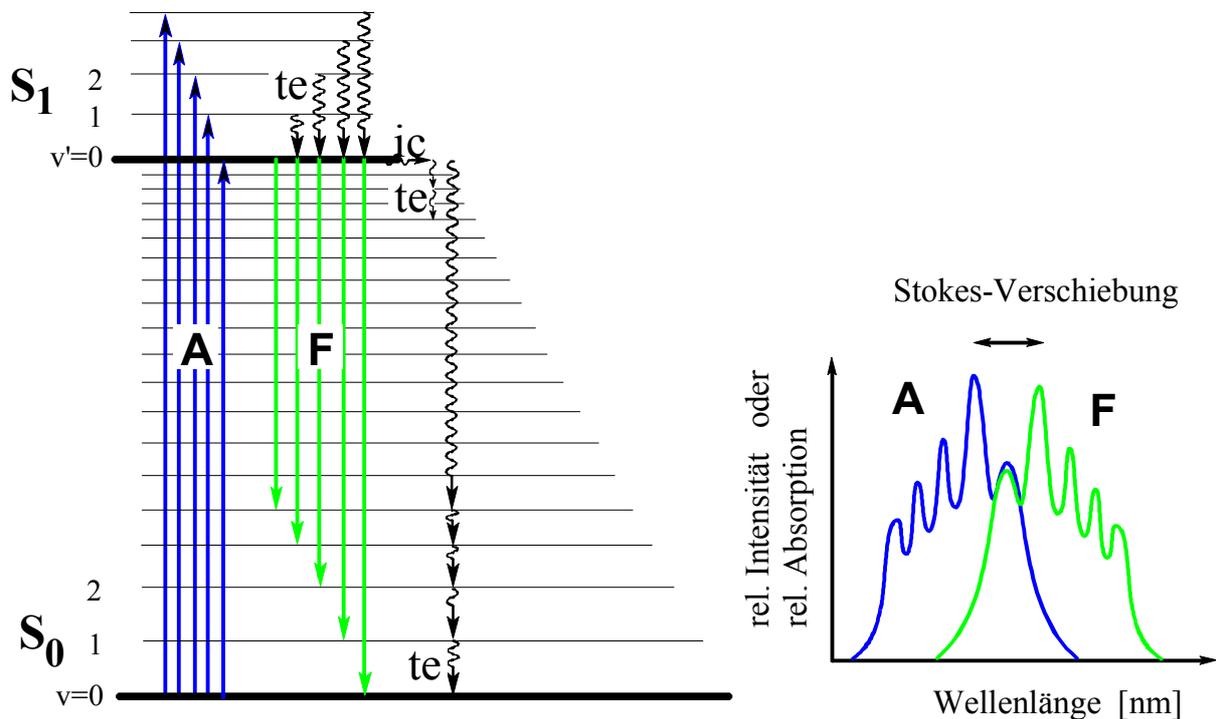


Abb. 11 Jablonski-Termschema zur Darstellung von Absorption (A) und Fluoreszenz (F).

Bei Raumtemperatur befinden sich praktisch alle Valenzelektronen im Schwingungsgrundzustand ($v=0$) des elektronischen (Singulett-) Grundzustandes (S_0). Durch Energieübertragung vom anregenden Photon wird ein Elektron in einen Schwingungszustand ($v' = 0, 1, 2, 3, \dots$) eines höheren elektronischen Zustandes mit gleicher Spinmultiplizität (S_1) angehoben (etwa 10^{-15} s). Es findet eine schnelle thermische Relaxation (te, thermal equilibration, strahlungslos) in das Schwingungsgrundniveau des angeregten elektronischen Zustandes ($S_1, v'=0$) statt (ca. 10^{-12} s). Von diesem relativ langlebigen Zustand wechselt das Elektron spontan und unter Emission von Licht innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} s nach Anregung in die Schwingungszustände des elektronischen Grundzustandes – man spricht von *Fluoreszenz*.

Fluoreszenzlöschung (Quenchen) kann beispielsweise durch Stöße mit anderen Molekülen stattfinden. Dabei findet ein isoenergetischer Übergang von $S_1, v'=0$ in das entsprechende angeregte Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes statt (ic, internal conversion). Von dort aus findet strahlungslose Desaktivierung durch thermische Relaxation statt.

Die elektronische Energie kann aber auch strahlungslos unter Absorption auf in der Nähe befindliche sogenannte *Fluoreszenzlöcher* (*Quencher*) übertragen werden [Gauglitz1983]. Fluoreszenzlöschende Eigenschaften haben beispielsweise leitfähige Stoffe und Oberflächen [Chance1978, 1975], Sauerstoff, verschiedene Aromaten, Halogenide und andere Verunreinigungen oder spezifisch absorbierende Chromophore. In letzterem Fall eines solchen Fluorophor/Akzeptor-Paares (*Förster-Paar*) spricht man von Fluoreszenzbasiertem Resonantem Energie-Transfer (FRET), dessen Abstandssensitivität man sich beispielsweise für die Affinitätsanalytik zunutze machen kann [Schobel1999a], [Brecht1998b]. Der sogenannte Förster-Abstand, bei welchem die Transfereffizienz immerhin noch 50% beträgt, kann etliche Nanometer betragen.

Da die Rayleighstreuung reziprok mit λ^4 abnimmt ist im langwelligeren Bereich eine stark reduzierte *Hintergrundfluoreszenz* zu erwarten, was besonders empfindliche Messungen erlaubt.

Die *Stokes-Verschiebung* gibt die Wellenlängendifferenz zwischen maximaler Absorption und maximaler Fluoreszenz wieder. Ein großer Stokes-Shift vereinfacht die Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht mit Filtern.

Mathematische Betrachtungen

Die relative transmittierte Intensität I_T/I_0 eines monochromatischen Lichtstrahles der Einstrahlintensität I_0 nimmt in einer ideal verdünnten Lösung eines absorbierenden Stoffes exponentiell mit seiner Weglänge d (in cm) und der Konzentration c ab. Das Lambert-Beer-Gesetz faßt dies in einen quantitativen Zusammenhang:

$$\frac{I_T}{I_0} = e^{-\alpha cd} = 10^{-0.434 \alpha cd} = 10^{-\epsilon cd} \quad (29)$$

bzw. umgeformt für die Extinktion $E = \lg \frac{I_0}{I_T} = \epsilon cd$ (30)

wobei der zu α entsprechende dekadische Proportionalitätsfaktor ϵ Extinktionskoeffizient genannt wird. Sie sind naturgemäß stark abhängig von der Wellenlänge, aber auch beispielsweise von der Temperatur. Diese stoffspezifische Größe erreicht bei guten Fluorophoren Werte von $\epsilon > 50000$ L/(mol cm).

Nicht jedes absorbierte Photon führt zur Fluoreszenz. Die Quantenausbeute ϕ beschreibt dieses Verhältnis $\frac{\text{absorbierter}}{\text{emmittierter}}$ Lichtquanten. Anders ausgedrückt gilt für die Fluoreszenzintensität

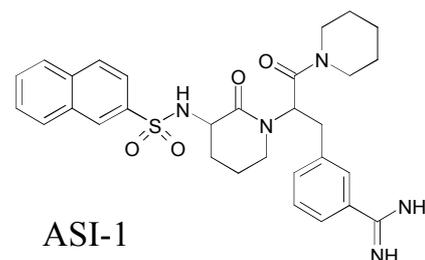
$$\begin{aligned} I_F &\sim \phi(I_0 - I_T) = I_0 \phi(1 - 10^{-\epsilon c d}) \approx I_0 \phi(1 - (1 - \epsilon c d)) \\ I_F &\sim I_0 \phi \epsilon c d \end{aligned} \quad (31)$$

Mit der in Gl. (31) gemachten Näherung für $(\epsilon c d) \ll 1$ für verdünnte Lösungen, ist die Fluoreszenzintensität also proportional zur Konzentration an Fluorophor.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Biochemikalien

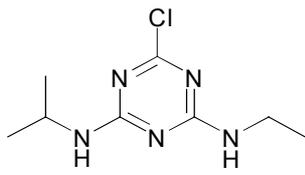
- Biochemikalien wurden bezogen von Sigma (Deisenhofen), außerdem 3-Mercaptopropionsäure, Immersionsflüssigkeit Chinaldin (2-Methylchinolin, $n_D = 1.6116$, zum Brechungsindexangleich im SPR-Aufbau I).
- Von Fluka (Neu-Ulm) wurden Feinchemikalien bezogen. Sonstige Chemikalien waren in p.A.-Qualität.
- Das thermisch behandelte, partiell aggregierte Rinderserumalbumin-Biotin-Konjugat („t-BSA-Bi“) und das (partiell quervernetzte) poly-Streptavidin („pSA“) waren von Boehringer Mannheim.
- Thrombin (Rind) und synthetischer Thrombin-Inhibitor (ASI-1, 561.71 g/mol) waren von Dr. Thomas Friedrich, BASF (Ludwigshafen).



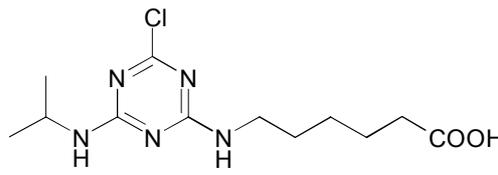
- Immersionsöl mit $n_D = 1.515$ (589.3 nm), $n_E = 1.518$ (627 nm) von Carl Zeiss (Oberkochen).
- DNA-Oligomere wurden von Interactiva (Ulm) synthetisiert, HPLC-gereinigt und lyophilisiert. Zur Immobilisierung auf der Oberfläche wurde ein aminoterminiertes 21-mer, zur Hybridisierung ein komplementäres 23-mer verwendet. Die Sequenz ist zufällig, mit geringer Selbstkomplementarität (Palindrome) und ohne Haarnadelschleifen. Beide Enden des Hybridisierungsbereiches sind gc-Paare.

n-mer	Sequenz	FG (g/mol)	GC-Anteil	Schmelztemp.
21	5'-NH ₂ (C6)-ggaatgatgtaggtttagcg-3'	6680	47.6%	52.5°C
23	5'-NH ₂ (C6)-aacgctacaacctacatcattcc-3'	7127	43.5%	53.5°C

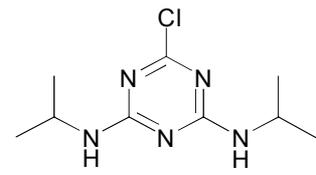
- Verwendete Pestizide und ihre Derivate:



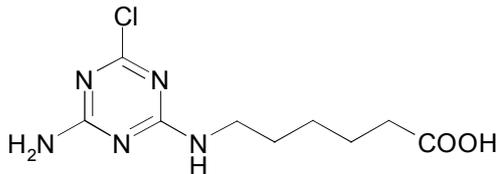
Atrazin (ATR)
215.7 g/mol



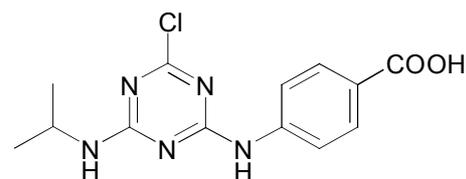
Atrazincapronsäure (ACA)
301.8 g/mol



Simazin (SIM)
229.7 g/mol



Desisopropylatrazincapronsäure (DESACA)
259.5 g/mol



Atrazinbenzoesäure (ZABA)
307.4 g/mol

- Polyklonale s-Triazin-Antikörper (Schaf-IgG) gegen Atrazin(capronsäure) (ATR-PAK) und Simazin (SIM-PAK) waren von Dr. Ram Abuknesha, HRC (London). Die Anreicherung erfolgte durch fraktionierte Ammoniumsulfat-präzipitation und einer nachgeschalteten spezifischen Selektion in einer immunogen beschichteten Sephadexsäule.
- Monoklonaler anti-Atrazin(capronsäure)-Antikörper, Kultur K4e7 (ATR-MAK_{K4e7}), wurde von Prof. Hock (Freising) bezogen. Der Antikörper wurde aus Hybridomkulturüberstand isoliert (serumfreie Kultur) und die über eine Protein-G-Säule angereichert.

	Atrazin	Simazin	ACA	ZABA	DESACA
ATR-PAK	0.18		0.65	0.13	0.0009
ATR-MAK _{K4e7}	1.2		>10	2.7	0.14
SIM-PAK		7.0	>10	2.5	0.0035

Tab. 3 Zusammenstellung ausgewählter Affinitäten K_{aff} in 10^9 L/mol (bestimmt mit RIfS von Jochen Mehne, Fehler etwa 10%). Fett hervorgehoben sind die im Assay für einen AK verwendeten Komponenten.

Ausgewählte Extinktionskoeffizienten: $\epsilon_{\text{ATR}, 263 \text{ nm}} = 3100 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$,

$\epsilon_{\text{BSA}, 278 \text{ nm}} = 45540 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$, $\epsilon_{\text{Cy5}, 649 \text{ nm}} = 250000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$,

$\epsilon_{\text{IgG}, 278 \text{ nm}} = 201700 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$, $\epsilon_{\text{ZABA}, 263 \text{ nm}} = 30960 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$.

Molgewichte: $\text{FG}_{\text{BSA}} = 69000 \text{ g/mol}$, $\text{FG}_{\text{IgG}} = 150000 \text{ g/mol}$.

3.1.1 Lösungen

Alle Lösungen wurden mit ultrareinem Wasser aus einer Filteranlage von SG (Barsbüttel) und einem spezifischem Widerstand von 18.2 M Ω ·cm angesetzt.

Reinigungslösungen

- Küvettenreiniger Hellmanex II, alkalisch (auf 2% verdünnen und 2-3 h einwirken lassen) von Hellma (Müllheim).
- Laborreiniger Extran MA 01, alkalisch (20%ig, pH 12.5), E. Merck, Darmstadt.
- „Piranha“ besteht aus konz. Schwefelsäure und 30%igem Wasserstoffperoxid im Verhältnis 7/3. Der Mischungsvorgang ist sehr exotherm. Piranha oxidiert organisches Material zu bis zum CO₂.

Puffer

- PBS („Phosphate buffered saline“) besteht aus 150 mM Natriumchlorid und 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat mit 2 M Kalilauge auf pH 7.4 titriert.
- Carbonatpuffer: 100 mM (10.6 g/L) Natriumcarbonat in bidest. Wasser wird mit 100 mM (8.4 g/L) Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 9.5 titriert.

Regenerationslösungen

- Acetonitrillösung bestehend aus 50 Teilen Acetonitril, 50 Teilen Wasser und 1 Teil Propionsäure.
- Guanidin/Harnstoff-Lösung (6M/6M) mit Salzsäure auf pH 2 titriert.

3.2 Sonstiges Material

- Dialyseschlauch aus Cellulose, Porengröße 2.5-5 nm, Cut-Off 12-14 kg/mol, Hydroxyfunktionalisiert, Proteinbindung <1 ng/g, stabil bei pH 5-9, sowie Alkohol, Ether und Kohlenwasserstoffe, Fa. Roth (Karlsruhe).
- Küvetten für Fluoreszenzmessungen mit dem LS50B, Spezialanfertigungen der Firma Hellma (Müllheim), 10*10 mm² außen, 4*4 mm² innen, rührbar, mit 500 μ L Füllvolumen, davon 170 μ L im sichtbaren Bereich.
- Mikrokonzentratoren Microcon-30 (Porengröße 30 kg/mol) von Amicon (Witten).

- MTPs der Firma Greiner (Frickenhausen) mit flachem Boden für ELISA-Experimente und als Vorratsbehälter für die Mikrodosierung. Polystyrol (Art. 655101) und Polypropylen (Art. 655201).
- MTPs für Fluoreszenz-Messungen (96 Kavitäten, weiß, bestehend aus Polystyrol mit ca. 12% Titanoxid) wurden von Perkin Elmer zur Verfügung gestellt.
- Ultraschallbad Sonorex RK255H von Fa. Bandelin (Berlin).
- Variable Pipetten 1000, 100, 10 μ L, Multipetten, 8-Kanal-Pipette von der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg).

3.3 Modifizierung von (Bio-)Polymeren

3.3.1 ACA-NHS-Aktivester

Herstellung von ACA

Atrazincapronsäure (ACA) wurde nach einer leicht modifizierten Anleitung undefinierter Herkunft hergestellt: 10 g Cyanurchlorid (54 mmol) wurden in 50 ml Glyme (1,2-Dimethoxy-ethan) gelöst und auf -10°C abgekühlt. 9.3 mL (108 mmol) Isopropylamin wurde mit 10 mL Glyme gemischt und vorsichtig unter starkem Rühren zugetropft (Temperatur unter 0°C). Die Mischung wurde 30 min bei 0°C gerührt, kalt abfiltriert und mit Glyme nachgewaschen. 7.11 g (54 mmol) 6-Aminohexansäure wurden mit 20 g (145 mmol) Kaliumcarbonat vermischt und in 50 mL Wasser gelöst. Die wäßrige Lösung wurde zum Filtrat zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Nach 1 h bei 30°C wurde die Lösung mit etwa dem gleichen Volumen an Wasser versetzt und mit Eisessig auf ca. pH 3 titriert. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert und in zweimal in Glyme und einmal in Methanol umkristallisiert. R_f -Wert 0.53 im DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HCOOH}$ 85/10/5), Ausbeute 14.5 g (89% d.Th.), Smp. 165°C .

Herstellung des Aktivester

5 mg (16.5 μ mol) ACA und 2.1 mg (18 μ mol) N-Hydroxysuccinimid (NHS) wurden in 200 μ L absolutem N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und eisgekühlt. Die Aktivierung erfolgte durch Zugabe von 3.76 mg (18 μ mol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 6 h Rühren bei RT. Die Aktivester-Lösung wurde

durch Abdekantieren von den Harnstoffnadeln abgetrennt und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das Massenspektrum zeigte als Verunreinigung Edukt und Nebenprodukte, wie Substitution von Chlor durch NHS und entsprechendes Hydrolysat. Die Lösung wies nach Monaten im Eisschrank keinen Verlust an Aktivität auf.

3.3.2 PSS-ACA-Konjugat

PSS (Polystyrolsulfonat, nicht löslich in gängigen organischen Lösungsmitteln wie DMF usw.) wurde mit Atrazincapronsäure in drei Schritten entsprechend folgendem Protokoll modifiziert: Im ersten Schritt erfolgte eine *partielle Oxidation* des Polymer-Backbones bis hin zum Carbonyl am sekundären Kohlenstoff bzw. zur Hydroxy-Gruppe. 495 mg (2.4 mmol) PSS wurden in 10 mL Wasser aufgenommen und mit 1 mL konz. Schwefelsäure (Chlorid würde zu Chlor oxidiert !) angesäuert. Dazu wurden 2 mL 1 M Kaliumpermanganat-Lösung zugegeben und zusätzlich 3 mal 0.5 mL innerhalb von 24 h. Dann wurde abfiltriert (2 µm Porengröße) und die Lösung mit 2 M NaOH neutralisiert. Die eingeeengte Lösung wurde 3 d gegen dest. Wasser dialysiert (mehrmaliger Wasserwechsel) und am Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 173.5 mg oxidiertes PSS, dessen Carbonylbande mittels IR-Spektroskopie identifiziert wurde.

Zur *reduktiven Aminierung* wurden 88.1 mg oxidiertes PSS in 1.76 mL Wasser gelöst, mit Ammoniumchlorid gesättigt und mit einem Überschuß Natriumcyanoborhydrid versehen. Während 24 h Reaktionszeit am Rührer wurden noch 2 weitere Spatelspitzen Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Die Aufreinigung erfolgte mit Wasser in Mikrokonzentratoren (Zentrifuge). Der Kaisertest auf Aminogruppen fiel positiv aus.

Zur *Konjugation mit ACA* wurde zu einer Lösung von 10 mg/mL aminiertem PSS in Carbonatpuffer (pH 9.5) stöchiometrisch zu den umzusetzenden Aminogruppen 1.4-fach ACA-NHS in DMF zugegeben (70% Kupplungseffizienz angenommen) und gründlich durchmischt. Die Aufreinigung erfolgte durch Dialyse gegen dest. Wasser. Anmerkung: Die Oxidation von PSS verläuft leicht, die von PVS (Polyvinylsulfat) schwer (bei RT keine Entfärbung).

3.3.3 Aminodextran

Herstellung von Aminodextran

Zur Herstellung eines Aminodextrans (AMD) [Piehler1996b] aus Dextran mit einem Molgewicht von z.B. 39 kg/mol mit 5%iger Aminierung der Zuckereinheiten wurde nach folgendem modifizierten Protokoll verfahren. Dieses AMD wird mit AMD39/5 bezeichnet¹⁵.

Oxidation: Zu einer 4°C kalten Lösung von 10 g (62 mmol) Dextran in 100 ml Wasser wird unter starkem Rühren eine Lösung von 1.5 g (7 mmol) Natriumperiodat in 50 ml Wasser gegeben. Diese Menge oxidiert theoretisch 10% der Zuckereinheiten und ergibt demnach 0.2 NH₂/Zucker, praktisch aber nur 0.05 (bis 0.1) NH₂/Zucker. Nach 12 h Reaktionszeit bei 4°C wird noch 2-3 d gegen dest. Wasser dialysiert (mehrmaliger Wasserwechsel).

Zur *reduktiven Aminierung* wird mit Ammoniumchlorid gesättigt und schnell 5 g Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Tägliche Zugabe von 2 g Natriumcyanoborhydrid vervollständigt die Reaktion. 1 d nach der dritten Zugabe wird mit Salzsäure auf pH 1 angesäuert (HCN-Austreibung, giftig !). Zur Fällung wird mit NaOH auf pH 4-5 eingestellt und mit dem zweifachen Volumen Methanol oder Aceton gefällt. Die Festsubstanz wird in bidest. Wasser konzentriert aufgenommen und 3 d gegen dest. Wasser dialysiert, am Ende gegen PBS. Schließlich wird mit Methanol oder Aceton gefällt und am Vakuum getrocknet. Hergestellt wurden AMD260/4, AMD 110/5, AMD 110/10, AMD 110/20 und AMD39/5.

Modifizierung von Aminodextran mit ACA

Zu einer Lösung aus 10 mg/mL AMD in Carbonatpuffer (pH 9.5) je umzusetzender Aminogruppen die 1.4-fache stöchiometrische Menge ACA-NHS in DMF zugegeben (70% Kupplungseffizienz angenommen) und gründlich durchmischt. Nach 30 min wurde durch zweifache Fällung in Aceton und Methanol vom ungebundenen ACA getrennt.

¹⁵ Manche Autoren geben den *theoretisch* oxidierten Anteil der Zucker an, also AMD39/10 statt AMD39/5.

3.3.4 Pestizid-BSA-Konjugate

32 μL (0.41 μmol) einer 0.013 M Lösung von ACA-NHS in absolutem DMF wurden zu einer Lösung von 4 mg Rinderserumalbumin (BSA) in 500 μL Carbonatpuffer (pH 9.5) gegeben und gründlich am Vortex durchmischt. Nach 30 min wurde überschüssiges ACA bei gleichzeitiger Umpufferung mit PBS mittels einer Sephadex-G-25-Säule abgetrennt (Kap.3.3.6). Der „Markierungsgrad“ (und die Konzentration) wurde mit UV/Vis-Spektroskopie (Kap.4.4.3, S.140f) zu ACA:BSA = 3.54:1 bestimmt. Die Markierungseffizienz lag damit bei 50%.

Die in dieser Arbeit verwendete Pestizid-BSA-Konjugate waren:

- ACA:BSA = 3.54:1
- ZABA:BSA = 4:1 (ZABA = Atrazinbenzoesäure)
- DESACA:BSA = 12:1 (DESACA = Desisopropylatrazincapronsäure)

3.3.5 Cy5-Antikörper-Konjugate

Antikörper wurden nach einem allgemeinen Aktivester-Kupplungsprotokoll (vgl. Kap.3.3.4) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert: Die Mengenverhältnisse waren 20 μL Cy5-NHS-Aktivester-Lösung, 500 μg Antikörper in 250 μL Carbonatpuffer. Die Markierungseffizienz lag bei 65%. Abtrennen von überschüssigem Cy5 bei gleichzeitiger Umpufferung mit PBS mittels einer Sephadex-G-25-Säule (Kap.3.3.6). Das Verhältnis Cy5:AK wurde bestimmt durch die Extinktion bei 653 nm (Cy5) und 278 nm (Protein) in PBS:DMF (1:1, v/v) [O'Donnell1979] unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten für Cy5 (in PBS) $\epsilon_{653 \text{ nm}} = 250000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ und für IgG (in PBS) $\epsilon_{278 \text{ nm}} = 201700 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$. Die verwendeten Konjugate in dieser Arbeit waren:

- Cy5:ATR-PAK = 4.6:1
- Cy5:ATR-MAK_{K4e7} = 4.5:1
- Cy5:SIM-PAK = 3.7:1

3.3.6 Trennung mit Sephadex-Säule

Die Trennung von BSA- oder Antikörper-Konjugaten von unkonjugiertem Analyt-Derivat oder Cy5 wurde mit Gel-Ausschlußchromatographie erreicht.

Dazu wurde eine Fertigsäule von Pharmacia Biotech (PD-10 mit Sephadex G-25 M, Bettvolumen 9.1 mL, Betthöhe 5 cm) mit 25 mL PPS equilibriert. Anhand von Versuchen mit dem blau erscheinenden Cy5 wurde folgendes Protokoll für IgG entwickelt: 1 mL Probe aufgeben und ablaufen lassen, 1.4 mL Puffer aufgeben und ablaufen lassen, 1.4 mL Puffer aufgeben und gereinigtes IgG-Konjugat auffangen. Die Cy5-Fraktion ist jetzt noch ca. 2 cm vom Säulende entfernt. Die Trennung mit diesem Protokoll ist sehr sicher und schnell und einer Aufreinigung mit Mikrokonzentratoren (Microcons) vorzuziehen. Sie ließ sich auch auf (kleinere) BSA-Konjugate übertragen und puffert gleichzeitig zum bevorzugten PBS um.

3.4 Oberflächenmodifikation

3.4.1 Gold- und Graphitschichten

Goldschichten im HV

Neben dem sogenannten Sputtern stellt die Verdampfung von Gold die wichtigste Methode zur Herstellung dünner Filme dar. Dies geschieht im Hochvakuum (HV) in sogenannten Edwards-Zellen bei einem Druck von etwa 10^{-7} bar. Durch das Durchleiten von Strom durch Wolfram-Schiffchen wird dieses zur Weißglut erhitzt und das darin befindlich hochreine Gold zum Schmelzen gebracht. Das zu bedampfende Substrat befindet sich im Abstand von etwa 10 cm darüber.

Dieses Verfahren wurde zur Beschichtung der Silizium-Nanotiterplatten (Kap.3.5.4, S.71f) gewählt, wobei als Haftvermittler 5 nm Chrom (oft werden auch Titan oder ein Mercaptosilan verwendet) und eine Goldschicht von 100 nm aufgedampft wurden. Aufdampftrate und Gesamtschichtdicke wurden auf einem Schwingquarzmonitor verfolgt. Der Schwingquarz befand sich zwischen den Substraten inmitten des Aufdampfkegels. Für die ersten 5 nm wurde eine Aufdampftrate von 10-100 pm/s gewählt, anschließend bis zu 500 pm/s.

Für Nanotiterplatten aus Kunststoff (ABS) wurde kein Haftvermittler verwendet, ansonsten aber gleich verfahren.

Goldschichten in der Ultrahochvakuum(UHV)-Anlage

Im Unterschied zum HV wird im UHV mit einem Druck gearbeitet, der um ca. 2 Größenordnungen kleiner ist. Dadurch werden im allgemeinen reinere und homogenere Schichten erzielt. Als Haftvermittler wurden etwa 4-5 nm Titan und daran anschließend Gold thermisch aufgedampft. In der verwendeten Anlage konnte aus räumlichen Gründen während des Aufdampfvorganges nicht simultan mit einem Schwingquarz detektiert werden. Aus diesem Grund wurden die Parameter aufgrund einer vorhergehenden Kalibrierung gewählt. Ein Nachträgliches Ausheizen der Substrate bis eine Stunde lang bei über 300°C bewirken eine höhere Homogenität und Stabilität der Metallschicht. Mit dieser etwas aufwendigeren Methode wurden deshalb die SPR-aktiven Schichten hergestellt, die mehrere Regenerationen in kalter Piranha ohne Verlust ihrer Leistungsfähigkeit überstanden. Diese UHV-Schichten wurden freundlicherweise von Tilo Weiss hergestellt.

Direkte Nachbehandlung der Goldschichten

Nach dem Bedampfen wurden die SPR-aktiven Schichten zum Schutz des dünnen Metallfilms vor Oxidation und zur Funktionalisierung 24 h lang in eine 0.1 Vol% (1 μ L/mL) Lösung von 3-Mercaptopropionsäure in absolutem Ethanol getaucht, mit absolutem Ethanol gespült und trockengeblasen.

Regeneration goldbeschichteter Glasplättchen

Die im UHV goldbeschichteten Glasplättchen ließen sich durch kurzes Eintauchen in kalte Piranha (2-5 s) regenerieren. Dabei wurde das Plättchen mit der Goldschicht nach unten vorsichtig derart über dem Gefäßboden bewegt, daß die sich entwickelnden Gasbläschen abgestreift wurden. Mit dieser Methode ließen sich sogar Biotin/Streptavidin-Schichten entfernen. Goldschichten aus dem HV waren aufgrund ihrer geringeren Stabilität für die Behandlung mit Piranha weniger geeignet.

Graphitschichten im HV

Graphit wurde in einer HV-Edwards-Zelle mit Elektronenstrahlverdampfer bei einem Vakuum von $7 \cdot 10^{-7}$ mbar aufgedampft. Bei den Einstellungen 2.25 g/cm³ Dichte und dem kleinsten einstellbaren Wert von $5 \cdot \frac{10^5 \text{ g}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}$ (anstelle der korrekten $2.71 \cdot \frac{10^5 \text{ g}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}$) am Schichtdickenmonitor, sowie einer Spannung am Elektronen-

strahlverdampfer von 2.5 kV wurde bei einer Aufdampftrate von 0...0.1 nm/s eine Schichtdicke von 50 nm aufgedampft. Die Objektträgerplättchen (25*25 mm²) wurden etwa zur Hälfte bedampft. Es ergab sich eine wischstabile, sonnenbrillenartige, spiegelnde Schicht.

3.4.2 Quenchen auf Graphit und Gold

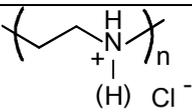
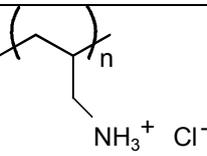
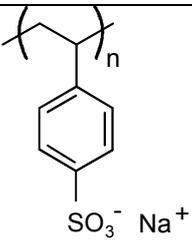
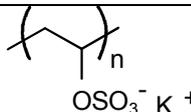
Zur Beurteilung des Quenchverhaltens von Graphit- bzw. Gold-Oberflächen bezüglich Cy5-markierten Antikörpern wurden Vorversuche in einer Küvette gemacht. Nach dem Bedampfen (Kap.3.4.1) einer halben Küvettenwand wurden die Objektträgerplättchen mit Isopropanol und Wasser gespült und 1 h mit einer 10%igen wäßrigen PEI-Lösung benetzt. Nach dem Spülen mit Wasser wurden die Plättchen 2 h lang mit einer Lösung aus 40 µg/mL ACA-BSA(3.54:1) in PBS bedeckt. Nach Spülen mit PBS und Wasser wurde das adsorbierte Konjugat 1 h lang mit 2.5% wäßrigem Glutaraldehyd quervernetzt. Nach Spülen mit Wasser wurden schließlich die unspezifischen Bindungsplätze ½ h lang mit 1 mg/mL OVA in PBS blockiert. Anschließend wurde das Plättchen gespült.

Nach dem Teilbeschichten mit Quencher (Graphit oder Gold) und flächigem Immobilisieren des Antigenderivates ACA eine Lösung mit markiertem Antikörper (500 ng/mL Cy5-ATR-PAK(4.6:1) in 1 mg/mL OVA) in die beschichtete Kammer gegeben. Dann wurde die Gesamtfluoreszenz über Glas und Graphit gemessen. Da der Anteil an oberflächengebundenem Cy5-Konjugat sehr gering ist, wird hiermit praktisch der Volumenanteil gemessen. Zum Abschluß wurde mehrfach mit PBS gespült, mit 1 mg/mL OVA aufgefüllt und die Fluoreszenz des (spezifisch) gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpers gemessen. Aus den Differenzen über Glas und Graphit bzw. Gold wurde auf das Quenchverhalten dieser Oberflächen geschlossen.

Zur Messung wurde das teilbeschichtete Glasplättchen als Rückwand einer Meßkammer in das Fluoreszenz-Spektrometer unter etwa 30° eingebaut. Vorderseitig war die Meßkammer durch ein Objektträgerglas abgeschlossen. Dazwischen ergab sich ein Volumen von gut 2 mL. Durch Verschieben der Meßzelle wurde zwischen Glas- und Graphit- bzw. Gold-Oberfläche gewechselt. Die Anregungswellenlänge war 640 nm, die Spalteinstellungen für Anregungsspektren betragen 4 mm am Emissionsmonochromator und 2.5 mm am Anregungsmonochromator, für Emissionsspektren umgekehrt.

3.4.3 Polyelektrolyte

Untersucht wurden Lösungen der in Tab. 4 beschriebenen Polyelektrolyte. Die Erzeugung von Multischichten erfolgte mit einer Eppendorf-FIA, die Detektion mit dem SPR-Labor-Aufbau.

	Polykationen		Polyanionen	
	PEI	PAH	PSS	PVS
	Polyethylenimin 1:2:1	Polyallylamin Hydrochlorid	Poly-p-Styrol- sulfonat	Polyvinylsulfat
				
g/mol je Einheit	42.5	93.6	206.2	162.2
Einheiten	1200	600	350	350
kg/mol gesamt	50	55	70	55

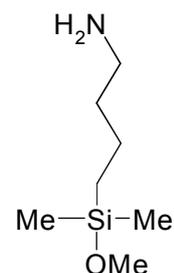
Tab. 4 Verwendete Polyelektrolyte (PE).

3.4.4 Grundreinigung oxidischer Oberflächen

RfS-Transducer wurden mit 20% Extran 2 min im Ultraschall vorbehandelt, mit Leitungswasser ab gespült und mit Labortüchern (Kim-Wipes) kräftig abgerieben (besonders wichtig bei Mehrfachverwendung der Transducer). Anschließend wurden sie in frisch bereiteter Piranha 15 min im Ultraschall nachgereinigt bzw. hydrophil eingestellt und mehrfach (!) mit viel bidest. Wasser gespült und am Stickstoffstrom getrocknet. Ein Verzicht auf den mechanischen Reinigungsschritt bei gebrauchten Transducern führte bisweilen zu niedrigeren Oberflächenbelegungen!

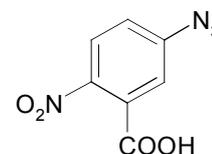
3.4.5 Aminosilanisierung von Glas

10 mL Toluol wurden mit 50 μ L Wasser gesättigt. Dazu wurden 100 μ L 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan gegeben. Zusammen mit den Transducern wurde 12-24 h leicht geschüttelt, mit Methanol und mehrfach mit Wasser gespült und am Stickstoffstrom getrocknet.



3.4.6 Photolinker-Oberflächen

Nach dem Standard-Protokoll wurde der Photolinker 5-Azido-2-nitrobenzoesäure (ANB) mit DIC und NHS in DMF zum ANB-NHS-Aktivester voraktiviert¹⁶.

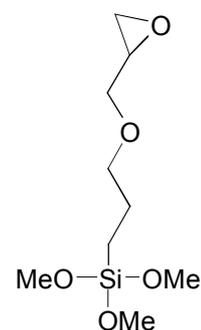


10 μ L einer Lösung von 100 mg/mL ANB-NHS in DMF wurden auf eine Oberfläche mit Aminogruppen (z.B. aminosilanisiert) aufgebracht. Nach 5 h in einer DMF-Kammer wurde 10 μ L Carbonatpuffer aufgetropft. Nach 1 h wurde mit DMF und Wasser gespült und am Stickstoffstrom getrocknet.

Die so erhaltene Photolinker-Oberfläche wurden mit 5 μ L einer 10%-igen wässrigen Lösung aus AMD-ACA-Konjugat benetzt. Nach dem Trocknen wurde mit einer 125W-Quecksilberdampflampe und einem Kantenfilter (Schott WG335) 20 min belichtet.

3.4.7 Epoxid-Oberflächen

Zum Einsatz kam 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS). Die gereinigten RfS-Transducer wurden mit 15 μ L GOPTS je cm^2 inkubiert und nach 1 h in einer geschlossenen Kammer mit trockenem Aceton gespült und am Stickstoffstrom getrocknet. Wasser, sowie prinzipiell alle Nucleophile reagieren an dieser Oberfläche (Desaktivierung) ab und müssen daher vermieden werden. Die so hergestellten Transducer wurden innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet.



¹⁶ Zu Beginn der Untersuchungen wurde auch ein (gleich effektiver) käuflicher Aktivester verwendet.

3.4.8 Carboxy-Oberflächen

Auf die mit Epoxid (GOPTS) beschichteten Oberflächen wurde 8 μL 6-Aminohexansäure (AHA, 1 mg + 1.25 μL Wasser) aufpipettiert. Nach mind. 4-5 h im Sandwichverfahren (bedeckt mit einem zweiten Transducer) in einer Feuchtekammer (drei Tropfen Wasser in einem Wägegglas) wurde sorgfältig mit Wasser abspült. Durch Spülen mit wenig Aceton wurde neben einer Nachreinigung vor allem die rückstandsfreie Trocknung unter dem Stickstoffstrom verbessert. Im Zusammenhang mit den DNA-Oberflächen wurden noch weitere Carboxy-Oberflächen getestet (Kap.3.4.10).

3.4.9 NHS-Aktivester-Oberflächen

Freie Carboxylgruppen modifizierter Oberflächen wurden mit 8 μL einer frisch hergestellten Lösung aus 1 M NHS und 1.5 M DIC in trockenem DMF aktiviert. Besonders wichtig war eine sehr schnelle Bedeckung mit einem zweiten Transducer, da sonst aufgrund einer sofort eintretenden sichtbaren Phasenseparierung die Reaktionslösung an DIC verarmte und somit die Kupplungseffizienz signifikant vermindert wurde. Nach mindestens 4 h in einer DMF-Atmosphäre wurden die Transducer mit DMF und wenig Aceton gespült und mit Stickstoff getrocknet. Eine weitere Zugabe von DIC in dieser Zeit wirkte sich positiv aus.

Modifizierung mit ACA-AMD

Die Immobilisierung von ACA-AMD-Konjugat auf Aktivesteroberflächen mit der OF-Microdrop-Pipettieranlage (Kap.3.5.1, S.67f) erfolgte mit einer Konjugat-Konzentration von 1 mg/mL (70 μm -Düse, 2-faches 100 μm -ccp-Muster). Das Benetzungsverhalten war durchweg hydrophil. Parallel wurde das Konjugat (1 mg + 4 μL Wasser) vergleichend auch von Hand appliziert. Zur Charakterisierung wurden Standardparameter verwendet (OVA 1 mg/mL, ATR-PAK 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Regeneriert wurde jeweils 3 mal mit Pepsin bei pH = 9 und Acetonitril-Lösung.

3.4.10 DNA-Oberflächen

In einem ersten Schritt wurden die Glasoberflächen über verschiedene Wege carboxyliert (AHA, ADA, AMD-GA)¹⁷. In einem zweiten Schritt kamen unterschiedliche Strategien zum Einsatz, um die aminoterminierten Oligonucleotide kovalent an die carboxylierte Oberfläche zu binden. Im Normalfall wurden die Carboxylgruppen der Oberfläche mittels NHS und DIC (AHA-NHS, ADA-NHS, AMD-GA-NHS) noch vor ihrem Kontakt mit DNA-Oligomeren aktiviert. Als Alternative hierzu wurde auch versucht, die aminoterminierten DNA-Oligomere auf *nicht-aktivierte* Carboxyloberflächen aufzutragen und sie in einem nachgeschalteten Kupplungsschritt kovalent anzubinden (AHA-DNA-DICvap, AMD-GA-DNA-DICvap, AHA-EDC/DNA).

Vorbehandlung der Oberflächen und Einführung der Carboxylgruppen

Alle Transducerchips (1 cm²) wurden in derselben Weise gereinigt (Kap.3.4.4) und mit GOPTS (Kap.3.4.7) modifiziert. Direkt an diese Vorbehandlung schlossen sich folgende Schritte an, die sich für die einzelnen Modifikationen unterschieden. Alle Modifikationen basieren auf einer der drei verschiedenen Carboxyl-Oberflächen (AHA, ADA und AMD-GA).

Standard-AHA-Oberflächen

Die Herstellung der 6-Aminohexansäureschichten erfolgte wie in Kap.3.4.8 beschrieben.

Heiz/Schmelz-AHA-Oberflächen

Als eine Modifikation zu den Standard-AHA-Oberflächen wurde versucht, das Reaktionsverhalten von AHA über erhöhten Temperaturen oder Aufschmelzen der Reinsubstanz zu beeinflussen. Dazu wurde die AHA-Lösung auf eine vorgeheizten Transducer-Oberfläche pipettiert. Die Transducer waren nicht abgedeckt, so daß die AHA-Lösung innerhalb weniger Minuten eintrocknete. Folgende Bedingungen wurden untersucht:

¹⁷ Die verwendeten Abkürzungen beschreiben die Oberflächenmodifikation und finden sich auch in den nachfolgenden Überschriften wieder. Die Fragmente bedeuten: 6-Aminohexansäure (AHA), 12-Aminododekansäure (ADA), Aminodextran (AMD), Glutaranhydrid (GA), gasförmiges Diisopropylcarbodiimid (DICvap). S.a. Abkürzungsverzeichnis.

- (i) Reaktion bei 70°C, 15 min lang (trocken nach 3 min).
- (ii) Reaktion bei 100°C, 15 min lang (trocken nach 1 min).
- (iii) Reaktion bei 100°C, 15 min lang, anschließend Schmelzen der getrockneten AHA auf die Oberfläche (209°C, 3 min).
- (iv) Aufbringen fester AHA auf einen unbeheizten Transducer und anschließendes Heizen des Transducers auf einer Heizplatte bis zum Schmelzpunkt der AHA (209°C, 5 min).

ADA-Oberflächen

12-Aminododekansäure (ADA) ist kaum löslich in Wasser. Deshalb wurde ADA in fester Form auf den vorbereiteten Transducer gegeben und wie in Heiz/Schmelz-AHA-(iv) bis zum Schmelzpunkt erwärmt (187°C, 5 min). Für eine vollständiges Entfernen der überschüssigen ADA-Kruste waren aggressive Bedingungen notwendig (pH 12 und Ultraschall).

AMD-GA-Oberflächen

2 mg AMD260/10 wurden in 4 µL Wasser gelöst, auf die GOPTS-Oberfläche pipettiert, mit einem zweiten Transducer bedeckt und 4 h lang in einer Feuchtekammer inkubiert. Beide Transducer wurden dann sorgfältig mit Wasser und wenig Aceton gespült und mit Stickstoff getrocknet. Die freien Aminogruppen wurden dann durch einen Überschuss an Glutaraldehyd carboxyliert (7 µL einer Lösung bestehend aus 2 mg/mL Glutaraldehyd in DMF) und mit einem zweiten Transducer 6 h lang bedeckt. Anschließend wurden beide mit DMF und Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Strategien zur Immobilisierung von DNA auf Carboxyl-Oberflächen

Oberflächenaktivierung über einen NHS-Aktivester vor dem DNA-Transfer

AHA-NHS, ADA-NHS, und AMD-GA-NHS:

Die Aktivierung der freien Carboxylgruppen dieser Oberflächen erfolgte nach Kap.3.4.9 (ohne zweite Zugabe an DIC). Direkt nach dieser Aktivierung wurde das aminoterminierte DNA-Oligomer mittels Tintenstrahltechnik auf die Oberfläche aufgetropft (s.u.).

DNA-Transfer auf nicht-aktivierte Oberflächen

AHA-DNA-DICvap:

Das aminoterminierte DNA-Oligomer wurde direkt auf die nicht-aktivierte Standard-AHA-Oberfläche mittels Tintenstrahltechnik aufgebracht. Die Peptidbindung wurde nachträglich über DIC geknüpft. Dazu wurde der Chip 12 h lang einer DIC-gesättigten Atmosphäre ausgesetzt; und zwar (a) bei Raumtemperatur und (b) bei 100°C in einem evakuierten Gefäß in Gegenwart von flüssigem DIC.

AMD-GA-DNA-DICvap:

Analog zu AHA-DNA-DICvap (b).

AHA-EDC/DNA:

Eine frisch bereitete Mischung aus aminoterminiertem DNA-Oligomer (2 mg/mL) und wasserlöslichem EDC (1:2700 g/g) wurden auf eine Standard-AHA-Oberfläche mittels Tintenstrahltechnik pipettiert (s.u.).

DNA-Transfer mittels Tintenstrahltechnik

Zur Verwendung kam das in Kap.3.5.1 beschriebene OF-Microdrop-System (S.67f). Die aminoterminierten DNA-Lösung (Standard: 2 mg/mL in Wasser) in einem zweifachen ccp-Muster (s.u.) mit kreisförmiger Gesamtform ($d = 2$ mm) auf die Transduceroberfläche pipettiert.

Charakterisierung der immobilisierten DNA

Die Transducer wurden mit RfS hinsichtlich ihrer maximalen spezifischen Bindung von komplementärem Oligonucleotid (Hybridisierung), ihrer unspezifischen Bindung mit nicht-komplementärer DNA und Protein und hinsichtlich der Stabilität der immobilisierten DNA-Schicht charakterisiert. Die maximale Hybridisierungskapazität wurde mit 10 µg/mL DNA-Oligomer in PBS ermittelt. Dazu wurde 1 mL Oligomer-Lösung in die Probenschleife (0.8 mm Innendurchmesser, 400 µL) gesogen und mit einer anfänglichen Flußrate von 240 µL/min (10 s) gefolgt von einer Flußrate von 30 µL/min (250 s) inkubiert. Dann wurde die Flußzelle mit PBS gespült (240 µL/min, 125 s). Die Transduceroberfläche wurde durch eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge mittels zwei kurzen Pulsen mit 0.01 M HCl (180 µL/min, 50 s) regeneriert. Die unspezifische Wechselwirkung wurde mit demselben Injektionsprotokoll überprüft.

Zum Einsatz kamen das zur Immobilisierung verwendete und daher nicht-komplementäre DNA-Oligomer (10 µg/mL) und auch DNA aus Lachshoden (100 µg/mL).

Für das gesamte Injektionsprotokoll wurden Reflexionsspektren aufgenommen. Alle 5 s wurde aus einem Summenspektrum die optische Schichtdicke als ein Datenpunkt im Profil ausgewertet. Der Unterschied zwischen der anfänglichen Basislinie zum Ende des Spülvorgangs nach der Inkubation ergab die Änderung der optischen Schichtdicke. Für Proteine wurde ein Zusammenhang gefunden, nach dem eine Änderung von 1 pm optischer Schichtdicke eine Änderung von 1 pg/mm² in der Oberflächenbeladung ergibt [Brecht1999].

3.4.11 Oberflächenmodifikation für PSFIA

MTP-Format

Das Antigen-BSA-Konjugat wurde in verschiedenen Konzentrationen auf der Oberfläche immobilisiert („coating“). Dazu wurden 280 µL des Konjugats in bidest. Wasser pro Kavität der Mikrotiterplatte (MTP) über Nacht im Kühlschrank (oder 1 h bei RT) zur Adsorption gebracht. (die Konjugat-Menge wurde in stöchiometrischem Verhältnis zu den im Assay zuzufügenden Antikörperbindungsstellen berechnet). Dann wurde ½-1 h durch dazupipettieren von 10 µL einer Lösung 28 mg/mL BSA geblockt (Belegung unspezifischer Bindungsplätze). Nach zweimaligem Spülen mit PBS (Füllen mit PBS, ausschütteln und ausklopfen auf Labortuch) wurde wiederum 2 h mit 1 mg/mL BSA geblockt und mit PBS gespült. Dann wurde die Proteinschicht ½-1 h mit 280 µL 2.5% wäßrigem Glutaraldehyd quervernetzt, gespült (mit Wasser, dann PBS) und nochmal ½ h mit 280 µL BSA (1mg/mL) geblockt. Die Quervernetzung brachte einen deutlich kleineren Nullwert, das zweite Blocken verkleinerte die Standardabweichung. Auf das Detergenz Tween im PBS (0.1%) beim Spülen wurde verzichtet, da es sich ungünstig auf die Kalibrierkurve und die Standardabweichung auswirkte (!).

Nach der Oberflächenvorbereitung wurde für den Assay folgendes Protokoll verwendet: Blocken mit 10 µL (28 mg/mL) BSA-Lösung und 170 µL PBS. Dazu wurden 50 µL Analyt pipettiert, 2-5 min geschüttelt und dann 50 µL AK in PBS (mit 1 mg/mL Hintergrund-BSA) zugegeben. Nach ½ h wurde in eine Küvette oder Fluoreszenz-MTP umpipettiert und die Fluoreszenz gemessen.

Zum Pipettieren wurde eine Multipette oder eine 8-Kanal-Pipette verwendet. Mit dem LSR200 war starkes Photobleaching zu beobachten ($>15\%$ in 10 s). Eine Verdoppelung der Meßzeit von 10 auf 20 s je Kavität vergrößerte den Fehler, da die Schwankungen zwischen den Kavitäten nicht kleiner wurden, dafür aber die absoluten Werte durch Bleaching.

NTP-Format

Nanotiterplatten (NTP) aus Silizium wurden analog der RIFS-Transducer mit 20% Extran-Lösung 2 min im Ultraschall gereinigt und kräftig mit Leitungswasser abspült. Nach *jedem* Spülvorgang wurden die Kavitäten mit Stickstoff ausgeblasen, da die hohe Oberflächenspannung in den kleinen Kavitäten zu einer verringerten Austauschwirkung führen kann. Nach einer weiteren Behandlung mit frischer Piranha 15 min im Ultraschallbad und äußerst sorgfältigem Spülen und kurzen Ultraschallbehandlungen in bidest. Wasser war die Grundreinigung beendet. Kunststoff-NTPs aus ABS wurden nur mit Isopropanol gespült und am Stickstoffstrom getrocknet (keine Mehrfachverwendung). Längerer Kontakt mit organischen Lösungsmitteln führt zum Anlösen der Kunststoffoberfläche.

Bei (teil-)vergoldeten Silizium-NTPs wurden gute Erfahrungen mit einer ersten Modifikation mit Mercaptopropionsäure erzielt. Bei ABS-NTPs führte dies zur Auflösung der Platte. Die goldbeschichteten NTPs (3.4.1) bzw. teil- oder nichtbeschichtete NTPs wurden dann in eine Lösung von 2.5% *PEI* in Wasser getaucht. Bei solchen Tauchprozessen mußten generell die Kavitäten durch *Druckspülen* mit einer Eppendorf-Pipette von Luftblasen an den Kavitätswänden befreit werden. Nach 2 h wurde 2 mal mit maßvollem Druck mit Wasser gespült und trockengeblasen.

Das *Coaten* der NTP (Belegung mit Pestizid-Konjugat) erfolgte mit einer Lösung aus 5 µg/ml ACA-BSA(3.54:1) in PBS (kein Unterschied bei bidest. Wasser statt PBS feststellbar). Dazu wurde die NTP in die Lösung getaucht und nach dem Druckspülen mit einem Objekträgerdeckglas noch in der Lösung abgedeckt und in eine Feuchtekammer transferiert. Nach 3 h wurde vorsichtig mit Wasser gespült und mit maßvollem Stickstoffstrom getrocknet.

Zum *Blockieren* der UWW mit einer 10 mg/ml BSA-Lösung in PBS wurde analog dem Coaten verfahren. Die so erhaltenen NTPs wurden möglichst bald weiterverarbeitet, sind aber auch mehrere Wochen lagerfähig.

3.5 Mikrodosierung

3.5.1 OF-Microdrop

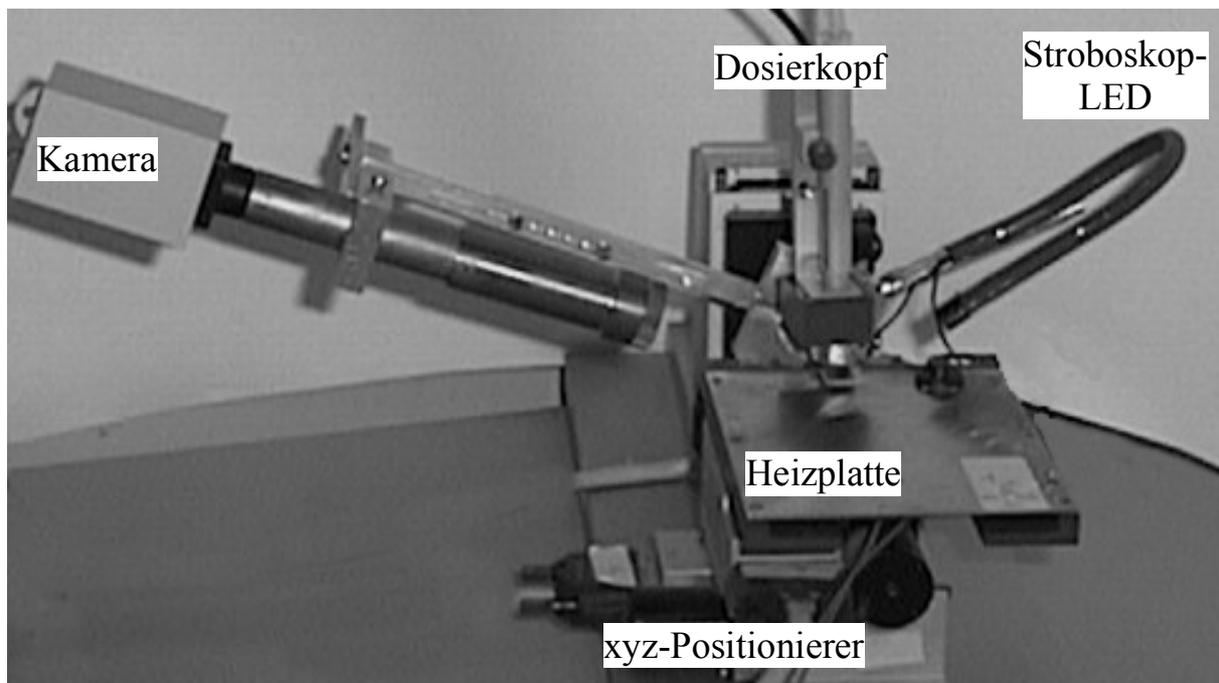


Abb. 12 Aufbau des OF-Microdrop

Zur Verwendung kam ein (vorhandenes) xyz-Positioniersystem F9S von Uhl (Ablar) mit Verfahrwegen von 28 mm bei einer Auflösung von $0.1 \mu\text{m}$ und 3 mm/s Geschwindigkeit. (Ein System mit einer Genauigkeit von $\leq 50 \mu\text{m}$ bei höheren Verfahrwegen würde genügen). Zur Ansteuerung von Tisch (RS232-Schnittstelle) und Mikrodosierung (parallele Schnittstelle) wurde ein flexibles Programm unter Testpoint geschrieben. Als Ansteuerungseinheit für den Piezokristall diente das manuelle System MF-E-201 von Microdrop, an welchem voreingestellte Parameter von Pulslänge, -höhe und Tropfenfrequenz und -zahl pro Auslösung manuell voreingestellt werden können. Der Parameterbereich stimmt weitgehend mit dem in Kap.3.5.1 beschriebenen System überein, auch wenn die Rechteckfunktion des Spannungspulses mit einem Oszilloskop eine höherfrequente Modulation zeigte. Für den Haltedruck bzw. die Befüllung und Entleerung der Pipette sorgte eine manuell bedienbare pneumatische Druckregelungseinheit (AD-E-130). Weitere Komponenten waren eine Heizfolie und

eine Kamera von Conrad Elektronik (Hirschau), sowie ein 2.5:1 achromatisches Objektiv von Uhl (Aßlar).

Untersuchung der orts aufgelösten Oberflächenmodifikation mit Modellprotein

Als Modellprotein diente Schaf-IgG in bidest. Wasser, welches mit der OF-Microdrop auf ein 40°C warmes mit PEI oder GOPTS beschichtetes Objektträgerglas pipettiert wurde. Nach ½-1 h in einer 10%igen wässrigen Trockenmilchpulver-Lösung wurde mit bidest. Wasser gespült. Mit einem anti-Schaf-Antikörper mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP, Verdünnung 1/200) in PBS wurde ½-1 h inkubiert und mit bidest. Wasser gespült. Anschließend wurde mit dem unlöslichen blauen Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB insoluble) ½ h angefärbt und anschließend gespült. Wichtig bei jedem Schritt ist der sofortige Kontakt der Flüssigkeit mit der gesamten Fläche, da sonst Zonen unterschiedlicher Färbungsintensität entstehen.

3.5.2 NTP-Microdrop

Über die Druckverteilungseinheit (AD-E-140-8) wird der vom Druckregelungseinschub (AD-E-130) erzeugte Luftdruck auf die bis zu 8 Dosierköpfe verteilt. Der Druck beim Aufsaugen von Probe beträgt -600 hPa, beim Entleeren 800 hPa. Im befüllten Zustand und während des Pipettiervorgangs hindert ein Haltedruck zwischen 0 und -50 hPa (Standardeinstellung war -7 hPa) die Flüssigkeit am Austritt aus der Pipette (AD-K-301). Die Impulse zur Ansteuerung des Piezoaktuator dient der Dosierkopftreiber (AD-E-110), welcher Spannungspulse mit einer Höhe von 30-200 V und 10-300 µs Dauer in einer Frequenz von 0-2000 Hz liefern kann. Die Reinigung der Düse wird unterstützt durch ein 12 kHz-Signal.

Die Positioniereinheit MD-P-701 bietet Verfahrswege von 200/200/80 mm. Über eine Spindelsteigung von 2 mm erzielt der DC-Servomotor eine Positioniergenauigkeit von <10 µm und eine Wiederholgenauigkeit von <5 µm bei einer Maximalgeschwindigkeit von 125 mm/s. Die Ansteuerung der Positioniereinheit funktioniert über einen speziellen Controller, dessen einprogrammierter Befehlssatz über die serielle Schnittstelle des eingebauten DX486-Rechners von der Autodrop-Software angesprochen wurde. Die Autodrop-Software wurde schließlich von einem selbstgeschriebenen flexiblen Programm unter Testpoint

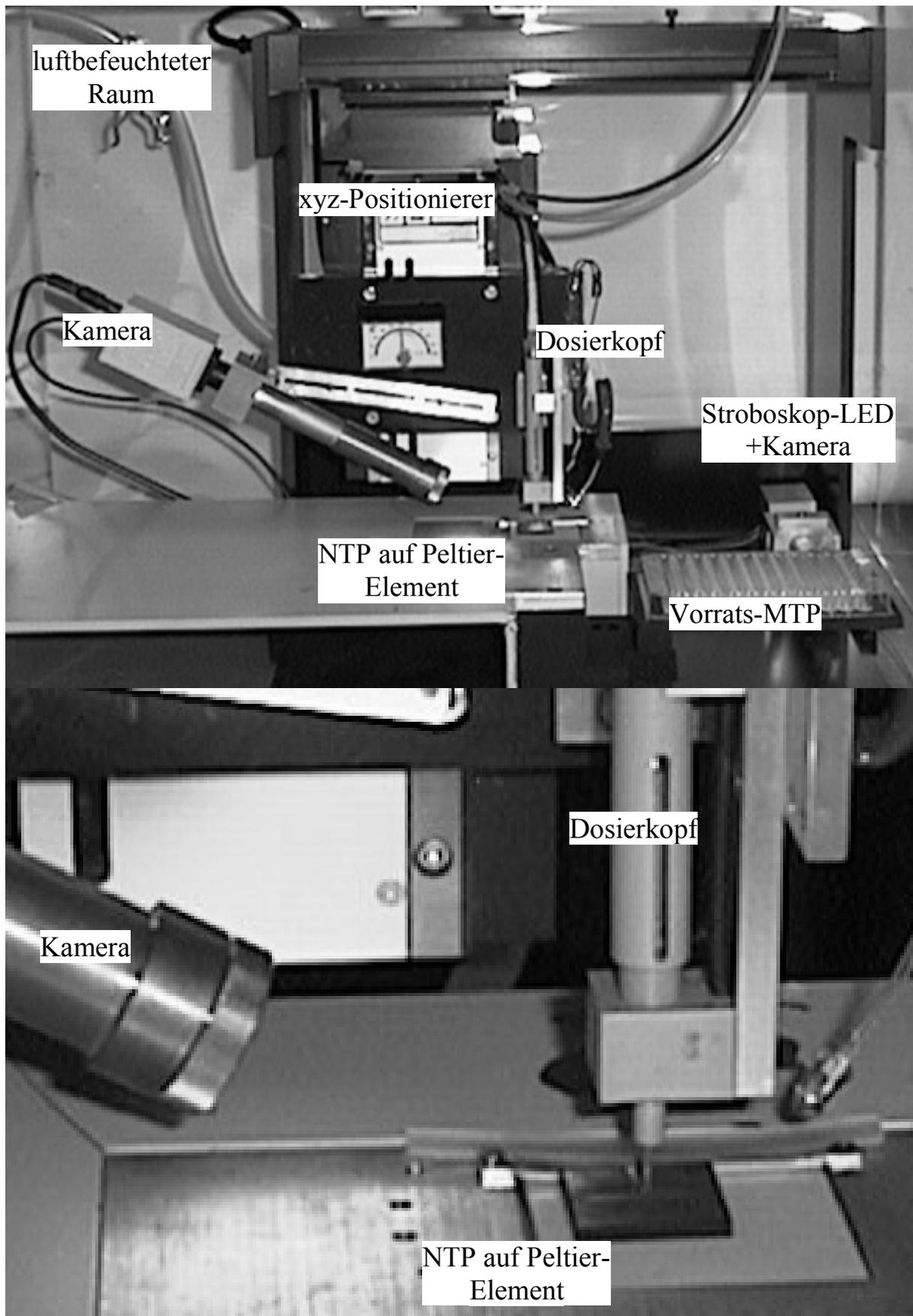


Abb. 13 Mikrodosieranlage zur Befüllung von NTP mit Kühlung und Luftbefeuchtung in Gesamt- und Detailansicht.

angesprochen. Drei mit Säulenfüllmaterial aus Glas und bidest. Wasser gefüllte Waschflaschen füllten den ca. 80 L großen Probenraum ($55 \times 38 \times 39 \text{ cm}^3$) an drei verschiedenen Stellen mit einer Blasengeschwindigkeit von je etwa 50 Blasen/s mit feuchter Luft. Durch Feinregelung der Spannung am Peltierelement wurde unter Beobachtung mit der Kamera die NTP kurz vor dem Taupunkt gehalten. Weitere Bauteile: Peltierelement und Kamera von Conrad Elektronik (Hirschau), Linse von Uhl (Aßlar).

3.5.3 NTP-GeSiM

Vom Projektpartner Bremer Institut für Angewandte Strahlentechnik (BIAS) stand zeitweilig ein Mikrodosiersystem zur NTP-Befüllung zur Verfügung, welches auf einer siliziumgeätzten Pipette der Firma GeSiM basiert. Die Pipettenöffnung ist quadratisch (Kantenlänge $65 \mu\text{m}$). Ein langer Pipettierarm ließ einen kleinen Probenraum zu. Ein sehr leistungsfähiges Peltier-Element kühlte über eine massive Metallgrundplatte den gesamten Probenraum samt dem aufliegenden massiven NTP-Halter. Zum Erreichen der gewünschten Luftfeuchtigkeit genügte daher eine Waschflasche und durch den kleineren Probenraum eine deutlich kürzere Zeitspanne als beim NTP-Microdrop-Aufbau. Durch die große Wärmekapazität der mit dem Peltierelement verbundenen Metallplatten konnte der Taupunkt jedoch im Gegensatz zum NTP-Microdrop-Aufbau nur mit Ansprechzeiten von etlichen Minuten über die Spannung am Peltier-Element nachjustiert werden. Die Kamera wurde hier außerhalb des Probenraumes montiert. Damit betrug der Abstand von Kamera zu NTP über 20 cm, so daß eine hohe Brennweite notwendig war (Linsenkombination achromat $f=6\text{mm}/d=3\text{mm}$ und $f=35\text{mm}/d=20\text{mm}$ von Edmund Scientific/Pörschke, Höchst Odw.). Der verwendete xyz-Positionierer der Firma PI bot eine Verfahrestrecke von 200 mm bei einer Auflösung von $1 \mu\text{m}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von 100 mm/s.

Das gesamte Pumpensystem war permanent mit Flüssigkeit gefüllt. Eine Kolbenpumpe sorgte für den nötigen Unterdruck beim Einsaugen der Probe. Nach dem Pipettiervorgang konnte die Probe aufgrund von diffusionsbedingtem Austausch mit der Spülflüssigkeit nicht mehr verwendet werden und wurde durch Überdruck aus der Mikropumpe entfernt. Hierbei führten schon kleinste Verunreinigungen zum Platzen der dünnen Siliziummembran der Pipettenspitze. Ein flüssigkeitsgefüllter Ausgleichsbehälter sorgte für den nötigen Unterdruck beim Pipettieren.

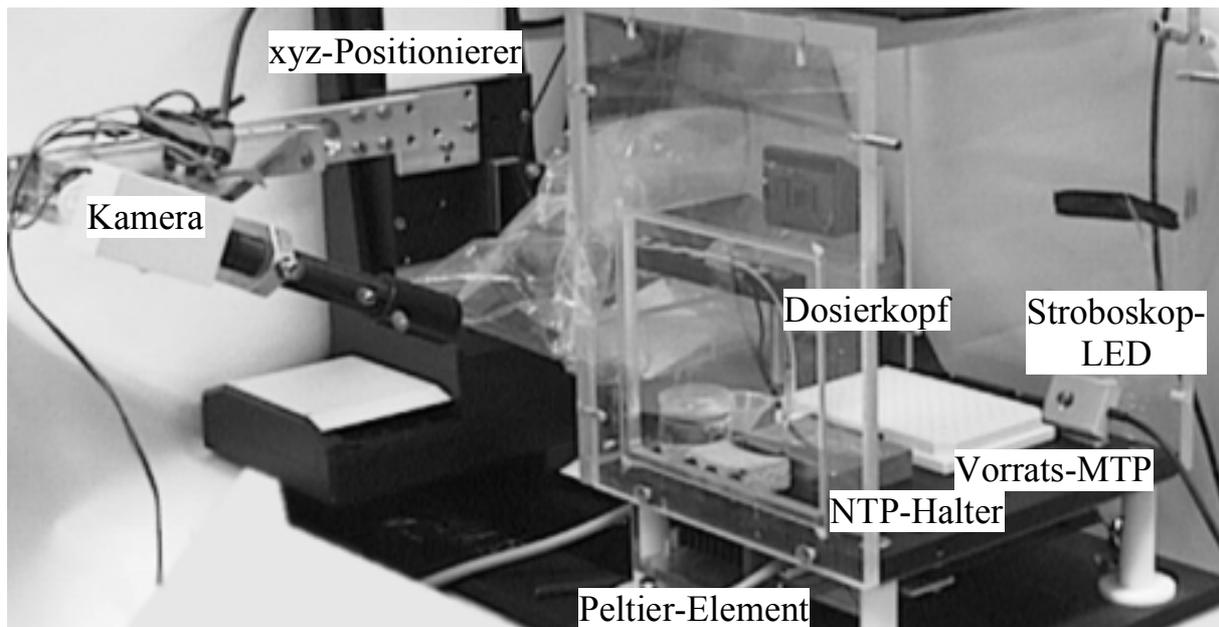


Abb. 14 Aufbau der NTP-GeSiM.

3.5.4 NTP-Platten

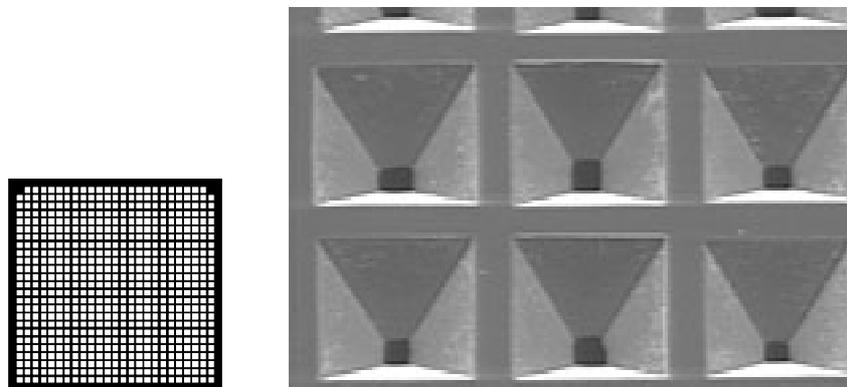


Abb. 15 Schematische Aufsicht auf eine NTP aus Kunststoff (ABS) mit 623 Kavitäten in Originalgröße und Ausschnitt von 3*2 Kavitäten (Silizium).

Zur Verwendung für den PSFIA wurden verschiedene (im Projekt LINDAU entwickelte) NTPs untersucht. Sie bestanden aus Silizium (1 mm Gesamtdicke) oder Kunststoff (2 mm) und waren jeweils $20 \times 20 \text{ mm}^2$ groß. Bei Verwendung eines $750 \text{ }\mu\text{m}$ -Rasters fanden $25 \times 25 = 625$ Kavitäten auf einer NTP Platz. Diese Anzahl verringerte sich zugunsten von Justagemarkierungen um 8 Kavitäten bei NTPs aus Silizium bzw. um 2 bei NTPs aus Kunststoff. Neben anderen Formen wurden pyramidenstumpfförmige Kavitäten bevorzugt (Abb. 15).

Zu Projektbeginn wurden Silizium-NTPs, Auftragsarbeit der Firma GeSiM, verwendet. Pyramidenstumpfförmige Vertiefungen wurden durch naßchemisches Ätzen (KOH) in Si(100)-Wafer über den anisotropen Ätzwinkel 54.7° erhalten. Die $380\ \mu\text{m}$ dünnen NTPs wurden durch anodisches Bonden mit einer dicken Pyrexschicht stabilisiert und gleichzeitig nach unten hin (Pyramidenstumpfspitze) abgedichtet. Das durchsichtige Pyrex ermöglicht auch Fluoreszenz- bzw. Absorptionsmessungen von „unten“.

Am Projektende standen Kunststoff-NTPs aus ABS (Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer, Handelsname Terulan 877M-71300) zur Verfügung, welche im Spritzgußverfahren hergestellt wurden. ABS ist ein schwarzer elastomermodifizierter Thermoplast mit hoher Schlagzähigkeit und Wärme-Formbeständigkeit, der sich zudem durch eine gute Beständigkeit gegenüber wäßrigen Säuren und Basen, aliphatischen Kohlenwasserstoffen und Fetten auszeichnet, jedoch weniger beständig gegenüber chlorierten und aromatischen Kohlenwasserstoffen und polaren Lösungsmitteln (Ester, Ketone) ist [Falbe1995].

Die relevanten Maße der Kavitäten dieser beiden NTP-Typen sind in Abb. 16 zusammengefaßt.

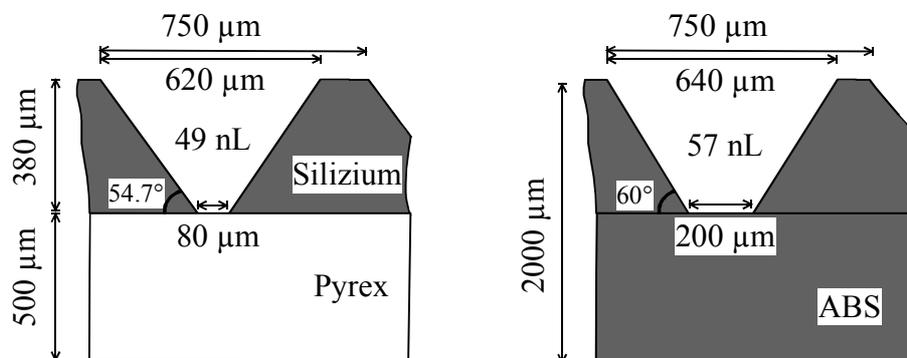


Abb. 16 Abmessungen der Einzelkavitäten der verwendeten NTPs aus Silizium und ABS (Genauigkeit ca. $\pm 10\ \mu\text{m}$).

Folgende siliziumbasierte NTP-Varianten wurden als Prototypen für Kunststoff-NTPs untersucht, aber nicht für den Einsatz im Assay herangezogen:

- Eine *dünne Pyrexschicht* (120 statt $500\ \mu\text{m}$) erwies sich als zu instabil, z.B. bei Reinigungsschritten.
- Bei NTPs mit beidseitig *offenen Pyramidenstümpfen* (ohne Pyrex-Schicht) sorgte die Oberflächenspannung nach dem Befüllen mit Mikrodosierung dafür, daß die Flüssigkeit in der Kavität gehalten wurde. Die gekühlte Unterlage wurde unter den Arbeitsbedingungen jedoch feucht, so daß Flüssigkeit

aus den offenen Kavitäten in den Spalt zwischen Unterlage und NTP gesogen wurde.

- NTPs mit *senkrechten Wandungen* können mit einem Flüssigkeitsstrahl nicht mehr so zuverlässig gereinigt werden, wie pyramidenförmige Kavitäten. Sie eignen sich nur dann, wenn auf *jeden* Spülschritt verzichtet werden kann.
- Gleiches gilt auch für die Versuche mit *umgekehrten Pyramidenstümpfen* (kleine Fläche offen). Zusätzlich wurde bedingt durch die kleine Öffnung die Unsicherheit bei der NTP-Befüllung stark erhöht, jedoch die Verdunstung (ungekühlt) vermindert.
- *Plasmageätzte* NTPs unterscheiden sich optisch von naßchemisch geätzten (grau) durch eine leicht goldene Farbe. Die veränderten Oberflächeneigenschaften bringen etwas günstigere Benetzungseigenschaften mit sich. Beim Arbeiten am Taupunkt ist die Kondensation vermindert und die Ablaufeigenschaften beim Tropfen auf den Steg sind verbessert. Diese Variante wurde jedoch nicht weiterverfolgt, um Experimenten mit preiswerten Kunststoff-NTPs den Vorrang zu geben.

3.5.5 Klebefolie

Zur Vermeidung von Verdunstung nach dem Befüllen der NTP in der Feuchtkammer wurde die NTP versiegelt. Dazu wurde eine selbstklebende transparente Klebefolie Arcare 7759 aus Polyester der Firma Adhesives Research (Glen Rock, PA, USA) verwendet, die uns freundlicherweise zu Testzwecken kostenfrei überlassen wurde. Inklusiv einer Beschichtung mit 32 g/m² medizinischem Acrylkleber AS-110 war die Klebefolie 50 µm dick. Die 180°-Ablösehaftung ist mit >330 g/cm angegeben. Zum Schutz der Klebeschicht ist die Folie mit einer silikonisierten Deckschicht versiegelt. Das Abkleben der NTPs wurde durch Abrollen mit einem Gummiwalze (d = 5 cm) auf die NTP bewerkstelligt.

3.6 Fluoreszenzdetektion

3.6.1 Fluoreszenzfarbstoff Cy5

Die Aufnahme von Fluoreszenzsignalen ist durch den permanenten Fluoreszenzhintergrund (ohne Farbstoff) stark limitiert. Da dieser im langwelligeren Bereich bedeutend schwächer ist, fiel die Wahl auf einen rot fluoreszierenden Farbstoff der Firma Amersham-Pharmacia-Biotech (Braunschweig):

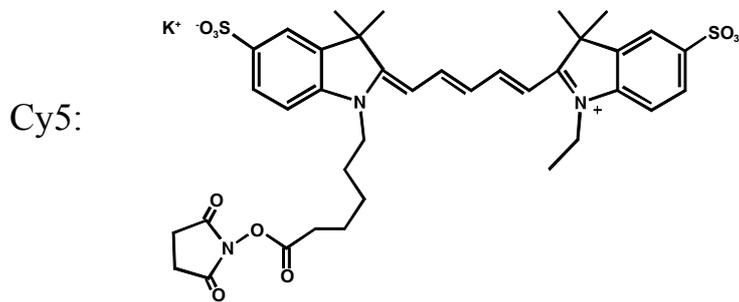


Abb. 17 Strukturformel von Cy5 (-NHS)

1-(e-Carboxypentyl)-1'-(ethyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin-5,5'-disulfonatkaliumsalz-N-hydroxysuccinimidester wird in seiner nicht-aktivierten Form kurz Cy5TM genannt¹⁸. Die aktivierte Form erlaubt eine einfache Anbindung an eine Aminofunktionen. Grundlegende Daten des freien Farbstoffs finden sich in [Mujumdar1993], weitergehende Untersuchungen und Charakterisierung von Protein-Konjugaten in [Schobel1999a]. Einige interessante Daten sind Tab. 5 zusammengefaßt.

	$\lambda_{\text{abs,max}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em,max}}$ [nm]	$\epsilon(\lambda_{\text{abs,max}})$ [L/(mol·cm)]	ϕ_F	Monomer
Cy5 in PBS	647	665	250000	0.27	100%
Cy5-IgG (4.5:1) in PBS	649	667	250000	0.40	69%

Tab. 5 Eigenschaften von freiem und gebundenem Cy5.

¹⁸ Die Abkürzung für Cy5 beruht auf den 5 C-Atomen der verbindenden Polymethinkette dieses Cyaninfarbstoffes.

Die Anbindung des Farbstoffes an einen Antikörper bewirkt eine geringfügige langwellige Verschiebung der Maxima von Absorption $\lambda_{\text{abs,max}}$ und Fluoreszenz $\lambda_{\text{em,max}}$ um 2 nm bei gleichbleibendem Extinktionskoeffizient ϵ . Die Fluoreszenz-Quantenausbeute ϕ_F nimmt durch die rigidere (starrere) Umgebung bei Anbindung ans Protein zu, obwohl es bereits bei 4.5 Cy5 pro Antikörper zu einem hohen Anteil an nicht fluoreszierendem Dimer-Komplex kommt (nur noch 69% Monomer). Ein optimales Verhältnis an Cy5 pro Antikörper liegt bei 4:1. Oberhalb dieses Wertes findet keine Steigerung der Fluoreszenz mehr statt [Schobel1999a].

Abb. 18 zeigt das Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum für Cy5. Der Stokes-Shift von 18 nm erlaubt eine Abtrennung des Anregungslichtes durch optische Filter.

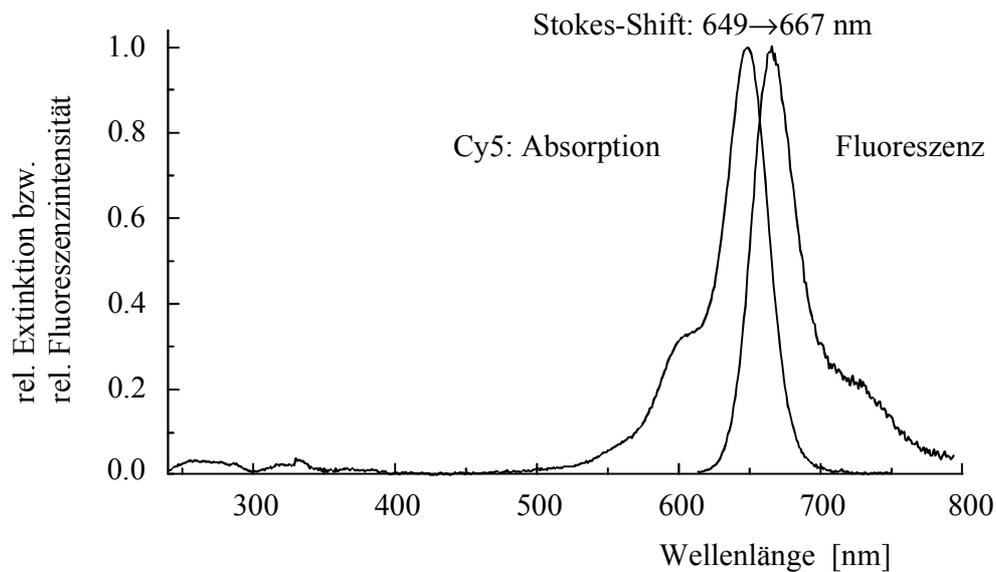


Abb. 18 Absorptions- und Fluoreszenzspektren eines Cy5-IgG-Konjugats.

3.6.2 Küvetten-Fluoreszenz-Spektrometer LS50B

Erste Fluoreszenzmessungen für den PSFIA (Kap.4.4, S.126f) im MTP-Maßstab bei gleichzeitig hoher Meßgenauigkeit wurden mit einem Küvetten-Luminiszenz-Spektrometer LS50B von Perkin Elmer (Überlingen) vorgenommen. Als Lichtquelle diente eine gepulste Xenon-Entladungslampe mit einem Energieäquivalent von 20 kW für 8 μ s Pulsdauer (Halbwertsbreite $<10 \mu$ s). Zur Messung von Cy5 und Cy5.5 war ein rotempfindlicher Photomultiplier (R928)

eingebaut. Zusammen mit dem Monk-Gillieson Typ Monochromator (Emission 200-900 nm) lassen sich die Wellenlängen nach Herstellerangaben auf ± 1.0 nm genau bei einer Reproduzierbarkeit von ± 0.5 nm einstellen. Der spektrale Bandpaß von Anregungsspalt (2.5-15 nm) und Emissionsspalt (2.5-20 nm) ließ sich in 0.1 nm-Schritten variieren. Die Scan-Geschwindigkeit konnte in einer Auflösung von 1 nm/min zwischen 10 und 1500 nm/min verändert werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird mit 500:1 rms angegeben (unter Verwendung der Raman-Bande von Wasser bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und jeweils 10 nm Bandpaß).

Die verwendeten Standardparameter für Cy5 waren jeweils 5 nm Bandpaß, 649 nm Anregung, 120 nm/min Vorschub-Geschwindigkeit (scan-speed) bei 5 Akkumulationen pro Messung für Emissionsspektren. Für relative Konzentrationsbestimmungen im Assay waren die Parameter: 647 nm Wellenlänge Anregung, 667 nm Emission, und es wurden bei einem Datenintervall und einer Ansprechzeit von je 2 s 65 Meßwerte in einer Zeit von 130 s je Konzentration aufgezeichnet.

3.6.3 MTP-Fluoreszenzleser LSR200

Im Vergleich zu den Messungen in der Küvette bietet der MTP-Luminiszenzleser LSR200 von Perkin Elmer (Überlingen) einen wesentlich höheren Proben-durchsatz. Für Messungen von Cy5 wurde das LSR200 mit einem entsprechenden Anregungsfilter bei 640 nm umgerüstet. Die Lichtquelle entspricht der im LS50B. Das Licht wird in einen Y-Lichtleiter eingekoppelt und zu einer MTP-Kavität geleitet. Das Fluoreszenzlicht aus der Kavität wird wieder vom Lichtleiter aufgesammelt und zur Detektionseinheit mit Monochromator und Photomultiplier geleitet. Das Auslesen einer MTP funktioniert sequentiell durch automatische Positionierung des Lichtleiters.

Standardparameter waren 10 s Meßdauer pro Kavität und 667 nm Emissionswellenlänge.

3.6.4 NTP-Fluoreszenzleser BioScan

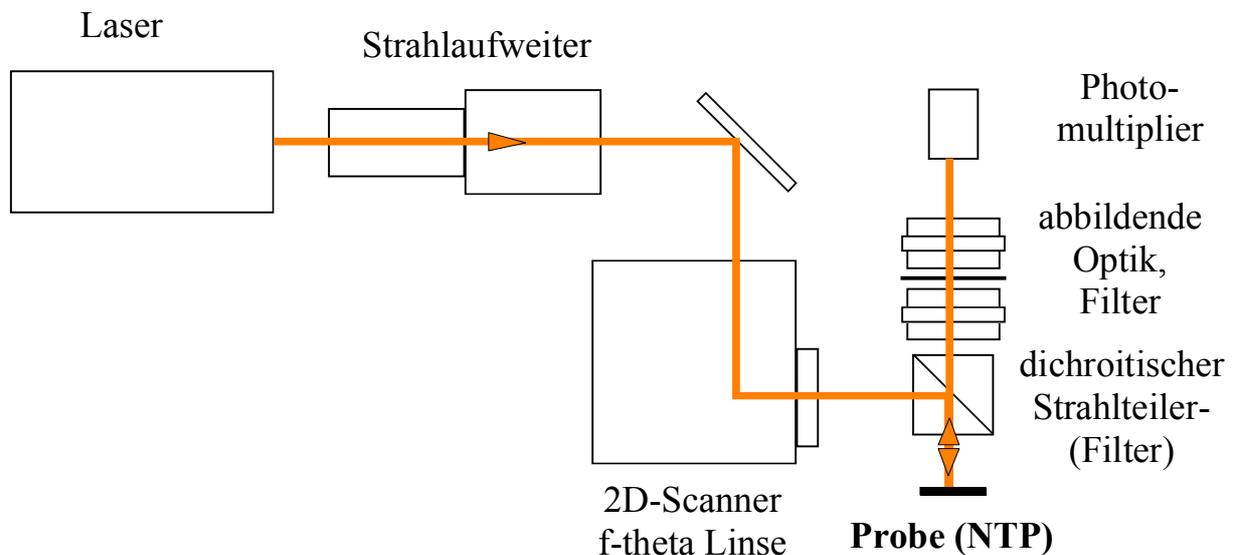


Abb. 19 Scannender NTP-Fluoreszenzleser „BioScan“: Schematischer Aufbau

Zur Auswertung der Fluoreszenzsignale in der NTP wurde von der Firma Perkin Elmer / Applied Biosystems in Überlingen der sogenannte „BioScan“ entwickelt [LINDAU1999]. In der verfügbaren Version waren die Filterkomponenten speziell auf die Verwendung von Cy5-Farbstoffen ausgerichtet. Der Aufbau der optischen Komponenten ist in Abb. 19 schematisch dargestellt:

Die NTP wurde mit einem (aufgeweiteten) Laserstrahl bei 639 nm Wellenlänge in einem 2D-Scanners zeilenweise abgerastert. In dieser Konfiguration erfolgte Anregung und Detektion von derselben Seite („Epi-mode“). Das Fluoreszenzlicht wurde (zusammen mit reflektiertem Anregungslicht) über der NTP von einer großen Linse eingesammelt und am dichroitischen Strahlteiler aufgespalten, wobei das Anregungslicht für den Detektionsstrahlengang bereits auf ca. 5% geblockt wurde. Durch die zusätzliche abbildende Optik, ein Kantenfilter (EFLP 665 nm) und ein Emissionsfilter (IF 670 nm) wird der Anregungslaser auf $>OD\ 6$ (also 10^{-6}) gesperrt. Die numerische Apertur beträgt 0.24 und die Kollektionseffizienz damit etwa 1%. Die Anordnung ermöglicht somit ein sehr hohes Verhältnis an Nutz- zu Hintergrundsignal.

Durch eine nachgeschaltete Software werden die Fluoreszenzintensitäten an jedem Ort auf der NTP in Form eines *Grauwertbildes* mit 12 Bit zusammengesetzt. Standardparameter waren 1000 V Photomultiplierspannung, 20 μm Auflösung (1000*1000 Bildpunkte für eine NTP), 1-fach Oversampling, 150 mm/s

Vorschubgeschwindigkeit und 12500 kHz Abtastfrequenz. Die Verschiebung der NTP aus der 0/0-Position betrug $x -1500 \mu\text{m}$ und $y +400 \mu\text{m}$. Die effektive Meßdauer betrug 172 s/NTP. Erste Messungen erfolgten mit 1000 mm/s Vorschubgeschwindigkeit entsprechend 30 s/NTP. Die effektiven Meßdauern pro NTP betragen daher 130-150% vom theoretisch minimal notwendigen Wert (20 bzw. 133 s).

An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß bei dem verwendeten Aufbau *in jedem Bildpunkt jeweils die Gesamtfluoreszenz* erfaßt wird, die bei der Bestrahlung dieses Punktes entsteht.

⇒ Dadurch kann es z.B. zu Verzerrungen der tatsächlichen Fluoreszenzintensität aufgrund von Mehrfachreflexionen in der NTP kommen!

Eine exakte *ortsaufgelöste* Beobachtung würde die Modifikation des BioScan zum sogenannten *bikonfokalen Aufbau* erlauben. Hier wird das Emissionslicht über die Spiegel des 2D-Scanners reflektiert. Eine abbildende Optik läßt das Licht auf eine ortsfeste Lochblende („pinhole“) vor dem Photomultiplier fallen, so daß nur Emissionslicht der beleuchteten Stelle registriert wird. Dieser teilweise realisierte Aufbau mit „echter Ortsauflösung“ stand für die Messungen in dieser Arbeit leider nicht zur Verfügung.

3.6.5 Auswertung der Fluoreszenzintensitäten

Zur Auswertung wurde ein unter Delphi erstelltes Windows-Programm (Martin Hessling, LLG Göttingen) verwendet bzw. modifiziert. Es erlaubt eine halbautomatische Auswertung der Pixelbilder des Fluoreszenzlesers. Diese enthalten ein Abbild der NTP mit 12 Bit Helligkeitswerten bzw. Fluoreszenzintensitäten. Mit „UTHSCSA Image Tool“¹⁹ kann das Dateiformat vom PE-Format (*.flf, 2048 Byte Header) in ein spezielles Bitmap-Bildformat (*.bmp, 66 Byte Header) konvertiert werden und dann in das Delphi-Programm geladen werden. Eine quadratische oder runde Fläche mit frei einstellbarem „Radius“ dient als Mauszeiger und kann über dem NTP-Bild bewegt werden. Der mittlere Helligkeitswert (Fluoreszenzintensität) unterhalb dieser Fläche wird als Zahlenwert ausgegeben. Zur Auswertung mehrerer Kavitäten einer NTP werden die vier Eck-Kavitäten mit der Maus markiert und die Anzahl der Kavitäten in x- und y-

¹⁹ UTHSCSA ImageTool Programm (entwickelt an der University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas und verfügbar über Internet über anonymous FTP von <ftp://maxrad6.uthscsa.edu>)

Richtung vorgegeben. Ungenauigkeiten bei dieser manuellen Eingabe werden automatisch über eine Mittelung der vier Steigungen vermindert. Durch die unabhängige Skalierungen von x- und y-Richtung kann eine lineare Verzerrung aufgefangen werden. Die quadratischen Auswertebereiche der einzelnen Kavitäten werden in gleicher Weise wie die gesamte Auswertematrix gedreht.

3.7 RIFs, SPR und FIA

3.7.1 Optik und Lichtquelle

- Halbzylindrisches Prisma, Glastyp WG335, Brechungsindex $n_D=1.62$, $r=20\text{mm}$ von Schott (Mainz).
- Gleichseitige Prismen 10 mm und 15 mm Seitenlänge, Glastyp SF18, $n_D=1.72$ von Edmund Scientific (New York, USA)
- Lichtquelle für SPR: 5V/5W Krypton mit integriertem Reflektor, Welch Allyn (New York, USA). Die Lichtquelle wurde auf einer optischen Bank mit Kondensor- und Sammellinse auf das Lichtleiterende fokussiert. Eine mit Wasser gefüllte Quarzküvette vor dem Lichtleiter absorbierte den Großteil der infraroten Strahlung der Lampe.
- Lichtquelle für RIFs: Eine 12V/20W Wolframdraht-Halogenlampe auf einer optischen Bank mit Vorderflächenhohlspiegel Kondensor- und Sammellinse wurde auf das Lichtleiterende fokussiert. Eine mit Wasser gefüllte Quarzküvette vor dem Lichtleiter diente der Absorption infraroter Strahlung.
- Lichtleiter für SPR-Aufbauten II und III: HCP-Quarzlichtleiter 600 μm (Anregung) und 400 μm (Detektion).
- Lichtleiter für RIFs-Aufbau: Y-Quarzlichtleiter, 600 μm Durchmesser.
- Dichroitischer Polarisationsfilter („Polarisationsfolie“) Typ 4K, Polarisationsgrad >99.97%, Spindler&Hoyer, (Göttingen).
- RIFs-Transducer bestanden aus D263-Float-Glas (ca. 10*10 mm), welches mit einem Interferenzschichtsystem beschichtet wurde (10 nm Ta_2O_5 / 330 nm SiO_2) von Schott (Mainz).

3.7.2 Spektrometer

- Für SPR: S1000 von Ocean Optics (Florida, USA). Spezifikationen: CCD-Zeile mit 1024 Dioden (je $25 \times 25 \mu\text{m}^2$), Wellenlängenbereich 354 bis 860 nm, spektrale Auflösung 5 nm (Rayleigh) mit einer $100 \mu\text{m}$ -Faser, Intensitätsauflösung 12 Bit.
- Für RfS: MCS 210 von (Carl Zeiss GmbH, Jena). Spezifikationen: CCD-Zeile mit 512 Dioden (je $50 \times 50 \mu\text{m}^2$), mit Spalt, spektrale Auflösung 2.4 nm (Rayleigh), Intensitätsauflösung 12 Bit.

3.7.3 FIA-Systeme

Zur Handhabung flüssiger Proben kamen Systeme der Fließinjektionsanalyse (FIA) zum Einsatz. Durch die automatisierte Steuerung des Probenstromes ließen sich sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielen. Der Betrieb unter Argon-Überdruck verhinderte das Ausgasen der Lösungen im Probenraum.

Abb. 20 zeigt die beiden typischen Einstellungen einer FIA, die durch Umschalten des Scherventils erhalten werden. Im Normalbetrieb (**Load**) kann durch Zuschalten von Pumpe 2 Analyt in die Probenschleife gezogen werden, von wo aus er in umgekehrter Fließrichtung durch Umschalten auf **Inject** in die Meßzelle injiziert wird.

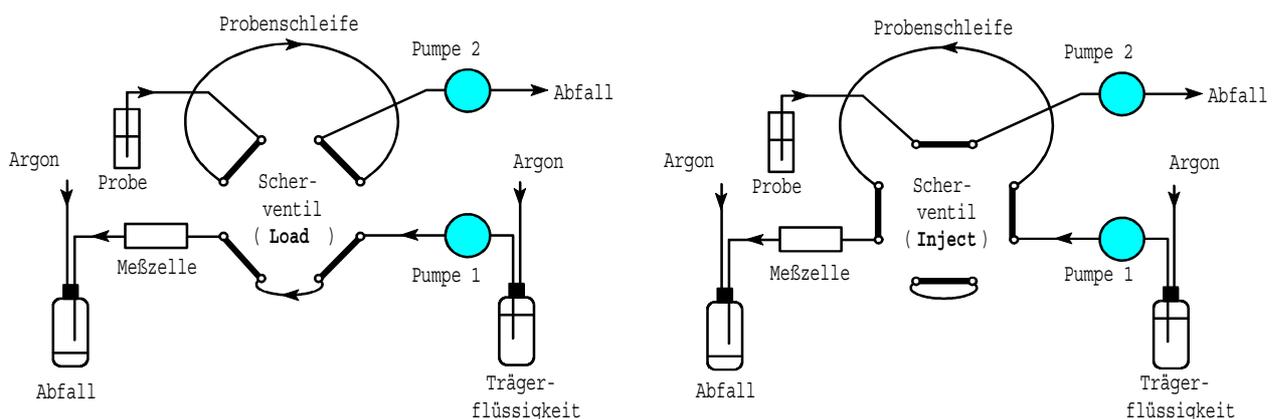


Abb. 20 Schematische Darstellung einer Fließ-Injektions-Anlage (FIA).

Zum Einsatz kamen eine EVA-FIA mit einer kombinierten Peristaltikpumpe und 8-Wege-Ventil von Eppendorf (Hamburg) für den SPR-Aufbau I. Für alle weiteren Bindungsexperimente mit RfS und SPR wurde eine ASIA-FIA mit zwei Peristaltikpumpen und einem 6-Wege-Ventil von Ismatec (Glattbrugg-

Zürich, Schweiz) verwendet. Beide FIA-Systeme sind eigenständig bedienbar, wurden in der Regel aber über Programmzeilencode im Meß- und Steuerprogramm Measure (Windows) reproduzierbar angesteuert. Die Flußzelle für RfS war aus Polyacrylnitril mit den Maßen $4 \times 1 \times 0.05 \text{ mm}^3$ ($< 200 \text{ nL}$). Die Flußzellen-Varianten für SPR sind in Kap.3.7.5 spezifiziert.

3.7.4 Software

Zur Ansteuerung von FIA und Datenerfassung vom Spektrometer wurde das Windows-Programm Measure verwendet, zur Bestimmung der Extremwerte des Spektrums (linear least squares) das Windows-Programm IFZ²⁰, welches durch Datenaustausch mit Measure eine graphische on-line-Auswertung des Bindungsexperimentes ermöglicht. Die Standardeinstellungen zur Extremwertbestimmungen bei RfS waren für die 10/330-Plättchen: Polynom 2-ter Ordnung, 20% lineare Gewichtung beim Fit, 4500 Wellenzahlen mit Bewegung des Fenstermittelpunktes (move) und 100 Spektren mit 42.6 ms Integrationszeit pro Meßpunkt. Die SPR-Wellenlänge wurde angenähert über eine parabolische Anpassungsfunktion, welche die Halbwertsbreite des Plasmons in der Reflektivitätskurve überstreicht.

3.7.5 SPR-Transducer

Transducer-Variation

Der in [Stemmler1995] beschriebene Aufbau I (Abb. 21-I) diente als Ausgangspunkt und Referenz für die Leistungsfähigkeit der modifizierten Aufbauten. Zur Miniaturisierung (Aufbau II und III, Abb. 21-II und -III) wurden die Kollimatorlinsen und Blenden entfernt. Anregungs- und Detektionslichtleiter wurden in direkten Kontakt mit dem Prisma gebracht. Die verbleibenden optischen Bauteile bestanden aus einer Polarisationsfolie und (nur für Aufbau III) in einem provisorischen Oberflächenspiegel (metallbedampftes Glas). Das Halbzylinder-Prisma wurde durch ein gleichseitiges Prisma mit Kantenlänge von 10 mm bzw. 15 mm ersetzt. Das eingestrahlte Licht aus der Anregungsfaser wurde an der goldbeschichteten Basisfläche des Prismas reflektiert und von der Detektionsfaser eingesammelt. Die Apertur dieses Systems definiert sich so-

²⁰ Measure und IFZ von Brecht A., Kraus G., Gauglitz G., et al., Tübingen.

wohl über beide Durchmesser von Anregungs- und Detektionsfaser, sowie auch über ihre optische Distanz. Um Reflexionsverluste zu reduzieren, wurden die Lichtleiter mit Hilfe von Zeiss-Immersionssöl optisch angekuppelt.

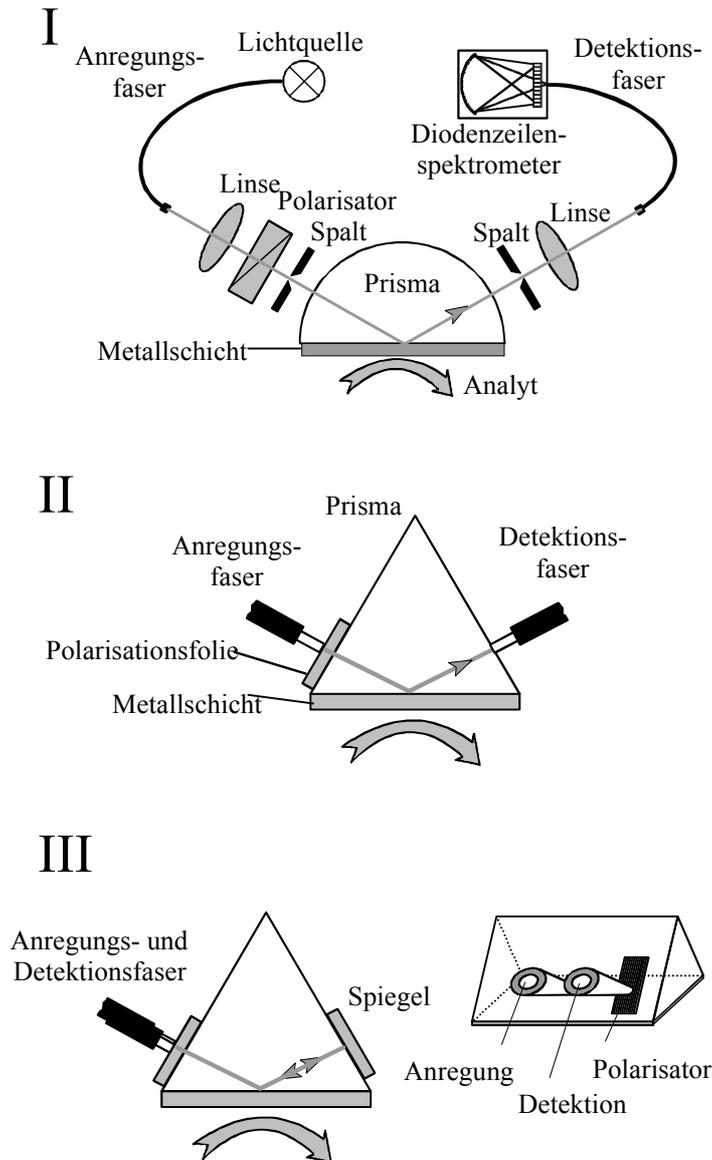


Abb. 21 (I) Aufbau I („Laboraufbau“): Flexibler Laboraufbau zur Untersuchung spektraler SPR. (II) Aufbau II mit gleichseitigem Prisma, festem Winkel und einfacher optischer Anbindung. (III) Aufbau III („verspiegelter Aufbau“): miniaturisierter Aufbau, modifiziert im Hinblick auf einen kompakteren Sensorkopf.

In Aufbau II sind Anregungs- und Detektionsfaser an den gegenüberliegenden Prismenseiten angebracht, wobei die Polarisationsfolie auf der Anregungsseite (mit Immersionssöl) angebracht wurde. Um eine weitere Verkleinerung des Systems zu erreichen, wurden im Aufbau III die Anregungs- und Detektionsfa-

ser auf derselben Prismenseite plaziert. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde ein provisorischer Oberflächenspiegel mit Immersionsöl am Prisma fixiert. Das unpolarisierte Licht der Anregungsfaser wird in das Prisma eingekoppelt, die gewünschte Polarisationssebene wird über die Polarisationsfolie selektiert, welche zwischen Anregungs- oder Detektionsfaser und dem Prisma angebracht ist.

Ein Referenzspektrum kann zum einen durch Drehen der Polarisationsfolie oder auch über eine zweite Detektionsfaser mit entsprechend vorgeschalteter Polarisationsfolie erhalten werden. Für ein Prisma mit einem Brechungsindex von 1.7 haben die verwendeten Lichtleiter einen maximalen Einkopplungswinkel von etwa 10° . Da der von der Faser beleuchtete Bereich sich auf einige Millimeter Durchmesser ausdehnen wird, bevor er die Detektionsfaser erreicht, erlaubt dies eine gewissen Positionierungstoleranz bezüglich Winkel und Position der Fasern.

Bei identische Abmessungen der Prismen verdoppelt sich der optische Abstand zwischen Anregungs- und Detektionsfaser beim Übergang von Aufbau II zu Aufbau III. Daher sollte sich auch der detektierbare Winkelbereich halbieren, die detektierte Intensität jedoch vierteln. Der detektierbare Winkelbereich läßt sich aus der Geometrie berechnen und ist in Tab. 6 (S.88) gegeben (maximaler Winkelfehler).

Parameter

Die Prismen (Aufbau II und III) bzw. die Gläser (Aufbau I) wurden im UHV mit wenigen nm Titan (Haftvermittler) und ca. 50 nm Gold bedampft und mit 3-Mercaptopropionsäure modifiziert (Kap.3.4.1, S.56f).

Die Flußzellen bestanden aus einem Polyacrylnitrilblock mit eingelassenen Zuleitungen aus Edelstahl (0.8 mm Innendurchmesser), welcher mit einer Silikonmatte mit ovalem Ausschnitt des Flußzellenvolumens bedeckt ist, auf welche wiederum das Prisma gepreßt war. Die Abmessungen $L*B*H$ [mm^3] betragen für Aufbau I $14*7*0.5$ (40 μL Volumen), Aufbau II $9*5*0.5$ (20 μL Volumen), Aufbau III: $7.5*4*0.5$ (13 μL Volumen).

Die Flußraten betragen während der Inkubation 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ein Austausch der Lösungen wurde durch eine erhöhte Flußrate von 240 $\mu\text{L}/\text{min}$ gefördert.

Die Konzentration von t-BSA-Bi bzw. pSA betrug 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oder auch 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS. Zwischen 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konnte kein Einfluß

der Konzentration auf die Sättigungssignale beobachtet werden. Die Lösungen wurden abwechselnd injiziert.

Der *Thrombin-Assay* mit Aufbau II/15mm wurde mit einer Zeitauflösung von 0.1 Spektren/s bei konstanter Flußrate durchgeführt. Zur vollständigen Regeneration wurden zwei kurze Pulse Salzsäure (pH 1.8) verwendet.

Der Thrombin-Inhibitor (Kap.3.1, S.49) wurde über seine Aminofunktion an die Carboxyoberfläche gekuppelt. Dazu wurden 10µL einer Lösung aus 250 mg/mL Inhibitor in DMF und 2.5% (v/v) DIC auf den Transducer gegeben und über Nacht in einer DMF-Kammer belassen. Dann wurde kräftig mit DMF, Methanol und Wasser gespült und am Stickstoff getrocknet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 SPR

SPR ist das gebräuchlichste Werkzeug zur direkten markierungsfreien Detektion affiner Wechselwirkungen an einer Oberfläche. Im folgenden soll das Potential eines spektralen SPR-Systems mit planarer Transducer-Oberfläche bezüglich einer Miniaturisierung untersucht werden. Ziel ist ein per Lichtleiter fernabfragbares miniaturisiertes Sensorsystem mit reduzierter Optik und einfacher Probenhandhabung. Die Vor- und Nachteile dieser Konfiguration sind in Kap.2.3.2 (S.38f) beschrieben.

Das gut charakterisierte System „Biotin-Avidin“ (Kap.2.1.5, S.13) wird im folgenden herangezogen, um die Eigenschaften der verschiedenen Aufbauten miteinander vergleichen zu können. Dabei wird mittels eines programmierten FIA-Ablaufes abwechselnd Biotin-Konjugat und poly-Streptavidin über die modifizierte Goldoberfläche gepumpt. Das Resultat ist ein Multischichtsystem mit konstanten Schichtdicken der Doppelschichten [Spaeth1997].

4.1.1 Optische Eigenschaften

Ein Überblick der Grundparameter und Ergebnisse der Brechungsindexänderungen sind in Tab. 6 gegeben. Die mit Aufbau I erhaltenen Resonanzkurven wiesen ein hohes Verhältnis von maximaler zu minimaler Reflektivität auf, obwohl der Plasmon-„Dip“ breiter und weniger tief war, als die Simulation erwarten ließ. Es handelt sich um eine generelle Beobachtung, von der angenommen werden kann, daß sie auf Rauigkeit und Inhomogenität des Metallfilms zurückzuführen ist. Die Resonanzkurven für Aufbau I und III sind in Abb. 22 gezeigt.

Der maximal detektierte Winkelbereich der Detektionsfaser liegt bei $\pm 2.6^\circ$. Simulationen zeigen eine Verschiebung der Resonanzwellenlänge um etwa 10 nm/Grad. Da der detektierte Winkelbereich bei einer Wegverkürzung des Lichtes (kleineres Prisma) größer wird, muß sich daher auch das Plasmon verbreitern. Tatsächlich sind die Plasmonen deutlich verbreitert, wenn das 15mm-Prisma durch ein 10mm-Prisma ersetzt wird. Die Halbwertsbreite des Plasmons wirkt sich bezüglich Datenerfassung und -auswertung nicht negativ

aus. Betrachtet man Aufbau III, so sollte der Lichtstrahl unter idealen Bedingungen den Goldfilm zweimal unter gleichem Winkel treffen. Die resultierende Reflektivität sollte als Ergebnis zweier sich überlagernder Oberflächenplasmonen etwa der quadrierten Reflektivität eines Oberflächenplasmons entsprechen, welches mit Aufbau II erhalten wurde. Das entspräche einem tieferen, aber breiteren Dip. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, daß alle Spektren einzeln auf das T_E -Moden-Spektrum normiert wurden, welches für den jeweiligen Aufbau zuvor aufgezeichnet wurde.

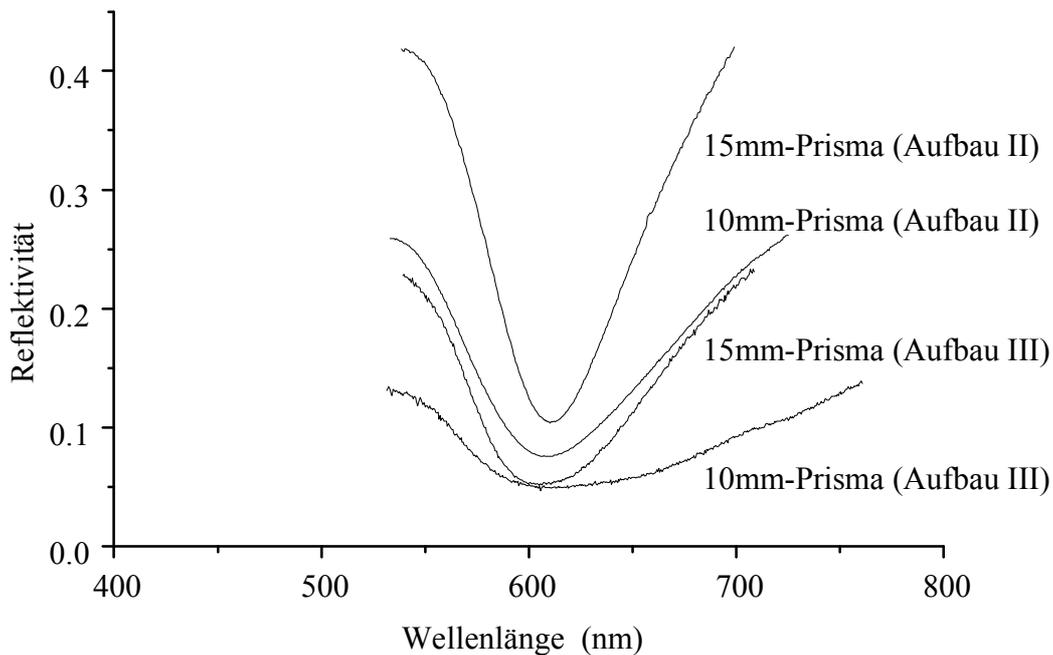


Abb. 22 *Typische Oberflächenplasmonen mit den miniaturisierten Aufbauten (II und III).*

Tatsächlich weisen die für Aufbau III erhaltenen Resonanzkurven eine verminderte Reflektivität und eine erhöhte Halbwertsbreite auf. Auch leichte Ungenauigkeiten bei der geometrischen Ausrichtung des Aufbaus können zu einer weiteren Erhöhung der Halbwertsbreite führen, wenn dadurch die erste und die zweite Reflexion unter unterschiedlichen Einfallswinkeln stattfindet. Das wiederum würde eine Verbreiterung der Resonanz zur Folge haben, da sich Plasmonen von zwei unterschiedlichen Anregungswinkeln überlagern würden. Wie bereits diskutiert, wird bereits eine Winkeldifferenz von 1° zwischen beiden Reflexionen zu einer signifikanten Verbreiterung führen.

Die Parameter der Datenerfassung aus Tab. 6 (S.88) spiegeln die relativen detektierten Lichtintensitäten mit den unterschiedlichen Aufbauten wider. Die Integrationszeit des Detektors wurde jeweils so gewählt, daß die Signalhöhe für

das Referenz-Signal (T_E -Mode) maximal war. Die reziproke Integrationszeit dieses Referenzsignals kann demnach als Maß für die erhaltenen Lichtintensitäten erhalten werden. Wie erwartet verringert sich die Lichtintensität beim Übergang vom unverspiegelten (II) zum verspiegelten Aufbau (III). Beim Übergang vom 15mm- zum 10mm-Prisma sollte sich die Intensität erhöhen. Dies trifft für den unverspiegelten Aufbau (II) zu, nicht jedoch für den verspiegelten (III). Die Ursache hierfür liegt vermutlich an einer unzureichenden geometrischen Justierung.

Die Empfindlichkeit und die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bestimmen die Leistungsfähigkeit des Aufbaus. Die Empfindlichkeit ist definiert als das Verhältnis der Verschiebung der SPR-Wellenlänge zur Änderung des Volumenbrechungsindex. Die Brechungsindizes der hierfür verwendeten Kaliumsulfatlösungen wurden mit einem Abbé-Refraktometer kontrolliert. Die Lösungen wurden nach einem statistischen Versuchsplan injiziert. Für alle Aufbauten war der Zusammenhang zwischen Resonanzwellenlänge und Volumenbrechungsindex linear. Mit dem Laboraufbau I wurde die höchste Empfindlichkeit mit $1700 \text{ nm}/\Delta n$ erzielt, weil hier der Brechungsindex des Prismas am niedrigsten war. Wie erwartet, lag die Empfindlichkeit für die Aufbauten II und III niedriger. Der Unterschied zwischen dem 10mm- und dem 15mm-Prisma deutet auf geringfügig differierende Einfallswinkel beider Aufbauten hin.

Die Auflösung des Gerätes bzw. die Nachweisgrenze für den Volumenbrechungsindex ist gegeben durch das Rauschen der Grundlinie (ausgedrückt als rms-Unsicherheit bei der Bestimmung der Resonanzwellenlänge) und der Geräteempfindlichkeit. Aus den Rauschwerten läßt sich ersehen, daß Aufbau II/10mm (5 pm) eine gleich gute oder gar bessere Leistungsfähigkeit verglichen mit Aufbau I (5 pm) hat, wo etwa doppelt so viele Spektren akkumuliert wurden (höhere Lichtintensität und geringere Zeitauflösung). Die Nachweisgrenze für Volumenbrechungsindexänderungen sind vergleichbar und liegen bei 10^{-5} . Das Rauschen für Aufbau II/15mm liegt bei etwa 7 pm, was einem Detektionslimit für Volumenbrechungsindexänderungen (3σ) von $1.7 \cdot 10^{-5}$ entspricht. Dieser höhere Wert hat seine Ursache in einer kleineren Lichtintensität ($69\% = 216/315$) und ist unter äquivalenten Bedingungen mit dem Laboraufbau I vergleichbar. Für den verspiegelten Aufbau III ergab sich eine verschlechterte Nachweisgrenze. Im Fall des 10mm-Prismas liegt ein deutlich verbreitertes Plasmon vor, was zu einem erhöhten Signalrauschen führt. Dies läßt, wie bereits erwähnt, auf Positionierungsprobleme schließen. Prinzipiell sollte in diesem

Fall die Leistungsfähigkeit mit dem kleinerem Prisma höher sein. Schon die kleinere Signalhöhe beim 15mm-Prisma verdeutlicht seine reduzierte Leistungsfähigkeit.

Aufbau # / Prismengröße	I	II / 15mm	II / 10mm	III / 15mm	III / 10mm
Brechungsindex des Prismas	1.62	1.72	1.72	1.72	1.72
maximaler Winkelfehler [°]	—	± 1.7	± 2.6	± 0.85	± 1.3
Halbwertsbreite der Plasmonen [nm]	83	75	96	92	126
Reflektivität (max./min.)	0.63 / 0.23	0.41 / 0.1	0.26 / 0.075	0.23 / 0.05	0.16 / 0.05
Zeitauflösung [1/s]	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
Integrationszeit [ms]	216	315	126	1365	1365
Anzahl der akkumulierten Spektren pro Datenpunkt	40	13	26	3	3
Rauschen der SPR-Wellenlänge (Volumenbrechungsindexversuch) [pm]	5	7	5	18	50
Empfindlichkeit (Volumen) [nm/dn]	1700	1244 ± 4	1455 ± 11	1237 ± 10	1565 ± 17
Nachweisgrenze (Volumen, 3σ) [Brechungsindex]	1·10 ⁻⁰⁵	1.7·10 ⁻⁰⁵	1·10 ⁻⁰⁵	4.4·10 ⁻⁰⁵	9.6·10 ⁻⁰⁵

Tab. 6 Optische Charakteristika und grundlegende Eigenschaften der Aufbauten I-III

4.1.2 Biospezifische Wechselwirkung

Zwei bioaffine Systeme kamen zum Einsatz, um sicherzustellen, daß die in den Experimenten mit Volumenbrechungsindizes gefundenen Charakteristika auch für die Beobachtung biomolekularer Wechselwirkungen Bestand haben. Für erste Tests wurde das Biotin/Streptavidin-System (Kap.2.1.5, S.13) verwendet. Das konstante Schichtdickenwachstum jeder Doppelschicht ermöglicht es, die

Leistungsfähigkeit des Systems über praktisch die gesamte Eindringtiefe des Evaneszentfeldes hinweg zu beurteilen.

Die Regeneration dieser äußerst fest verankerten Proteinschichten gelang mit kalter Piranha-Lösung (Kap.3.4.1, S.56f). Andere beschriebene Verfahren, wie Kombinationen aus stark salzsauren Lösungen (pH 2 und kleiner) mit hoher Konzentration Guanidiniumchlorid (6-8 M) [Hermanson1992] oder organische Lösungsmittel (Acetonitril) brachten auch bei Mehrfachinjektion über mehrere Stunden hinweg nur partiellen Erfolg.

Die Bindungskurven in Abb. 23A (Aufbau I) zeigen online das Wachstum des Multischichtsystems auf der Transduceroberfläche. Zu Beginn ist die Bindung von Protein für jede Schicht linear, gegen Ende wird Sättigungscharakter sichtbar. Der Grund hierfür liegt in einer diffusionskontrollierten Bindung am Anfang, gefolgt von einer immer größer werdenden sterischen Behinderung des Anbindungsprozesses. Aufgrund seines kleineren Molekulargewichtes und folglich einer höheren Diffusionskonstante bindet t-BSA-Bi mit einer höheren Rate. Die gebundene Schichten sind fest auf der Oberfläche verankert und werden beim Spülen der Flußzelle mit Puffer nicht von der Oberfläche gelöst.

Während die ersten Schichten noch variieren, wird das Wachstumsmuster der folgenden Schichten stabil, wie dies bei einem konstanten Schichtdicken für jede Doppelschicht auch zu erwarten ist. Mit allen SPR-Aufbauten wurde das Wachstum von bis zu 20 Doppelschichten beobachtet. Für alle Aufbauten wurden vergleichbare Muster gefunden. Tab. 7 gibt einen Überblick der spezifischen Ergebnisse. Für dieses Bioaffinitätssystem wurde in [Spaeth1997] eine konstante Schichtdicke von 37.5 ± 2.8 nm und eine Oberflächenbedeckung von 9.47 ± 0.82 ng/mm² ermittelt. Zusammen mit diesen Werten ist eine Abschätzung der Eindringtiefe des Evaneszentfeldes möglich: Die Abnahme der detektierten Stufenhöhe auf 1/e des mittleren Startwertes gibt die Anzahl der Doppelschichten innerhalb der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes an. Diese Anzahl kann mit 37.5 nm pro Doppelschicht multipliziert werden. Abhängig vom verwendeten Prisma wurden unterschiedliche Eindringtiefen ermittelt: 550 nm für das 10mm- und 700 nm für das 15mm-Prisma. Keine Unterschiede jedoch wurden zwischen den unverspiegelten und verspiegelten Aufbauten (II und III) gefunden. Auch dies bestätigt leicht unterschiedliche Einfallswinkel für die Aufbauten mit 10mm- und 15mm-Prisma und zeigt auf überzeugende Weise, daß der gewählte Ansatz für Aufbau III nicht die Eigenschaften als Sensor beeinträchtigt.

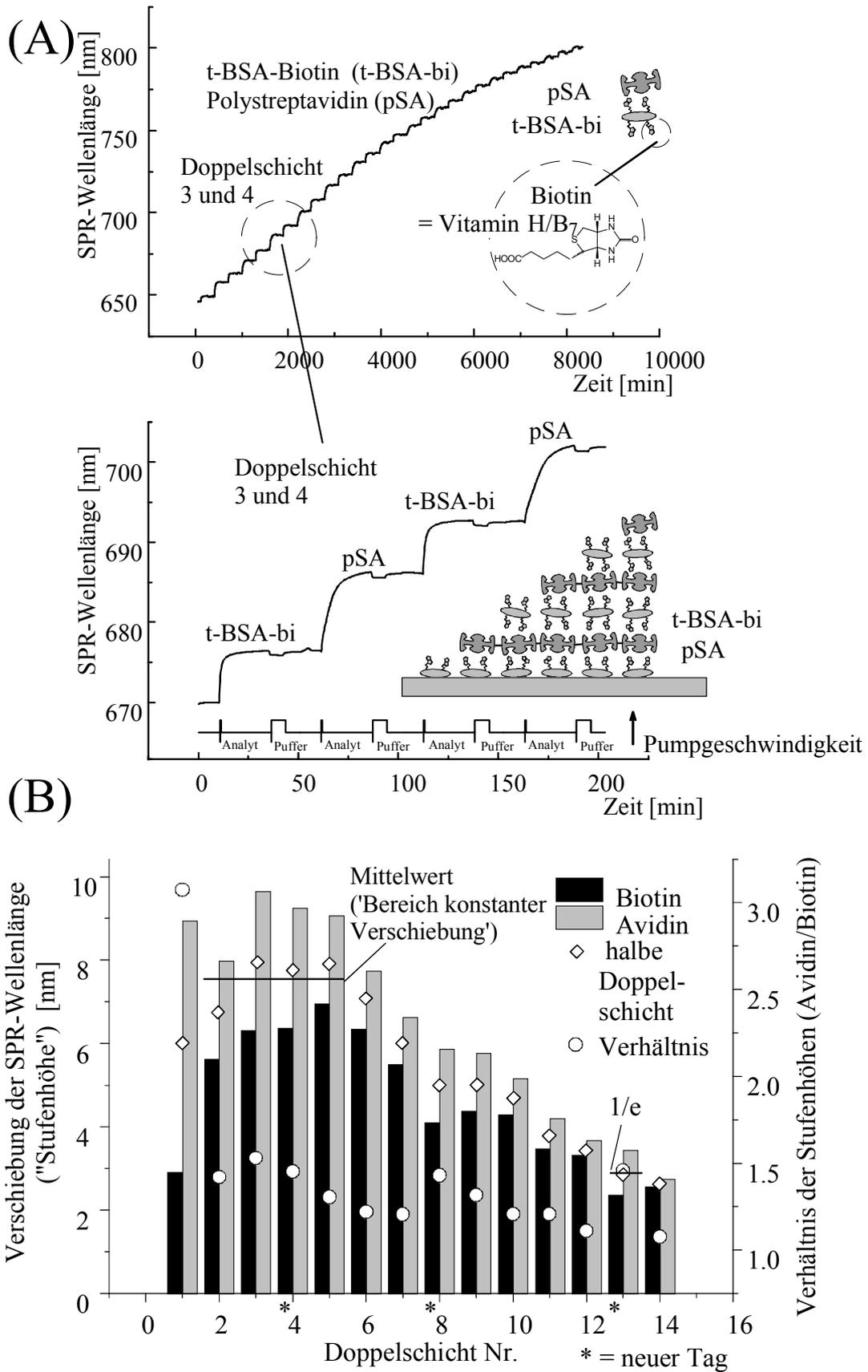


Abb. 23 Multischichtsystem mit t-BSA-Bi/pSA mit dem Laboraufbau I. (A) Bindungskurven und (B) ihre Auswertung.

Nach [Spaeth1997] erniedrigt sich der Brechungsindex einer Proteinmultischicht auf $3 \cdot 10^{-3}$ von 600 auf 750 nm. Dies wirkt sich als zusätzliche Verminderung der Verschiebung der SPR-Wellenlänge mit steigender SPR-Wellenlänge aus. Die abgeschätzten Eindringtiefen stellen daher lediglich eine Untergrenze dar, der daraus resultierende Fehler dürfte aber unter 10% liegen.

Für Aufbau I ist das Signalrauschen mit dem Biotin/Streptavidin-System identisch mit den Werten aus den Experimenten mit Volumenbrechungsindizes (etwa 5 pm entsprechend 0.05% einer Monolage). Aufbau II weist im Vergleich zu Volumenbrechungsindex-Experimenten höhere Rauschwerte auf. Der Grund hierfür ist nicht eindeutig, liegt aber vermutlich am ehesten an mechanischen Unzulänglichkeiten. Eine grobe Kalibrierung des Systems in nm Signalverschiebung pro Oberflächenbelegung in ng/mm^2 kann über die Auswertung des Bereichs mit nahezu konstanter Verschiebung und der Berücksichtigung des Wertes von $9.47 \text{ ng}/\text{mm}^2$ aus [Spaeth1997] erfolgen (Tab. 7).

Aufbau # / Prismengröße	I	II/ 15mm	II/ 10mm	III/ 15mm	III/ 10mm
Zeitauflösung [1/s]	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
Rauschen der SPR-Wellenlänge (Multischichtversuch) [pm]	5	14	50	20	40
Mittlere Signalverschiebung pro Doppelschicht (Nummer 2 bis Maximum, „Bereich konstanter Verschiebung“) [nm]	15.4	4.8	8.8	3.6	6.4
Rauschen [pg/mm^2] (berechnet mit $9.47 \text{ ng}/\text{mm}^2$ pro Doppelschicht [Spaeth1997])	3	27	53	52	59
Empfindlichkeit [ng/mm^2 pro nm Signalverschiebung] (berechnet für den „Bereich konstanter Verschiebung“)	0.61	1.97	1.08	2.63	1.48
Obergrenze des „Bereichs konstanter Verschiebung“ [Doppelschicht Nummer]	5	7	7	7	7

Aufbau # / Prismengröße	I	II/ 15mm	II/ 10mm	III/ 15mm	III/ 10mm
Eindringtiefe des Evaneszentfeldes [Doppelschicht Nummer]	13	19	15	19	14
Eindringtiefe des Evaneszentfeldes [nm]	500	700	550	700	550

Tab. 7 Daten aus dem Multischicht-Versuch zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit bezüglich der Detektion bioaffiner Wechselwirkungen innerhalb der Eindringtiefe des Evaneszentfeldes

In einem zweiten (angewandten) System wurde die Interaktion von Thrombin mit Thrombin-Inhibitor untersucht. Thrombin ist eine Serin-Proteinase, welche an der Blutgerinnungskaskade beteiligt ist. Eine Blockieren oder Deaktivieren dieses Systems (mit Inhibitor) ist von Interesse für pharmazeutische Anwendungen (Kap.2.1.4, S.13). Die Interaktion von Thrombin mit immobilisiertem Thrombin-Inhibitor wurde als ein weiterer Bioassay mit den Aufbauten II und III untersucht. Abb. 24A zeigt das Profil für unterschiedliche Konzentrationen von 25 $\mu\text{g/mL}$ bis zu 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Thrombin in PBS mit Hintergrundprotein (400 $\mu\text{g/mL}$ OVA), welche bei konstanter Flußrate injiziert wurden. Die Daten wurden mit den Werten einer Blindwertinjektion mit Hintergrundprotein (ohne Thrombin) korrigiert. Der lineare Anstieg des Signals während der Inkubation deutet auf eine diffusionskontrollierte Bindung hin. Im Fall der höchsten Konzentration (25 $\mu\text{g/mL}$ Thrombin) deutet ein nicht-linearer Anstieg auf eine Sättigung aufgrund der hohen Oberflächenbeladung hin. Während des Spülschrittes mit PBS wurde keine signifikante Erniedrigung der SPR-Wellenlänge detektiert, was auf eine hohe Affinität des gebundenen Thrombins zur Oberfläche hindeutet. Signifikante Dissoziation wurde nur für die Thrombin-Konzentration von 25 $\mu\text{g/mL}$ beobachtet. Der Grund hierfür dürfte eine geringe Dissoziationsrate und Rückbindungseffekte bei kleinen Oberflächenkonzentrationen sein. Die Steigung der Bindungskurve stellt in diesem Versuch eine lineare Funktion der Analytkonzentration dar (Abb. 24B).

Aufgrund der kleineren Zeitauflösung (0.1 Spektren/s) liegt das Signalrauschen in diesem Versuch bei nur 3 pm. Geht man von einer Nachweisgrenze ($>=3\sigma$) von 9 pm Verschiebung des SPR-Signals aus, so erhält man eine Untergrenze der Nachweisgrenze von 0.03 $\mu\text{g/mL}$ Thrombin bzw. 18 pg/mm^2 oder $7.2 \cdot 10^{-6}$ für den Volumenbrechungsindex. Die Abschätzung dieser Werte basiert auf

einer SPR-Wellenlängenverschiebung von 9 pm und der Daten zur Empfindlichkeit aus dem Multischichtversuch in Tab. 6 und Tab. 7. Weiterhin wurde eine lineare Antwort des Assays unterhalb 0.5 µg/mL Thrombin (Stufenhöhe 196 pm) vorausgesetzt. Das erhaltene Profil eines Thrombinassays mit Aufbau III (Abb. 24C) ist vergleichbar mit den Bindungskurven von Aufbau II (Abb. 24A, B). Das Signalrauschen betrug hier etwa 10 pm, was einer dreifach höheren Nachweisgrenze gleichkommt. Diese Ergebnisse erlauben eine Abschätzung der Leistungsfähigkeit der miniaturisierten Aufbauten II und III für eine hochaufgelöste Beobachtung bioaffiner Wechselwirkungen.

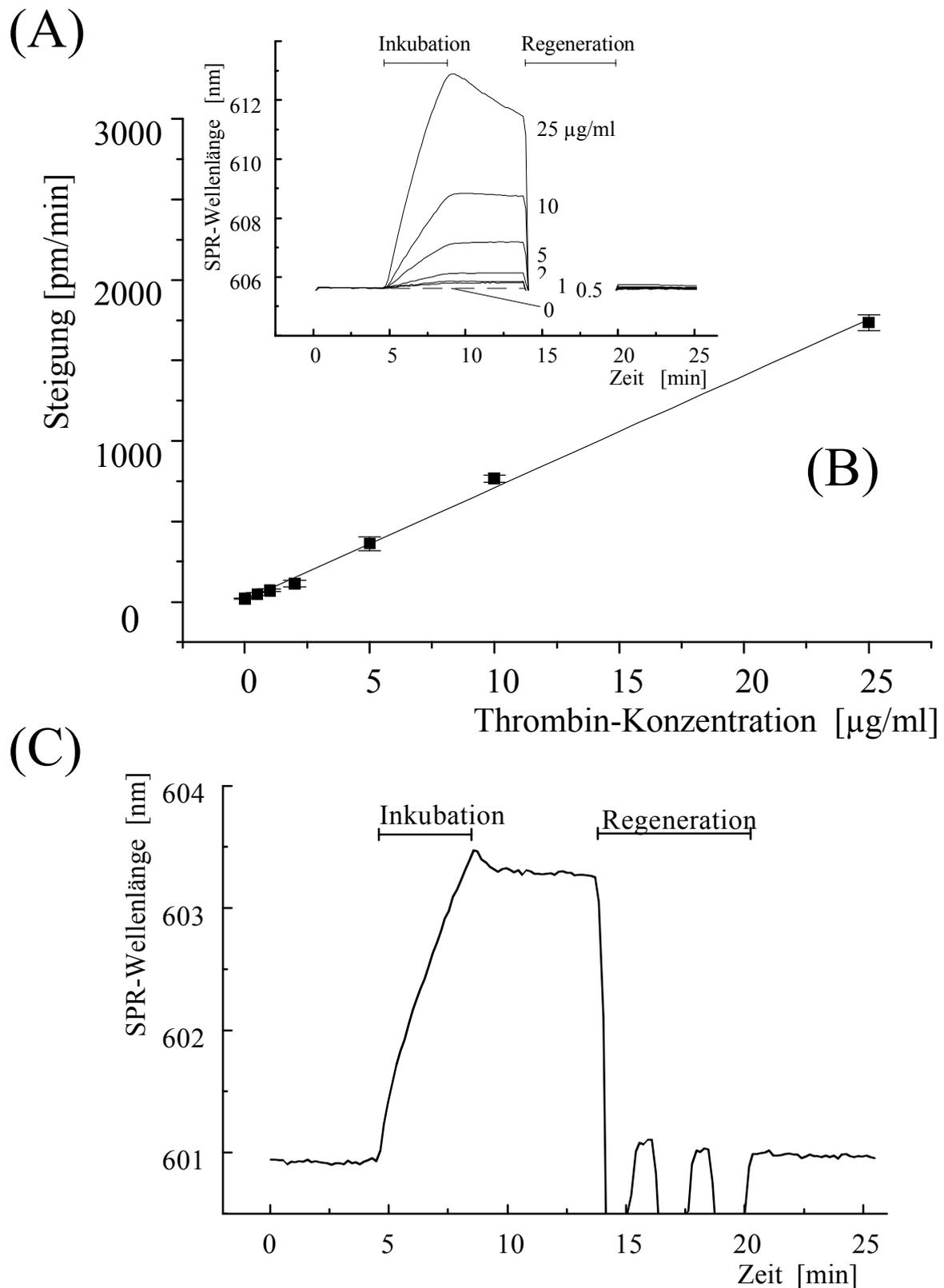


Abb. 24 (A) Beziehung zwischen Thrombin-Konzentration und Steigung der Bindungskurve. (B) Bindungskurven des Thrombinassays mit Aufbau II (Blindwertkorrigiert). (C) Unkorrigiertes Profil der Thrombinanbindung mit 10 µg/mL Thrombin mit Aufbau III.

4.2 Mikrodosierung als Werkzeug

Die Vorteile einer Mikrodosierung lassen sich prinzipiell auf zwei verschiedene Arten nutzen, nämlich zur orts aufgelösten *Oberflächenmodifikation* und zum *Mischen kleiner Volumina*. Die Verdunstung einzelner Tröpfchen (0.5 nL) liegt bei Raumtemperatur und normaler Luftfeuchtigkeit um 30% bei ca. 4 s. Sie spielt daher für Versuche in kleinen Volumina eine zentrale Rolle, kann hingegen bei der Oberflächenmodifikation auch vorteilhaft genutzt werden.

4.2.1 Charakterisierung des Mikrodosiersystems

Tropfenvolumen

Für die Tropfengenerierung stehen zwei Parameter zur Verfügung, die das Rechtecksignal des Spannungspulses am Piezo beschreiben: Pulshöhe und Pulsdauer. Abb. 25A und B geben den Einfluß dieser Parameter auf das Volumen an von Tropfen erzeugt mit einer 50 μ m-Düse eines Microdrop-Systems an.

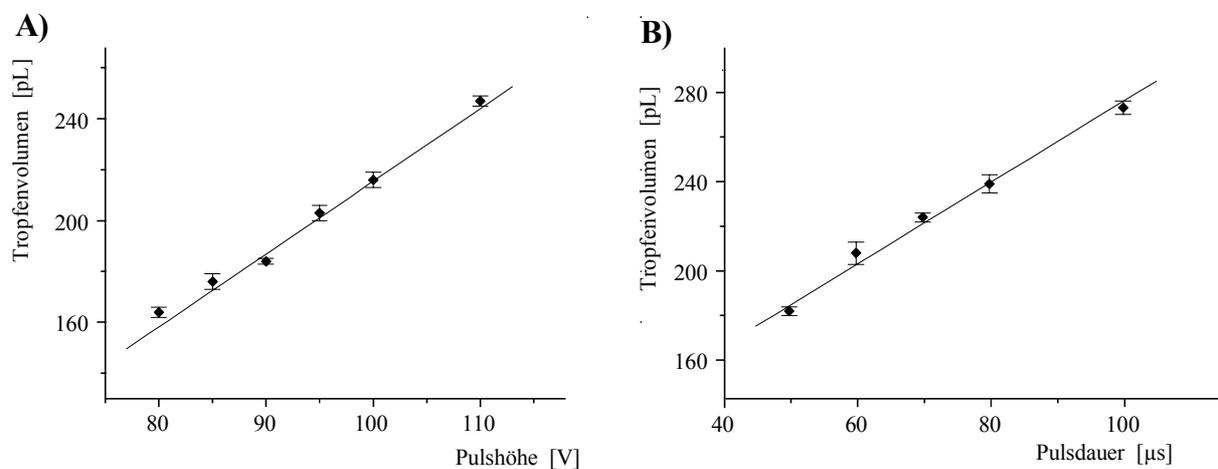


Abb. 25 Einfluß von Pulshöhe (A) und -dauer (B) auf das Tropfenvolumen für eine 50 μ m-Düse.

Nur ein bestimmter Parameterbereich führte zu einer erfolgreichen Tropfenablösung. Innerhalb dieses Bereichs war ein linearer Zusammenhang mit folgenden Werten erkennbar:

$$\text{Tropfenvolumen (in pL)} = (70.7 \pm 2.7) + (2.9 \pm 0.2) \cdot \text{Pulshöhe (in V)}$$

$$\text{bzw. Tropfenvolumen (in pL)} = (92.9 \pm 6.7) + (1.8 \pm 0.1) \cdot \text{Pulsdauer (in } \mu\text{s)}.$$

Die Standardbedingungen hierfür waren: 50 μm -Düse, bidestilliertes Wasser, Pulshöhe 90 V, Pulsdauer 50 μs , Tropfenfrequenz 400 Hz, 9600 Tropfen, jeweils drei Versuche. Aus dem Gesamtgewicht (bestimmt mit einer μg -Waage) wurde auf das Tropfenvolumen je Puls zurückgerechnet (nicht differenziert in Haupttropfen und möglichen Satelliten). Für die Standardbedingungen bedeutet dies eine Änderung des dosierten Volumens je Puls von 3.2% je Volt und 3.8% je μs .

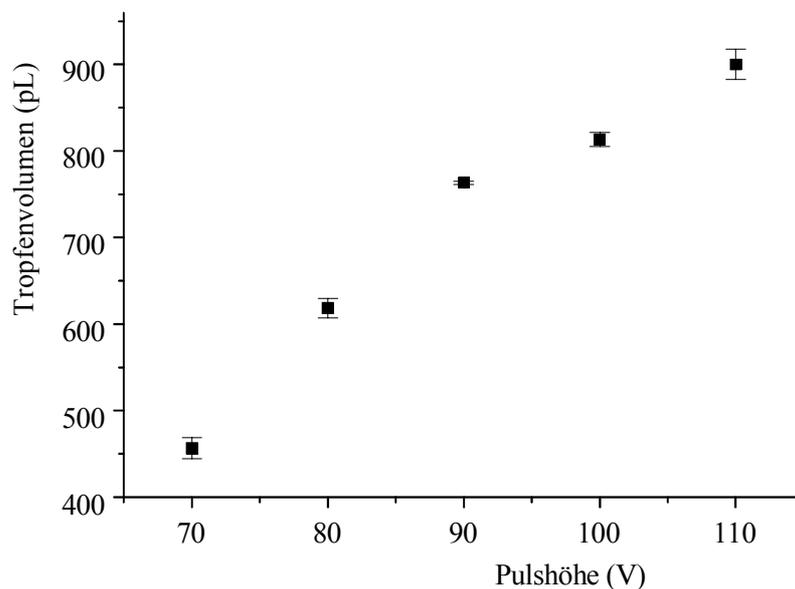


Abb. 26 Tropfenvolumen in Abhängigkeit der Pulshöhe mit einer 70 μm -Düse.

Für eine 70 μm -Düse (Abb. 26) konnte keine lineare Abhängigkeit des Tropfenvolumens von der Pulshöhe gefunden werden. Die Tropfenanzahl pro Meßwert lag hier bei 96000. Die Pulslänge hatte hier *keinen* wesentlichen Einfluß auf das Volumen ($\pm 5\%$ im Bereich von 70 bis 100 μs). Für jede Düse wurden aufgrund der Fertigungstoleranzen andere Volumina gefunden, so daß bei Bedarf jede Düse einzeln kalibriert werden muß. Veränderungen am Benetzungsverhalten im Düsenauslaßbereich machten sich deutlich im dosierten Volumen bemerkbar, so daß für ein exaktes absolutes Dosiervolumen auch eine einzelne Düse regelmäßig neu kalibriert werden müßte.

Als dritter Parameter kommt noch die *Tropffrequenz* hinzu. Dieser hatte jedoch im Gegensatz zu den beiden anderen Parametern keinen signifikanten Einfluß auf das Tropfenvolumen. Auch die *Proteinkonzentration* (variiert von 0 bis

1 mg/mL) bzw. der Einsatz von Puffer als Lösungsmittel hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Konzentration.

Tropfverhalten

Grundvoraussetzung für eine saubere Immobilisierung ist zunächst ein definiertes *Tropfverhalten*, so daß sich mit jedem Spannungspuls am Piezoelement ein wohldefinierter Tropfen senkrecht ablöst. Um Satellitenbildung zu unterdrücken und die Tropfenparameter Geschwindigkeit und Volumen zu beeinflussen, können die Parameter Pulshöhe und Pulsdauer variiert werden. Der Tropfengenerator wurde dazu mit einer konstanten Frequenz von z.B. 500 Hz betrieben und triggerte gleichzeitig eine Stroboskop-LED. Diese LED beleuchtete die sich ablösenden Tropfen, welche von einer Kamera als stehendes Bild eingefangen wurden.



Abb. 27 Stroboskop-Bilder sich ablösender Tropfen, aufgenommen mit verschiedenen Delayzeiten (Zeitverschiebung zwischen Tropfepuls und Blitz).

Der Parameter *Pulshöhe* hatte neben dem Tropfenvolumen vor allem einen Einfluß auf die Tropfengeschwindigkeit. Typische Werte der Pulshöhe für das Pipettieren wäßriger Lösungen lagen für 70- und 50 μm -Düsen zwischen 50 und 100 V. Das Anlegen von Pulsen hoher Spannung (bis 200 V) sorgte für einen relativ sicheren, aber sprühenden Ausstoß an Flüssigkeit. Eine zu niedrige Spannung führte zu mangelhafter oder ausbleibender Ablösung von Tropfen. Mit der *Pulsdauer* wurde neben dem Volumen vor allem das Tropfverhalten bezüglich der Satellitenbildung beeinflusst. Sinnvolle Parameter lagen etwa zwischen 50 und 100 ms. Die *Tropffrequenz* hatte einen relativ geringen Einfluß, darf aber nicht zu hoch liegen, da sonst die Tropfenbildung gestört sein kann. Die Grenzfrequenz war meistens dann erreicht, wenn der neue Puls noch während der Nachschwingphase der Flüssigkeit an der Pipettenöffnung folgte. Sinnvolle Frequenzen lagen zwischen 100 und 500, maximal 1000 Hz. Die Einstellung der Parameter erfolgte z.B. nach folgendem Schema: Bei einer

Frequenz von 500 Hz und einem Delay (Zeitverschiebung zwischen Tropfenpuls und Blitz) von etwa 70 ms vorgegeben wurde die Spannung in einen Bereich gebracht, in dem die Tropfen sich geradlinig von der Pipettenspitze lösten. Anschließend wurde die Satellitenbildung über die Pulsdauer abgestellt. Die so gefundenen Parameter waren in der Regel ohne Nachjustierung für eine bestimmte Lösung immer wieder verwendbar.

Aufgrund des Dosierprinzips war für eine bestimmte zu dosierende Lösung eine *Maximalkonzentration* an Biopolymer zu erwarten, oberhalb welcher sich keine sauber definierte Tropfen mehr ausbilden. Für wäßrige IgG-Lösungen, 70µm-Microdrop-Düse lag dieser Wert bei 1 mg/mL. Beim Übergang zu OVA oder BSA verschob sich diese Grenze zu 2 mg/mL, während für 23-mer ss-DNA 5 mg/mL möglich waren. Als Hauptursache für diesen Effekt kann das abnehmende Molgewicht bzw. Teilchengröße (150 / 69 / 7 kg/mol) der Biopolymere angenommen werden.

Kleinere *Düsendurchmesser* (50 µm und kleiner) bewirkten eine geringere Dosiersicherheit. Für eine Störung des Tropfverhaltens genügten schon geringfügige Änderungen im Bereich der Pipettenöffnung, wie z.B. anhaftende Flüssigkeit von der letzten Probennahme. So kam es nach einem Wechsel der Dosierflüssigkeit häufiger zu Totalausfällen, d.h. es löste sich kein Tropfen ab. Diese stark erhöhte Störungsempfindlichkeit spiegelte sich auch in der Tatsache wider, daß der Bereich der Pipettierparameter für eine saubere Tropfenablösung (Pulshöhe, -dauer und -frequenz) kleiner wurde. Für reines Wasser lag dieser Bereich bei ca. ±10%, für Polymerlösungen bei nur ca. ±1-2%. Die verwendbare Maximalkonzentration verschob sich bei diesen kleinen Düsendurchmessern merklich nach unten. Praktische Erfahrungswerte hatten weiterhin gezeigt, daß die Verstopfungsgefahr bei einem Düsendurchmesser von etwa 70 µm äußerst gering gegenüber beispielsweise 50 µm war. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit bevorzugt mit 70 µm-Düsen gearbeitet.

4.2.2 Charakterisierung mikrodosierter Oberflächenbeschichtung mit Modellprotein

Alle Versuche zur Oberflächenmodifikation wurden mit einem System der Firma Microdrop („OF-Microdrop“) durchgeführt, welches sowohl software- wie auch hardwaretechnisch den Erfordernissen angepaßt wurde (Kap.3.5.1, S.67). Für den OF-Microdrop-Aufbau mit 70 µm-Düse wurden sehr robuste

Parameter von 500 Hz, 90 V und 50 ms gefunden. Damit konnte der gesamte Bereich von 0-1 mg/mL IgG und Hydrogel (AMD260/10), 0-2 mg/mL BSA, sowie 0-5 µg 23-mer DNA-Oligomer pipettiert werden. Mit Wasser ergab das Auswiegen von 10^6 Tropfen unter diesen Parametern einen Wert von 380 pl/Tropfen, woraus sich ein Tropfendurchmesser von 90 µm errechnen läßt. Ziel der Oberflächenmodifikation ist eine definierte Veränderung der chemischen Eigenschaften einer Oberfläche. Dies läßt sich am besten mit einer *homogenen Beschichtung* erreichen. Am dichtesten und homogensten ist eine Schicht in der Regel dann, wenn die Oberfläche maximal belegt ist. Anhand eines Modellproteins (Schaf-IgG) wurde der Einfluß verschiedener Parameter bei der orts aufgelösten Immobilisierung mit Mikrodosierung auf eine Oberfläche untersucht.

PBS (Puffer) als Lösungsmittel war für diese Oberflächenbeschichtungstechnik ungeeignet, da beim Verdunsten des Tropfens eine hohe Salzkonzentration zurückblieb, die eine Wechselwirkung mit der Oberfläche drastisch verminderte. Das Lösungsmittel sollte also rein sein (z.B. reines Wasser), um vollständig verdunsten zu können. Mit den getesteten Pipetten ließen sich organische Lösungsmittel, wie DMF nicht dosieren, so daß im weiteren nur mit wäßrigen Lösungen gearbeitet wurde. Nicht-wässrige Systeme lassen sich nach Herstellerangaben durch die Wahl eines geeigneten Pipettendurchmessers dosieren, höherviskose Lösungen durch beheizbare Pipetten.

Zur Beobachtung des Beschichtungsprozesses wurde eine Kamera in einem Winkel von etwa 30° auf der Grundplatte der Düsenhalterung so angebracht, daß stets ein Ausschnitt von etwa 3*2 mm² unterhalb der Pipettenspitze einschließlich Pipettenspitze sichtbar war. Eine Momentaufnahme eines solchen Prozesses mit gerade aufgeschlagenem Tropfen ist in Abb. 28 gezeigt.

Die Tropfenfrequenz spielt für die Oberflächenimmobilisierung im weiteren keine Rolle, da hierbei nur mit Einzeltropfen gearbeitet wurde. Eine wichtige Voraussetzung für eine homogene Beschichtung war das *Trocknen des einzelnen Tropfens*, bevor er mit einem versetzt abgesetzten Tropfen auf der Oberfläche in Berührung kam. Andernfalls hätten sich beide Tropfen beim Eintrocknen in undefinierter Weise zu einem Tropfen zusammengezogen, was zu einer undefinierten Substanzablagerung auf der Oberfläche geführt hätte. Im Standardverfahren wurde deshalb die Verdunstung jedes Tropfens abgewartet, was bei Raumtemperatur und normaler Luftfeuchte etwa 4 s pro Tropfen dauerte. Um den Prozeß auf weniger als 1 s zu beschleunigen, wurde die *Oberflächen-*

temperatur auf etwa 40°C *erhöht*. Im Bezug auf eine kovalente Immobilisierung geht eine erhöhte Temperatur außerdem mit einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit einher (Kap.4.2). Eine andere Möglichkeit war, bei Raumtemperatur die Tropfen in ausreichendem Abstand voneinander auf der Oberfläche abzusetzen, wobei die verlängerten Verfahrswege der Positioniereinheit (großer Spotabstand) deutlich als zeitlich limitierender Faktor ins Gewicht fielen. Beide Verfahren ermöglichten homogene Schichten, wobei der Temperaturerhöhung bei kleinen Verfahrswegen der Vorzug gegeben wurde.

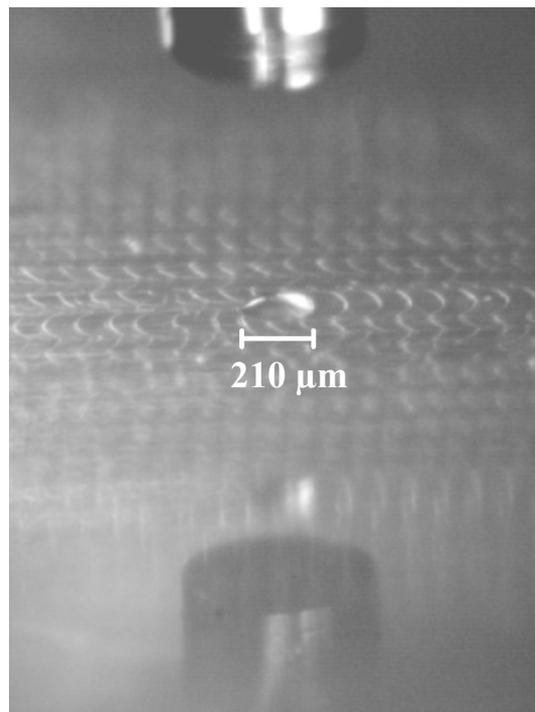


Abb. 28 Beschichtung eines Glassubstrates mit Mikrotröpfchen.

Um die Ortsauflösung der Spots auch bei nicht senkrechter Tropfenablösung maximal zu halten, wurde der *Abstand der Pipette zur Oberfläche* möglichst gering gehalten. Der Arbeitsabstand der Pipette zur beheizten Oberfläche lag bei etwa 1 mm. Eine Verringerung dieses Abstandes oder eine Erhöhung der Temperatur bewirkte, daß mehr Polymer an der Pipettenspitze trocknete und so die Tropfenablösung behinderte.

Im Zusammenhang mit der Immobilisierung wurde zunächst der *Einfluß der Konzentration* untersucht. Konzentrationen deutlich unter 1 mg/mL Modellprotein führten zu Spots mit inhomogener Substanzverteilung (Abb. 29A und B). Abb. 29A zeigt deutlich, wie sich das Protein (0.1 mg/mL) während des Verdunstens in der Mitte aufkonzentriert. Für etwas höhere Konzentrationen

(0.5 mg/mL, Abb. 29B) tritt eine zusätzlich noch eine Konzentrationserhöhung am Rand des verdunstenden Spots auf. Spots aus Tropfen mit 1 mg/mL des Modellproteins zeigen hingegen nach dem Spülen einen homogenen Substanzauflauf (Abb. 29C).

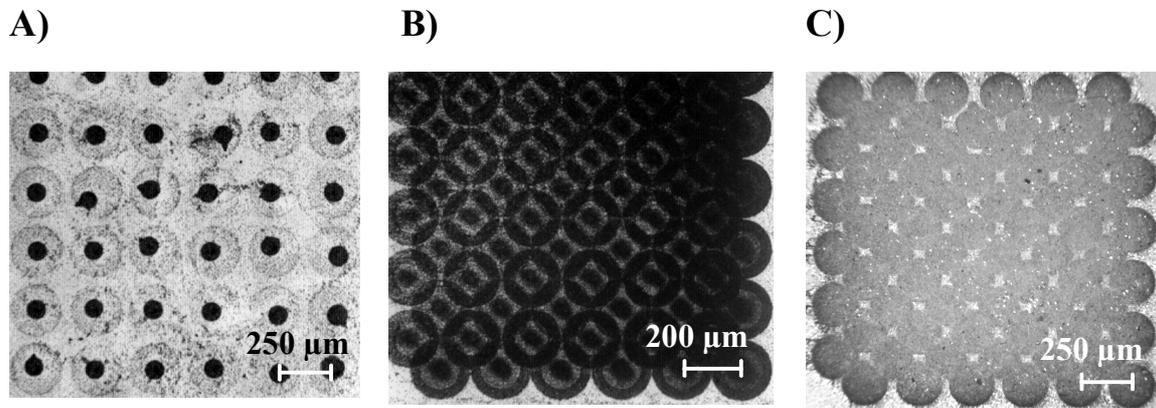


Abb. 29 Spots mit (A) 0.1, (B) 0.5 und (C) 1 mg/mL Modellprotein IgG, welches anschließend immunogen angefärbt wurde.

Noch höhere Konzentrationen waren bezüglich des Tropfverhaltens bzw. der Tropfsicherheit nicht mehr gut handhabbar, so daß 1 mg/mL als optimale Konzentration für das Modellprotein im folgenden beibehalten wurde. Der Durchmesser eines Spots, welcher von einem Tropfen mit einem Durchmesser von 90 µm erzeugt wurde, betrug 210 µm. Mit dem zu 380 pl bestimmten Tropfenvolumen ergibt sich theoretisch eine durchschnittliche Oberflächenbelegung von 11 ng Protein/mm². Nimmt man für 5 ng/mm² für eine Protein-Monolage an [Brecht1999], so entspricht dies 220% davon.

Um eine größerflächige und orts aufgelöste Oberflächenmodifikation mit homogenem Substanzauflauf zu erzielen, wurden verschiedene Pipettierabfolgen getestet. Die Einzelspots wurden als einfaches Raster mit einem Punktabstand a und in dessen Lücken (um $a/2$ versetzt) ein weiteres, identisches Raster gesetzt. Diese Musterfolge soll im folgenden *dichteste Packung (ccp)* genannt werden und war Grundlage für alle Beschichtungen. Variiert wurden folgende drei Parameter: der Punktabstand a von 50 bis 300 µm, die Tropfenzahl pro Spot dps (ohne Trocknen) von 1 bis 4 und die Anzahl der dichtesten Packungen übereinander np 1 bis 2. Eine qualitative Auswertung analog Abb. 29 brachte als Ergebnis, daß eine Erhöhung von dps und np auf Werte größer 1 (Vergleich zwischen Abb. 30A und B) keinen signifikanten Vorteil brachte. Entspricht der Punktabstand a dem Spotdurchmesser d , so war die Fläche nahezu homogen

und wurde bei schließlich $a < d$ homogen. Um für neue Experimente Sicherheitsreserven hinsichtlich einer homogene Beschichtung zu erhalten, wurde diese Minimalforderung zu einem *Standardprotokoll* erweitert: Zwei dichteste Packungen mit $a=100\ \mu\text{m}$ und einer Konzentration von $1\ \text{mg/mL}$ bei 40°C . Dies entsprach rund $400\ \text{Tropfen/mm}^2$, also $160\ \text{ng Substanz/mm}^2$ in etwa $5\ \text{min/mm}^2$. Durch Weglassen der zweiten dichtesten Packung können diese Werte problemlos halbiert werden, ohne die Sicherheit nennenswert zu tangieren (Abb. 30).

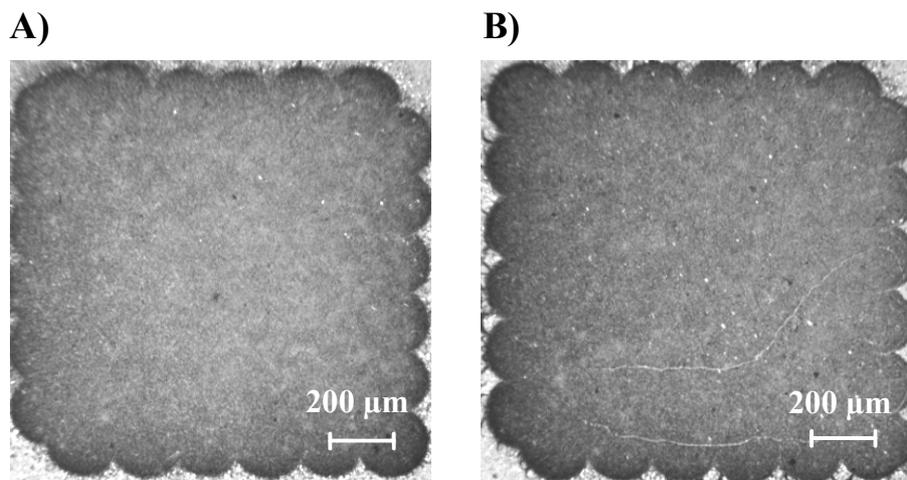


Abb. 30 Beurteilung der Homogenität beim *ccp*-Verfahren mit $1\ \text{mg/mL}$ Modellprotein mit (A) einfachem und (B) zweifachem Bedrucken.

4.2.3 Mikrodosierung in die NTP

Die Kavitätdichte beim konventionellen 96er-Mikrotiterplattenformat (MTP) liegt bei etwa $1/\text{cm}^2$ für Volumina von etwa $250\ \mu\text{L/Kavität}$. Bei den verwendeten NTPs liegen die entsprechenden Werte bei über $150\ \text{Kavitäten/cm}^2$ (150-fach der MTP) und etwa $50\ \text{nL/Kavität}$ ($1/5000$ der MTP).

Im Gegensatz zur mikrodosierten Oberflächenbeschichtung spielt beim Pipettieren in eine Nanotiterplatte die *Verdunstung* eine große Rolle. Ohne Gegenmaßnahmen trocknete eine befüllte NTP bei Raumtemperatur und normaler Luftfeuchtigkeit von ca. 30% innerhalb etwa 5 min vollständig aus. Jede Kavität einer Standard-NTP faßte dabei ein Volumen von rund $50\ \text{nL}$, was nur etwa 100 Tropfen entspricht.

Erste Versuche wurden mit einem Aufbau der Firma Microdrop („NTP-Microdrop“, Kap.3.5.1, S.68) durchgeführt, welcher entsprechend mit Software und

notwendigen Auf- und *Umbauten* an die Erfordernisse angepaßt wurde. Auch an diesen Aufbau wurde eine Kamera unter etwa 30° so installiert, daß die Pipettenspitze und ein darumliegender Bildausschnitt von etwa 3*6 Kavitäten der NTP sichtbar waren.

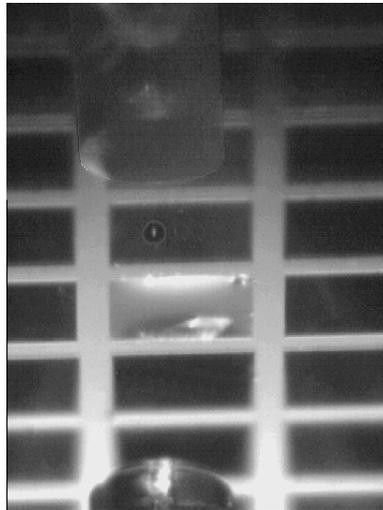


Abb. 31 Befüllungsvorgang einer Silizium-NTP-Kavität. Unten ist das Spiegelbild der Pipettenspitze zu sehen.

Die NTP wurde auf einem Peltierelement fixiert, welches zur Kühlung diente. Durch Variieren der Spannung wurde bei gegebener Luftfeuchtigkeit die Temperatur der NTP knapp oberhalb des Taupunktes eingestellt. Dies machte sich bei Beobachtung der NTP mit Kamera durch einen hauchfeinen Schleier auf der NTP-Oberfläche bemerkbar, welcher aus Tröpfchen kondensierenden Wassers $<1 \mu\text{m}$ bestand. Einzelne auf dem Steg einer NTP abgesetzte Tropfen bzw. eine gefüllte Kavität zeigten unter diesen Bedingungen keine erkennbare Verdunstung in einem Zeitraum von einer Stunde und mehr. Spannungen von mehr als 6 V führten zu einem Wärmedurchbruch, d.h. die Wärme auf der Unterseite des Peltierelements konnte durch den Kühlerventilator nicht mehr ausreichend abgeführt werden. Arbeiten am Lüftungssystem in den Laborräumen hatten eine Reduzierung der Luftfeuchtigkeit zur Folge, so daß dieser Verlust jetzt künstlich kompensiert werden mußte. Dazu wurde eine geschlossene Kammer geschaffen, in welche feuchte Luft eingeblasen wurde. Die Beleuchtung mit einer 10 W Halogenlampe von außerhalb des Kastens (Abstand zur NTP ca. 50 cm) führte zur Erwärmung des Probenraums, so daß sie durch eine LED an der Pipettenhalterung ersetzt wurde. Zur Kontrolle der Tropfenparameter wurde innerhalb des Verfahrensweges des Positioniersystems eine zweite Kamera mit Stroboskop-LED installiert. Es konnte gezeigt werden, daß die laterale Auflö-

sung des Positioniersystems von 5 μm zur sicheren Befüllung der NTP vollkommen ausreichend ist.

Um einer Verdunstung nach dem Befüllen bzw. während des Auslesens der NTP zu vorbeugen, wurde die NTP nach dem Befüllvorgang jeweils mit einer speziellen *Klebefolie* abgeklebt (Kap.3.5.5, S.73). Bei noch feuchten Stegen während des Abklebens wurde Flüssigkeit von einer Kavität zur nächsten verschleppt. Durch vorsichtiges einmaliges Abrollen der Klebefolie mit einer Gummiwalze wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Trotz einer völlig anderen Geometrie der Pipettenspitze sprach auch das *GeSiM-System* („NTP-GeSiM“, Kap.3.5.3, S.70) auf ähnliche Tropfenparameter wie das Microdop-System an: Pulshöhe 40 bis 100 V, Pulsdauer 40 bis 100 ms, Pulsfrequenz 100 bis 500 Hz.

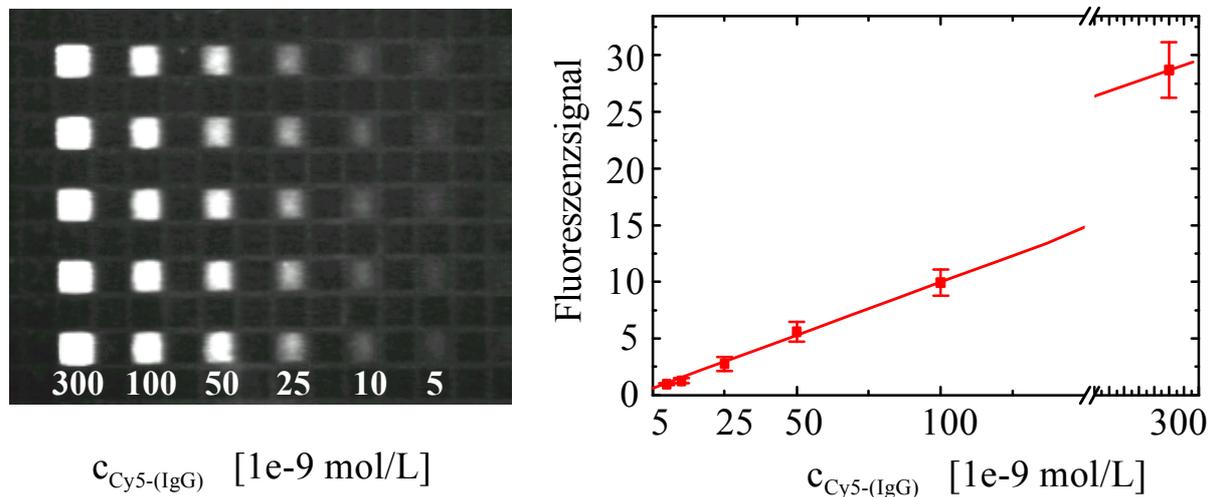


Abb. 32 Konzentrationsreihe mit Cy5-markiertem IgG-Antikörper zur Bestimmung der Nachweisgrenze an Cy5 in einem NTP-Assay.

Die *Nachweisgrenze* für AK-gebundenen Cy5-Farbstoff in einer mit BSA vorbehandelten NTP lag mit dem BioScan bei 5 nmol/L Cy5 (Signal 3σ über Hintergrund, Abb. 32).

4.2.4 Referenzierung des detektierten Fluoreszenzsignals

Nach Angaben von Perkin Elmer war die Empfindlichkeit eines baugleichen Fluoreszenzscanners für Fluorescein-Farbstoffe über die Fläche einer NTP hinweg mit $\pm 1\%$ homogen. Eine Analyse der NTP-Bilder mit dem „BioScan“ für Cy5 deutete jedoch auf eine weit höhere Inhomogenität hin. Dadurch wurde

eine Überprüfung der Empfindlichkeitsverteilung, also das Erstellen eines Referenzbildes, notwendig. Hierzu mußte eine homogen fluoreszierende Fläche gefunden werden, wie z.B. ein Cy5-Schicht konstanter Dicke. Eine Cy5-Schicht zwischen zwei aufeinandergedrückten Objektträgern war aufgrund von Interferenzen als Referenz nicht geeignet. Andere Materialien, wie z.B. Siliziumwafer als Substrat und Deck- oder Präzisionsgläser als Superstrat brachten keinen Gewinn. Eine Erhöhung der Schichtdicke auf 0.5 bzw. 1 mm mittels einer flachen Silikondichtung entsprechender Dicke verstärkte das Interferenzmuster noch. Trockene und feuchte Dünnschichtchromatographie-Platten wiesen keine homogene Fluoreszenz auf, ein gleichmäßiges Tränken in Cy5-Lösung erwies sich als nicht praktikabel.

Eine gleichmäßig mit Cy5-Lösung befüllte NTP sollte eine gleichmäßige Fluoreszenz der Kavitäten aufweisen und sich daher als Referenz eignen. Von dieser Art der Referenz kann gleichzeitig ein hoher Praxisbezug erwartet werden, da sie auch einen möglichen Einfluß durch eine NTP berücksichtigt. Zunächst mußte für eine gleichmäßige Befüllung der NTP gesorgt werden. Eine mikrodosierte Befüllung kann fehlerbehaftet sein, weshalb die gesamte NTP in Cy5-Lösung getaucht wurde. Nach dem Entfernen der Luftblasen in den Kavitäten mittels Druckspülen mit einer Pipette wurde die NTP entnommen und die überstehende Lösung durch Abdecken mit einem passenden Deckgläschen herausgedrückt. Der fehlende Meniskus und die Verwendung eines Deckglases markieren hierbei die Unterschiede zu mikrodosierten NTPs. Zur Fehlerminimierung wurden 3 NTPs 4 mal aufgenommen (jeweils um 90° gedreht). Der Referenzwert einer Kavität ergab sich aus dem Median der Auswertung (14 Pixel Radius) positionsgleicher Kavitäten, wodurch eine Matrix aus 25*25 Werten erhalten wurde (Abb. 33). Die detektierte Fluoreszenzintensität nahm von hinten links (100%) nach vorne rechts ab (74%).

Diese 25*25 Matrix wurde durch ein interpolierendes Vergrößerungsverfahren in die 1000*1000 Matrix von BioScan-Aufnahmen umgerechnet, um ein angenähertes pixelorientiertes Referenzieren zu ermöglichen.

Mit einem Kantenfilterglas (Schott RG 665) wurde schließlich eine homogen fluoreszierende Fläche gefunden. Unregelmäßigkeiten dieses Filterglases und Pixelrauschen ließen sich wiederum durch die Kumulation von 4 Aufnahmen (Filter jeweils um 90° gedreht) vermindern. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde jeweils ein so erhaltenes Referenzbild (Abb. 34A) zur pixelweisen Referenzierung herangezogen. Dazu wurde ein eigens hierfür geschriebenes Pro-

gramm mit Gleitkommaoperationen verwendet, welches pixelweise Originalwert durch Referenzwert teilt und anschließend mit dem maximalen Referenzwert multipliziert.

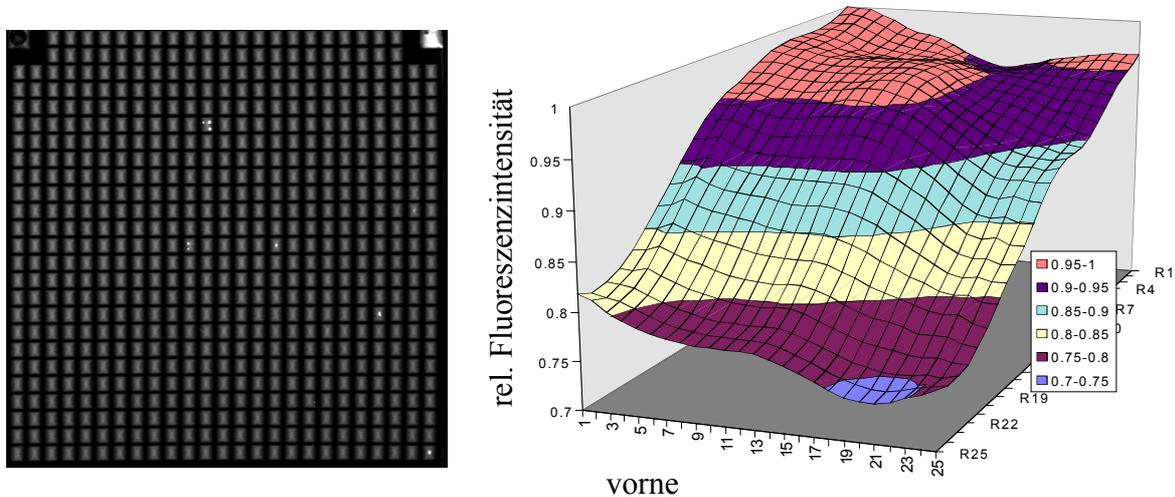


Abb. 33 Fluoreszenzsignal einer gleichmäßig befüllten NTP: (A) BioScan-Aufnahme, (B) Auswertung (normiert auf 100%).

Durch die Auswertung des Referenzbildes mit den entsprechenden Standardparametern kann wiederum eine 25*25-Matrix für eine kavitätsbezogene Referenzierung erhalten werden (Abb. 34B). Es ergibt sich eine Abnahme der Empfindlichkeit von hinten links nach vorne rechts auf 69%. Ein Vergleich der Referenzbilder aus befüllter NTP und Filterglas zeigt eine weitgehende Übereinstimmung beider Methoden.

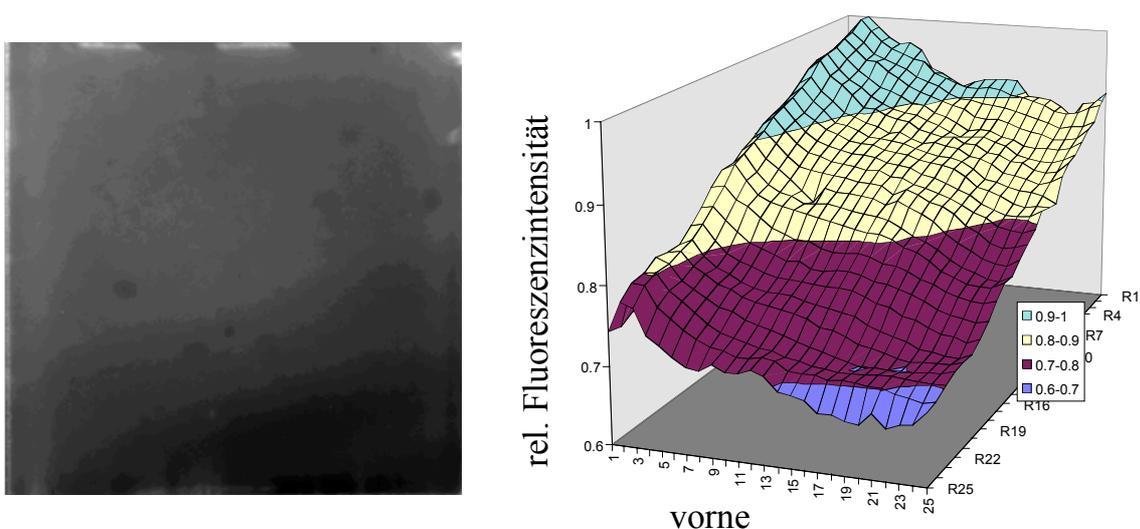
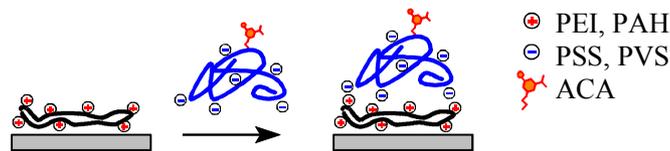


Abb. 34 (A) BioScan-Aufnahme eines homogen fluoreszierenden Filterglases RG 665; (B) auf 25*25 Punkte (Kavitäten) reduziertes Referenzbild (normiert auf 100%).

4.3 Oberflächenmodifizierung

4.3.1 Polyelektrolyte



Polyanionen und Polykationen versprechen durch ihre Vielzahl entgegengesetzter Ladungen hohe Bindungskonstanten. Ihre besonders einfache Handhabung läßt sie zunächst als Immobilisierungssystem für einen heterogenen Immunoassay besonders attraktiv erscheinen. Um die Oberfläche weitgehend abstoßend gegenüber im allgemeinen negativ geladenen unspezifischen Proteinen zu gestalten, scheint eine polyanionische Oberfläche am zweckmäßigsten zu sein. Eine (ortsaufgelöste) Immobilisierung von Antigen könnte dann in Form eines Antigen-Polyanion-Konjugates erfolgen.

Untersucht wurden PSS, PVS, PAH und PEI (Kap.3.4.3, S.59). Mit einer FIA wurden abwechselnd Polykationen und Polyanionen über einen mit Mercaptoethylsulfonat modifizierten goldbeschichteten SPR-Transducer gepumpt und online das Schichtdickenwachstum beobachtet. Untersucht wurde die Abhängigkeit des Schichtwachstums von Ionenstärke, pH-Wert und Konzentration der PE-Lösungen, sowie die Stabilität einer Multischicht gegenüber pH-Wert- bzw. Ionenstärkeänderungen des überstehenden Mediums. Außerdem wurde die unspezifische Wechselwirkung der Polyelektrolyt-Schichten (mit OVA) untersucht. In einem weiteren Schritt wurde PSS mit Atrazincapronsäure modifiziert.

Bei den Multischichtsystemen führte die Verwendung von *reinem Wasser* als Lösungsmittel zu teilweise negativen SPR-Schichtdicken der Polykationen und allgemein schwer interpretierbaren Bindungsverläufen. Diese Effekte der Polykationen wurden verstärkt durch eine Erhöhung der *Ionenstärke* – im Gegensatz zu den Polyanionen, welche dann stärkere positive Verschiebungen bei hoher Reproduzierbarkeit aufwiesen. Eine *pH-Wert*-Erniedrigung wirkte sich auf die untersuchten Systeme günstig aus. Sowohl mit 10 mM HCl, wie auch mit 10 mM bzw. 50 mM HOAc wurden prinzipiell gute Resultate erzielt. Bei Versuchen mit HCl zeigten sich bisweilen starke Driften, die mutmaßlich vom Ausgasen der Lösung rührten. Die Salzkonzentration der sauren Lösungen

wurde von 0 bis 500 mM (NaCl) variiert. Die beobachteten Schichtdicken erhöhten sich mit der Salzkonzentration bis auf das 4-fache des Wertes ohne Salz.

Als Protokoll wurde schließlich 10 mM PE in 100 mM NaCl / 50 mM Essigsäure etabliert. Die pH-Werte lagen für alle PE bei dem der Essigsäure (2.9), für PEI bei 3.6. Mit diesem Protokoll wurden sehr reproduzierbare Profile für Multischichtsysteme bis zu 7 Doppelschichten erhalten. Als Träger- bzw. Spülmedium wurde reines Wasser gewählt, da es im SPR die schönsten Kurven ergab. Gute Ergebnisse wurden erhalten, wenn das Lösungsmittel von Träger und PE-Lösung gleich waren.

Eine annähernd rechteckige Form der Bindungsprofile läßt auf sehr *hohe Assoziationsraten* schließen, eine geringe Drift des SPR-Signals beim Spülen auf *hohe Bindungskonstanten*. Die untersuchten PE-Multischichten sind gegenüber kleinen *pH-Werten* praktisch inert (gemessen bis pH 1.3) und zeigen ab pH 10 deutliche Schichtabnahme. *OVA* bindet leider sowohl auf Polykationen, als auch auf Polyanionen hervorragend.

Die erste Polyanion-Schicht auf dem Transducer zeigt für Polyanionen im SPR jeweils reproduzierbar eine überproportionale Schichtdicke. Für PSS beträgt diese etwa das 10-fache der siebten Polyanionschicht des Multischichtsystems. In etwas geringerem Maß trifft diese auch auf die PVS-Schichten zu. Bei solchen Signalverläufen handelt es sich vermutlich um Brechungsindex-Effekte, denn eine vergleichende Untersuchung mit denselben Lösungen auf einem Schwingquarz [Rickert1997] zeigte von erster bis siebter Doppelschicht konstante Schichtdicken, teils jedoch auch hier mit ungewöhnlichen Signaldriften.

Regenerieren bis zur kovalent gebundenen Oberflächenmodifikation läßt sich das Multischichtsystem durch Spülen mit 0.1 N NaOH, wobei alle Schichten innerhalb 10 s abgelöst werden. Um die FIA-Schläuche vor Verstopfung zu bewahren, müssen diese auch alkalisch (10 mM NaOH) gespült werden.

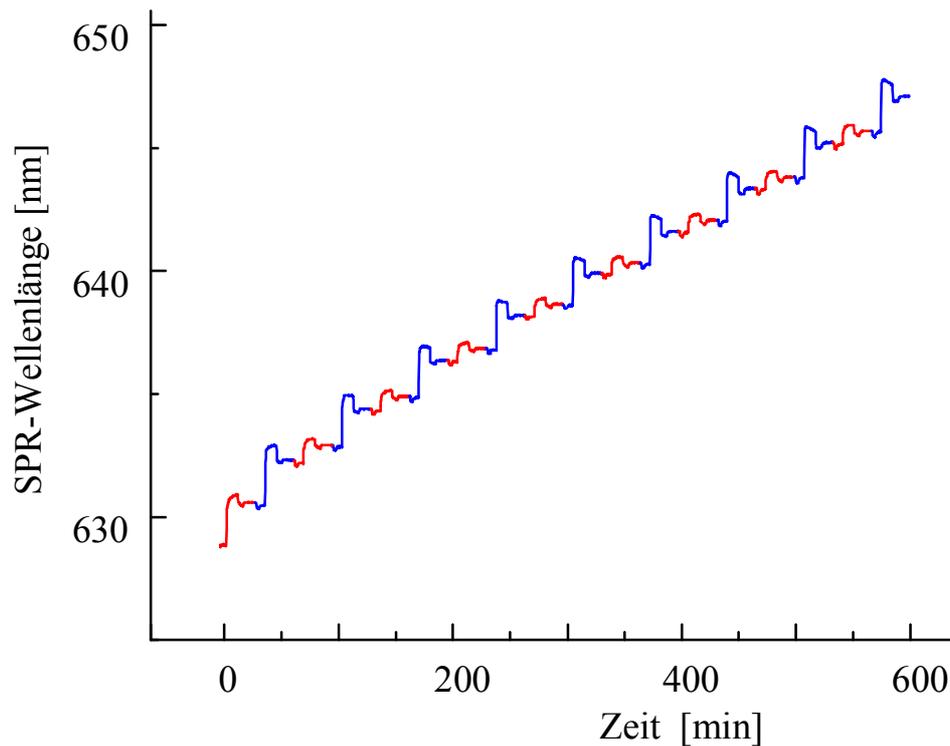


Abb. 35 Multilayersystem aus 9 Doppelschichten PEI/PSS (saure Salzlösung), detektiert mit SPR.

Bei Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) wurden einfachere Systeme mit einer kovalent auf GOPTS gekuppelten PEI-Unterlage untersucht. Dabei zeigte sich, daß auf einer adsorbierten PSS-Schicht (8000 pm), deren UWW mit 1 mg/mL OVA blockiert wurde (700 pm optische Schichtdicke, OSD) der ATR-PAK ohne Vorhandenseins eines Antigens bindet, und zwar mit etwa der Menge einer Monolage des Antikörpers (5600 pm OSD). Der Antikörper konnte mit Pepsin entfernt werden, ohne die PSS-Schicht zu tangieren, die mit 0.1 M NaOH weitgehend entfernt werden konnte.

Kationische PEI-Schichten (1000 pm, adsorbiert auf PSS) zeigten höhere WW mit negativem OVA (2500 pm). Die Bindung von ATR-PAK war gering (400 pm). Die Regeneration mit Pepsin verlief unvollständig, mit NaOH hingegen nahezu bis zum kovalent gebundenen PEI.

Durch Blockieren der UWW von PSS mit BSA (1200 pm) konnte die scheinbare SWW mit ATR-PAK auf 1685 ± 27 pm gedrückt wurde. Die Regeneration dieses Systems mit Pepsin verlief jedoch unter Verlust von etwa 20-30% der PSS-Schicht. Auf PVS (mit BSA blockiert) bindet weniger als $\frac{1}{4}$ des ATR-PAK (400 pm) im Vergleich zu PSS. Demnach ist die hohe Bindung auf PSS vermutlich auf eine *Kreuzreaktivität des ATR-PAK mit der Sulfonat-Gruppe* (anstelle ACA) zurückzuführen.

Das hergestellte *PSS-ACA-Konjugat* (Kap.3.3.2, S.53) bindet nicht an das ebenfalls anionische PVS, jedoch mit 2900 pm auf PEI. Nach der vergleichsweise geringen maximalen UWW mit BSA (500 pm) lag die SWW mit 5600 pm wiederum relativ hoch. Die Regeneration mit Pepsin hat jedoch auch die PSS-ACA-Schicht angegriffen, so daß die UWW jetzt 1000 pm und SWW nur noch 1600 pm betrug. Mit NaOH (2 mal) konnte weitgehend vollständig regeneriert werden. Die Modifikation des PSS mit ACA war demnach gelungen; für eine reine AK-Regeneration war die adsorptive Bindung auf einem Polykation jedoch nicht stabil genug.

4.3.2 Charakterisierung der Aminodextrane

Dextrane unterschiedlichen Molgewichtes wurden mit Aminogruppen funktionalisiert (Kap.3.3.3, S.54). Die erhaltenen Aminodextrane (AMD) wurden zur Charakterisierung mit EDC auf die Oberfläche gekuppelt, mit 100 mg/mL ACA und DIC versetzt und anschließend über ihre UWW (1 mg/mL OVA) und SWW (50 µg/mL ATR-PAK) mit RfS über die optische Schichtdicke (OSD) in pm charakterisiert:

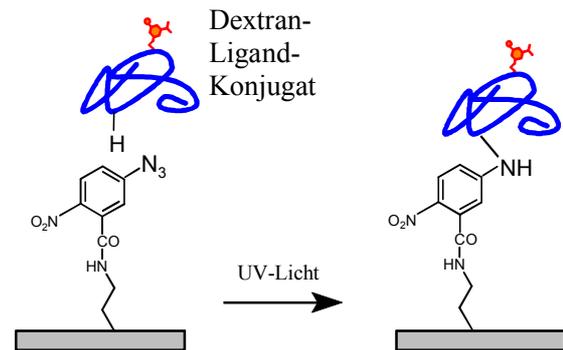
Aminodextran (kD/%Amin je Zucker)	UWW [pm]	SWW [pm]
AMD39/5	97±38	10625±1803
AMD110/5	497±12	15560±130
AMD110/10	428±8	6660±1396
AMD110/20	319±117	9298±136

Höhermolekulare Dextrane schirmen i.a. die Oberfläche aufgrund ihrer hohen Schichtdicke besonders gut ab, was in einer relativ kleinen UWW resultiert. Durch die höhere Schichtdicke höhermolekulare Dextrane ist bei diesen auch eine höhere SWW (höhere Beladung durch 3D) zu erwarten. Im Experiment lag die höchste SWW beim hochmolekularen AMD110/5, die geringste UWW jedoch beim AMD39/5, weshalb letzteres in dieser Arbeit zur Verwendung kam. Ein weiteres Argument gegen die höhermolekularen AMDs liegt in ihrer höheren Zähigkeit. Damit sind sie schwieriger handhabbar, nicht zuletzt bei der Mikrodosierung.

4.3.3 Photolinker mit AMD

Photolinker versprechen vor allem für die orts aufgelöste Immobilisierung interessante Perspektiven. Eine photo-reaktive Oberfläche kann in einem beliebigen Zeitraum mit verschiedenen Substanzen belegt werden, um dann die Immobilisierung in einem Schritt kovalent zu machen. Untersucht wurde die

kommerziell erhältliche 5-Azido-2-nitrobezoesäure (ANB) [Lewis1977], welche z.B. bei Immobilisierung von Dextran zum Einsatz kam [Elender1996].



Wahl des Filterelements

Bei der Bestrahlung mit einer Quecksilberdampfampe ist die Verwendung eines Filters empfehlenswert, da bei Wellenlängen ≤ 300 nm mit einer unspezifischen Spaltung aromatischer Ringe zu rechnen ist. Der Extinktionskoeffizient von ANB in DMF/Wasser (1:1) wurde bestimmt zu $\epsilon_{311 \text{ nm}} = 10164 \pm 214$ L/(mol·cm). Die Umsetzung von ANB nach verschiedenen Zeitpunkten wurde als Änderung der Absorption registriert. Dabei stellte sich heraus, daß ein anfangs verwendeter Linienfilter (334.1 nm) nur zu einer Umsetzung von etwa 20% in 15 min führte. Die Wahl für weitere Experimente fiel auf einen WG335 Filter (Schott) mit einer Kante bei 318 nm (10% Transmission). Hier werden in 10 min ca. 80% in homogener, geschüttelten wäßrigen Phase umgesetzt, bei guter Schonung von Substraten durch Wellenlängen über 300 nm. Die Belichtungszeit wurde im folgenden auf 15 min festgelegt. Ohne Filter wäre die Reaktion etwa 4-fach schneller.

Immobilisierung von ACA-AMD-Konjugat auf Photolinker-Oberflächen

Verschiedene Oberflächenmodifikationen mit dem Photolinker ANB-NHS (Tab. 8) auf Amino-OF wurden unter gleichen Bedingungen mit einem ACA-Aminodextran-Konjugat beschickt und nach dem Trocknen mittels UV-Licht kovalent angebunden (Kap.3.4.6, S.60). Die Charakterisierung erfolgte über RfS, indem die UWW mit 1 mg/ml OVA und die SWW mit 50 $\mu\text{g/mL}$ ATR-PAK in Einheiten von pg/mm^2 (bzw. pm optischer Schichtdicke) beobachtet

wurde. Als Referenz-Kopplungsverfahren ohne Photolinker wurde das ACA-AMD-Konjugat nach Standard-Protokoll mit EDC auf eine Carboxyoberfläche gekuppelt. (Tab. 8a).

	Modifikation	UWW [pg/mm ²] (%d.Ref.)	SWW [pg/mm ²] (%d.Ref.)
a	Referenz: AMD39/5-ACA0.5a ²¹ mit EDC auf Carboxyoberfläche (s.o.)	234±181 (100%)	714±1 (100%)
b	Ein ANB-AMD-Konjugat (1 mg AMD39/5-ANB2.5 + 2 µL Wasser) auf die Carboxyoberfläche mit EDC gekuppelt	303±55 (129%)	110±77 (15%)
c	Zusätzliche PEG2000-COOH-Zwischenschicht (kovalent)	284±149 (121%)	305±50 (43%)
d	ANB direkt auf eine PEG2000-NH ₂ -Oberfläche gekuppelt	537±119 (229%)	972±182 (136%)
e	Neue Referenz (s.o.) mit verbessertem AMD39/5-ACA0.5b	146±14 (100%)	9236±724 (100%)
f	PEI mit EDC, dann ANB-NHS	578 (395%)	3932 (43%)
g	PAH mit EDC, dann ANB-NHS	326±243 (223%)	4217±644 (46%)
h	PEI adsorbiert, dann ANB-NHS nach 1. Regeneration (64%d.1.SWW), 2. Reg. (56%d.1.SWW)	137± 10 (94%)	4307±364 (47%)
i	Vakuumentrocknung vor dem Belichten	100±19 (68%)	3653±442 (40%)
k	wie (i), aber mit Microdrops aufgebracht	0 (-)	3848±238 (42%)

Tab. 8 Immobilisierung von AMD-ACA-Konjugat mit Photolinker. Charakterisierung der unspezifischen (UWW) und spezifischen Wechselwirkung (SWW) mit RfS.

Eine nicht verbesserte UWW zeigte (b), obwohl die Verwendung eines Dextran-Photolinker-Konjugates als Unterlage eine besonders effektive Abschir-

²¹ Dextran mit 39 kg/mol, 5% der Zucker effektiv aminiert, 0.5% der Zucker mit ACA gekuppelt.

mung der Oberfläche und damit eine niedrige UWW verspricht. Auch die SWW blieb mit 15%d.Ref. weit hinter den Erwartungen zurück. Eine PEG2000-COOH-Zwischenschicht (c) brachte immerhin eine SWW von 43%d.Ref. bei annähernd gleicher UWW. Wurde der Photolinker direkt auf PEG gekuppelt (d), so stieg die SWW auf hervorragende 136%d.Ref., jedoch war die UWW mit rund 500 pm vergleichsweise zu hoch, so daß kaum noch von einer spezifischen Oberfläche die Rede sein kann. Ein anderes AMD-Photolinker-Konjugat brachte mit dem Referenz-Verfahren gegenüber dem ersten Konjugat nur halb so viel UWW und 13-fache SWW (e) und diente daher als weitere Referenz. PEI bzw. PAH sollten mit ihrer Fülle an Aminogruppen eine hochbelegte Photolinker-Oberfläche ermöglichen. Diese Modifikation brachte jedoch sowohl mit kovalent gekuppeltem (f) PEI oder PAH (g), wie auch mit absorbiertem PEI (h) nur etwa 45%d.Ref. Die hohe UWW der Polyelektrolyte sollte bei guter Anbindung des AMD-ACA-Konjugates keine Rolle spielen, was jedoch nur für adsorbiertes PEI beobachtet wurde. Die üblichen Regenerationsbedingungen für AK sorgten jedoch für einen starken Abtrag der Oberfläche-Modifikation, so daß bereits nach der ersten Regeneration nur noch 64% der SWW verzeichnet wurden. Eine Vakuumantrocknung (1 h bei 1 mbar) sollte die Reaktion des ANB mit Wasser reduzieren, brachte hingegen eine leicht reduzierte SWW, dafür aber auch eine deutlich kleinere UWW (i). Derselbe Versuch mit dem Microdrop-Verfahren (k) mit einer nur 0.1%igen ACA-AMD-Lösung brachte eine vergleichbare SWW, aber eine auf Null reduzierte UWW, was auf eine sehr homogene Oberflächenmodifikation schließen läßt.

Der Vergleich mit einem weiteren ACA-AMD-Konjugat und Vakuumtrocknung auf kovalent gekuppeltem PEI (Abb. 36) zeigte sowohl bei der Auftragung von Hand, wie auch mit Microdrops eine weitgehend stabile Ankupplung. Die SWW betrug jedoch auch hier ca. 40% d. Ref.

Diese Versuchsreihe demonstriert, daß mit dem Photolinker ANB keine hoch-effektive Ankopplung von Polymer möglich war (40-50% der SWW von Vergleichsverfahren). Mit Microdrop-Verfahren wurden vergleichbare SWW zur Kupplung von Hand erzielt, jedoch ohne jede UWW und bei einem Reagenzienverbrauch von etwa 10^{-4} der Auftragung von Hand.

Weitere Verbesserungen sind mit effektiveren Photolinkern zu erwarten. Versuche mit perfluorierten Azido-Aromaten versprechen eine geringere interne Einschubreaktion und könnten daher bei weiteren Versuchen von Vorteil sein [Keana1990], [Stein1996]. Nachteil ist die bislang nicht kommerzielle Verfüg-

barkeit dieser Photolinker. Weitere interessante Photolinker könnten beispielsweise auf der Basis von Benzophenonen liegen [Delamarche1996], da diese schonendere Wellenlängen >350 nm erlauben und gleichzeitig spezifischer an CH- bzw. CC-Bindungen knüpfen und daher weniger Reaktionen mit dem Lösungsmittel (Wasser) eingehen. Interessant erscheinen auch Aryldiazirin-BSA-Konjugate, die zur sehr einfachen Immobilisierung von Dextran direkt auf Kunststoff [Barié1998] oder von Fabs direkt auf Glas [Gao1995] verwendet werden – bislang jedoch mit weniger zufriedenstellenden Belegungen (1.25 ng Fab/ mm^2).

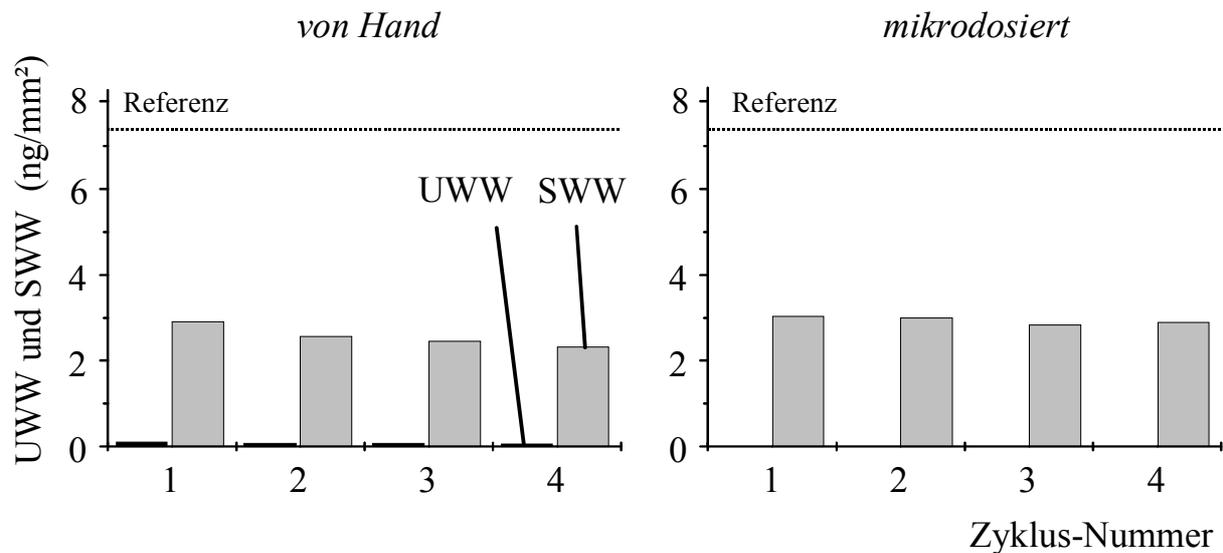
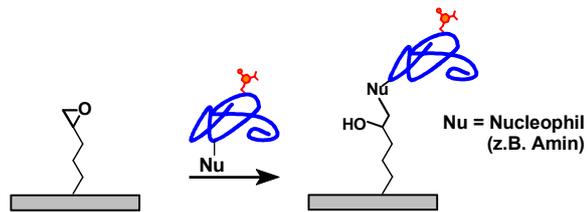


Abb. 36 *ACA-AMD-Konjugat gekuppelt auf Photolinker-Oberfläche und Vergleich der Aufbringung von Hand und mikrodosiert. Typische UWW (1 mg/mL OVA) und SWW (50 $\mu\text{g/mL}$ AK) mit mehrfacher Regenerierung des AK (Zyklus). Referenz-Kupplung mit EDC auf Standard-Carboxy-Oberfläche.*

4.3.4 Epoxide mit AMD

Die Oberflächenmodifikation von Glas mit Epoxysilan (GOPTS) ist vom Aufwand her denkbar einfach. Eine nucleophile Ringöffnung kann auch durch Wasser (neutraler pH) als



Konkurrenz-molekül verursacht werden. Dennoch zeigten verschiedene Experimente, daß Aminogruppen stark bevorzugt sind, gefolgt von Hydroxy- und Carboxy-Gruppen, so daß dennoch eine effiziente Ankupplung möglich ist. Typische Meßergebnisse mit einer Epoxy-Oberfläche, auf welche ein ACA-AMD-Konjugat aufgebracht wurde, zeigt Abb. 37. Die UWW der Handauftragung und Mikrodosierung waren sehr gering, bzw. nicht zu erkennen. Auch die SWW waren vergleichbar und die Stabilität der Oberflächenmodifikation gegenüber der AK-Regeneration war hoch (reproduzierbare SWW). Die Handauftragung ergab aufgrund der großen Mengen im μL -Maßstab und der hohen Konzentrationen an AMD-Konjugat zunächst Schichten mit einem dicken Dextranpanzer, der sich auch durch kräftiges Spülen nur schwer oder sogar unvollständig entfernen ließ. Eine kurze Behandlung im Ultraschall könnte abhelfen und dafür sorgen, daß die SWW von Zyklus 1 und 2 gleich werden.

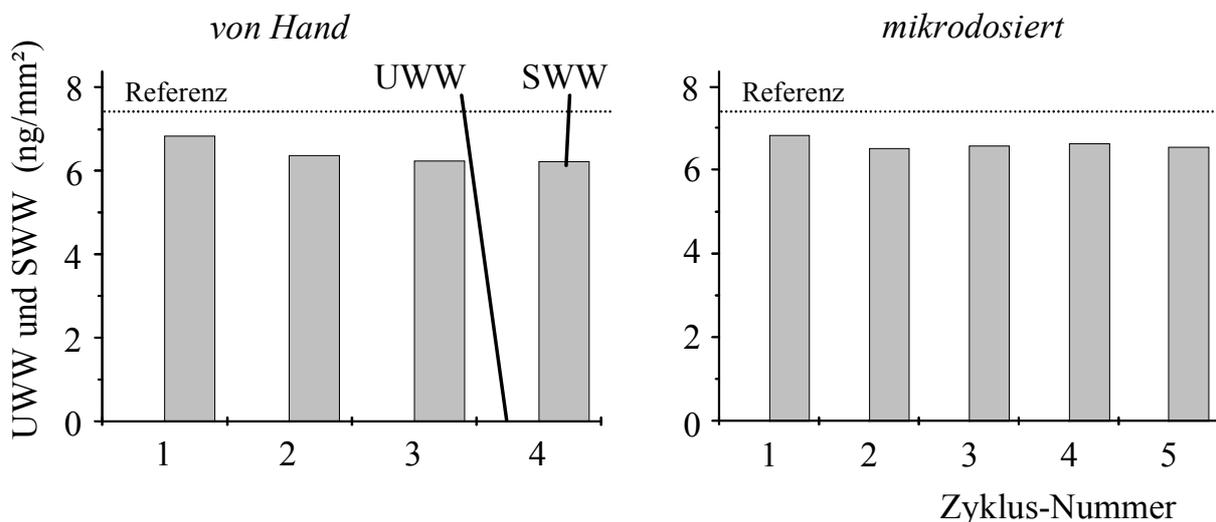
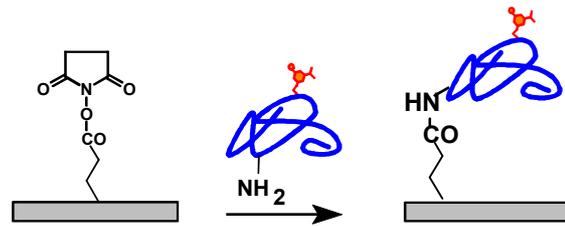


Abb. 37 ACA-AMD-Konjugat gekuppelt auf Epoxidoberfläche und Vergleich der Aufbringung von Hand und mikrodosiert. Typische UWW (1 mg/mL OVA) und SWW (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AK) mit mehrfacher Regenerierung des AK (Zyklus). Referenz-Kupplung mit EDC auf Standard-Carboxy-Oberfläche.

4.3.5 Aktivester mit AMD

Eine über Aktivester aktivierte Carboxyfunktion reagiert sehr selektiv mit einer Aminogruppe. Im trockenen Zustand sind NHS-Aktivester monatelang stabil, während sie im wässrigen



Medium nach etwa einer halben Stunde vollständig hydrolysiert sind. Damit sind die Voraussetzungen optimal für die Ankupplung eines ACA-AMD-Konjugates an eine NHS-aktivierte Oberfläche (Abb. 38). Beim Auftragen von Hand (große Konzentration und Menge) erreichte die SWW erwartungsgemäß die Referenz-Kupplungsmethode mit EDC. Die Stabilität der Oberflächenmodifikation gegenüber der AK-Regeneration war hoch, nur die erste SWW lag wiederum auf höherem Niveau. Die UWW war nach der Kupplung mit 250 pg/mm² um 250% über der Referenz und nahm kontinuierlich mit jeder AK-Regeneration ab. Das mikrodosierte Auftragen des ACA-AMD-Konjugates ergab sehr homogene Schichten (UWW nahe Null), begleitet von einer 15% niedrigeren SWW. Die Steigerung der SWW nach drei AK-Regenerationen um 7% ist auf eine Neuorientierung der Dextranschicht zurückzuführen, die sich durch 1 min im Ultraschall vorwegnehmen ließ.

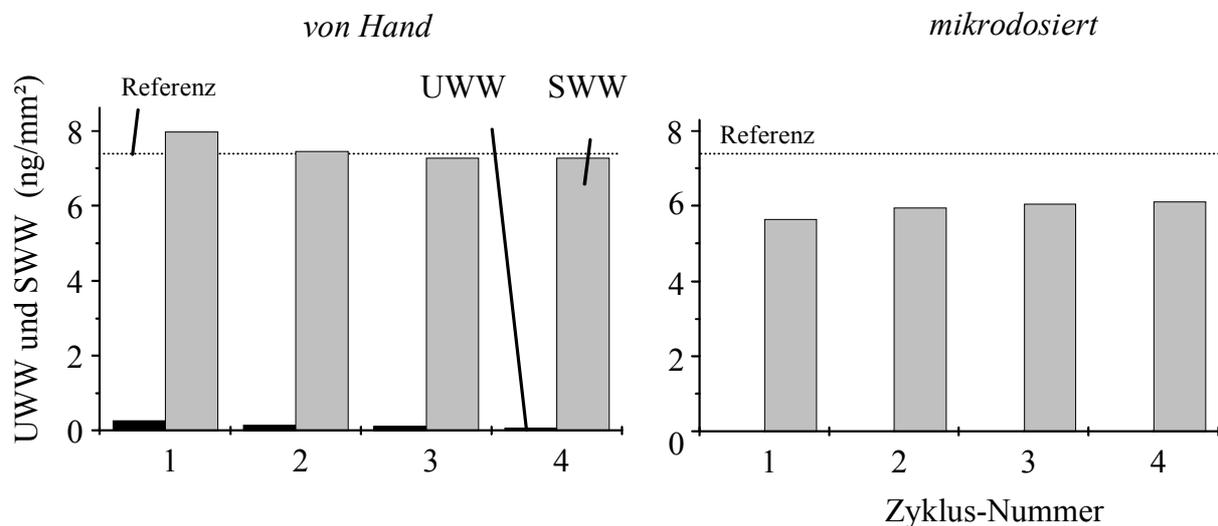


Abb. 38 ACA-AMD-Konjugat gekuppelt auf Aktivesteroberfläche und Vergleich der Aufbringung von Hand und mikrodosiert. Typische UWW (1 mg/mL OVA) und SWW (50 µg/mL ATR-PAK) mit mehrfacher Regenerierung des AK (Zyklus). Referenz-Kupplung mit EDC auf Standard-Carboxy-Oberfläche.

4.3.6 Immobilisierung von DNA-Oligomeren

In dieser Arbeit wurde die Effizienz lokalisierter Immobilisierung aminotermi- nierter DNA-Oligomere mittels Tintenstrahltechnik auf modifizierte oxidische Glastypoberflächen untersucht. Verschiedene Methoden zur Modifizierung der Oberfläche mit Carboxylgruppen, sowie auch zur kovalenten Anbindung des DNA-Oligomers über eine Peptidbindung wurden vergleichend untersucht. Die Protokolle für den Transfer der DNA-Oligomere (per Tintenstrahltechnik) und die nachfolgende Charakterisierung der spezifischen und unspezifischen Bin- dungskapazität und Stabilität mit RfS waren für alle Transducer einheitlich. Dies erlaubte einen direkten Vergleich aller verwendeten Protokolle und somit die Auswahl des geeignetsten Protokolls für eine bestimmte Anwendung. Zur Immobilisierung wurden die in Kap.3.4.10 (S.62f) beschriebenen Standardpa- rameter verwendet. Die 40°C warme Oberfläche der Transducer wurde mit einem zweifaches ccp-Muster ($a = 100 \mu\text{m}$, $d = 2 \text{ mm}$) und einem Tropfentakt von 0.8/s mit DNA-Oligomer belegt.

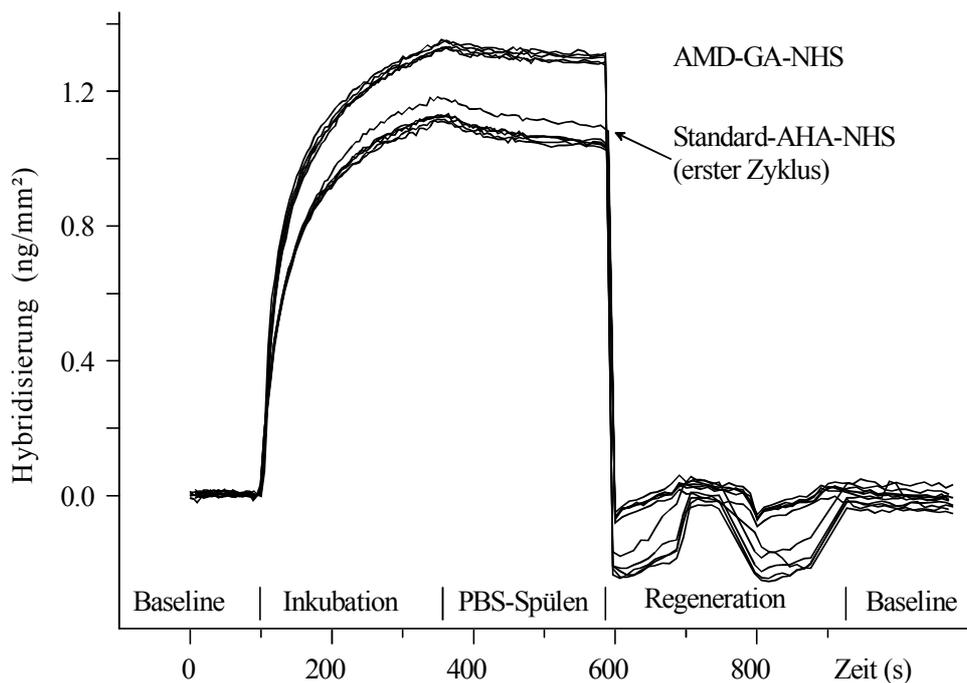


Abb. 39 RfS-Bindungskurven der Hybridisierung auf die DNA-Oberflächen Standard-AHA-NHS und AMD-GA-NHS.

Typische RfS-Bindungskurven komplementärer DNA-Oligomere an die immo- bilisierte Sonden auf einer AHA-NHS und einer AMD-GA-NHS-Oberfläche sind in Abb. 39 gezeigt. Die Anfangsphase der Bindung ist durch einen schnel- len Zuwachs an gebundenem Material gekennzeichnet. Während des Spülvor-

ganges mit PBS läßt sich eine leichte Dissoziation beobachten. Die Regeneration am Ende jedes Zyklus mit Salzsäure führte jeweils zu einer vollständigen Dissoziation von hybridisiertem DNA-Oligomer.

Gute Ergebnisse wurden mit Standard-AHA-NHS-Oberflächen erzielt. Die beobachtete Änderung der optischen Schichtdicke für die spezifische Hybridisierung betrug etwa 1100 pm. Geht man davon aus, daß die Empfindlichkeit von RI_S für Proteine und DNA etwa gleich hoch ist, so läßt der von [Brecht1999] bestimmte Zusammenhang zwischen Signalverschiebung und Proteinbeladung auch auf DNA-Beladungen übertragen. Für das untersuchte 23-mer erhält man somit eine spezifische Hybridisierung von 1100 pg/mm² entsprechend 155 fmol/mm². Während die Hybridisierungskapazität beim zweiten Zyklus auf etwa 95% zurückging, war während der folgenden Zyklen kein weiterer Verlust mehr zu erkennen. Vor der sauren Regeneration wurde der Transducer bei erhöhter Flußrate mit PBS gespült, wobei die optische Schichtdicke um 65 bis 80 pg/mm² abnahm. Ursache hierfür dürfte eine geringe unspezifische Bindung des Komplementärstranges an die Oberfläche sein. Unspezifische Wechselwirkungen mit DNA konnten nicht detektiert werden. Mit 1 mg/mL OVA wurde eine geringe unspezifische Wechselwirkung von etwa 80 pg/mm² für alle AHA- und ADA-Oberflächen beobachtet. Dieses Protein wurde im Verlauf der üblichen sauren Regeneration jedoch wieder komplett von der Oberfläche abgelöst. Bindungskapazitäten für die verschiedenen Immobilisierungsstrategien wurden in Abb. 40 und in Tab. 9 vergleichend dargestellt.

Immobilisierungs- Protokoll	Max. Hybridisie- rung (Zyklus 1) [pg/mm ² / fmol/mm ²]	Abnahme beim Spülvorgang [pg/mm ² / fmol/mm ²]	Regenerations- Stabilität Hybri- dis.-Zyklus ...4 (1...4), *: 2..3 (1...3)
Standard-AHA-NHS	1050 / 147	65-80 / 9-11	100% (100%)
Heiz-AHA-NHS			
a) 70°C	790 / 111	85-95 / 12-13	93% (91%)
b) 100°C	815 / 114	30-40 / 4-6	99% (97%)
c) 100°C+Schmelz	1052 / 148	45-50 / 6-7	98% (96%)
Schmelz-AHA-NHS	1125 / 158	15-35 / 2-5	97% (102%)
ADA-NHS	995 / 140	50-70 / 7-10	101% (90%)*

AHA-DNA-DICvap/RT	850 / 119	40-80 / 6-11	80% (65%)
AHA-EDC/DNA	237 / 33	80-130 / 11-18	98% (76%)
AMD-GA-NHS	1300 / 182	0-15 / 0-2	100% (100%)

Tab. 9 Vergleich verschiedener Immobilisierungsansätze für DNA-Oberflächen bezüglich ihrer Bindungskapazitäten und Regenerationsstabilitäten.

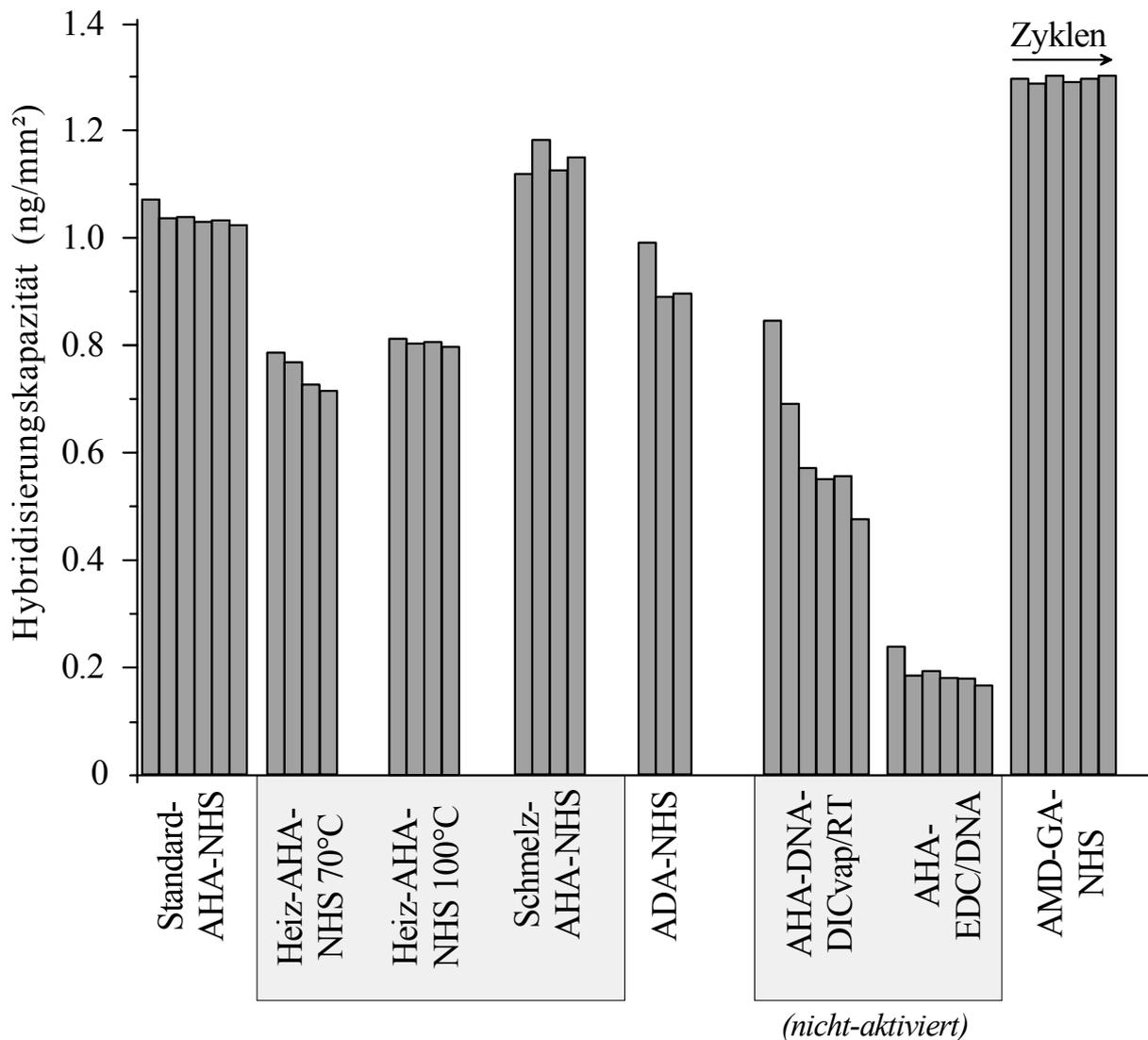


Abb. 40 Maximale Oberflächenbeladung bei wiederholter Hybridisierung und Regeneration.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der anderen Immobilisierungsprotokolle mit den Ergebnissen des Protokolls für AHA-NHS verglichen. Die

Protokolle für die Oberflächen Standard-AHA, Heiz/Schmelz-AHA, ADA und AMD-GA wurden durchgeführt, um einen Vergleich der verschiedenen Ansätze in der Präparation der carboxylierten Oberfläche zu erhalten. Eine Temperaturerhöhung während der Reaktion von AHA mit GOPTS (Heiz-AHA-Oberfläche) führte zu keiner Verbesserung. Vielmehr wurde eine reduzierte Hybridisierungskapazität und eine verringerte Regenerationsstabilität beobachtet. Dieser Effekt ist am stärksten für das Protokoll mit 70°C ausgeprägt. Die Immobilisierung reiner AHA auf eine GOPTS-Oberfläche (Schmelz-AHA-Oberfläche) zeigt eine der Standard-AHA-Oberfläche vergleichbare Hybridisierungskapazität, jedoch eine geringere Reproduzierbarkeit der Signalverschiebung während wiederholten Hybridisierungs- und Regenerationszyklen.

Für ADA ist aufgrund der längeren Alkylkette eine dichtere bzw. geordnetere Packung der immobilisierten Moleküle auf der Transduceroberfläche vorstellbar. ADA wurde als Reinsubstanz auf die Oberfläche aufgeschmolzen. Aufgrund der geringen Löslichkeit von ADA mußte der Transducer zum Entfernen der überschüssigen ADA-Kruste nach dem Aufschmelzen mit alkalischer Lösung und Ultraschall behandelt werden. Die resultierenden Oberflächen zeigten stark hydrophobes Verhalten. Mikropipettierte Tropfen der zu immobilisierenden wäßrigen DNA-Lösung trockneten deshalb nicht in Form eines runden Spots, was zu einer geringeren Homogenität der DNA-Schicht führen kann. Die Oberflächen zeigten eine reduzierte Bindungskapazität, jedoch eine akzeptable Regenerationsstabilität. Dieser Effekt kann mit einer Kombination aus reduzierter Oberflächenbelegung und geringerer Homogenität der Oberfläche erklärt werden.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob ein Oligomer-Transfer auf eine aktivierte Oberfläche vorteilhafter als der Transfer auf nicht-aktivierte Oberflächen und gleichzeitig mittransferiertem oder nachträglich über die Gasphase zugeführtem Kupplungsreagenz ist. Die beiden letzteren Ansätze hätten den Vorteil, daß sie ohne die Herstellung einer aktivierten Oberfläche mit geringer Stabilität auskommen. Eine Kupplung mit gasförmigem DIC bei Raumtemperatur (AHA-DNA-DICvap/RT) zeigte eine relativ kleine Hybridisierungskapazität bei gleichzeitig geringer Regenerationsstabilität (Abb. 40). Wurde die Temperatur auf 100°C erhöht und das Reaktionsgefäß zu Beginn evakuiert, so wurde die Bindungskapazität während des ersten Zyklus auf 500 pg/mm² reduziert. AMD-GA-Oberflächen zeigten keine brauchbaren Ergebnisse. Durch das gleichzeitige Aufbringen einer Lösung aus DNA-Oligomer und dem Kupp-

lungsreagenz EDC (AHA-EDC/DNA) wurde nur eine sehr kleine Hybridisierungskapazität, jedoch eine hohe Stabilität gegenüber Regenerationsbedingungen erzielt.

Im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Oberflächen aus endständig funktionalisierten Alkylketten bietet eine mit Makromolekülen modifizierte Oberfläche eine Matrix aus reaktiven Gruppen und kann somit zu einer erhöhten Bindungskapazität führen. Zu diesem Zweck wurde aminofunktionalisiertes Dextran (AMD) hergestellt, welches nach der kovalenten Anbindung an die Oberfläche carboxyliert wurde (AMD-GA). Diese Oberfläche zeigte die höchste Hybridisierungskapazität (1300 pg/mm^2 bzw. 180 fmol/mm^2) im Vergleich zu allen anderen untersuchten Oberflächen.

Abb. 39 zeigt, daß für diese Oberfläche das zur Abschätzung der Hybridisierungskapazität verwendete Routineprotokoll nicht zur vollständigen Sättigung aller Bindungsstellen führt. Wiederholte Hybridisierung nach diesem Protokoll, jedoch ohne den üblichen Regenerationsschritt nach jedem Zyklus, führte zu einer Oberflächenbeladung von über 1600 pg/mm^2 bzw. 225 fmol/mm^2 (Abb. 41).

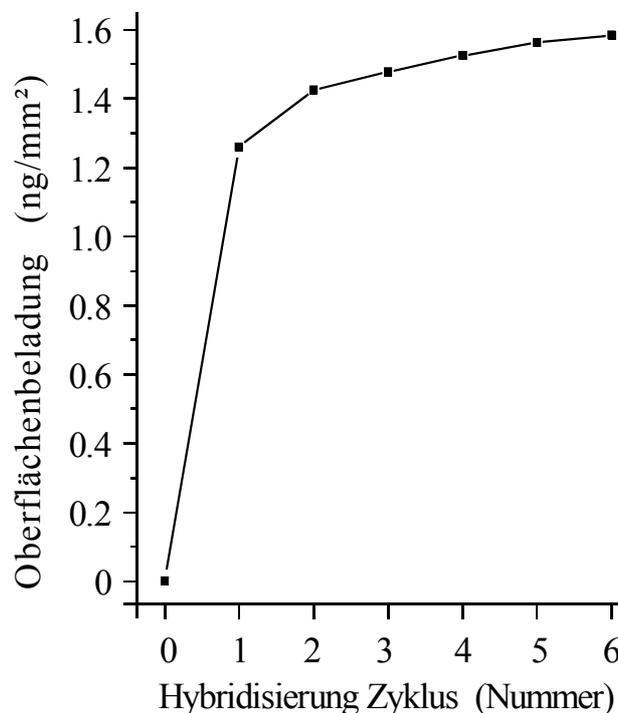


Abb. 41 Oberflächenbelegung durch Wiederholung der Hybridisierung ohne Regeneration.

Die untersuchten AMD-GA-Oberflächen wiesen gleichzeitig die höchste Regenerationsstabilität auf (Abb. 39, Abb. 40). Eine Lagerung unter Puffer bei Raumtemperatur führte nach 50 Tagen zu einem Verlust von nur 15% der ursprünglichen Bindungskapazität, was die hohe Stabilität dieser DNA-Oberflächen unterstreicht. Zusätzlich zu einer nicht detektierbaren unspezifischen Wechselwirkung mit DNA war auch mit Protein (OVA, 1 mg/mL) keine unspezifische Wechselwirkung zu beobachten. Diese Eigenschaft ist bei der Beobachtung von DNA-Protein-Wechselwirkungen interessant, wie z.B. in Studien von Transkriptionsfaktoren und anderen Regulationsproteinen.

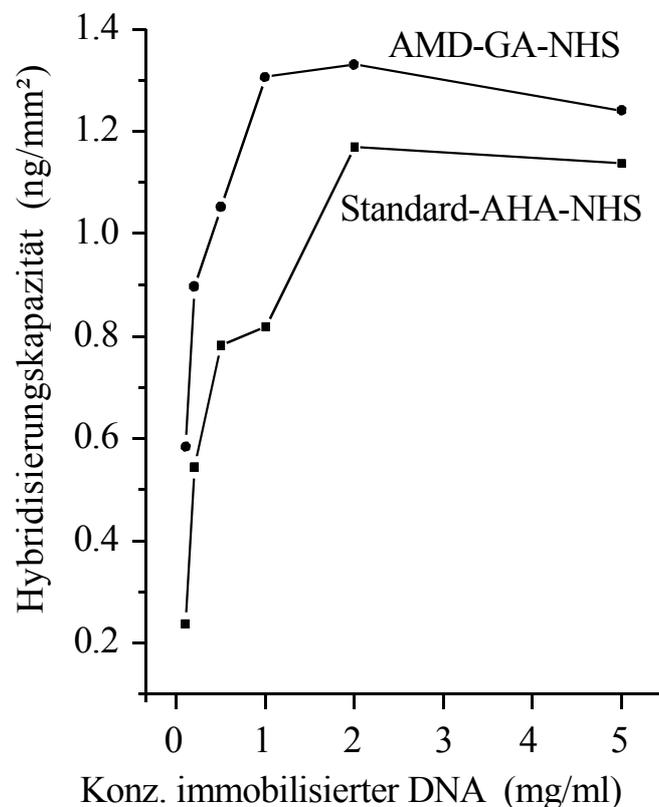


Abb. 42 Einfluß der Konzentration an DNA-Oligomeren in der Immobilisierungslösung auf die spezifische Hybridisierungskapazität für Standard-AHA-NHS ■ und AMD-GA-NHS ●.

Der Einfluß der mikropipettierten DNA-Konzentration wurde für die zwei besten Oberflächentypen getestet, nämlich die Standard-AHA-NHS- und die AMD-GA-NHS-Oberfläche (Abb. 42). Es konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Konzentration auf über 1 mg/mL bei AMD-GA-Oberflächen und über 2 mg/mL bei AHA-Oberflächen nicht mehr zu einer Erhöhung der maximalen Bindungskapazität beitrugen. Kleinere Konzentrationen resultierten in einer verringerten Hybridisierungskapazität.

Zum Vergleich wurde auf beiden Oberflächentypen auch noch eine Immobilisierung „von Hand“ durchgeführt, wobei eine vergleichsweise große Menge an DNA-Lösung (und somit auch an Wasser) auf die Aktivesteroberfläche pipettiert wurde. Es wurden 1.5 μL einer Lösung von 100 mg/mL DNA-Oligomer in Wasser auf der aktivierten Transduceroberfläche im Sandwich-Verfahren 1 h lang in einer Feuchtekammer inkubiert. Konzentrationen zwischen 100 und 300 mg/mL werden häufig zur kovalenten Oberflächenmodifizierung verwendet. Obwohl die DNA-Konzentration 50 bis 100-fach erhöht war, konnte keine Verbesserung von Hybridisierungskapazität oder Regenerationsstabilität beobachtet werden.

Die orts aufgelöste Immobilisierung vorbereiteter DNA-Sequenzen auf einer Oberfläche ist in einer Reihe von Publikationen der letzten Jahre thematisiert. Beispielhaft wurden in Tab. 10 einige dieser Publikationen vergleichend zusammengefasst. Die spezifischen Bindungskapazitäten reichen von 15 bis 100 fmol/mm². In dieser Arbeit wurden Bindungskapazitäten von 150 fmol/mm² für AHA-Oberflächen und über 220 fmol für AMD-GA-Oberflächen beobachtet, also bedeutend mehr als in der zitierten Literatur.

Lit.	Verfügbarkeit für Hybridis.	Hybridis.-Kapazität [fmol/mm ²]	Bindungssystem / Details
[Guo1994]	20%	45	aminoterminierte DNA mit Aminosilan und Phenylendiisothiocyanat auf Glasoberflächen; DNA-Verbrauch von 10000 ng/mm ²
[Chrisey 1996a]	9.3%	15	DNA mit Thiolgruppen mittels bifunktionellem Crosslinker auf mit Aminosilan modifiziertem Quarz
[O'Donnel 1997]	40%	100	vergleichbar zu [Chrisey1996a]
[Caruso 1997c]		70	biotinylierte DNA aufgebracht auf einen kovalent angebundenen Avidin-Film

Tab. 10 Vergleich verschiedener veröffentlichter DNA-Immobilisierungs-Strategien über die erzielten Hybridisierungskapazitäten (angegeben oder umgerechnet in fmol/mm²).

4.3.7 DNA-Oligomere als Hilfsligandensystem

DNA-Oligomer-Spots eignen sich beispielsweise auch als spezifische Anker für zu immobilisierende Liganden. Für den Einsatz in der heterogenen Immunanalytik mit parallelen Systemen (z.B. TIRF [Brecht1998a]) müßte die DNA-Oberfläche mit Antigen-DNA-Konjugat hybridisieren. DNA wäre in diesem Fall ein Hilfsligandensystem [Brecht1998c]. Da jedes DNA-Oligomer nur an seinen Komplementärstrang auf der Oberfläche bindet, kann durch den Einsatz verschiedener Antigen-DNA-Konjugate eine orts aufgelöste Immobilisierung verschiedener Antigene auf einem entsprechend strukturierten DNA-Spot-Raster in einem Schritt erfolgen. Nach einem Immunoassay und anschließender Regeneration der DNA-DNA-Bindung steht die Oberfläche ohne Ausbau aus der Meßzelle für einen neuen Zyklus oder eine neue Antigen-Strukturierung zur Verfügung. Die vorbereiteten DNA-Oberflächen sind bequem lagerfähig. Durch die Mehrfachverwendung von Transducern steigt sowohl die Rentabilität, wie auch die Qualität der erhaltenen Daten. Wichtig sind die absolute Regenerierbarkeit und die Vermeidung unspezifischer Wechselwirkung. Konkret wurde ein System untersucht, welches auf dem zuvor vorgestellten DNA-modifizierten AMD-GA-NHS-Oberflächentyp besteht (Abb. 43).

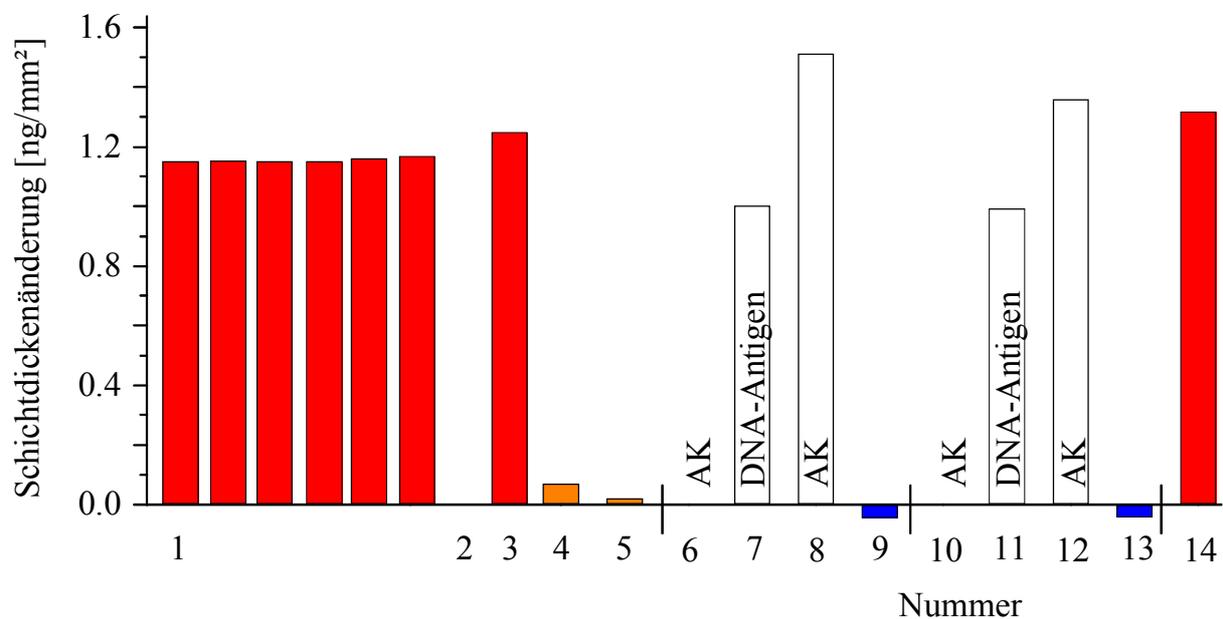


Abb. 43 DNA als Hilfsligand für einen heterogenen Immunoassay bei Verwendung einer mikrodosierten AMD-GA-DNA-Oberfläche. Bestimmung der Schichtdickenänderungen mit RIfS.

Legende zu den Nummern in Abb. 43:

1. Hybridisierungen mit komplementärem Oligomer und jeweilige Regeneration mit HCl, pH 2.
2. Unspezifische WW (DNA-Oligomer, 10 µg/mL).
3. wie 1., aber nach 20 h.
4. Unspezifische WW (OVA, 1 mg/mL).
5. Unspezifische WW (IgG Schaf, 100 µg/mL).
6. Markiertes Antikörperkonjugat (Cy5-ATR-PAK, 10 µg/mL mit OVA, 200 µg/mL).
7. Hybridisierung mit DNA-Antigen-Derivat (ACA-Oligo, 10 µg/mL).
8. wie 6., diesmal anschließend aber mit Regeneration: Harnstoff/Guanidin-Lösung (je 6M, pH 2, kein Balken).
9. nochmal Regeneration.
10. -13. wie 6.-9.
14. wie 1., nach 40 h.

Eine vollständige Regeneration des Hilfsligandensystems nach spezifischer Anbindung des Antikörpers war durch drei- bis viermaliges Regenerieren mit einer Lösung von 6M Guanidin/6M Harnstoff/pH 2 möglich. Eine (spezifische) Antikörper-Bindung nach einer solchen Regeneration war praktisch nicht detektierbar. Im zweiten Zyklus wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt, jedoch mit einer spezifischen Antikörper-Bindung von 90% des ersten Durchlaufs. Vergleichbare Versuche mit den AHA-DNA-Oberflächen schlugen aufgrund mangelhafter Regenerierbarkeit fehl. Die grundlegenden Kriterien für den Einsatz der AMD-GA-DNA-Oberflächen für ein Hilfsligandensystem sind gut erfüllt.

4.4 Phasenseparations-Fluoreszenz-Immunoassay (PSFIA)

4.4.1 Allgemeines

Beim PSFIA handelt es sich um einen neu entwickelten und damit hier erstmals vorgestellten heterogenen Immunoassay.

Der Assays gliedert sich in drei Schritte (Abb. 44):

1. „**Coaten**“: Belegen der Wandflächen einer Kavität mit Analytderivat (Antigen, AG_{of}).
2. „**Inkubation**“: Zugabe von markiertem Antikörper und Probe (Analyt bzw. Antigen) in die Kavität.
3. **Phasenseparation**: Detektion der flüssigen Phase nach deren Transfer in eine unbeschichtete Kavität oder durch „Ausblenden“ von wandgebundenem AK.

Das heterogene Assayformat erlaubt es, lagerfähige Probenräger vorzubereiten (Schritt 1, Coaten). Für den Assay ist dann nur noch die Zugabe von Probe und AK notwendig. Nach einer theoretischen Abschätzung des Potentials eines solchen Assays (Kap 4.4.2) wurde dieser zunächst im MTP-Maßstab (Kap.4.4.3 und Abb. 44) realisiert und anschließend in den NTP-Maßstab transferiert (Kap.4.4.4). Die Optimierung des Coatens ist vor allem Gegenstand der Versuche im MTP-Maßstabs. Im NTP-Maßstab sind die Inkubation und Phasenseparation kritische Schritte und mußten entsprechend modifiziert werden.

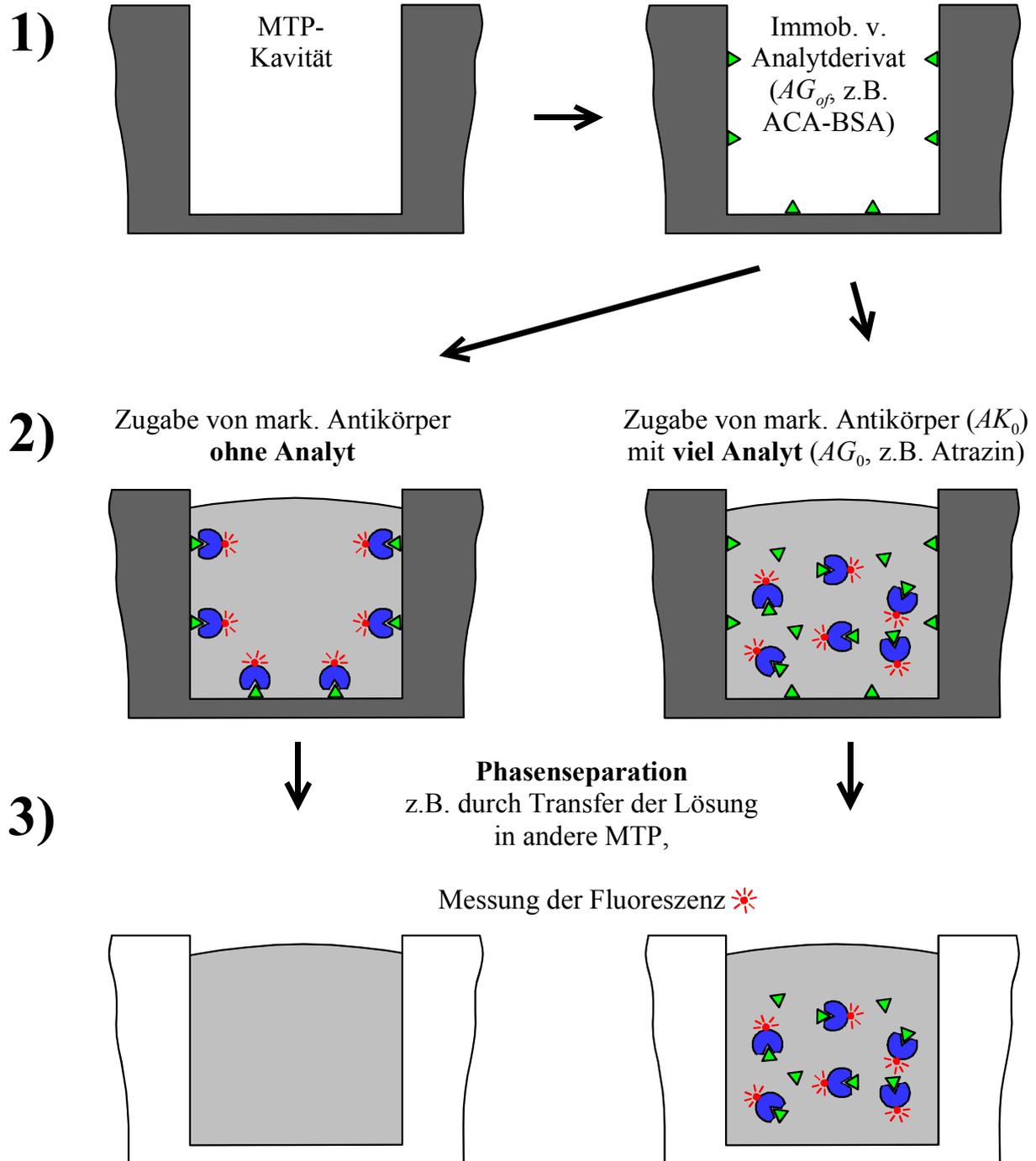
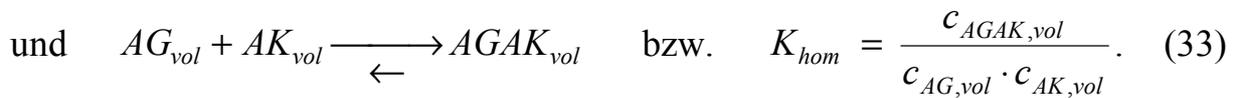


Abb. 44 PSFIA in der MTP: Schema.

4.4.2 Theoretisches Signal

Für das Verständnis des Assays wurde ein mathematisches Modell entwickelt. Der eingesetzte monovalente Antikörper konkurriert sowohl mit dem Analyt, als auch mit dem immobilisierten Antigen-Derivat in einer Gleichgewichtsreaktion. Die beiden Teilgleichgewichte und deren Massenwirkungsgesetze lauten:



Dabei steht AG_{of} für das immobilisierte Antigen, AG_{vol} für den Analyt, AK_{vol} für freien Antikörper, $AGAK_{vol}$ für gelösten Komplex und $AGAK_{of}$ für spezifisch wandgebundenen Komplex. K_{het} bzw. K_{hom} sind die Gleichgewichtskonstanten, $c_{AG,of}$, $c_{AG,vol}$ und $c_{AK,vol}$ die Gleichgewichtskonzentrationen. Zudem gelten die Stoffbilanzen für die eingesetzte AK-Konzentration $c_{AK,0}$, die eingesetzte Analytkonzentration („Probe“) $c_{AG,vol,0}$ und die Konzentration an immobilisiertem Analytderivat („Tracer“) zum Zeitpunkt Null ($c_{AG,of,0}$):

$$c_{AK,0} = c_{AK,vol} + c_{AGAK,vol} + c_{AGAK,of} \quad (34)$$

$$c_{AG,vol,0} = c_{AG,vol} + c_{AGAK,vol} \quad (35)$$

$$\text{und} \quad c_{AG,of,0} = c_{AG,of} + c_{AGAK,of} \quad (36)$$

Die Auflösung dieses Gleichungssystems (Gl. 32-36) nach der Konzentration von Antigen-Antikörper-Komplex an der Oberfläche ($x = c_{AGAK,of}$) führte über eine Gleichung dritten Grades:

$$\begin{aligned} & x^3 [K_{hom} K_{het} - K_{het}^2] \\ & + x^2 [-K_{hom} + K_{hom} K_{het} (c_{AG,vol,0} - c_{AG,of,0} - c_{AK,0}) + K_{het} + K_{het}^2 (c_{AK,0} + 2c_{AG,of,0})] \\ & + x [K_{hom} K_{het} (c_{AG,of,0} c_{AK,0} - c_{AG,of,0} c_{AG,vol,0}) - K_{het} c_{AG,of,0} - K_{het}^2 (2c_{AG,of,0} c_{AK,0} + c_{AG,of,0}^2)] \\ & + K_{het}^2 c_{AK,0} c_{AG,of,0}^2 = 0 \end{aligned} \quad (37)$$

Für den Fall, daß die beiden Gleichgewichtskonstanten K_{het} und K_{hom} gleich sind ergab sich eine einfache Lösung, wobei nur die negative Wurzel sinnvolle Ergebnisse liefert:

$$x = \frac{Kc_{AG,of,0}(Kc_{AG,of,0} + Kc_{AG,vol,0} + Kc_{AK,0} + 1)}{2K^2 \cdot (c_{AG,of,0} + c_{AG,vol,0})} \pm \frac{\sqrt{[Kc_{AG,of,0}(Kc_{AG,of,0} + Kc_{AG,vol,0} + Kc_{AK,0} + 1)]^2 + 4K^4(c_{AG,of,0} + c_{AG,vol,0})c_{AG,of,0}c_{AK,0}}}{2K^2 \cdot (c_{AG,of,0} + c_{AG,vol,0})}. \quad (38)$$

Ansonsten kann eine Lösung über die Cardanischen Formeln erreicht werden. Man erhält mehrere Lösungen (Fallunterscheidung), wobei jede einzelne weit- aus komplexer als Gl. 38 ist. Auf eine Darstellung dieser Lösungen soll hier aus Gründen der Anschaulichkeit verzichtet werden.

Das Fluoreszenzsignal im Gleichgewicht ist proportional zur Antikörperkonzentration im Volumen und damit nach Gl. 34:

$$\mathbf{Signal} \sim (x - c_{AK,0}). \quad (39)$$

Anhand dieser theoretischen Signalfunktion und ihrer Graphen können Grenzen und Optimierung eines Assays anschaulich erläutert werden. Übliche Werte für Antikörperaffinitäten liegen etwa zwischen 10^8 und 10^{10} L/mol. Für die Simulationen wurden, sofern nicht anders angegeben, folgende praxisnahe Grund-Parameter verwendet:

K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
10^9	10^9	10^{-9}	10^{-9}	220

Diese Parameter liegen in der Größenordnung, wie sie auch in dieser Arbeit zum Tragen kamen (Kap.3.1, S.49). Die *heterogene Affinität* K_{het} hängt von verschiedenen Parametern ab, wie z.B. der Zugänglichkeit des immobilisierten Antigens oder der Affinitätsänderung durch Anbindung an einen hochmolekularen Träger. Die Simulation zeigt, daß

⇒ eine kleinere Coating-Konzentration $c_{AG,of,0}$ weitgehend denselben Effekt wie eine entsprechend kleinere Affinität K_{het} zum Antikörper hat.

Das Verhältnis von immobilisiertem Antigen zu eingesetztem Antikörper ist eine wichtige Kenngröße für den Assay und wird im folgenden mit *CE* (*coating excess*) bezeichnet. Um dieses Verhältnis unabhängig von K_{het} zu machen (s.o.), wird zusätzlich noch eine normiertes Verhältnis eingeführt:

$$CE_{eff} = \frac{c_{AG,of,0} \cdot K_{het}}{c_{AK,0} \cdot K_{hom}} = CE \cdot \frac{K_{het}}{K_{hom}} \quad (40)$$

Bei den Auswertungen der theoretischen Signalfunktion erwies sich dieser Wert als besonders aussagekräftig zur Ermittlung einer optimalen Beschichtung mit Antigen-Derivat. Bei den nachfolgenden Simulationen wurde der Einfachheit halber

$$K_{het} = K_{hom} \quad \text{gesetzt.}$$

Sollte beispielsweise K_{het} kleiner K_{hom} sein, so läßt sich dies durch eine Erhöhung von $c_{AG,of,0}$ kompensieren (s.o.). Eine zentrale Frage bei der Optimierung eines Immunoassays ist:

Wie läßt sich ein Assay optimieren, um den Testmittelpunkt in einen bestimmten (meist kleinstmöglichen) Bereich zu bringen?

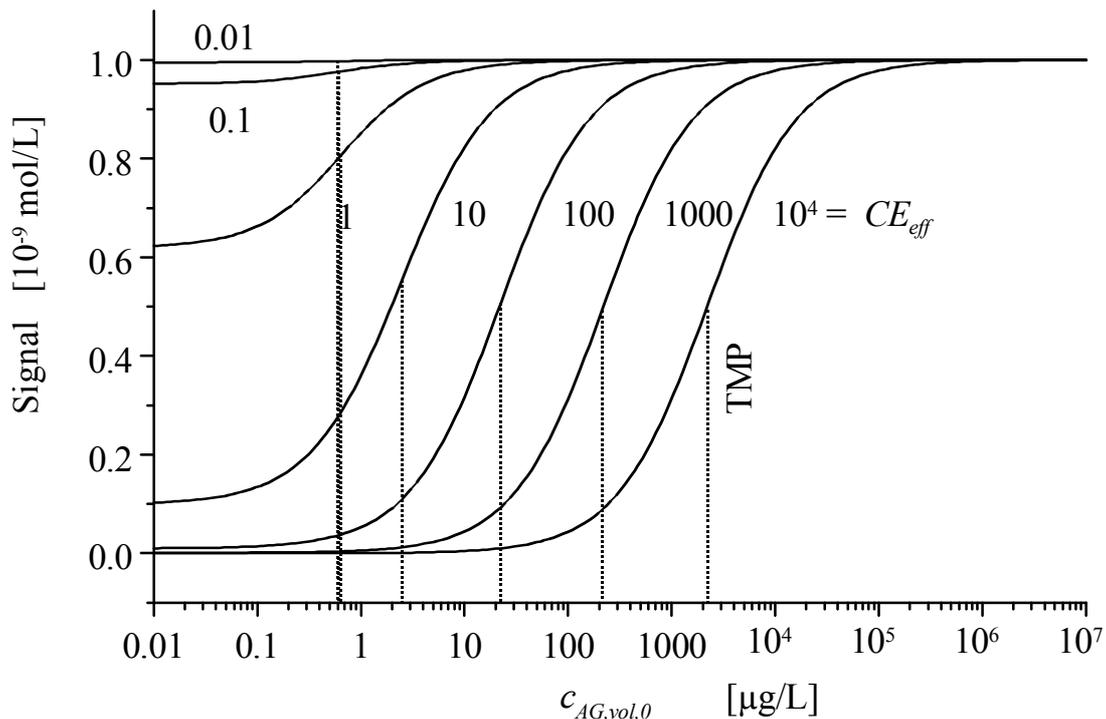
Die *Nachweisgrenze des Fluoreszenz-Detektionssystems* liefert eine untere Grenze für den Assay. In den nachfolgenden Simulationen wurde daher exemplarisch als AK-Konzentration $c_{AK,0} = 10^{-9}$ mol/L angenommen (Abb. 32).

Welchen Einfluß hat nun die Oberflächenmodifikation mit Antigen?

Abb. 45 veranschaulicht, wie eine

- ⇒ höhere effektive Coating-Konzentration ($CE_{eff} \geq 10$) proportional zu höheren Testmittelpunkten führt. Ein Assay mit einer Anzahl verschieden effektiver Oberflächen würde demnach beliebig hohe Analytkonzentration nachweisen können.
- ⇒ Für niedrige Coating-Konzentrationen (um $1/K$, also $CE_{eff} = 1$) verschlechtert sich die Signaldynamik drastisch – bei gleichzeitig nur geringfügiger Verbesserung des TMP.
- ⇒ Die Arbeitsbereiche²² sind weitgehend konstant. (1.7 bei niedriger bis 1.9 Größenordnungen bei hoher Coating-Konzentration).

²² definiert als Analytkonzentrationen zwischen 10 und 90% Signal im Assay, s. Grundlagen.



K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
10^9	10^9	10^{-9}	$10^{-11} \dots 10^{-5}$	220

Abb. 45 Variation der effektiven Coating-Konzentration.

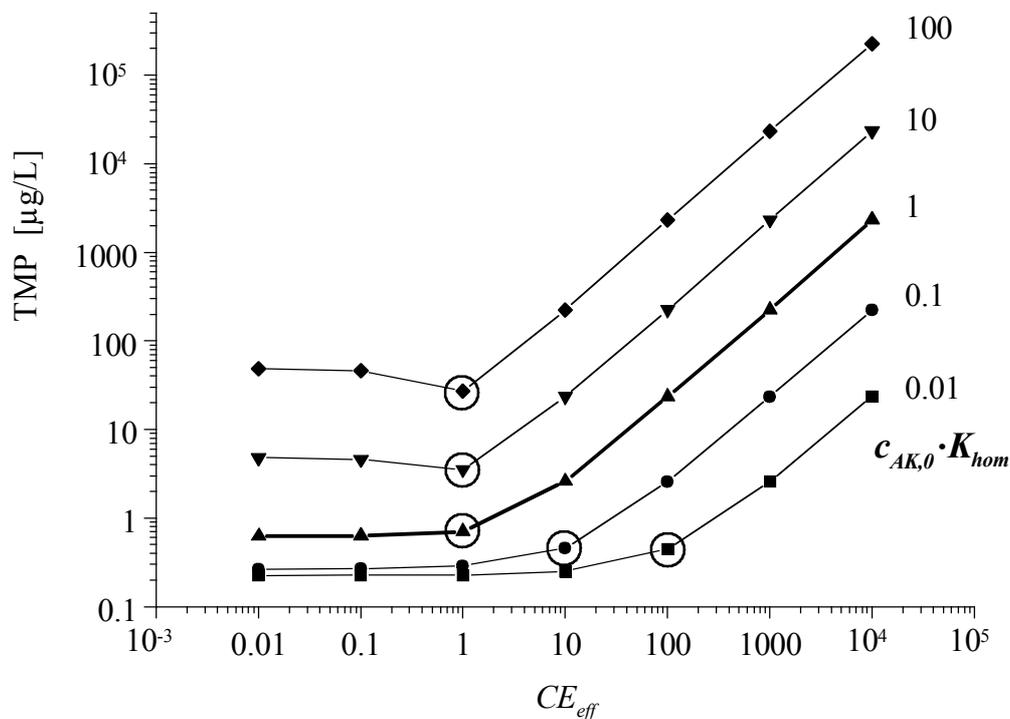
Abb. 46 bis Abb. 48 verdeutlichen diese Sachverhalte anschaulich. Die dick gezeichnete Linie in Abb. 46 entspricht den Testmittelpunkten aus Abb. 45. Zusätzlich wurde noch die AK-Konzentration ($c_{AK,0}$) variiert. Der TMP ändert sich bei niedrigen Konzentrationen kaum noch:

⇒ Die unterste Grenze für den TMP läßt sich bereits mit $c_{AK,0} \cdot K_{hom} = 0.1$ erreichen (0.23 µg/L). Kleinere AK-Konzentrationen bringen keinen signifikanten Gewinn.

⇒ Es gibt für jede AK-Konzentration eine Art minimale (bzw. optimale) Coating-Konzentration $CE_{eff,opt}$, unterhalb derer sich der TMP nur noch relativ geringfügig ändert. Sie entsprechen in etwa den eingekreisten Punkten ○. Dieser Wert liegt bei $CE_{eff,opt} = \frac{1}{c_{AK,0} \cdot K_{hom}}$ für $c_{AK,0} \leq 1/K_{hom}$,

(also $CE_{eff,opt} \geq 1$). Bei AK-Konzentration größer $1/K_{hom}$ sollte das effektive Coating 1:1 (immob. Antigen : Antikörper) als unterstes Limit nicht weiter unterschreiten. Niedrigere Coating-Konzentrationen bewirken in diesem Fall eine leichte Erhöhung und anschließender Konstanz des TMP, sowie eine Reduzierung des Arbeitsbereiches.

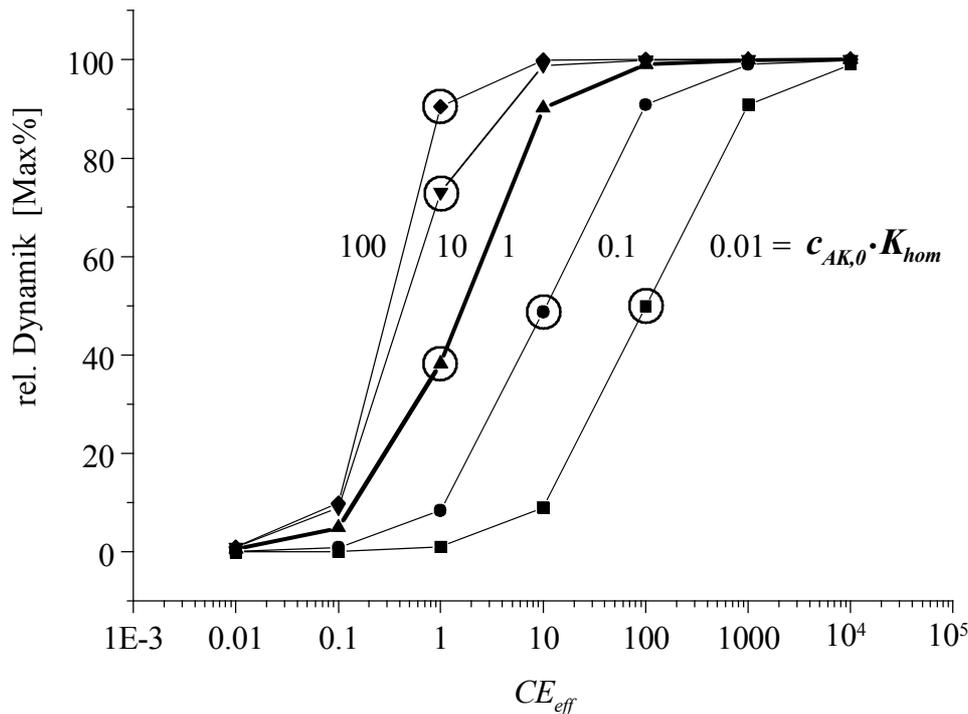
Anschaulich gesprochen: Steht nur halb soviel immobilisiertes Antigen wie Antikörper (bei gleichen Affinitäten) zur Verfügung, so kann auch maximal die Hälfte der Antikörper an die Oberfläche binden, d.h. die verbleibenden Antikörper sorgen für ein Nullsignal $>c_{AK,0}/2$. Damit verschlechtern sich die Dynamik und der Testmittelpunkt.



K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
10^9	10^9	$10^{-11} \dots 10^{-7}$	$10^{-11} \dots 10^{-5}$	220

Abb. 46 Testmittelpunkte als Funktion der Coating-Konzentration (x -Achse) und der Antikörperkonzentration (Kurven).

Um die günstigste Kombination aus Coating und AK-Konzentration auszuwählen (\bigcirc), lohnt sich ein Blick auf die Dynamik des Assays (Abb. 47).



K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
10^9	10^9	$1^{-11} \dots 10^{-7}$	$10^{-11} \dots 10^{-5}$	220

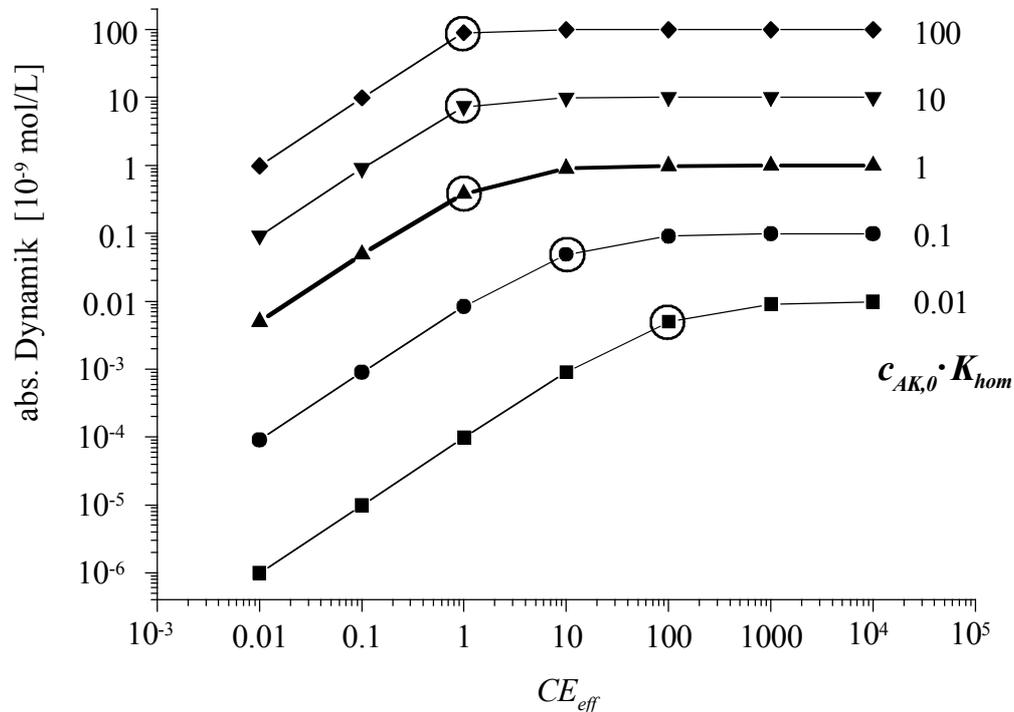
Abb. 47 Betrachtung der relativen (auf maximales Signal normierten) Dynamik der Assays von Abb. 46. Eine Dynamik von 100% bedeutet, daß das minimale Signal Null („keine Fluoreszenz“) sein muß. \circ sind wieder $CE_{eff,opt}$ aus Abb. 46.

\Rightarrow Die relative Dynamik liegt für $CE_{eff} = \frac{1}{c_{AK,0} \cdot K_{hom}}$ unter 50%, d.h. das Nullsignal liegt unter 50% des maximalen Signals. Bei einer 10-fach höheren Coating-Konzentration liegt die Dynamik bereits bei etwa 90%, für $CE_{eff} = 0.1 \cdot \frac{1}{c_{AK,0} \cdot K_{hom}}$ sind nur 10% Dynamik oder weniger zu verzeichnen.

Entscheidend ist jedoch das absolute Meßsignal bzw. die absolute Dynamik.

Diese ist in Abb. 48 aufgetragen. Sollte beispielsweise das Detektionssystem nur AK-Konzentrationen (entsprechend hoch mit Fluoreszenzfarbstoff markiert) von >0.1 nmol/L nachweisen können, so muß für den Assay eine höhere AK-

Konzentration mit entsprechend höherem Signal (Dynamik) gewählt werden. Für sehr kleine AK-Konzentrationen erniedrigt sich mit ihr die Dynamik (○) immer noch weitgehend proportional – im Gegensatz zum TMP (Abb. 46).

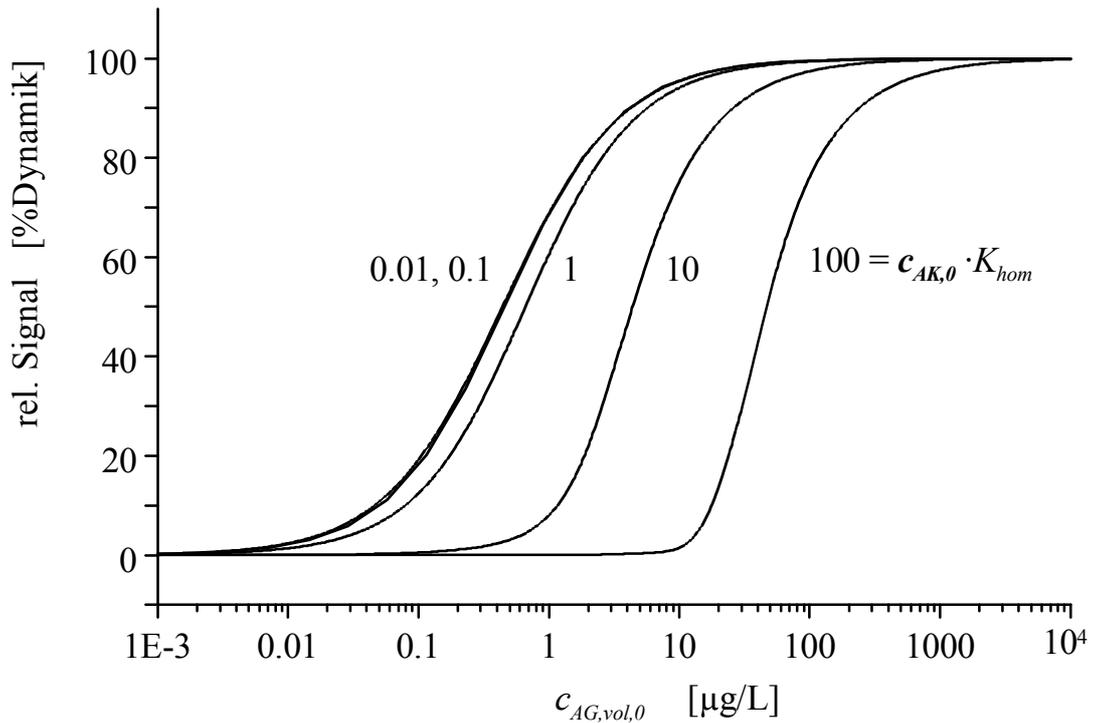


K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
10^9	10^9	$10^{-11} \dots 10^{-7}$	$10^{-11} \dots 10^{-5}$	220

Abb. 48 Betrachtung der absoluten Dynamik (Differenz zwischen maximalem und minimalem Signal) der Assays von Abb. 46. ○ sind wieder $CE_{eff,opt}$ aus Abb. 46.

Abb. 49 zeigt den Signalverlauf, Abb. 50 den TMP, die absolute Dynamik und den Arbeitsbereich für verschiedene AK-Konzentrationen auf einer Antigen-Oberfläche mit $c = 1/K_{hom}$ verfügbarem Antigen. Daraus läßt sich ersehen:

- ⇒ Der TMP erniedrigt sich für eine AK-Konzentration kleiner $1/K_{hom}$ kaum noch.
- ⇒ Die absolute Dynamik erhöht sich bei einer AK-Konzentration größer $1/K_{hom}$ kaum noch. Gleichzeitig nimmt hier der Arbeitsbereich von 1.9 zu 1.1 Größenordnungen ab (steilerer Signalverlauf, s. Abb. 49)



K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
10^9	10^9	$10^{-11} \dots 10^{-7}$	10^{-9}	220

Abb. 49 Normierter Signalverlauf für verschiedene AK-Konzentrationen.

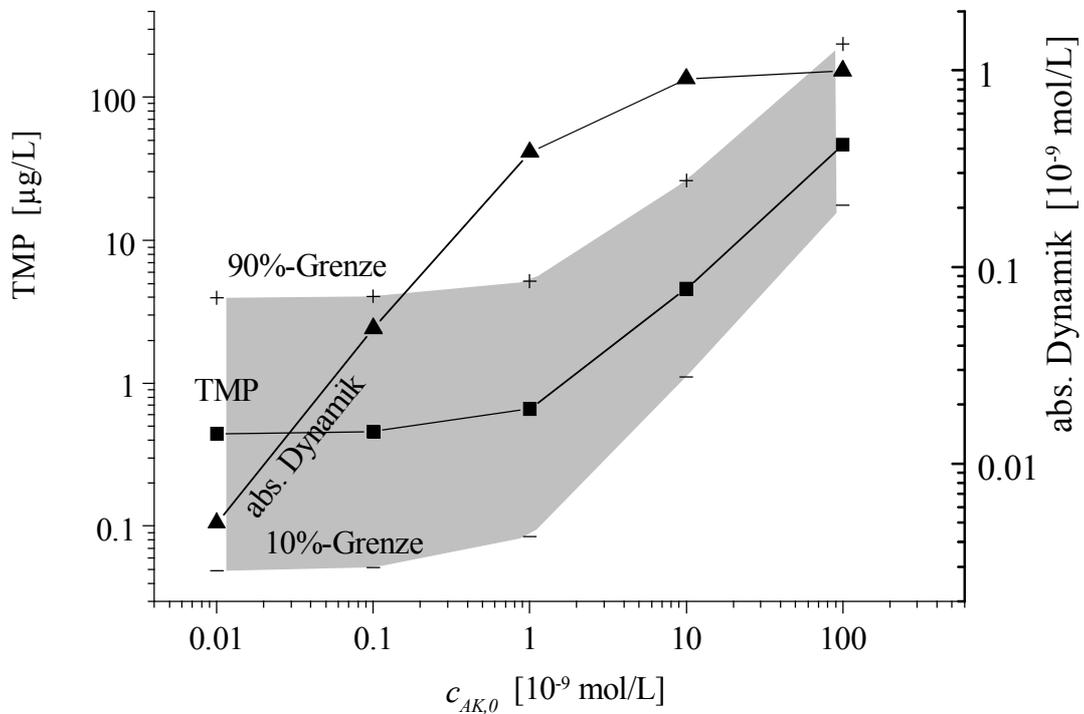
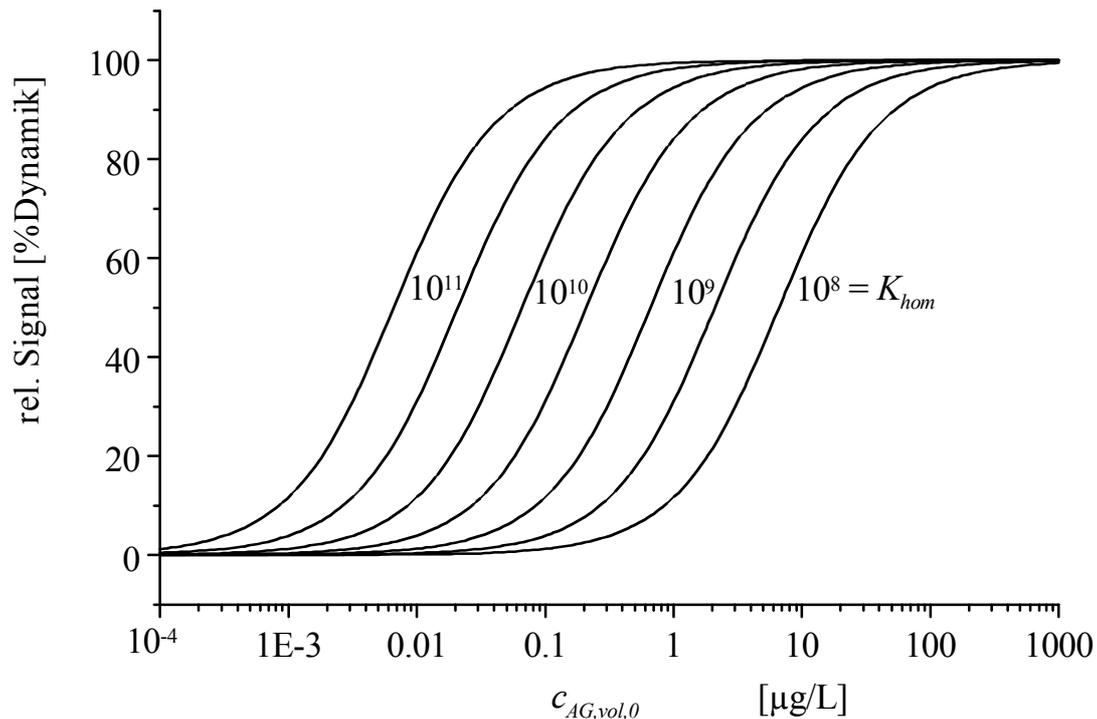


Abb. 50 Testmittelpunkte und Signaldynamiken für Abb. 49.



K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
$10^8 \dots 10^{11}$	$= K_{hom}$	$= 1/K_{hom}$	$= 1/K_{hom}$	220

Abb. 51 Eine Verbesserung der Antikörperaffinität verschiebt den TMP proportional (bei relativ angepaßten Konzentrationen). Die absolute Dynamik verringert sich dabei (mit $c_{AK,0}$) jedoch antiproportional.

⇒ Mit der Affinität eines Antikörpers läßt sich der TMP praktisch beliebig verschieben (Abb. 51). Durch die notwendige Verringerung der AK-Konzentration (sowie der Coating-Konzentration) werden aber entsprechend auch die Anforderungen an die Detektion höher.

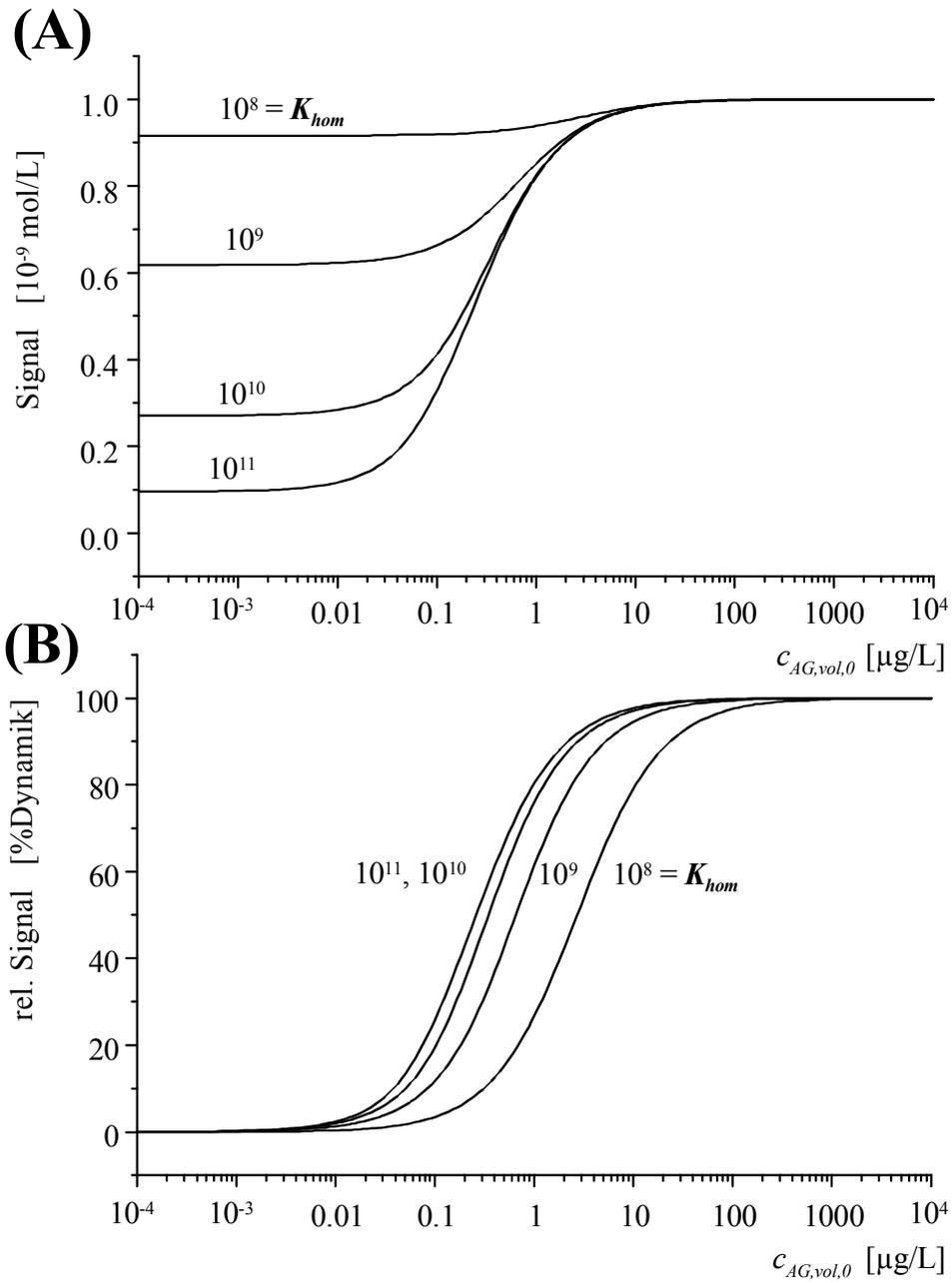
Für die gewählten Parameter ($K_{hom} = K_{het} = 1/c_{AK,0} = 1/c_{AG,of,0}$) umfaßt der Arbeitsbereich konstant 1.8 Größenordnungen an Analytkonzentration.

In Abb. 52 wird dem Fall Rechnung getragen, daß die Nachweisgrenze von der Detektionseinheit limitiert wird. Deshalb wurde die (signaltragende) AK-Konzentration konstant gehalten und exemplarisch auf 10^{-9} mol/L festgesetzt. Das effektive Coating CE_{eff} wurde hier durchweg gleich 1 gewählt, d.h. die Coating-Konzentration $c_{AG,of,0} = 10^{-9}$ mol/L. Man erkennt

⇒ für eine Affinität kleiner $1/c_{AK,0}$ (10^9 L/mol) eine relativ geringe Verschiebung des TMP um maximal $\frac{1}{2}$ Größenordnung. Höher affine AK als $100 \cdot 1/c_{AK,0}$ ($>10^{11}$ L/mol) bringen bei diesen AK-Konzentrationen nur noch marginalen Gewinn in TMP und Dynamik.

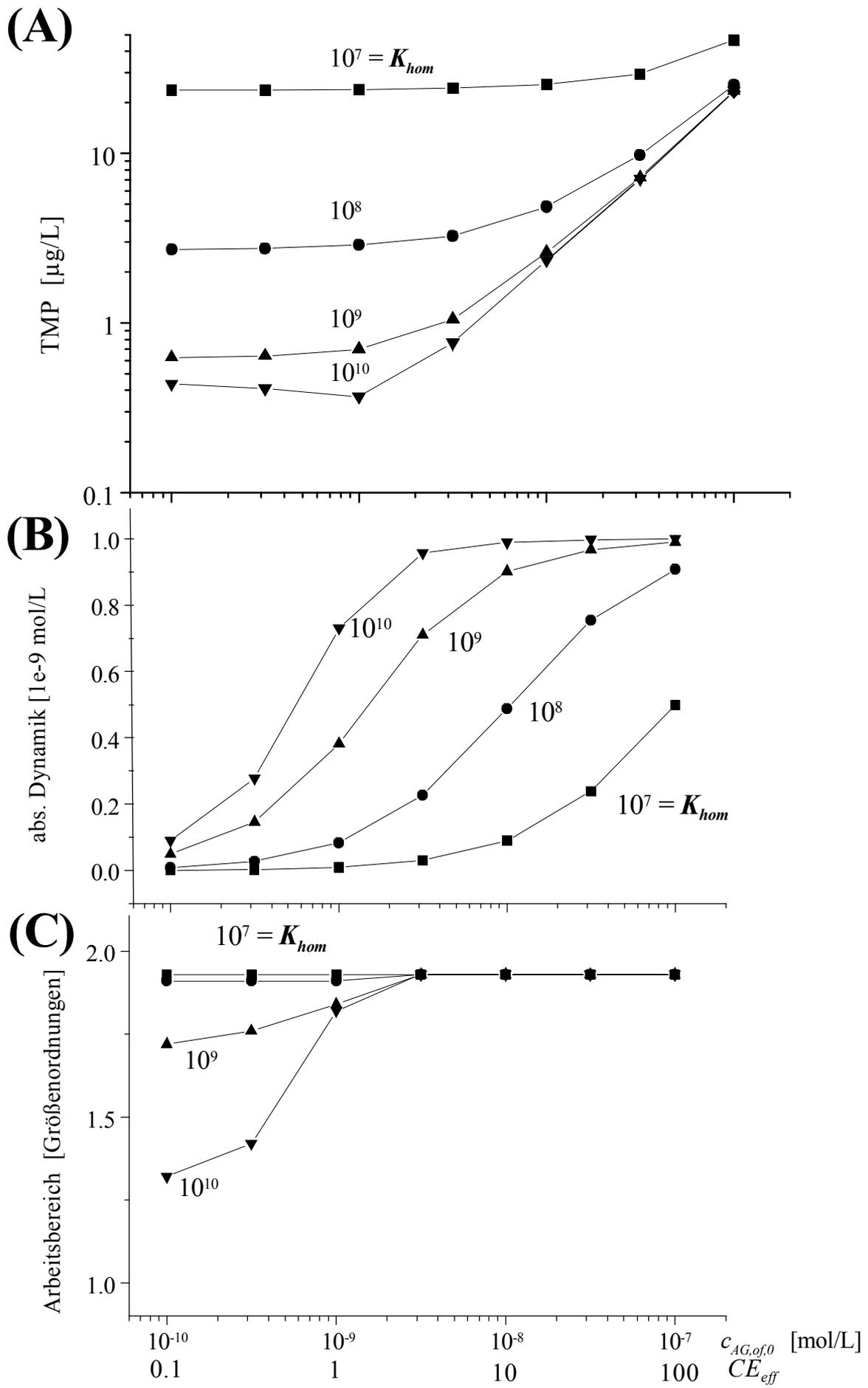
Abb. 53 zeigt den Effekt der Coating-Konzentration bei verschiedenen AK-Affinitäten und konstantem $c_{AK,0}$ (entsprechend Abb. 52). Bezüglich des TMP läßt sich feststellen, daß

- ⇒ ab einer Affinität von $10 \cdot 1/c_{AK,0}$ (hier 10^{10} L/mol) für *keine* Coating-Konzentration eine signifikante Verbesserung erreichbar ist, bzw. daß auch schon ab $1/c_{AK,0}$ (10^9 L/mol) nur noch wenig Verbesserung ($-0.2 \mu\text{g/L}$) zu verzeichnen ist (Abb. 53A).
- ⇒ Als Coating-Konzentration ist $CE_{eff} \geq 1$ (bis 10) besonders günstig. Eine Größenordnung kleiner bringt praktisch nichts für den TMP, aber eine deutlich schlechtere Dynamik (Abb. 53B). Höhere Coating-Konzentrationen bringen bei $K \geq 1/c_{AK,0}$ noch einen deutlichen Gewinn in der Dynamik.
- ⇒ Der Arbeitsbereich ist quasi stabil bei 1.9 Größenordnungen, sofern die Coating-Konzentration $CE_{eff} > 1$ ist. Darunter sinkt der Arbeitsbereich sehr schnell vor allem für hochaffine AK auf 1.1 Größenordnungen ab (Abb. 53C). Dieser sehr steile Verlauf führt auch zu dem geringfügigen Anstieg des TMP für hochaffine AK und $CE_{eff} < 1$ (Abb. 53A).



K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
$10^8 \dots 10^{11}$	$= K_{hom}$	10^{-9}	10^{-9}	220

Abb. 52 Verschiedene Antikörperaffinitäten bei konstantem $c_{AK,0}$.



K_{hom} [L/mol]	K_{het} [L/mol]	$c_{AK,0}$ [mol/L]	$c_{AG,of,0}$ [mol/L]	Analyt [g/mol]
$10^7..10^{10}$	$= K_{hom}$	10^{-9}	$10^{-10}..10^{-7}$	220

Abb. 53 *Verschiedene Antikörperaffinitäten bei konstantem $c_{AK,0}$ und verschiedenen Coating-Konzentrationen.*

Diese theoretische Betrachtung läßt sich auch auf die homogene Variante des PSFIA, den Fluoreszenzbasierten Resonanten Energie-Transfer (FRET) [Schobel1999a,b], [Brecht1998b] übertragen. Die Fluoreszenz des markierten AK wird ebenfalls beim Binden an den das Analyt-Derivat (entspricht AG_{of}) gequencht, welches sich hier jedoch in Lösung befindet.

4.4.3 PSFIA in der MTP

Nach den einführenden Erläuterungen in Kap.4.4.1 wurde in einer ersten praktischen Umsetzung das Potential des Assays im MTP-Format untersucht. Wie aus Kap.4.4.2 hervorgeht, ist die vorbereitende Belegung („Coating“) der MTP mit Antigen (Analytderivat bzw. Tracer) ein wesentlicher Schritt.

Antigen-Derivat

Aus Gründen der vereinfachenden einheitlichen Handhabung (z.B. Vermeidung von Löslichkeitsproblemen) wurde das Analytderivat kovalent an ein Trägerprotein (BSA) gekoppelt. Dieses Konjugat kann in größerem Maßstab hergestellt werden und dient fortan zum Coaten der Wandfläche des Probenvolumens. Ein Verhältnis Antigen:BSA = 6:1 käme einem Antigen in jeder Raumrichtung gleich. Nach dem Coaten würde davon noch etwa eines in Richtung Probenvolumen übrigbleiben. Sinnvolle Verhältnisse liegen daher etwa in einem Bereich von etwa $(6\pm 5):1$. Für einen Atrazin-Assay wurde ein Konjugat mit Atrazincapronsäure (ACA) hergestellt (Kap.3.3.4, S.55). Die Charakterisierung erfolgte mit UV-Vis-Spektroskopie, wobei die unterschiedlichen Extinktionsmaxima für eine Annäherung der quantitativen Verhältnisse genutzt wurden. Die Genauigkeit dieser Methode ist in Abb. 54 exemplarisch dargestellt. Das in dieser Arbeit verwendete ACA-BSA-Konjugat hatte demnach ein Verhältnis ACA:BSA = 3.54:1. Dieser Wert dient jedoch nur dem Vergleich zu weiteren Chargen des gleichen Konjugates, da mit dieser Methode über die effektive Verfügbarkeit des Antigens und Effekte wie der Maximum-Verschiebung durch Konjugation keine Aussage getroffen wird. Entsprechende Untersu-

chungen der spezifischen Bindungssteigung mit RIFs zeigten eine Verfügbarkeit von 25% (bis 10% für andere Antigen-BSA-Konjugate) des spektroskopisch ermittelten Wertes.

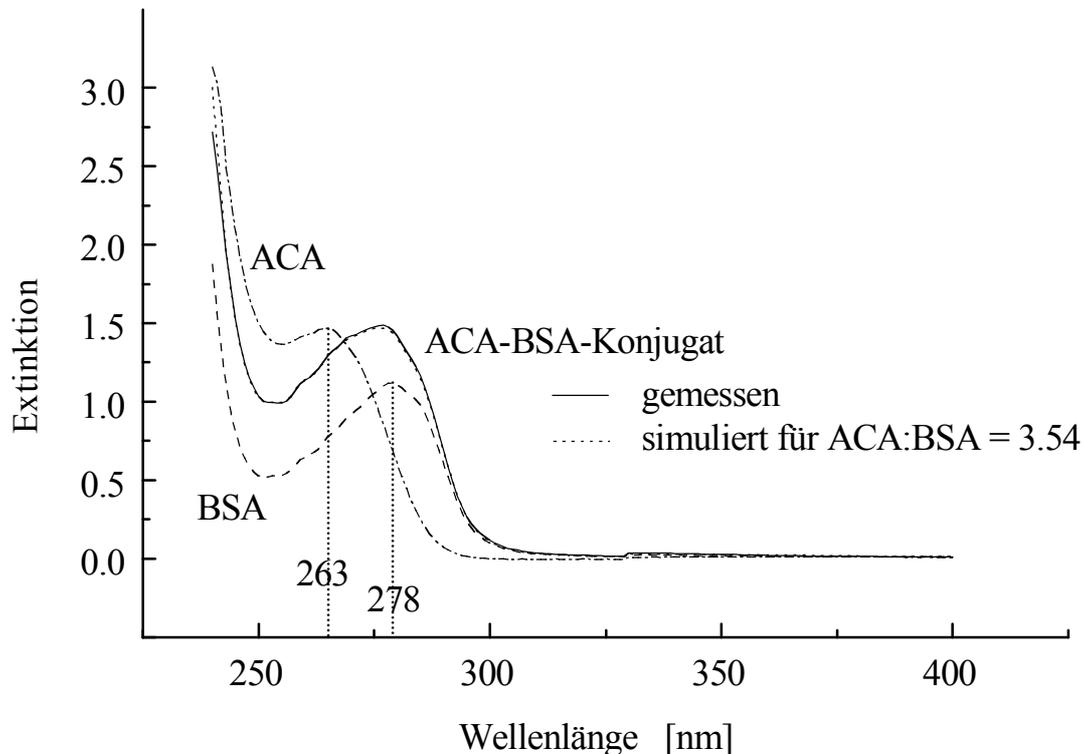


Abb. 54 Charakterisierung eines Analytderivat-Protein-Konjugats mit UV-Vis-Spektroskopie.

Vorbehandlung der MTP

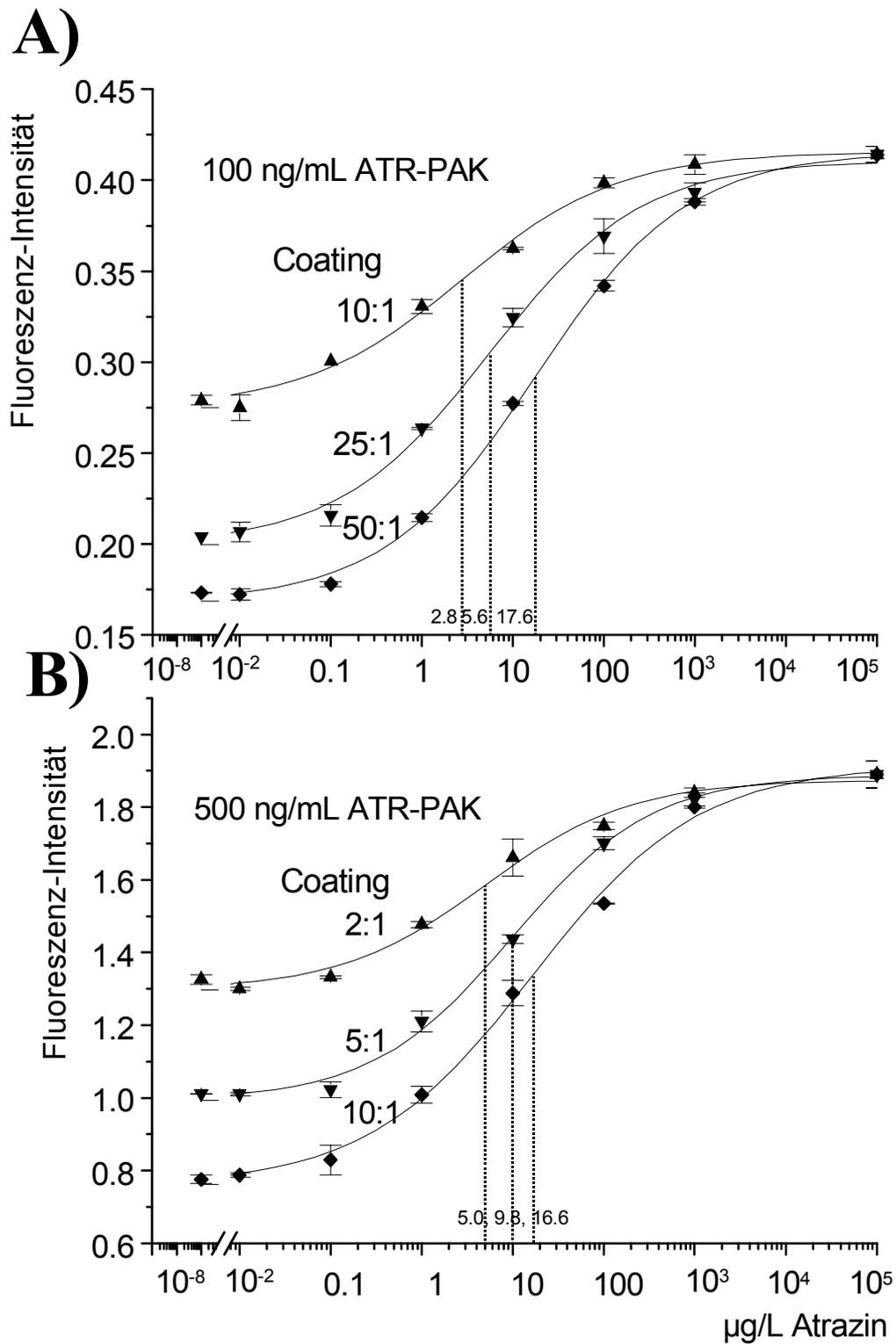
Nach dem Coaten der MTP mit ACA-BSA-Konjugat wurden unspezifische Bindungsplätze mit hoher Konzentration an BSA belegt (Kap.3.4.11, S.65). Durch eine nachfolgende Quervernetzung wurden deutlich kleinere Nullwerte beobachtet, d.h. ein nachträgliches Lösen eines ACA-AK-Komplexes von der Wand wurde unterdrückt. Ein weiteres Blocken nach der Quervernetzung wirkte sich positiv auf die Standardabweichung aus. Auf die Verwendung eines Detergenzes (Tween) wurde verzichtet, da eine ungünstige Auswirkung auf die Kalibrierkurve und die Standardabweichung beobachtet wurde.

Messungen im MTP-Format

Nach der Inkubationsphase (mit Analyt und markiertem AK) wurde die flüssige Phase separiert, indem je Kavität ein definiertes Volumen in eine gereinigte Fluoreszenzküvette oder eine unbehandelte weiße MTP transferiert wurde. Die

Küvettenmessungen mit dem Fluoreszenzspektrometer LS50B (Perkin Elmer) zeichneten sich durch hohen Aufwand (Einzelmessungen), aber hervorragende Standardabweichungen aus. Fluoreszenzmessungen mit dem MTP-Leser LSR200 (Perkin Elmer) sind hingegen mit einem sehr geringen Aufwand verbunden, werden aber mit höheren Standardabweichungen und hohem Photo-bleaching erkaufte (>15% in 10 s, Zweitmessung nicht möglich).

Abb. 55 zeigt jeweils drei Atrazin-Kalibrierkurven mit unterschiedlichen Coating-Konzentrationen an ACA-BSA-Konjugat bei zwei Konzentrationen (A) und (B) des mittelaffinen polyklonalen ATR-PAK. Durch den Transfer von Inkubations-MTP in die Küvette und der Messung im LS50B konnten niedrige Standardabweichungen mit Werten von etwa 0.5% erreicht werden. Die maximale Fluoreszenz wurde für ein Coating ohne ACA (nur BSA) erzielt („10⁵ µg/L Atrazin“) und ist bei allen Kalibrierkurven gleich. Die Coating-Konzentration, ausgedrückt als Verhältnis von ACA-Molekülen an der Wand zur gesamten AK-Anzahl (10:1 bis 50:1) stellt nur einen theoretischen Wert dar, der auf spektroskopischen Daten (Abb. 54) und vollständiger Adsorption beruht. Die verfügbare Anzahl an ACA-Molekülen liegt vermutlich um mindestens eine Größenordnung kleiner. Der effektive CE -Wert CE_{eff} kann zudem nach Gl. 40 auch durch eine kleinere Gleichgewichtskonstante des heterogenen Gleichgewichts K_{het} erniedrigt werden. Die Nullwerte Kalibrierkurven sind offensichtlich auch bei 40% vom Maximalwert für die Kurven mit hoher Dynamik (hoher CE -Wert) noch nicht an einem Minimum angekommen, wie dies für $CE_{eff} > 10$ (Abb. 45) zu erwarten wäre. Die TMPs steigen in Abb. 55 im Rahmen der Meßgenauigkeit gleichmäßig mit dem CE -Wert an und läuft damit dem Empfindlichkeitsgewinn durch die höhere Dynamik entgegen. Der Arbeitsbereich des Assays umfaßt etwa 4 Größenordnungen und liegt damit deutlich über der Simulation mit maximal 2 Größenordnungen, was auf die typische Eigenschaft eines polyklonalen AK zurückzuführen ist.

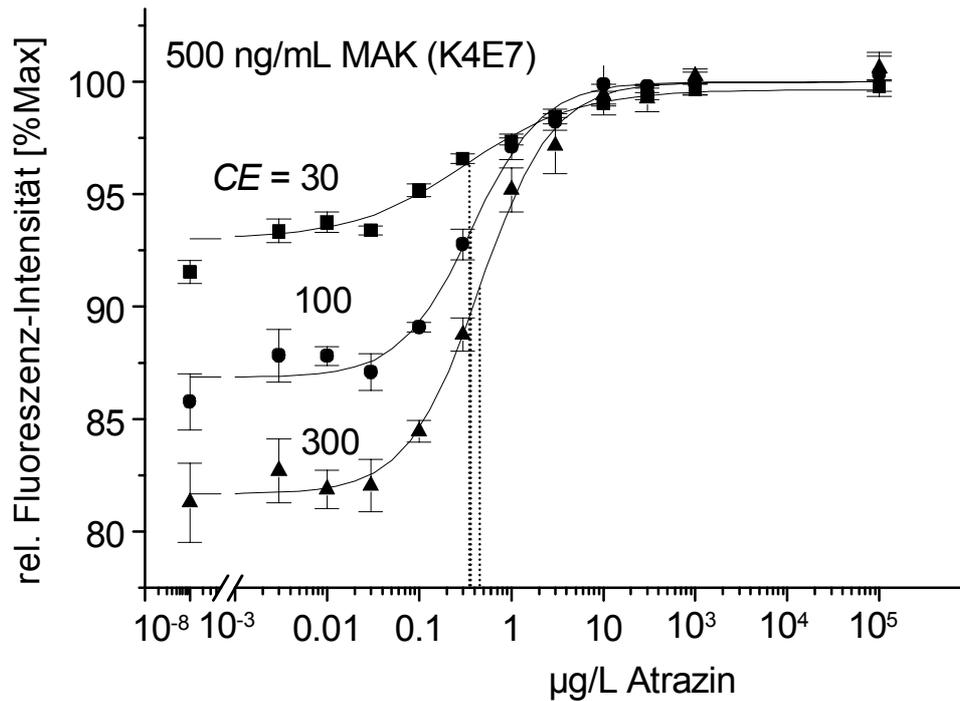


$c_{AK,0}$ [ng/mL]	100			500		
Coating ($c_{AG,0}:c_{AK,0}$)	10:1	25:1	50:1	2:1	5:1	10:1
min [cts]	0.27±0.00	0.20±0.00	0.17±0.00	1.30±0.02	0.99±0.02	0.76±0.02
max [cts]	0.42±0.01	0.41±0.01	0.42±0.00	1.87±0.03	1.89±0.02	1.91±0.03

TMP [$\mu\text{g/L}$]	2.75 \pm 0.91	5.61 \pm 1.23	17.57 \pm 2.57	5.03 \pm 2.01	9.84 \pm 1.87	16.60 \pm 3.74
s [cts*L/ μg]	0.50 \pm 0.07	0.52 \pm 0.05	0.52 \pm 0.03	0.54 \pm 0.10	0.56 \pm 0.05	0.48 \pm 0.05
Arbeitsbereich [$\mu\text{g/L}$]	0.03...223	0.08...384	0.26...1202	0.09...294	0.19...498	0.17...1615

Abb. 55 Kalibrierung von Atrazin mit ACA-BSA und ATR-PAK (mit LS50B) und die Anpassung mit der Logistischen Funktion (Gl. 6). Der Wert für ein Coating ohne ACA wurde bei $10^5 \mu\text{g/L}$ Atrazin zugeordnet.

Die Verwendung von monoklonalem Antikörper (K4e7, Abb. 56) bringt Arbeitsbereiche entsprechend der Simulation (<2 Größenordnungen). In dieser Kombination mit immobilisiertem DESACA liegt K_{hom} (mit Atrazin) bei $1.2 \cdot 10^{-9}$ L/mol, K_{het} aber deutlich kleiner. Durch die höhere Affinität sind bei gleichbleibender AK-Konzentration im Einklang mit der Simulation höhere Coating-Konzentrationen (CE -Werte) notwendig (Kap.4.4.2, S.128f). Im Verlauf der Antikörperherstellung (z.B. auch beim Markieren) ist es möglich, daß ein Teil der AK aufgrund struktureller Änderungen im Bereich der Bindungstasche keine Aktivität mehr zeigt. Die eigentliche AK-Konzentration ist dann erniedrigt und das Nullsignal erhöht. Unter Betrachtung von Abb. 46 bis Abb. 48 würde dies die hohen Nullwerte bei nur sehr kleiner Verschiebung des TMP mit steigendem CE -Wert erklären. Bedingt durch die höhere Affinität des AK liegt der TMP jedoch vergleichsweise niedrig. Die Standardabweichung in Abb. 56 bei Verwendung des MTP-Fluoreszenzlesers LSR200 liegen im Bereich zwischen 0.5 und 1.5%.



$c_{AK,0}$ [ng/mL]	500	500	500
Coating ($c_{AG,0}:c_{AK,0}$)	30:1	100:1	300:1
min [%Max]	93.01±0.43	86.86±0.39	81.68±0.36
max [%Max]	99.65±0.33	100±0.36	100±0.35
TMP [$\mu\text{g/L}$]	0.33±0.09	0.37±0.06	0.46±0.05
s [%Max*L/ μg]	0.68±0.12	1.13±0.18	1.10±0.12
Arbeitsbereich [$\mu\text{g/L}$]	0.01...8.4	0.05...2.6	0.06...3.4

Abb. 56 Kalibrierung von Atrazin mit monoklonalem Antikörper (ATR-MAK_{K4e7}) und DESACA-BSA (mit LSR200) und die Anpassung mit der Logistischen Funktion (Gl. 6).

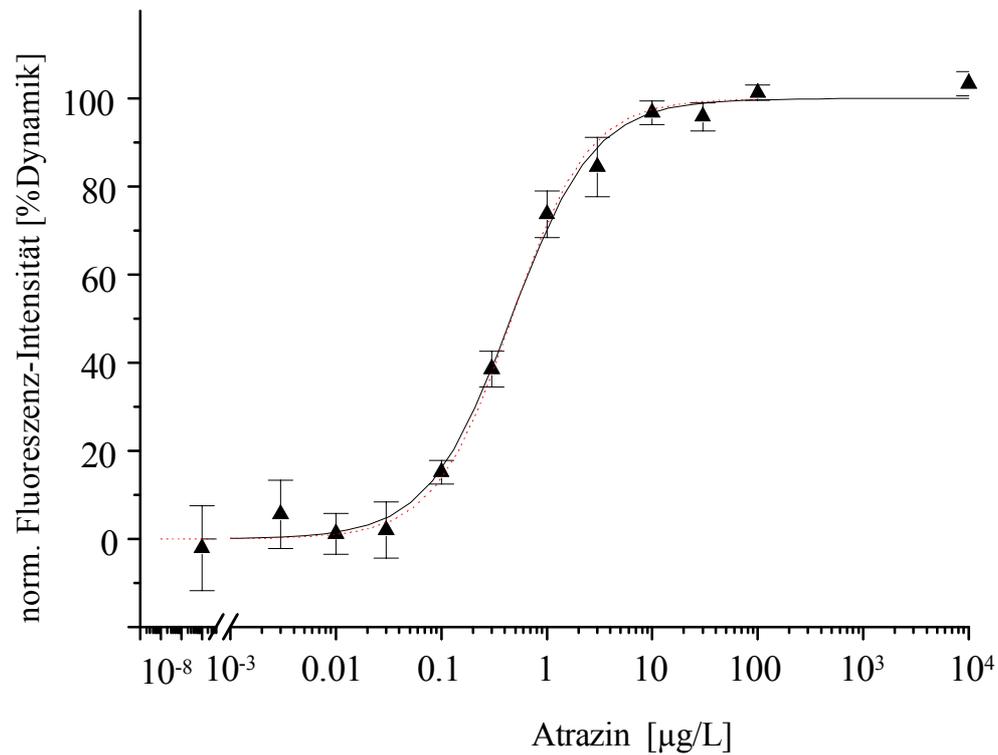


Abb. 57 Vergleich der Kalibrierung von Atrazin mit DESACA und ATR- MAK_{K4e7} (Abb. 56, $CE = 300$) mit FRET (gepunktete Linie).

Ein Vergleich der Kalibrierkurven mit der homogenen Variante FRET [Schobel1999b] (Abb. 57) zeigt eine hervorragende Übereinstimmung des Kurvenverlaufs.

4.4.4 PSFIA in der NTP: Strategie und Quenchen an Oberflächen

Wurde bei den Versuchen in der MTP die flüssige Phase zur Messung noch transferiert, so ist dies bei Benutzung von NTPs wegen der kleinen Volumina (ca. 50 nL) nicht mehr praktikabel. Außerdem sollte der Assay aufgrund des Verschleppungsrisikos zwischen den Kavitäten keine Spülschritte mehr enthalten. Die Diskriminierung zwischen Antikörper an der Oberfläche und im Volumen muß deshalb in der Kavität selbst erfolgen. Zwei mögliche Ansätze bieten sich hierfür an:

1. **Ortsaufgelöste Detektion** (beispielsweise mit einem scannenden Laserstrahl). Innerhalb der Kavität wird ein Bereich mit hohem Volumen- und kleinem Oberflächenanteil gemessen, wie z.B. die mittige Flüssigkeitssäule einer Kavität. Die Form der Kavität (senkrechte oder schräge Wandung) spielt dabei keine entscheidende Rolle. Die Dynamik der Meßwerte kann durch Berücksichtigung von Stellen mit hohem Oberflächenanteil erhöht werden.
2. **Quenchende Oberflächen.** Dabei kann der wandgebundene Anteil an fluoreszenzmarkiertem Antikörper quasi ausgeblendet werden. Als Quencher bieten sich Metallfilme wie z.B. Gold, aber auch Graphit, Übergangsmetallkomplexe oder quenchende Farbstoffe an [Chance1978, 1975]. Aufgrund der kurzen Reichweite von Quenchern in der Größenordnung von 100 nm kann das Meßsignal der gelösten Anteile hingegen voll erfaßt werden.

Durch ein Kombinieren beider Ansätze ist eine weitere Effektivitätssteigerung zu erwarten. Die Effekte sind in Abb. 58 am Beispiel einer pyramidenstumpfförmigen Kavität veranschaulicht. Mit Methode 1 (Ortsauflösung) moduliert die mittlere Fluoreszenzintensität je nach Analyt-Gehalt zwischen 100 und 200% der Gesamtfluoreszenz. Durch Methode 2 (Quenchen) kann die minimale Fluoreszenz im Idealfall auf Null abgesenkt werden. Beide Methoden lassen sich sowohl eigenständig, als auch in Kombination verwenden.

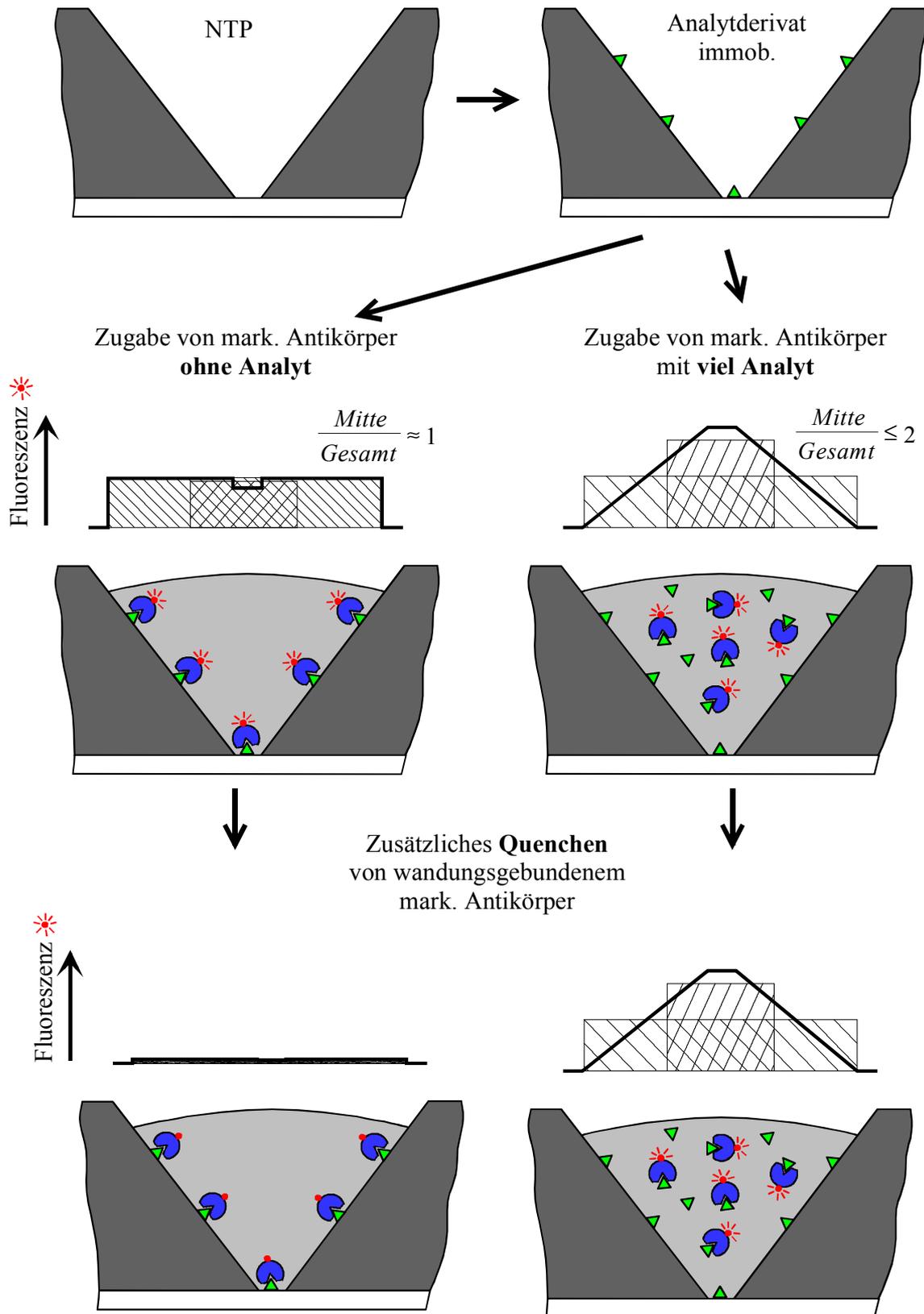


Abb. 58 PSFIA in der NTP: Strategie der Abtrennung des Fluoreszenzsignals wandgebundener Anteile vom Volumen über Detektion in der Kavitätmitte und/oder über Quenchen wandgebundener Anteile.

Quenchen an Oberflächen

Für ebene Graphitoberflächen und einem Einstrahlwinkel von 30° (Kap.3.4.2, S.58) wurde eine Verstärkung der Volumenfluoreszenz auf 300% (Abb. 59-A) und ein Quenchen der spezifisch an die Oberfläche gebundenen Cy5-markierten Antikörper auf 50% (Abb. 59-B) beobachtet. Nebenbei ist eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 667 nm im Volumen zu 670 nm an der Oberfläche zu verzeichnen.

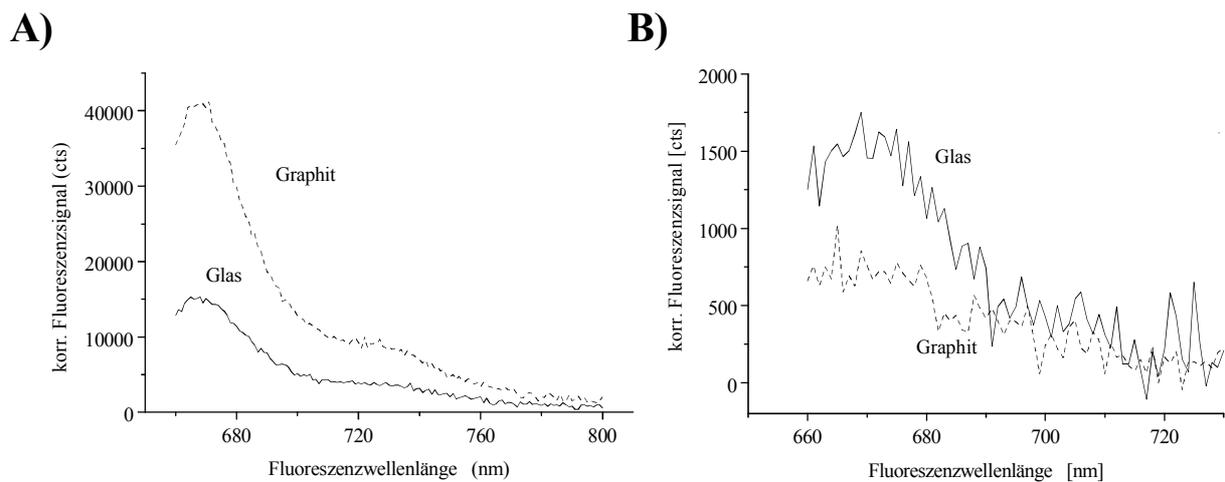


Abb. 59 Verhalten von Graphitoberflächen bezüglich der detektierten Fluoreszenzintensität von Cy5 im Volumen (A) und an der Oberfläche (B).

Entsprechende Versuche mit ebenen Goldoberflächen ergaben keine Verstärkung des Fluoreszenzsignals im Volumen (Abb. 60-A), aber ein Quenching auf 30% an der Oberfläche (Abb. 60-B).

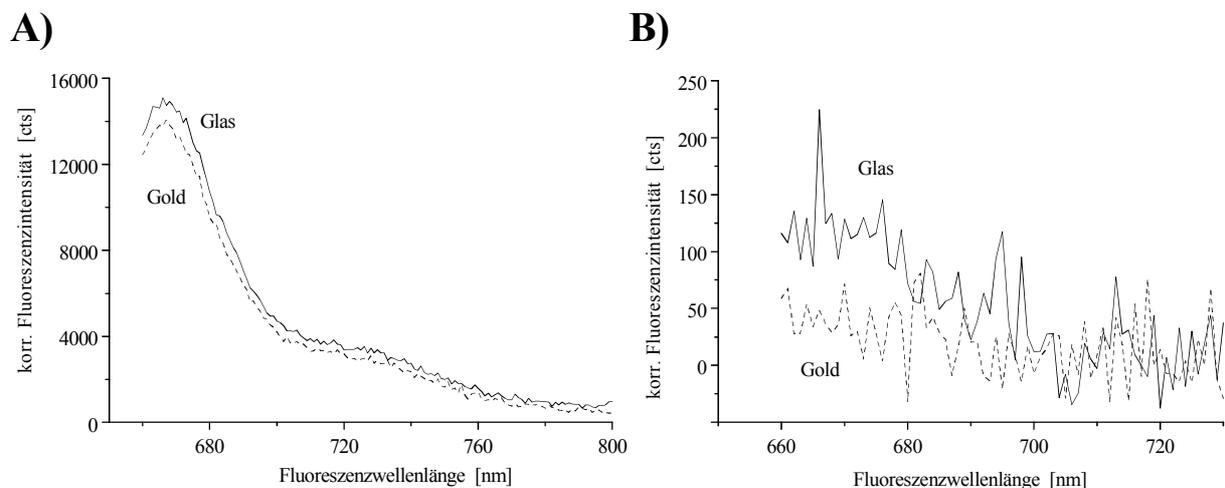


Abb. 60 Verhalten von Goldoberflächen bezüglich der detektierten Fluoreszenzintensität von Cy5 im Volumen (A) und an der Oberfläche (B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß aufgrund dieser Vorversuche sowohl Graphit-, als auch Gold-Oberflächen gute Quenching-Eigenschaften haben. Graphit zeigt zudem noch hohe Verstärkung des Signals der Volumenfluoreszenz. Auf den Einsatz von Graphit für NTPs wurde jedoch vorerst zugunsten von Gold verzichtet, da Goldoberflächen gut etabliert sind und bekanntermaßen günstige Eigenschaften bezüglich Oberflächenmodifikation und mechanischer Stabilität haben. Für weitere Versuche sind jedoch Graphit-beschichtete NTPs von hohem Interesse.

Messungen in der NTP

Nach Vorversuchen in NTPs aus Silizium wurde schließlich auf die dann verfügbaren NTPs aus ABS zurückgegriffen, in welchen die hier vorgestellten Kalibrierkurven aufgenommen wurden. Dazu wurden die vorgereinigten NTPs zunächst mit ca. 100 nm Gold als Quencher bedampft und mit PEI adsorptiv beschichtet. Hierauf wurde dann analog zur MTP mit ACA-BSA-Konjugat gecoatet und die UWW mit BSA blockiert. Die so vorbereitete (lagerfähige) NTP wurde über die Mikrodosierung am Taupunkt mit Pestizid-Standardlösungen und markiertem Antikörper befüllt, verklebt und die Fluoreszenz im BioScan gemessen.

Abb. 61 zeigt eine Simazin-Kalibrierkurve in der NTP mit ACA und SIM-PAK ($K_{hom} = 7 \cdot 10^8$ L/mol). Bei einer AK-Konzentration von 300 ng/mL und einer Coating-Konzentration von 5 µg/mL ACA-BSA(3.54:1) ergab sich ein Verhältnis von 64 ACA-Molekülen zu einer AK-Bindungsstelle. Dieser Wert ($CE = 64$) gilt für alle hier vorgestellten NTP-Kalibrierkurven. Zur Auswertung wurde jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität der gesamten Fläche einer Kavität herangezogen. Eine Betrachtung der Fluoreszenzverteilung mit dem BioScan brachte *kein* zusätzliches Signal. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in der nicht bikonfokalen Anordnung, mit welcher z.B. Verfälschungen der Fluoreszenzintensitäten durch Vielfachreflexion auftreten. Die Auswertung eines kleineren mittigen Ausschnitts der Kavitäten brachte den gleichen relativen Kurvenverlauf. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten waren dabei aufgrund der höheren Flüssigkeitssäule erhöht, aufgrund der kleineren Pixelzahl jedoch auch die Standardabweichung. Eine weitere Problematik bei der Einbeziehung der Fluoreszenzverteilung in die Auswertung ist ihre Störanfälligkeit. Fehler treten z.B. auf, wenn die Wölbung der Flüssigkeitsoberfläche nicht zentriert über der Kavitätsmitte liegt (kommt bei nicht-zentrierter Befüllung vor). Oder

wenn aufgrund unterschiedlicher Hydrophilie der Meniskus anders ausfällt. Äußerst empfindlich ist die Fluoreszenzverteilungsmethode auch gegenüber Verdunstung bzw. Einkondensierung von Flüssigkeit in die Kavitäten während des Pipettiervorganges. In einem solchen Fall läßt sich die Kalibrierkurve sogar scheinbar invertieren. Daher wurden zur Phasenseparierung im weiteren nur der Effekt des Quenchens an der Oberfläche herangezogen.

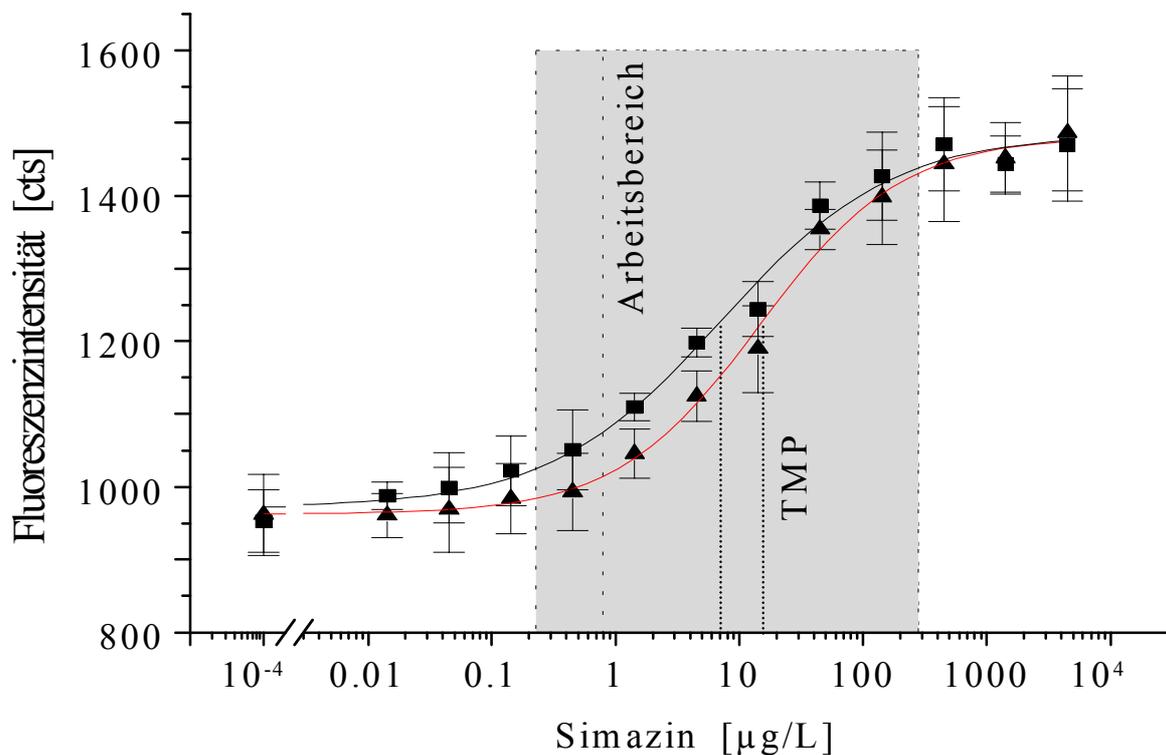


Abb. 61 Kalibrierung eines Simazin-Assays in der NTP (CE = 64). Die linke Kurve beschreibt die Messung 5 min, die rechte 25 min nach Pipettierende.

Der Signalverlauf der Kalibrierkurve (Abb. 61) entspricht den Erwartungen. Die Standardabweichungen lagen in diesem Fall zwischen 2 und 6%. Interessant ist hier die Möglichkeit der zeitaufgelösten Beobachtung. Die Auswertung zeigte, daß die Gleichgewichtseinstellung zwischen fester und flüssiger Phase unmittelbar nach Befüllen der Kavitäten noch nicht erfolgt ist. Vielmehr banden im Verlauf der ersten 25 Minuten noch eine beträchtliche Anzahl Antikörper an die Oberfläche (rechte Kurve in Abb. 61). Das Signal im Arbeitsbereich wurde dabei kleiner, da die (markierten) Antikörper an der Oberfläche gequenchet werden. Die absoluten maximalen und minimalen Signale blieben jedoch gleich, so daß sich der Testmittelpunkt von 7,1 nach 14,6 µg/L verschob. Auch die Untergrenze des Arbeitsbereiches erfuhr eine Schein-Verschiebung von 0,2

nach 0.8 $\mu\text{g/L}$. In ersten Untersuchungen konnte keine wesentliche Verschiebung zwischen 25 und 40 min nach Pipettierende festgestellt werden. Weitergehende kinetische Untersuchungen sind jedoch für zukünftige Messungen von nicht unerheblichem Interesse.

Fluoreszenzbasierter Resonanter Energietransfer (FRET) stellt gewissermaßen die homogene Variante dieses Assays dar, die prinzipiell auch denselben theoretischen Grundlagen gehorcht und denselben Signalverlauf aufweist. Ein Vergleich der Kalibrierkurve nach 25 min und einer FRET-Kurve mit den selben Reagenzien im MTP-Maßstab [Schobel1999b] zeigt eine sehr gute Übereinstimmung bezüglich Testmittelpunkt und Signalverlauf (gepunktete Linie in Abb. 62).

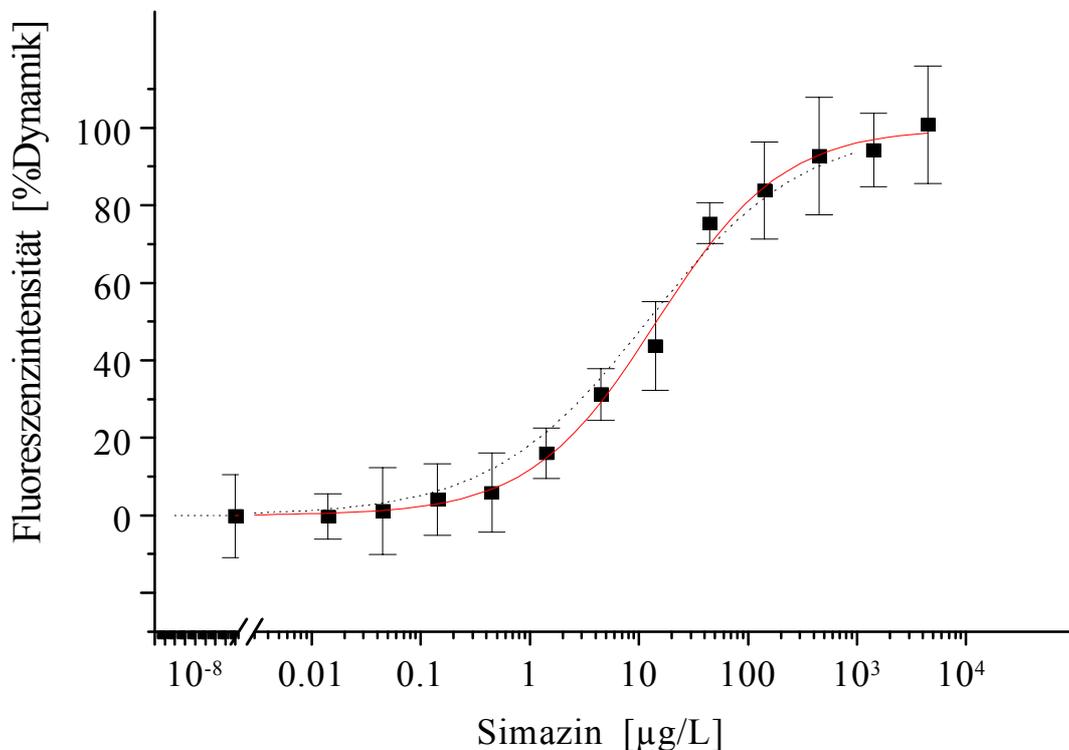


Abb. 62 Vergleich eines Simazin-Assays mit FRET.

Abb. 63-A zeigt einen Atrazin-Assay in der NTP (40 min nach Pipettierende) entsprechend der MTP-Variante in Abb. 55. Der Arbeitsbereich umfaßt 0.5...940 $\mu\text{g/L}$ Atrazin also mehr als drei Größenordnungen, der TMP liegt bei 17.6 $\mu\text{g/L}$. Abb. 63-B zeigt den direkten Vergleich mit dem MTP-Maßstab, wobei hier die Achsen wie bei allen Systemvergleichen auf %Dynamik normiert sind. Die Übereinstimmung beider Kurven zeigt eine hervorragende Übertragung des Assays von der MTP in die NTP.

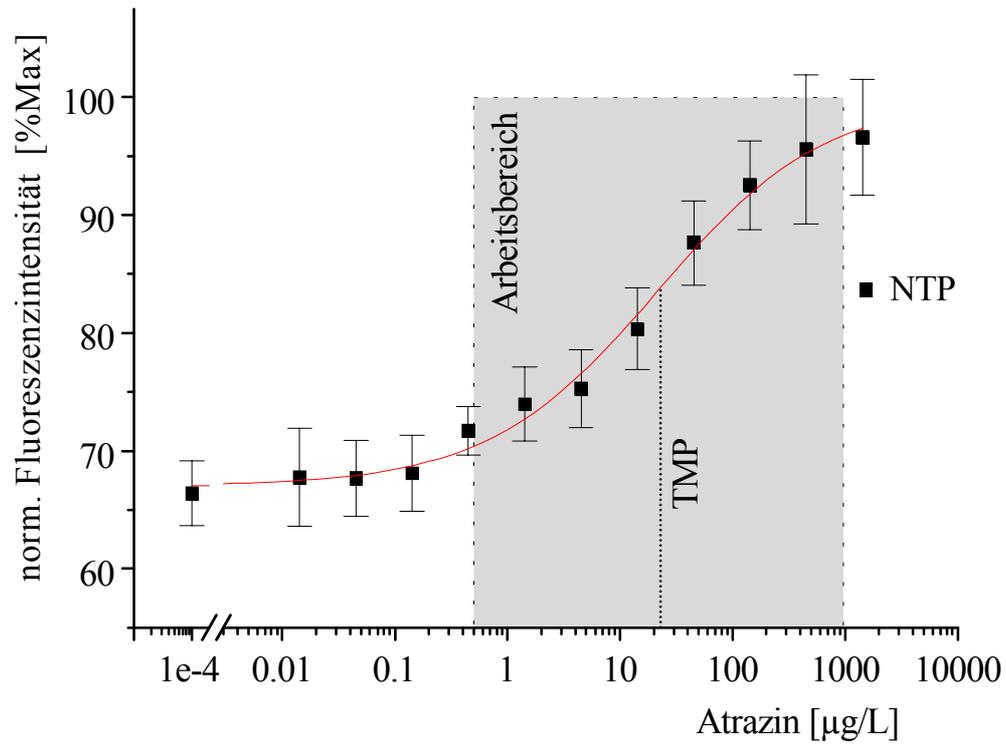
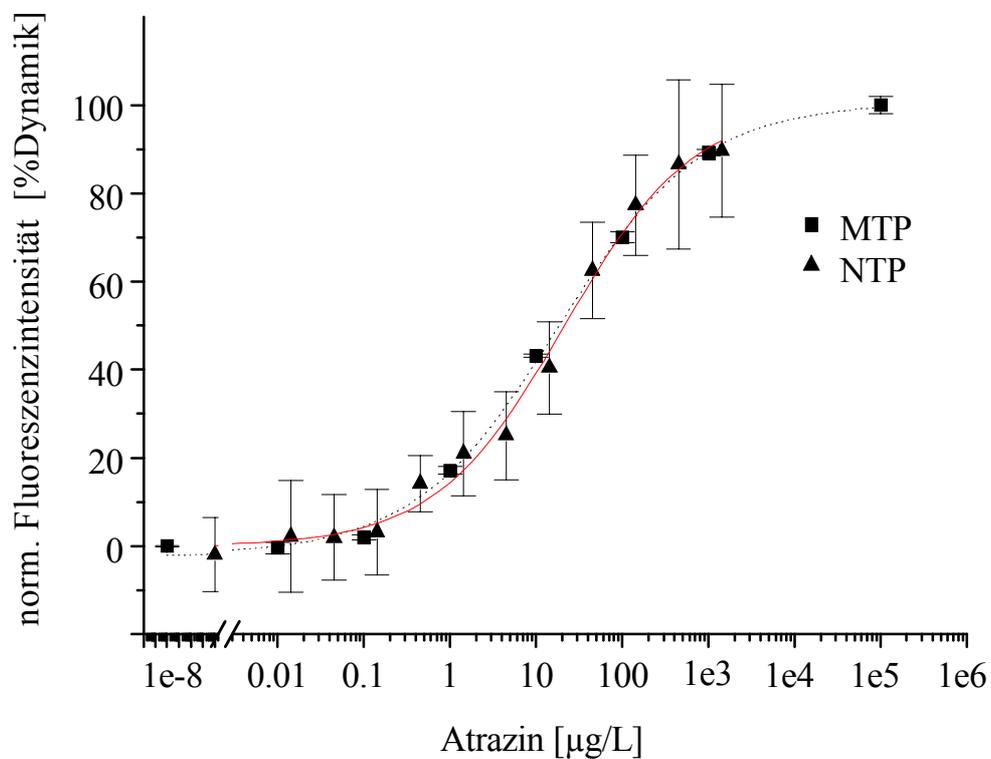
A)**B)**

Abb. 63 Kalibrierung eines Atrazin-Assays in der NTP (A) und Vergleich mit entsprechendem Assay in der MTP (B).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung miniaturisierbarer und parallelisierbarer Verfahren für die heterogene Affinitätsanalytik und die Optimierung dafür notwendiger spezifischer Oberflächen – mit folgenden Schwerpunkten:

1. Die Miniaturisierung *spektraler SPR*.
2. Ortsaufgelöste *Oberflächenmodifikationen* für Immun- und DNA-Analytik.
3. Die Entwicklung eines neuartigen waschfreien und heterogenen, sog. Phasenseparations-Fluoreszenzimmunoassays (*PSFIA*) im Mikro- und Nanotiterplattenformat.

SPR-Techniken sind gut etablierte Werkzeuge in affinitätsbasierten Biosensor-Anwendungen. Im Gegensatz zu winkelaufgelösten Techniken erlaubt *spektrale SPR* den Transducer von der Detektionseinheit örtlich flexibel über einen Lichtleiter zu trennen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie spektrale SPR mit einer planaren Transducergeometrie und einer kompakten Sensoreinheit kombiniert werden kann. Möglich wurde dies über eine starke Reduzierung der verwendeten Optik. Der am effektivsten miniaturisierte Aufbau (10mm-Prisma) erzielte eine vergleichbare Leistungsfähigkeit wie ein Aufbau (I) mit diskreten optischen Bauteilen und einer optischen Bank. Die geometrische Anbindung der Lichtleiter an das Prisma konnte als kritischer Punkt identifiziert werden. Dies stellt jedoch eher ein relativ leicht lösbares technisches als ein grundlegendes Problem dar.

In Bioaffinitätsassays zeigte der Aufbau eine gute Langzeitstabilität, jedoch ein erhöhtes Rauschen verglichen mit dem Laboraufbau I. Aufbau II und die verspiegelte Variante III zeigten vergleichbare Bindungskurven in Form und Höhe. Dies deutet darauf hin, daß eine zweifache Anregung von Oberflächenplasmonen in einem verspiegelten Aufbau möglich ist. Die Rauschwerte für Aufbau II und Aufbau III wiesen relativ starke Unterschiede auf. Aber die besten gemessenen Daten (Thrombin-System) zeigten sogar eine bessere Leistungsfähigkeit als mit Aufbau I und erreichten eine Nachweisgrenze von $dn \leq 10^{-5}$ bezüglich des Volumenbrechungsindex bzw. weniger als 0.1 µg/mL Thrombin in einem Durchflußassay. Die vorgestellten miniaturisierten Aufbauten stellen somit aufgrund ihrer vergleichbaren Leistungsfähigkeit zum voluminösen Laboraufbau eine hervorragende Alternative zu diesem dar.

Eine weitere Reduktion der Prismengröße auf beispielsweise 5 mm wird möglich sein. Weitere Verkleinerungen machen eine entsprechende Reduzierung der Faserdurchmesser notwendig. Dies sollte bei den dann höheren Intensitäten möglich sein. Das Signalrauschen kann durch die Verwendung von Spektrometern mit höherer Leistungsfähigkeit noch weiter reduziert werden. Ein weiter verbesserter Aufbau (Abb. 64) kann von der Tatsache profitieren, daß mit einer Anregungsfaser mehrere Punkte durch verschiedene Detektionsfasern abgefragt werden können. Dies schließt z.B. auch die Möglichkeit einer kontinuierlichen Referenzierung der Lichtquelle ein. Auch das Beobachten eines Referenzpunktes auf der Transduceroberfläche (z.B. zur Kompensation von Temperatur oder Brechungsindex) oder auch Multianalyt-Detektion sind vorstellbar. Letztendlich würden die optischen Fasern und die Polarisationsfolie im Gehäuse fixiert bleiben. Vorstellbar wäre ein (polymerbasiertes) Einwegprisma, welches über einen Schnellverschluß ausgetauscht wird. Dieser Ausblick rückt einer Verwirklichung auch durch die Miniaturisierung und gesteigerten Kosteneffizienz von Spektrometern näher [Bacher1993], [Becker1984], [Müller1995].

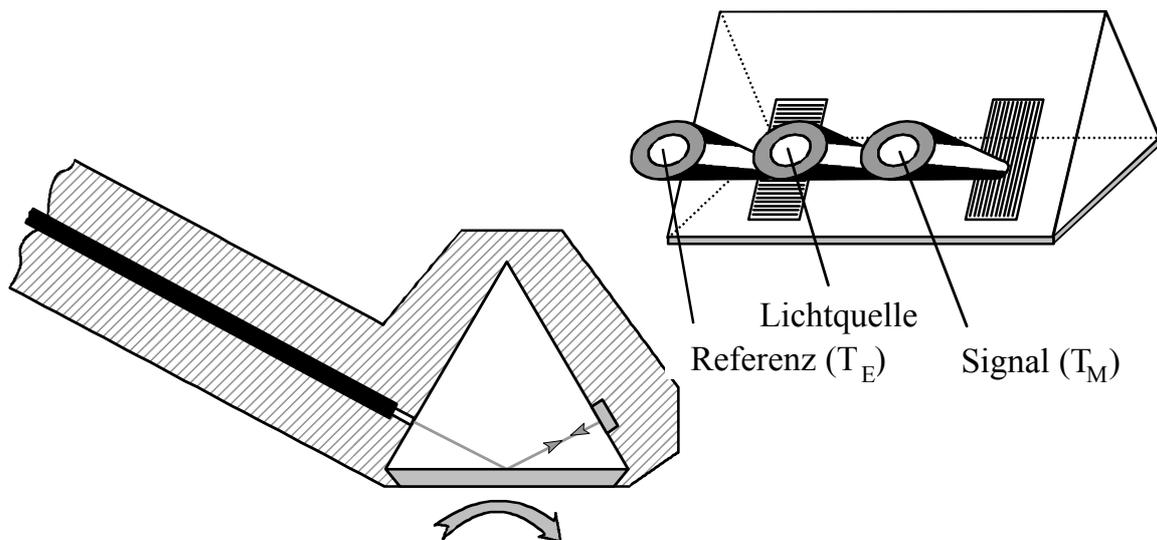


Abb. 64 Ausblick für einen kompakten per Lichtleiter fernabfragbaren Sensor mit online-Referenzierung.

Die Notwendigkeit **orts aufgelöster Oberflächenmodifikation** führte zu einer auf diesem Feld neuartigen Technik, nämlich der Dosierung nach dem Prinzip eines Tintenstrahldruckers. Durch Tropfendurchmesser $< 100 \mu\text{m}$ und Volumina im Subnanoliterbereich erschließen sich mit dieser kontaktfreien Transfermethode variable Oberflächenstrukturierungen im Bereich von etwa 0.01 mm^2 (Einzelspots) bis mehrere mm^2 (Multispots). Wenngleich die Präzision und

Leistungsfähigkeit des Systems sehr hoch sind, ist es in seiner Handhabung nicht gerade unempfindlich. So gibt es beispielsweise gewisse Obergrenzen für die Konzentration, z.B. 1 mg/mL für Immunglobuline, oberhalb derer keine definierte Tropfenablösung mehr möglich ist. Anhaftende Substanzen (z.B. durch Verdunstung) an der Spitze der Pipette führen zu einer hohen Störanfälligkeit der Tropfenablösung. Sehr wichtig ist daher auch die gründliche Reinigung des Systems. Unterschiede in der GeSiM- bzw. der Microdrop-Technologie konnten lediglich in der Handhabung bzw. der Stabilität der Düsen festgestellt werden. So weist die Microdrop-Technik eine höhere mechanische Belastbarkeit der Düsen auf (keine druckempfindliche Membranen) und bietet die Möglichkeit, überschüssige Flüssigkeit wieder komplett in einen Vorrat zurückzugeben. Durch die Konfektionierung und Programmierung der Pipettiereinheiten ließen sich diese Technologie erfolgreich neben dem Erstellen komplexer Muster kovalent gebundener Spots auch zur dosierten Befüllung von Nanotiterplatten einsetzen (s.u.). Als wichtiges Instrument zur Beurteilung der Güte hat sich die Beobachtung des Tropfvorganges mit einer Kamera erwiesen. Bei einer Beobachtung von höherfrequenten Tropfenfolgen bis 1 kHz lassen sich sowohl die Grenzen der Ansteuerungsparameter erkennen als auch über die scharfen Bilder die Reproduzierbarkeit betrachten (angegeben mit $\pm 1\%$). Optimale Konzentrationen für die Oberflächenmodifikation lagen im Bereich von 1 mg/mL.

In dieser Arbeit wurden mehrere Strategien untersucht, um aminoterminierte *DNA* kovalent an Glastypoberflächen zu immobilisieren. Die verwendete Tintenstrahltechnik erzeugte gut definierte Spots von 210 μm Größe. Durch ein immunologisches Markierungsverfahren konnte demonstriert werden, daß solche Spots zu einem definierten Array angeordnet werden können. Die örtliche Auflösung lag deutlich unter 0.1 mm, im Idealfall $< 5 \mu\text{m}$. Kleinere Tropfendurchmesser sollten ein kleineres Rastermaß ermöglichen. Oberflächenbereiche bis hin zu einigen mm^2 konnten durch das „Drucken“ bestimmter Muster homogen modifiziert werden. Für die kovalente Immobilisierung von *DNA* wurden die besten Ergebnisse mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktivierten carboxylierten Oberflächen basiert auf Aminohexansäure (AHA) oder carboxyliertem Aminodextran (AMD-GA) erzielt. Ein Charakteristikum des verwendeten Protokolls ist der Transfer auf eine erhitzte Oberfläche. Dies führte zu Verdampfungszeiten der Tropfen von weniger als einer Sekunde. Bemerkenswert ist, daß unter diesen Bedingungen hohe und stabile Beladungen der Oberfläche mit *DNA* erreicht wurden. Demgegenüber stehen konventionelle NHS-

basierte Protokolle im μL -Bereich, welche eine um etwa zwei bis drei Größenordnungen höhere Konzentration und Inkubationszeit benötigen. Die verwendeten Strategien erlauben weiterhin eine präzise Platzierung einzelner Mikrotropfen sogar in überlappenden Mustern. Ein Vergleich der Mikrotropfen-Strategie mit μL -Tropfen führt zu vergleichbaren Oberflächen. Während die μL -Tropfen-Methode zur Modifizierung der etwa 3 mm^2 $150\text{ }\mu\text{g}$ DNA verbrauchte ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{mm}^2$), kam die Tintenstrahl-Methode zwischen 200 und 400 Tropfen pro mm^2 mit einem Gesamtvolumen von 80 bis 160 nL und einer DNA-Menge von 80 bis $160\text{ ng}/\text{mm}^2$ aus. Dies zeigt deutlich, daß neben dem Potential der orts aufgelösten Modifizierung auch eine massive Reduzierung des DNA-Verbrauchs erzielt werden konnte. Die Standard-AHA-NHS-Modifikation zeigt für ein 23-mer eine Hybridisierungskapazität von $>1100\text{ pg}/\text{mm}^2$ ($155\text{ fmol}/\text{mm}^2$), die AMD-GA-NHS-Modifikation $>1600\text{ pg}/\text{mm}^2$ ($225\text{ fmol}/\text{mm}^2$). Diese Werte liegen deutlich höher, als die erreichten Hybridisierungskapazitäten in anderen Publikationen (s.o.). Geht man bei einer dichtesten Anordnung von etwa 325 fmol zylindrischen DNA-Helices pro mm^2 aus, so entspricht dies mehr als 70% des maximal Erreichbaren²³. Unspezifische Wechselwirkungen mit DNA oder Protein waren mit Ausnahme einer geringen Menge Protein bei der AHA-Oberfläche ($80\text{ pg}/\text{mm}^2$) nicht detektierbar, die jedoch mit wenig 0.01 M HCl komplett entfernt werden konnte. Die Stabilität unter diesen milden sauren Regenerationsbedingungen lag während wiederholter Hybridisierungs- und Regenerationsfolgen bei etwa 100%. Auch die Stabilität der immobilisierten DNA ist hoch (15% Verlust nach 50 Tagen für die AMD-GA-NHS-Modifikation unter Meßbedingungen). Die AHA-Oberfläche kann durch ein einfaches und weitgehend ausgereiftes Protokoll mit kommerziell erhältlichen Materialien hergestellt werden. Im Gegensatz dazu ist die AMD-GA-Oberfläche aufwendiger zu präparieren, überzeugt aber mit besten Ergebnissen. Gesetzt den Fall, daß eine signifikant kleinere Hybridisierungskapazität tolerabel ist, so stellt auch der gleichzeitige Transfer von DNA mit EDC eine Alternative dar, welche die Herstellung von aktivierten und folglich weniger stabilen Oberflächen vermeidet. Die Protokolle beschreiben einen effektiven Weg für die kovalente Immobilisierung von DNA-Mustern mit hoher Bindungskapazität auf Glastypoberflächen bzw. der Herstellung von DNA-Chips mit vorbereiteten Sequenzen. Eine Modifizierung und Erweiterung der Technik, wie z.B. die Verwendung komplexerer Moleküle zur Oberflächenaktivierung,

²³ Zur Abschätzung wurde ein Wert von 2.37 nm Durchmesser für eine Doppelhelix verwendet (Kap.2.1.3, S.9f).

könnte als Grundlage für höherentwickelte und maßgeschneiderte Modifikationen dienen.

Weiterhin wurden verschiedene Strategien zur *orts aufgelösten Oberflächenmodifikation für die Immunanalytik* untersucht, wobei DNA-Oberflächen auch als Hilfsligandensystem erfolgreich eingesetzt wurden. Die simpelste der untersuchten Methoden stellt jedoch die Modifikation mit *Polyelektrolyten* dar. Ihre hohen adsorptiven Kräfte führen zur schnellen Ausbildung von Self-Assembly-Schichten, die ihrerseits wiederum als adsorptive Unterlage für eine weitergehende Modifikation z.B. mit einem Pestizid-Polyelektrolyt-Konjugat dienen können. Im Experiment stellte sich eine nur bedingte Tauglichkeit für immunologische Tests heraus, da die untersuchten Polyelektrolyte zum einen eine sehr hohe unspezifische Wechselwirkung aufwiesen und sich zum anderen nicht als sehr stabil gegenüber einer Antikörperregeneration herausstellten. Die Untersuchung eines kovalent oberflächengebundenen *Photolinkers* (Azid) zur kovalenten Anbindung von Antigen-Polymerkonjugat (ACA-AMD-Konjugat als Modell) brachte mit der mikrodosierten Methode hohe Stabilitäten bezüglich einer Regeneration und eine sehr kleine unspezifische Wechselwirkung (UWW). Im Vergleich dazu war eine Auftragung des Konjugats von Hand („makrodosiert“) weniger regenerationsstabil bei etwas höherer UWW. Im Vergleich zu alternativen Methoden betrug die spezifische Wechselwirkung (SWW) weniger als 50%. Dennoch bietet diese Methode den Vorteil einer zeitlich unkritischen Modifizierung und kovalenter Anbindung der Spots erst durch Belichtung, so daß die Suche nach effizienteren Photolinkern mit Sicherheit lohnenswert ist. Die Verwendung von *Epoxiden* zur kovalenten Anbindung bietet bei sehr einfachen Immobilisierungsprotokollen eine sehr hohe SWW bei sehr kleiner UWW, sowohl bei mikro- wie auch makrodosierter Variante. Ähnlich verhält es sich für die Ankopplung via *Aktivesterprotokollen*, wobei hier die makrodosierte Variante höhere UWW, aber auch SWW aufweist. Der höhere Aufwand bei dieser Methode wird durch eine sehr spezifische Kupplung zwischen Amino- und Carboxy-Gruppe oftmals wieder wettgemacht. Zusammenfassend konnte auch für die Oberflächenmodifikation zur Immunanalytik gezeigt werden, daß eine mikrodosierte Immobilisierungsstrategie im Ergebnis der konventionellen, „großflächigen“ Immobilisierung in nichts nachsteht. Vielmehr ist durch diese Methode neben der hohen Ortsauflösung auch eine Reagenziensparnis um den Faktor 10^{-4} möglich.

Im letzten Teil dieser Arbeit konnte der erfolgreiche Aufbau eines neuartigen waschfreien heterogenen, sog. Phasenseparations-Fluoreszenzimmunoassays (*PSFIA*) demonstriert werden. Nach erfolgreicher Erprobung und Oberflächenmodifikation im MTP-Maßstab (250 µL), konnte die Übertragbarkeit in den miniaturisierten NTP-Maßstab gezeigt werden (50 nL). Neben der hervorragenden Übereinstimmung mit der homogenen Variante FRET konnte der Assay auch theoretisch untermauert werden. Bei Verwendung geeigneter Antikörper und Optimierung des immobilisierten Antigens kann der EU-Grenzwert von 0.1 µg/L Pestizid ohne Aufkonzentration bzw. Vorbehandlung der Proben erreicht werden. In der Natur immunologischer Methoden liegt die sehr flexible, über Antikörper und Analytderivat steuerbare Spezifität des Nachweises. So lassen sich mit immunologischen Verfahren problemlos auch ganze Substanzklassen, z.B. Triazine, mit einem Test erfassen. Durch den Einsatz von NTPs bzw. Mikrodosierung läßt sich sowohl der Reagenzienverbrauch um drei bis vier Größenordnungen verringern als auch der Probendurchsatz drastisch erhöhen. So wird diesem Assay, wie auch den anderen hier vorgestellten und vorangebrachten immunologischen Nachweismethoden, und ihrer Parallelisierung noch eine aufregende Zukunft beschieden sein.

6 Literatur

- Ackermann T., *Physikalische Biochemie: Grundlagen der physikalisch-chemischen Analyse biologischer Prozesse*, Springer-Verlag Berlin (1992).
- Akari S., Schrepp W., Horn D., Chemical imaging of single polyethylenimine polymers by chemical force microscopy, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 1014-1016.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J., *Molekularbiologie der Zelle*, 2. Aufl., VCH Weinheim (1990).
- Alinec B., Vanerek A., vandeVen T.G.M., Effects of surface topography, pH and salt on the adsorption of polydisperse polyethylenimine onto pulp fibers, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 954-962.
- Alphey L., *DNA-Sequenzierung*, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg (1998).
- Atkins P.W., *Physikalische Chemie*, 1. ber. Aufl., VCH Weinheim (1988).
- Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R., Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridisation with DNA probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977), 5350-5354.
- Azzam R.M.A., Bashara N.M., *Ellipsometry and Polarized Light*, North-Holland Physics Publishing, Amsterdam (1977).
- Bacher J., Mohr J., Ruprecht R., Schomburg W.K., Stark W., Das LIGA-Verfahren zur Fertigung dreidimensionaler Mikrostrukturen, *GIT Fachz. Lab.* **12** (1993), 1081-1085.
- Bain C.D., Troughton E.B., Tao Y.T., Evall J., Whitesides G.M., Nuzzo R.G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989a), 321-335.
- Bain C.D., Biebuyck H.A., Whitesides G.M., Comparison of self-assembled monolayers on gold: Coadsorption of thiols and disulfides, *Langmuir* **5** (1989b), 723-727.
- Bain C.D., Whitesides G.M., A study by contact angle of the acid-base behavior of monolayers containing ω -mercaptocarboxylic acids absorbed on gold: An example of reactive spreading, *Langmuir* **5** (1989c), 1370-1378.
- Barceló D., Hennion M.C., On-line sample handling strategies for the trace-level determination of pesticides and their degradation products in environmental waters, *Anal. Chimica Acta* **318** (1995), 1-41.
- Barceló D., Hennion M.-C., *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 19: Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water*, Elsevier Amsterdam (1997).

- Barié N., Rapp M., Sigrist H., Ache H.J., Covalent photolinker-mediated immobilization of an intermediate dextran layer to polymer-coated surfaces for biosensing applications, *Biosens. & Bioelectronics* **13** (1998), 855-860.
- Barzen C., Dissertation, Universität Tübingen, in prep. (1999).
- Becker E.W., Ehrfeld E., Hagmann E., Manner A., Münchmeyer D., Fabrication of microstructures with high aspect ratios and great structural heights by synchrotron radiation lithography, galvanofforming, and plastic moulding (LIGA process), *Microelectronic Engineering* **4** (1984), 35.
- Beisswanger G., Agnes Pockels und die Oberflächenchemie, *Chemie in unserer Zeit* **25** (1991), 97-101.
- Berger M., Deger A., Maler J., Boehringer Mannheim GmbH, Verfahren zur Herstellung einer Festphasenmatrix, *EP 0331127 B1*, (16.06.1993).
- Bergmann L., Schaefer C., *Lehrbuch der Experimentalphysik*, de Gruyter, Berlin (1992).
- Bernard A., Delamarche E., Schmid H., Michel B., Bosshard H.R., Biebuyck H., Printing Patterns of Proteins, *Langmuir* **14** (1998), 2225-2229.
- Bertilsson L., Liedberg B., Infrared study of thiol monolayer assemblies on gold: Preparation, characterization, and functionalization of mixed monolayers, *Langmuir* **9** (1993), 141-149.
- Biacore probe, *Product information*, Biacore AB (1997).
- Bisswanger H., *Enzymkinetik, Theorie und Methoden*, 2. Aufl., VCH, Weinheim (1994).
- Blanchard A.P., Kaiser R.J., Hood L.E., High-density oligonucleotide arrays, *Biosens. & Bioelectron.* **11** (1996), 687-690.
- Braun H.G., Fuchs H., Schrepp W., Surface Structure Investigation of Langmuir-Blodgett Films, *Thin Solid Films* **159** (1988), 301-314.
- Brecht A., *Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen*, Dissertation, Universität Tübingen (1993).
- Brecht A., Gauglitz G., Optical probes and transducers, *Biosens. & Bioelectron.* **10** (1995), 923-936.
- Brecht A., Burckardt R., Rickert J., Stemmler I., Schütz A., Fischer S., Friedrich T., Gauglitz G., and Göpel W., Transducer-Based Approaches for Parallel Binding Assays in HTS, *Journ. of Biomol. Screen.*, **1** (1996), 191-201.
- Brecht A., Gauglitz G., Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications, *Sens. & Actuators B* **38** (1997), 1-7.
- Brecht A., Klotz A., Barzen C., Gauglitz G., Harris R.D., Quigley G.R., Wilkinson J.S., Sztajn bok P., Abuknesha R., Gascón J., Oubiña A., Barceló D.,

- Optical immunoprobe development for multiresidue monitoring in water, *Anal. Chim. Acta* **362** (1998a), 69-79.
- Brecht A., Schobel U., Gauglitz G., „Resonant Energy Transfer Detection for Low Volume Immunoassay in Environmental Applications“ in Bahadir M., Collins H.-J., Hock B., (Hrsg.), *Biosensors for Environmental Diagnostics*, Teubner Verlag Stuttgart (1998b), 11-27.
- Brecht A., Barzen C., Klotz A., Gauglitz G., Harris R., Quigley G., Wilkinson J., Fraval S., Sztajn bok P., Barceló D., Gascón J., Steinwand S., Abuknesha R., „River Analyser - Multiresidue Immunoanalytical Monitoring Tools“ in Bahadir M., Collins H.-J., Hock B., (Hrsg.), *Biosensors for Environmental Diagnostics*, Teubner Verlag Stuttgart (1998c), 147-160.
- Brecht A., Abuknesha R.A., in preparation (1999).
- Brett A.M.O., Matysik F.M., Vieira M.T., Thin-film gold electrodes produced by magnetron sputtering. Voltammetric characteristics and application in batch injection analysis with amperometric detection, *Electroanalysis* **3** (1997), 209-212.
- Buchhammer H.M., Lunkwitz K., Surface modification by polyelectrolyte complexes, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 1039-1044.
- Burns M.A., Johnson B.N., Brahmasandra S.N., Handique K., Webster J.R., Krishnan M., Sammarco T.S., Man P.M., Jones D., Heldsinger D., Mastangelo C.H., Burke T.D., An integrated nanoliter DNA analysis device, *Science* **282** (1998), 484-487.
- Caruso F., Niikura K., Furlong D.N., Okahata Y., Ultrathin multilayer polyelectrolyte films on gold: Construction and thickness determination, *Langmuir* **13** (1997a), 3422-3426.
- Caruso F., Niikura K., Furlong D.N., Okahata Y., Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing, *Langmuir* **13** (1997b), 3427-3433.
- Caruso F., Rodda E., Furlong D.F., Niikura K., Okahata Y., Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development, *Anal. Chem.* **69** (1997c), 2043-2049.
- Chan D.W., Perlstein M.T., (Eds.), *Immunoassay: A Practical Guide*, Academic Press San Diego (1987).
- Chance R.R., Prock A., Silbey R., Classical theory of energy transfer, *J. Chem. Phys.* **62/6** (1975), 2245-2253.
- Chance R.R., Prock A., Silbey R., Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces, *Adv. Chem. Phys.* **37** (1978), 1-65.

- Chard T., *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*, 4th rev. ed. Elsevier Amsterdam (1990).
- Chrisey L.A., Lee G.U., O'Ferrall C.E., Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films, *Nucleic Acids Res.* **24** 15 (1996a), 3031-3039.
- Chrisey L.A., O'Ferrall C.E., Spargo B.J., Dulcey C.S., Calvert J.M., Fabrication of patterned DNA surfaces, *Nucleic Acids Res.* **24** 15 (1996b), 3040-3047.
- Cush R., Cronin J.M., Stewart W.J., Maule C.H., Molloy J., Goddard N.J., The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation, *Biosens. & Bioelectron.* **8** (1993), 347-354.
- Dahlgren M.A.G., Hollenburg H.C.M., Polyelectrolytes interacting with interfaces: Surface forces and theoretical results, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 1004-1007.
- Dandliker W.B., de Saussure V.A., Fluorescence polarisation in immunochemistry, *Immunochemistry* **7** (1970), 799-827.
- Daniels P.D., Deacon J.K., Eddowes M.J., Pedley D.G., Surface plasmon resonance applied to immunosensing, *Sensors and Actuators B* **15** (1988), 11-18.
- Dautzenberg H., Hartmann J., Grunewald S., Brand F., Stoichiometry and structure of polyelectrolyte complex particles in diluted solutions, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996a), 1024-1032.
- Dautzenberg H., Lukanoff B., Eckert U., Tiersch B., Schuldt U., Immobilisation of biological matter by polyelectrolyte complex formation, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996b), 1045-1053.
- Davies J., Roberts C.J., Dawkes A.C., et al, Use of Scanning Probe Microscopy and Surface Plasmon Resonance as Analytical Tools in the Study of Antibody-Coated Microtiter Wells, *Langmuir* **10** (1994), 2654-2661.
- Delamarche E., Sundarabu G., Biebuk H., Michel B., Gerber C., Sigrist H., Wolf H., Ringsdorf H., Xanthopoulos N., Manthieu H.J., Immobilization of Antibodies on a Photoactive Self-Assembled Monolayer on Gold, *Langmuir* **12** (1996), 1997-2006.
- Dotz J., Gerinnungshemmende Wirkstoffe blutsaugender Tiere: von Hirudin zu Hirudinmimetica, *Angew. Chem.* **107** (1995), 948-962.
- Döring M., Flüssigkeiten mikrofein dosieren, *Feinwerktechnik & Messtechnik* **99** (1991), 459-464.
- Drapp B., Piehler J., Brecht A., Gauglitz G., Luff B.J., Wilkinson J.S., Ingenhoff J., Integrated Optical Mach-Zehnder Interferometers as Simazine Immunoprobes, *Sens. & Actuators B* **39** (1997), 277-282.

- Drifford M., Dalbiez J.P., Delsanti M., Belloni L., Structure and dynamics of polyelectrolyte solutions with multivalent salts, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 829-835.
- Drmanac R., Drmanac S., Labat I., Crkvenjakov R., Vicentic A., Gemmell A., Sequencing by hybridization: Towards an automated sequencing of one million M13 clones arrayed on membranes, *Electrophoresis* **13** (1992), 566-573.
- Duevel R.M., Corn R.M., Amide and Ester Surface Attachment Reactions for Alkanethiol Monolayers at Gold Surfaces As Studied by Polarization Modulation Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Anal. Chem.* **64** (1992), 337-342.
- Ekins R.P., Chu F., (Eds.), „Microspot®, Array-based, Multianalyte Binding Assays : The Ultimate Microanalytical Technology?“, In: Price C.P. Newman D.J. (Hrsg.), *Principles and practice of immunoassay*, Stockton Press, 2nd Ed., New York (1997), 627-646.
- Elender G., Kühner M., Sackmann E., Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayer, *Biosens. & Bioelectronics* **11** (1996), 565-577.
- Falbe J., Regitz M. (Hrsg.), *Römpp Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 9. Aufl. (1995).
- Fielding M., Barceló D., Helweg A., Galassi S., Torstensson L., van Zoonen P., Wolter R., Angletti G., Pesticides in Ground and Drinking Water (Water Pollution Research Report, 27), Commission of the European Communities, Brussels (1992), 1-136.
- Fischer B., *Oberflächenplasmonen-Mikroskopie und -Spektroskopie an rekonstituierten Lipid/Protein-Membranen*, Diplomarbeit, TU München (1989).
- Fischer-Frühholz S., Das Labor auf dem Chip, *BioTec* (1997), Teil 1 1/1997, 40-41, Teil 2 2/1997, 42-44.
- Fischer-Frühholz S., The handling of nanoliter samples on a chip, *American Laboratory* **30** (1998), 46&.
- Fodor S.P.A., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., Solas D., Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis, *Science* **251** (1991), 767-773.
- Fortune D., Binding and Kinetics - New Dimensions in Optical Biosensor Analysis, *Biosens. & Bioelectron.* **8** (1993), xxxii-xxxiv.
- Frittrang A., Flüssigkeitsdosierung ab 250 Picoliter, *LaborPraxis* (1998), 36-37.
- Fuchs H., Ohst H. Prass W., Ultrathin Organic Films: Molecular Architectures for Advanced Optical, Electronic and Bio-Related Systems, *Adv. Mater.* **1** (1991), 10-18.

- Gao H., Sanger M., Luginbuhl R., Sigrist H., Immunosensing with photo-immobilized immunoreagents on planar optical wave guides, *Biosens. & Bioelectronics* **10** (1995), 317-328.
- Gauglitz G., *Praktische Spektroskopie*, Attempto Verlag Tübingen, (1983).
- Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W., Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sens. Actuators B* **11** (1993), 21-27.
- Gauglitz G., Opto-chemical and opto-immuno sensors, *Sensors Update Band 1* (Baltes H., Göpel W., Hesse J., Eds.), VCH Weinheim (1996), 1-35.
- Gingeras T.R., Ghandour G., Wang E., Berno A., Small P.M., Drobniowski F., Alland D., Desmond E., Holodniy M., Drenkow J., Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic Mycobacterium DNA arrays, *Genome Research* **8** (1998), 435-448.
- Grzybowski B.A., Haag R., Bowden N., Whitesides G.M., Generation of micrometer-sized patterns for microanalytical applications using a laser direct-write method and microcontact printing, *Anal. Chem.* **70** (1998), 4645-4652.
- Guo Z., Guilfoyle R.A., Thiel A.J., Wang R., Smith L.M., Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports, *Nucleic Acids Res.* **22** (1994), 5456-5465.
- Guthrie C. Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein, *Science* **253** (1991), 157-163.
- Hacia J.G., Brody L.C., Chee M.S., Fodor S.P., Collins F.S., Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis, *Nat. Genet.* **14** (1996), 441-447.
- Harris R.D., Wilkinson J., Waveguide surface plasmon resonance sensors, *Sensors and Actuators B* **29** (1995), 261-267.
- Haussling L., Ringsdorf H., Schmitt F.J., Knoll W., Biotin-functionalized self-assembled monolayers on gold: Surface plasmon optical studies of specific recognition reactions, *Langmuir* **7** (1991), 1837-1840.
- Healey B.G., Matson R.S., Walt D.R., Fiberoptic DNA sensor array capable of detecting point mutations, *Anal. Biochem.* **251** (1997), 270-279.
- Hellwege K.H., *Einführung in die Festkorperphysik*, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin (1988), 442-452.
- Henke L., Piunno P.A.E., McClure A.C., Krull U.J., Covalent immobilization of single-stranded DNA onto optical fibers using various linkers, *Anal. Chimica Acta* **344** (1997), 201-213.

- Hennion M.-C., Barceló D., Strengths and limitations of immunoassay for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review, *Anal. Chim. Acta* **362** (1998), 3-34.
- Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K., *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, San Diego (1992).
- Hermanson G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996).
- Hermeier I., Herzig M., Knoche W., Pohlmeier A., Narres H.D., Kinetics of complexation of heavy metal ions with polyelectrolytes in aqueous solution, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 788-795.
- Hock B., Nießner R., *Immunochemical detection of pesticides and their metabolites in the water cycle*, DFG Research Report, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1995).
- Homola J., Model of a chemo-optical sensor based on plasmon excitation in thin silver films, *Sensors and Actuators B* **11** (1993), 481-485.
- Honeybourne C.L., Solid Thin Films of Extended π -Systems: Deposition, Characterisation and Application, *J. Phys. Chem. Solids* **48** (1987), 109-141.
- Ibelgaufits H., *Gentechnologie von A bis Z*, VCH Weinheim (1990).
- Izumrudov V.A., Competitive reactions in solutions of protein-polyelectrolyte complexes, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 1017-1023.
- Jablonski A., Über den Mechanismus der Photoluminiszenz von Farbstoffphosphoren, *Z. Physik* **94** (1935), 38.
- Jackson T.M., Ekins R.P., Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: Current practice and potential advantages of fluorescent Eu^{3+} chelates as non-radioisotopic tracers, *J. Immunol. Meth.* **87** (1986), 13-20.
- Janeway C.A., Travers P., *Immunologie*, 2. Aufl. Spektrum Akadem. Verl. Heidelberg (1997).
- Jönsson U., Fägarstam L., Ivarsson B., et.al., Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology, *Bio Techn.* **11** (1991), 621-627.
- Jönsson B., Peterson C., Söderberg B., Variational Approach to the Structure and Thermodynamics of Linear Polyelectrolytes with Coulomb and Screened Coulomb Interactions, *J. Phys. Chem.* **99** (1995), 1251-1266.
- Jordan C.E., Frey B.L., Kornguth S., Corn R.M., Characterization of poly-L-lysine adsorption onto alkanethiol-modified gold surfaces with polarization-modulation fourier transform infrared spectroscopy and surface plasmon resonance measurements, *Langmuir* **10** (1994), 3642-3648.
- Jorgenson R.C., Yee S.S., A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators B* **12** (1993), 213-220.

- Jung G., *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, VCH Weinheim (1996).
- Katerkamp A., Bolsmann P., Niggemann M., Pellmann M., Cammann K., Micro-chemical sensors based on fiber-optic excitation of surface plasmons, *Mikrochim. Acta* **119** (1995), 63-72.
- Keana J.F.W., Cai S.X., New Reagents for Photoaffinity Labeling: Synthesis and Photolysis of Functionalized Perfluorophenyl Azides, *J. Org. Chem.*, **55** (1990), 3640-3647.
- Kemeny D.M., Challacombe S.J., *ELISA and other solid phase immunoassays – Theoretical and practical aspects*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore (1988).
- Kittel C., *Einführung in die Festkörperphysik*, 10. Aufl., R. Oldenbourg Verlag, München Wien (1993), 300-338.
- Kjellander R., Ion-ion correlations and effective charges in electrolyte and macroion systems, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 894-904.
- Klingler J., Friedrich T., Site-Specific Interaction of Thrombin and Inhibitors Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biophysical Journal* **73** (1997), 2195-2200.
- Kloos T., Zur Dispersion der Oberflächenplasmaverluste an reinen und oxydierten Aluminiumoberflächen, *Z. Phys.* **208** (1968), 77-93.
- Köhler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **256** (1975), 495-497.
- Kotzyba-Hilbert F., Kapfer I., Goeldner M., Neue Entwicklungen bei der Photoaffinitätsmarkierung, *Angew. Chem.* **107** (1995), 1391-1408.
- Kretschmann E., Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen, *Z. Phys.* **241** (1971), 313-324.
- Kretschmann E., Raether H., Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, *Z. Naturforsch.* **23a** (1968), 2135-2136.
- Laibinis P.E., Fox M.A., Folkers J.P., Whitesides G.M., Comparisons of self-assembled monolayers on silver and gold: Mixed monolayers derived from $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{Y}$ (X, Y = CH_3 , CH_2OH) have similar properties, *Langmuir* **7** (1991), 3167-3173.
- Laschewsky A., Mayer B., Wischerhoff E., Arys X., Jonas A., Polyelectrolyte complexes at interfaces, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 1033-1038.
- Lebl M., Krchnak V., Sepetov N.F., Seligmann B., Strop P., Felder S., Lam K.S., One-Bead-One-Structure Combinatorial Libraries, *Biopolymers* **37** (1995), 177-198.

- Leggett G.J., Davies M.C., Jackson D.E., Tendler S.J.B., Surface studies by static secondary ion mass spectrometry: Adsorption of 3-mercaptopropionic acid and cysteine onto gold surfaces, *J. Phys. Chem.* **97** (1993), 5348-5355.
- Lewis R.V., Roberts M.F. Dennis E.A. Allison W.S., Photoactivated Heterobifunctional Cross-Linked Reagents Which Demonstrate the Aggregation State of Phospholipase A₂, *Biochemistry* **16** (1977), 5650-5654.
- Liedberg B., Nylander C., Lundström I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators B* **4** (1983), 299-304.
- LINDAU-Abschlußpräsentation am 1.2.1999 im Schloß Maurach, Veranstalter Perkin Elmer GmbH.
- Lipshutz R.J., Fodor S.P.A., Gingeras T.R., Lockhart D.J., High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nature Genetics* **21** (1999), 20-24.
- Litborn E., Stjernström M., Roeraade J., Nanoliter Titration Based on Piezoelectric Drop-on-Demand Technology and Laser-Induced Fluorescence Detection, *Anal. Chem.* **70** (1998), 4847-4852.
- Liu M.T.H., The Thermolysis and Photolysis of Diazirines, *Chem. Soc. Rev.* **11** (1982), 127-140.
- Löfås S., Malmqvist M., Rönnberg I., Stenberg E., Liedberg B., Lundström I., Bioanalysis with surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators B* **5** (1991), 79-84.
- Löfås S., Johnsson B., Edström A., Hansson A., Lindquist G., Hillgren R.M.M., Stigh L., Methods for site controlled coupling to carboxymethyl dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors, *Biosens. & Bioelectronics* **10** (1995), 813-822.
- Lösche M., Schmitt J., Decher G., Bouwman W.G., Kjaer K., Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry, *Macromolecules* **31** (1998), 8893-8906.
- Lottspeich F., Zorbas H., (Hrsg.), *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1998).
- Ludwig H., Loebel K.H., Interaction of polyelectrolytes with mono- and divalent cations, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 863-868.
- Martin B.D., Gaber B.P., Patterson C.H., Turner D.C., Direct Protein Microarray Fabrication Using a Hydrogel 'Stamper', *Langmuir* **14** (1998), 3971-3975.
- Microdrop, Microdosing in the Picoliter Range with Piezo Technology, Produktkatalog, Norderstedt (1999).
- Morozov V.N., Morozova T.Y., Hiort C., Schwartz D.C., New polyacrylamide gel-based methods of sample preparation for optical microscopy: immobi-

- lization of DNA molecules for optical mapping, *J. Microsc.* **183** (1996), 205-214.
- Mrksich M., Dike L.E., Tien J., Ingber D.E., Whitesides G.M., Using micro-contact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver, *Exp. Cell Res.* **235** (1997), 305-313.
- Mueller C., Mohr J., Miniaturized spectrometer system in LIGA technique, *Wiss. Ber. - Forschungszent. Karlsruhe, FZKA 5609* (1995), 0947-8620.
- Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis C.J., Waggoner A.S., Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters, *Bioconjugate Chem.* **4** (1993), 105-111.
- Muthumukar M., Adsorption of a polyelectrolyte chain to a charged surface, *J. Chem. Phys.* **86** (1987), 7230-7235.
- Neurath M., Ma X., Pettersson S., *DNA-Protein-Interaktionen*, Spektrum-Verlag Heidelberg (1997).
- Nilsson J., Laurell T., Wallman L., Drott J., A Flow-Through Liquid Picoliter Sampling Cell, *Analytical Methods & Instrumentation, Special Issue μ TAS* (1996), 88-90.
- Nussenzweig V., Turner M.W. (Eds.) *Journal of Immunological Methods, Special issue: uses of biosensors in immunology* **183-1**, Elsevier, Amsterdam (1995).
- O'Donnell C.M., Suffin S.C., Fluorescence Immunoassays, *Anal. Chem.* **51** (1979), 33-40.
- O'Donnell M.J., Tang K., Koster H., Smith C.L., Cantor C.R., High density, covalent attachment of DNA to silicon wafers for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, *Anal. Chem.* **69** (1997), 2438-2443.
- O'Shannessy D.J., Brighma-Burke M., Sonesson K.K., Hensley P., Brooks I., Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: Use of nonlinear least squares analysis methods, *Analytical Biochemistry* **212** (1993), 457-468.
- Önnerfjord P., Nilsson J., Wallman L., Laurell T., Marko-Varga G., Picoliter sample preparation in MALDI-TOF MS using a micromachined silicon flow-through dispenser, *Anal. Chem.* **70** (1998), 4755-4760.
- Orlowski R., Raether H., The total reflection at smooth and rough silver films and surface plasmons, *Surf. Sci.* **54** (1976), 303-308.
- Osterberg E., Bergstrom K., Holmberg K., Schuman T.P., Riggs J.A., Burns N.L., Van-Alstine J.M., Harris J.M., Protein-rejecting ability of sur-

- face-bound dextran in end-on and side-on configurations: Comparison to PEG, *J. Biomed. Mat. Res.* **29** (1995), 741-747.
- Otto A., Excitation of non-radiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Z. Phys.* **23a** (1968), 398-410.
- Pang D.W., Zhang M., Wang Z.L., Qi Y.P., Cheng J.K., Liu Z.Y., Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA, *J. Electroanalytical Chem.* **403** (1996), 183-188.
- Patey G.N., Remarks on the forces between macroscopic particles in solution, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 885-888.
- Pharmacia Biosensor AB Product Catalogue (1995).
- Piehler J., *Spezifische und unspezifische Wechselwirkungen an chemisch modifizierten Glasyt-Oberflächen*, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1993).
- Piehler J., Brecht A., Gauglitz G., Affinity detection of low molecular weight analytes, *Anal. Chem.*, **68** (1996a), 139-143.
- Piehler J., Brecht A., Geckeler K.E., Gauglitz G., Surface modification for direct immunoprobes, *Biosens. Bioelectron.*, **11** (1996b), 579-589.
- Piehler J., Brecht A., Gauglitz G., Zerlin M., Maul C., Thiericke R., Grabley S., Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.*, **249** (1997a), 94-102.
- Piehler J., *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*, Dissertation, Universität Tübingen (1997b).
- Piunno P.A., Krull U.J., Hudson R.H., Damha M.J., Cohen H., Fiber-optic DNA sensor for fluorometric nucleic acid determination, *Anal. Chem.*, **67** (1995), 2635-2643.
- Polzius R., Dießel E., Bier F.F., Bilitewski U., Real-time observation of affinity reactions using grating couplers: Determination of the detection limit and calculation of kinetic rate constants, *Anal. Biochem* **248** (1997), 269-276.
- Price C.P. Newman D.J. (Hrsg.), *Principles and practice of immunoassay*, Stockton Press, 2nd Edition, New York (1997).
- Raether H., Surface plasma oscillations and their applications, *Phys. Thin Films* **9** (1977), 145-261.
- Raether H., *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, Springer Tracts in Modern Physics, Bd. 111, Heidelberg Springer-Verlag, Berlin (1988).
- Rickert J., Massensensitive Biosensoren zur spezifischen Detektion von Affinitätsreaktionen, Dissertation, Universität Tübingen (1997).

- Roberts M.J., Lindsay G.A., Herman W.N., Wynne K.J., Thermally stable nonlinear optical films by alternating polyelectrolyte deposition on hydrophobic substrates, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998), 11202-11203.
- Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K., *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995).
- Rothmund M., Schütz A., Brecht A., Gauglitz G., Berthel G., Gräfe D., Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening, *Fresenius J. Anal. Chem.* **359** (1997), 15-22.
- Rowan S.M., McHale G., Newton M.I., Toorneman M., Evaporation of Microdroplets of Three Alcohols, *J. Phys. Chem. B* **101** (1997), 1265-1267.
- Samsonova J.V., Rubtsova M.Y., Kiseleva A.V., Ezhov A.A., Egorov A.M., Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish peroxidase as a label, *Biosens. & Bioelectronics* **14** (1999), 273-281.
- Sauer, *Spezifische Protein- und DNA-Wechselwirkung an immobilisierten Nukleotidsträngen*, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1998).
- Sauer M., Brecht A., Charisse K., Stemmler I., Gauglitz G., Bayer E., Interaction of chemically modified antisense oligonucleotides with sense DNA: A label free interaction study, *Anal. Chem.* submitted (1999).
- Schena M., Genome analysis with gene expression microarrays, *Bioessays* **18** (1996), 427-431.
- Schlenoff J.B., Li M., Kinetics and multilayering in the adsorption of polyelectrolytes to a charged surface, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 943-947.
- Schobel U., Egelhaaf H.-J., Brecht A., Oelkrug D., Gauglitz G., A new donor-acceptor pair for fluorescent immunoassays by energy transfer, in prep. (1999a).
- Schobel U., Dissertation, Universität Tübingen, in prep. (1999b).
- Schober A., Günther R., Schwienhorst A., Döring M., Lindemann B.F., Accurate high-speed liquid handling of very small biological samples, *Biotechniques* **15** (1993), 324-329.
- Schober A., Schlingloff G., Thamm A., Kiel H.J., Tomandl D., Gebinoga M., Döring M., Köhler J.M., Mayer G., Systemintegration of microsystem/chip elements in miniaturised high-throughput synthesis and screening in biology, biochemistry and chemistry, *Microsystem Technologies* **4** (1997), 35-39.
- Schullek J.R., Butler J.H., Ni Z.J., Chen D., Yuan Z.Y., A high-density screening format for encoded combinatorial libraries: Assay miniaturization and its application to enzymatic reactions, *Anal. Biochem* **246** (1997), 20-29.

- Scranton A.B., Rangarajan B., Klier J., Biomedical applications of polyelectrolytes, *Biopolymers* **122** (1995), 1-54.
- Seidel C., Polyelectrolyte simulation, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 757-763.
- Service R.F., Microchip arrays put DNA on the spot, *Science* **282** (1998), 396-399.
- Sjöström L., Åkesson T., Jönsson B., Charge reversal in electrical double layers - A balance between energy and entropy, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 889-893.
- Sondag-Huethorst J.A.M., Schönenberger C., Fokkink L.G.J., Formation of holes in alkanethiol monolayers on gold, *J. Phys. Chem.* **98** (1994), 6826-6834.
- Southern E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* **98** (1975), 503-517.
- Spaeth K., Brecht A., Gauglitz G., Studies on the biotin-avidin multilayer adsorption by spectral ellipsometry, *Journal of Colloid and Interface Science* **196** (1997), 128-135.
- Speakman J., Gacem V., Gibaud A., Richardson T., Cowlam N., Structures and defects in Langmuir-Blodgett films, *Thin Solid Films* **329** (1998), 295-298.
- Stein T., Gerisch G., Oriented Binding of a Lipid-Anchored Cell Adhesion Protein onto a Biosensor Surface Using Hydrophobic Immobilisation and Photoreactive Crosslinking, *Anal. Biochem.* **237** (1996), 252-259.
- Stemmler I., *Untersuchungen zur Immunosensorik mit Oberflächenplasmonenresonanz*, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1995).
- Stenberg E., Persson B., Roos H., Urbaniczky C., Quantitative determination of surface concentration of proteins with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins, *J. Colloid. Interface Sci.* **143** (1991), 513-526.
- Stevens M.J., Kremer K., The nature of flexible linear polyelectrolytes in salt free solution: a molecular dynamics study, *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 1669-1690.
- Steward M.W., Steensgaard J., *Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance*, CRC Press Florida, (1983).
- Striebel C., Brecht A., Gauglitz G., Characterization of biomembranes by spectral ellipsometry, surface plasmon resonance and interferometry with regard to biosensor application, *Biosens. & Bioelectr.* **9** (1994), 139-146.
- Striebel C., *Charakterisierung von biologischen Schichtsystemen mit spektraler Ellipsometrie und Oberflächenplasmonenresonanz*, Dissertation, Universität Tübingen (1994).
- Stryer L., *Biochemie*, Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg, 4. Aufl. (1996).

- Sukhorukov G.B., Schmitt J., Decher G., Reversible swelling of polyanion/polycation multilayer films in solutions of different ionic strength, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 948-953.
- Sun F., Grainger D.W., Castner D.G., Leach-Scampavia D.K., Adsorption of ultrathin films of sulfur-containing siloxane oligomers on gold surfaces and their *in situ* modification, *Macromolecules* **27** (1994), 3053-3062.
- Tiefenthaler K., Grating couplers as label-free biochemical waveguide sensors, *Biosens. & Bioelectron.* **8** (1993), xxxv-xxxvii.
- Tijssen P., *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Elsevier Amsterdam (1985).
- Turq P., Bernard O., Simonin J.P., DurandVidal S., Barthel J., Blum L., Charge transport in polyelectrolyte solutions, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100** (1996), 738-747.
- Ulman A., *An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly*, Academic Press Boston (1991).
- Unger E., Die Erzeugung dünner Schichten: Das PECVD-Verfahren: Gasphasenabscheidung in einem Plasma, *Chemie in unserer Zeit* **3** (1991), 148-158.
- Wallace R.W., DNA on a chip: serving up the genome for diagnostics and research, *Molec. Med. Today* **3** (1997), 384-389.
- Wang J., Chen Q., Microfabricated phenol biosensors based on screen printing of tyrosinase containing carbon ink, *Anal. Letters* **28** (1995), 1131-1142.
- Watson J.D., Crick F.H.C., Molecular structure of nucleic acids, *Nature* **171** (1953), 737-738.
- Whitesides G.M., Laibinis P.E., Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces: Self-assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface, *Langmuir* **6** (1990), 87-96.
- Winklmaier M., Weller M.G., Mangler J., Schlosshauer B., Niessner R., Development of a high sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides, *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997), 614-622.
- Wood S.J., DNA-DNA hybridization in real time using BIAcore, *Microchem. J.* **47** (1993), 330-337.
- Woodbury R.G., Wendin C., Clendenning J., Melendez J., Elkind J., Bartholomew D., Brown S., Furlong C.E., Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniature integrated surface plasmon resonance sensor, *Biosens. & Bioelectronics* **13** (1998), 1117-1126.
- Yalow R.S., Berson S.A., Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *J. Clin. Invest.* **39** (1960), 1157-1175.

-
- Yang M.S., Kong R.Y.C., Kazmi N., Leung A.K.C., Covalent immobilization of oligonucleotides on modified glass/silicon surfaces for solid-phase DNA hybridization and amplification, *Chemistry Letters*, (1998), 257-258.
- Yang X., Johnson S., Shi J., Holesinger T., Swanson B., Polyelectrolyte and molecular host ion self-assembly to multilayer thin films: An approach to thin film chemical sensors, *Sens. & Actuators B* **45** (1997), 87-92.
- Zhang Y., Coyne M.Y., Will S.G., Levenson C.H., Kawasaki E.S., Single-base mutational analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.* **19** (1991), 3929-3934.
- Xue M.D., Haruyama T., Kobatake E., Aizawa M., Electrochemical luminescence immunosensor for alpha-fetoprotein, *Sens. & Actuators B* **36** (1996), 458-462.

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer
Ac	Acetylrest (HOAc = Essigsäure)
ACA	Atrazincapronsäure
ADA	12-Aminododekansäure
AE	Aktivester
AG	Antigen
AHA	6-Aminohexansäure
AK	Antikörper, s.a. PAK, MAK
AKB	Antikörper-Bindungsstellen (IgG hat zwei je Antikörper)
ANB	5-Azido-2-nitrobezoessäure
ATR	Atrazin
ATR-MAK _{K4e7}	monoklonaler Antikörper gegen Atrazin(capronsäure), Stamm K4e7
ATR-PAK	polyklonaler Antikörper gegen Atrazin(capronsäure)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
<i>c</i>	Konzentration
<i>CE</i>	von engl. coating-excess, stöchiometrisches Verhältnis von immobilisiertem Antigen zu Antikörper
<i>CE_{eff}</i>	effektiver <i>CE</i> -Wert nach Gl. 40
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff, s.Kap.3.6.1, S.74
DESACA	Desisopropylatrazincapronsäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDC	N-Ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimid-Hydrochlorid
FAB	monovalentes Antikörperfragment („fragment antibody“)
FIA	Fließ-Injektions-Anlage oder -Analyse
FIA	Fluoreszenz-Immunoassay
FRET	Fluoreszenzbasierter Resonanter Energie Transfer
GOPTS	3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan
HTS	High Throughput Screening
HV	Hochvakuum

IgG	Immunglobulin G
LIBRARIAN	BMBF-Projekt, Leitstruktur-Identifikation in komplexen Bibliotheken über Rezeptur-Affinitäts-Reaktionen in parallelen Analysesystemen, Förderkennzeichen 0310995
LINDAU	BMBF-Projekt, Laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion auf mikrostrukturierten Probenträgern für die Analytik im Umweltbereich, Förderkennzeichen 16 SV 541/6
LSR200	Fluoreszenzleser für Mikrotiterplatten
LS50B	Fluoreszenzspektrometer für Küvetten
MAK	monoklonaler Antikörper
MES	Mercaptoethylsulfonat
MTP	Mikrotiterplatte
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTP	Nanotiterplatte
OF	Oberfläche
OSD	optische Schichtdicke (Brechungsindex mal Schichtdicke)
OVA	Ovalbumin
PAH	Polyallylamin Hydrochlorid
PAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatpuffer („phosphate buffered saline“)
PE	Polyelektrolyt
PEI	Polyethylenimin
pSA	Polystreptavidin
PSFIA	Phasenseparations-Fluoreszenz-Immunoassay
PSS	Polystyrolsulfonat
PVS	Polyvinylsulfat
RET	Resonanter Energie Transfer
RIANA	EU-Projekt River Analyser, Förderkennzeichen ENV4-CT95-0066
RIfS	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie
RT	Raumtemperatur
SIM	Simazin
SIM-PAK	polyklonaler Antikörper gegen Simazin
t-BSA-Bi	thermisch behandeltes Rinderserumalbumin-Biotin-Konjugat
TMP	Testmittelpunkt
UHV	Ultrahochvakuum
WW	Wechselwirkung
ZABA	Atrazinbenzoesäure

7.2 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

- I. Stemmler, A. Brecht, G. Gauglitz, Compact SPR-transducers with spectral readout for biosensing applications, *Sensors & Actuators B*, 54 (1999), 98-105.
- I. Stemmler, M. Sauer, G. Gauglitz, A. Brecht, Covalent immobilisation of DNA-microspots by ink-jet printing, submitted (1999).
- M. Sauer, A. Brecht, K. Charisse, I. Stemmler, G. Gauglitz, E. Bayer, Interaction of chemically modified antisense oligonucleotides with sense DNA: a label free interaction study, *Anal. Chem.*, 71 (1999), 2850-2857.
- M. Steinwand, A. Brecht, I. Stemmler, G. Gauglitz, Quantitative Bestimmung von Analyten in einem heterogenen System, Patent P19903576.8 (1999).
- G. Gauglitz, A. Brecht, H.-M. Haake, M. Rothmund, M. Sauer, U. Schobel, A. Schütz, I. Stemmler, Array configurations based on read-out techniques, *SPIE*, 3570 (1998), 80-86.
- A. Brecht, R. Burckardt, J. Rickert, I. Stemmler, A. Schütz, S. Fischer, T. Friedrich, G. Gauglitz, and W. Göpel, Transducer-Based Approaches for Parallel Binding Assays in HTS, *J. Biomol. Screen.*, 1 (1996), 191-201.

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, G. Gauglitz, J. Gelinek, W. Göpel, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, B. Koppenhöfer, D. Krug, E. Lindner, I.-P. Lorenz, U. Nagel, W. Nakel, H. Pauschmann, D. Oelkrug, G. Pausewang, H. Pommer, H. Oberhammer, D. Oelkrug, B. Rieger, V. Schurig, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle.