

Validierung und Assayimplementierung im Rahmen der Entwicklung eines neuen optischen Biosensorsystems für die medizinische Diagnostik

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Markus Ehni
aus Filderstadt

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

27.06.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Udo Weimar

Meiner Mutter

Danksagung

Nach all den Jahren ist es an der Zeit mich bei einigen Menschen zu bedanken.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz bedanken. Für die Ermöglichung dieser Arbeit, auch der Freiheit eigene Ansätze in Forschung und Lehre verfolgen zu können und die Unterstützung dabei. Auch für die vielen Gelegenheiten der Teilnahme an Projekttreffen, sowie Tagungen und Konferenzen in aller Welt danke ich Ihm.

Bei Herrn Prof. Dr. Udo Weimar möchte ich mich für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Dipl. Chem. Nina Schweizer und Dr. Goran Marcovic möchte ich für Ihre gute Laune, moralische Unterstützung und alle Vorschläge danken. Allen Kollegen mit denen ich ein Büro teilen durfte, Dr. Nina Käppel, Dr. Christiane Albrecht, Dr. Peter Fechner, Dipl. Chem. Oliver Bleher und Dr. Günter Proll, danke ich für die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen und die gute Arbeitsatmosphäre. Dr. Lothar Leidner möchte ich für die Hilfe bei mathematischen Fragestellungen danken. Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Florian Pröll, Dipl. Chem. Johannes Riedt, Alexander LeBlanc, Dominik Furin und Melanie Ewald dafür dass ich sie als nette Kollegen kennenlernen durfte. Allen aktuellen und früheren Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die Gemeinschaft, die allzeitige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Meinen Hiwis, vor allem Lorenz Dietzsch danke ich für die sorgfältige Präparation der vielen hundert Transducer für diese Arbeit.

Ich möchte mich bei den vielen CARE-MAN Projektpartnern für die gute Zusammenarbeit bedanken. Innerhalb der Arbeitsgruppe bei Dipl. Biol. t.o. Barbara Schwarz für die Hilfe beim Spotten, Dr. Christiane Albrecht für die Vorarbeiten und die Unterstützung bei den verschiedenen Assays, Dr. Nina Käppel und Dr. Manuela Reichert für die gute Zusammenarbeit und den Zusammenhalt. Außerhalb der Arbeitsgruppe allen voran bei Dr. Joachim Kaiser (SIEMENS, Erlangen) für die wirklich gute und nette langjährige Zusammenarbeit und die Arbeit an FABIAN. Bei Dr. Andreas Breidenassel (damals SIEMENS, Erlangen), M. Sc. Fabricio de Carvalho Ferreira (SIEMENS, Erlangen) und Dr. Cornelia Hänel (damals BIT Analytical Instruments, Schwalbach) möchte ich mich für die viele Programmierarbeit und die Arbeit an FABIAN bedanken. Dr. Milan Fránek (Veterinary Research Institute, Brno, Tschechien) und Dr. František Škrob (EXBIO, Prag, Tschechien) danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen Antikörper. Prof. Dr. Lars Baltzer (University of Uppsala, Schweden) für die Bereitstellung der Scaffolds. Dr. Helen McEvoy (damals Dublin City University, Irland) danke ich für die Überlassung des Protokolls für die Präparation der Polyelektrolytmultischichten und die viele hilfreichen Ratschläge.

Mein Dank gilt auch den Geldgebern der interessanten Projekte in denen ich mitarbeiten durfte. Für diese Arbeit danke ich somit der Europäischen Union für die Finanzierung des Projektes CARE-MAN (NMP-CT-2006-017333). Mein Dank gilt auch der GDCh, besonders der Fachgruppe Analytische Chemie, für den Einblick und die Stipendien, die vieles möglich machten.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Familie. Meiner Mutter danke ich für die Unterstützung jeglicher Art und den Rückhalt in allen Lebenslagen. Ebenso danke ich meinen Großeltern, Christina und allen anderen Wellsteins. Steffi, dir danke ich dafür dass Du immer da warst. Danke für die fachliche und vor allem moralische Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit. Danke für den Rückhalt und die Kraft, die Du mir gegeben hast in meinem Leben und danke für das schönste Lächeln der Welt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 Optische Grundlagen	3
2.1.1 Photophysikalische Prozesse	3
2.1.2 Lumineszenz	5
2.1.3 Fluoreszenz	6
2.1.4 Chemilumineszenz	8
2.1.5 Totalreflexion und evaneszentes Feld	9
2.1.6 TIRF - Fluoreszenzanregung mit innerer Totalreflexion	14
2.2 Chemische und biochemische Grundlagen	15
2.2.1 Wechselwirkungskräfte	15
2.2.2 Polyelektrolyte	17
2.2.3 Prinzip eines Festphasen-Immunoassays	21
2.3 Evaluierung	24
2.3.1 Kenngrößen	24
2.3.2 Kalibrierfunktionen	32
2.3.3 Empfehlungen für Methodvalidierung	37
3. MATERIAL UND METHODEN	41
3.1 Verwendete Geräte und Aufbauten	41
3.1.1 Allgemeine Geräte	41
3.1.2 Spotter	41
3.1.3 TIRF-Biosensorsystem	42
3.1.4 RfS	51
3.2 Transducer	53
3.2.1 TIRF-Transducer	53
3.2.2 CL-Transducer	54
3.2.3 RfS-Transducer	54
3.3 Software	55
3.4 Chemikalien	56
3.4.1 Analyte, Derivate und Antikörper	56
3.4.2 Verbrauchsmaterialien	57
3.4.3 Lösungen und Puffer	57
3.5 Präparation	58
3.5.1 Oberflächenchemie	58
3.6 Auswertung	63

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	65
4.1 Systemcharakterisierung	65
4.1.1 Messwerterfassung	65
4.1.2 Einflussgrößen auf die Messwerterfassung: Laserintensität und Integrationszeit	67
4.1.3 Hintergrund und Rauschen	70
4.1.4 Einfluss der Fluidik	73
4.2 Fluoreszenzmessungen Neopterin	74
4.2.1 RfS-Messungen	75
4.2.2 Methodvalidierung – Messungen auf einem Transducer	76
4.2.3 Methodvalidierung – Messungen auf mehreren Transducern	101
4.3 Fluoreszenzmessungen mit CRP	108
4.3.1 Methodvalidierung – Messungen auf einem Transducer	109
4.4 Immobilisierungsstrategien auf Kunststoffoberflächen	115
4.4.1 Polyelektrolytmultischichten	115
4.4.2 Polyelektrolytmultischichten und Aminodextran auf Glastransducern	116
4.4.3 Polyelektrolytmultischichten und Aminodextran auf Kunststofftransducern	121
4.5 Chemilumineszenzmessungen Neopterin	127
4.5.1 Methodvalidierung – Messungen auf einem Transducer	128
4.6 Zusammenfassung der Neopterinmessungen	134
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	135
6. LITERATUR	139
7. ANHANG	145
7.1 Abkürzungen	145
7.2 Veröffentlichungen	147
7.2.1 Publikationen	147
7.2.2 Vorträge	148
7.2.3 Poster	148
7.3 Akademische Lehrer	150

1. Einleitung

Heutige quantitative Labor-Routineanalytik wird maßgeblich mit den klassischen Analysemethoden durchgeführt, wie z.B. den chromatographischen-, spektroskopischen und elektrochemischen Analyseverfahren [1]. Diese haben sich im Laufe der Zeit bewährt, wurden auch immer weiter entwickelt und den Erfordernissen angepasst. Allerdings gibt es auch einige Einschränkungen bei diesen Verfahren. Eine qualitative Bestimmung des Analyten ist bei den chromatographischen Verfahren meist nur über die Retentionszeiten, also indirekt, möglich, außer die chromatographische Methode wird mit anderen Methoden, wie der Spektroskopie, der MS- oder NMR-Technik kombiniert. Bei sehr komplexen Gemischen ist es in der Spektroskopie nahezu unmöglich einen Analyten ohne vorherige Prozessierung der Probe qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Auch bei den elektrochemischen Methoden ist bei komplexen Matrices meist eine Limitierung gegeben [2]. All diese Methoden profitieren im Regelfall nicht von einer hochselektiven und affinen Analyterkennung. Mittels der immunochemischen und anderer, auf Biomolekülen basierenden Verfahren, die auf hochselektiver und -affiner Erkennung basieren, können ganz gezielt bestimmte Analyten aus komplexen Gemischen qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden [3]. In Kombination mit den elektrochemischen oder spektroskopischen Verfahren wurde so das Feld der Biosensoren in der Analytik erschlossen. Die Sensorik ist somit eine Kombination von verschiedenen Verfahren, die die Vorzüge der einzelnen Methoden vereint.

Vollautomatisierte Biosensoren werden bereits in der Umwelt- und medizinischen Analytik eingesetzt, allerdings eher als Nischenprodukt [4]. Im medizinischen Bereich ist seit einigen Jahren der Trend festzustellen, dass kleinere Labore zugunsten größer und damit effektiveren und kostengünstigeren Laboren geschlossen werden. Damit wird abseits der medizinischen Ballungszentren die „Turnaroundtime“, die Zeit, die von der Probenahme bis zum Erhalt des Messergebnisses verstreicht, teils drastisch verlängert. Im Falle einer Sepsis kann dies fatale Folgen für den Patienten haben. Daher erscheinen immer mehr Point-of-Care-Geräte (POC) auf dem Markt, die direkt am Patienten, in diesem Falle einer Arztpraxis oder einem kleinem Labor, eingesetzt werden können. Diese Geräte müssen vom Personal nach kurzer Schulung und ohne tiefere Kenntnisse bedienbar, verhältnismäßig günstig in der Anschaffung und im Betrieb sein und die Turnaroundtime sollte sehr kurz sein.

Geräte für die Messung des Blutzuckerspiegels oder auch blutgerinnungshemmender Medikamente wie Macumar® sind bereits bis zum Einsatz vom Patienten selber vorgedrungen [5]. Auf dem Gebiet der Entzündungsparameter, im Drogenscreening und auch zur Messung kardialer Marker sind daher verstärkte Bemühungen in entsprechender Richtung auf dem Markt und in der Forschung zu beobachten.

Das von der EU geförderte Projekt CARE-MAN (NMP4-CT-2006-017333) verfolgte genau dieses Ziel. Mittels optischer Biosensoren in Kombination mit Affinitätsreaktionen sollten Analysegeräte für die medizinische POC-Diagnostik entwickelt werden. Im Rahmen dieses Projektes sind der in dieser Arbeit vorgestellte optische Biosensor mit Lumineszenzdetektion und die eigens dafür entwickelten Assays entstanden. Als Analyten wurden das CRP (C-reaktives Protein), ein Routineparameter für Entzündungen, und das Neopterin, ebenfalls ein Entzündungsparameter, der nicht in der Routinediagnostik bestimmt wird, ausgewählt. Neopterin ist auch als Marker für verschiedene Langzeitbeobachtungen, wie z.B. für den kardialen Status oder bei HIV-Infizierten, in der Diskussion.

Um den Erfordernissen der Zeit gerecht zu werden, wurde eigens eine neue, universelle Oberflächenmodifikationsstrategie aus der Kombination von Polyelektrolyten und klassischen Biopolymeren entwickelt, um die Assays auf verschiedenen Transducermaterialien, auch inerten Kunststoffen, die billig in der Massenproduktion sind, zu etablieren. Desweiteren wird die allgemeine Leistungsfähigkeit des Sensors aufgezeigt, sowohl Fluoreszenz- als auch Chemilumineszenzmessungen durchzuführen.

Ein Problem beim Vergleich verschiedener analytischer Methoden besteht oft darin, eine gemeinsame Bewertungsgrundlage zu finden. Bei den klassischen Analysemethoden ist dies zum Teil durch ISO/DIN Normen streng reglementiert [6; 7; 8]. Bestimmte Verfahren, wie zum Beispiel die Erstellung einer Kalibrierung oder auch die Bestimmung von Kenngrößen, welche Grenzbereiche der Methode aufzeigen wie die Bestimmungs-, Nachweis- und Erfassungsgrenze, sind strikt vorgegeben. Damit sind Ergebnisse mit verschiedenen statistischen Zusatzinformationen verfügbar und auch direkt vergleichbar. Eine gute Analytik zeichnet zudem aus, dass zusätzlich noch andere Faktoren außer den statistischen und vorgegebenen Richtlinien in das Analyseergebnis einfließen und als Unsicherheit zusammengefasst werden.

Sobald man das Feld der Affinitätsanalytik mittels Biomolekülen betritt, kann aber ein Problem entstehen. Bereits das Erstellen einer sinnvollen Kalibrierfunktion nach den bekannten Richtlinien, die fast ausschließlich von einem linearen Verhalten zwischen Messgröße und Gehalt ausgehen, kann Probleme bereiten. Oft werden sigmoidale Signalverläufe beobachtet, die mit einer linearen Funktion oder dahin führenden mathematischen Transformationen nur unzureichend das Leistungspotential der Methode beschreiben. Damit wird auch die Bestimmung der Kenngrößen erschwert. Es gibt einige Richtlinien und Hinweise, wie mit diesen sigmoidalen Signalverläufen verfahren werden soll, allerdings existiert bis heute in der Forschung kein anerkanntes Standardwerk zur Auswertung dieser Ergebnisse.

In dieser Arbeit wird anhand der Richtlinien der Eurachem und Richtlinien amerikanischer, zum Teil weltweit anerkannter Behörden, eine allgemeine Methodvalidierung, die die Selektivität, Richtigkeit, Präzision, Wiederfindungsrate und Stabilität überprüft, durchgeführt [9; 10]. Desweiteren werden in Wissenschaft und Forschung gängige Kalibrierfunktionen und Kenngrößen bestimmt, um die Vergleichbarkeit, Anwendbarkeit und Aussagekraft der verschiedenen Größen aufzuzeigen. Auf dieser Validierung beruht auch der Schwerpunkt dieser Arbeit, da damit auch die Entwicklung des Biosensors und den dafür entwickelten chemischen Grundlagen, die den Hauptteil des praktischen wissenschaftlichen Teils dieser Arbeit ausmachen, dargestellt und bewertet werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Optische Grundlagen

2.1.1 Photophysikalische Prozesse

Trifft ein Photon auf ein Atom bzw. Molekül können bestimmte Photon-Materie-Wechselwirkungen stattfinden. Bei der elastischen Streuung wird das Photon gestreut ohne seine Energie zu ändern bzw. die Energieänderung ist sehr klein. Dieser Effekt wird auch Thomson-Streuung genannt. Bei der Rayleigh-Streuung, einem Spezialfall der elastischen Streuung, die auftritt wenn die Wellenlänge des Photons größer ist als die Wellenlänge des Teilchens, ist die Streuwahrscheinlichkeit proportional zu λ^{-4} . Daher wird Licht größerer Wellenlänge weniger gestreut als energiereicheres Licht kleinerer Wellenlänge. Als Beispiele für inelastische Streuung können die Stokes-Raman-Streuung und die Anti-Stokes-Raman-Streuung aufgeführt werden. Hierbei handelt es sich um Streuprozesse, bei denen ein Elektron angeregt wird und unter Aussendung eines energieärmeren oder energiereichen Photons wieder in einen energetisch günstigeren Zustand relaxiert. Die Prozesse der Resonanzabsorption und spontanen Emission werden später noch eingehend behandelt. Bei der stimulierten Emission wird durch Wechselwirkung mit dem elektromagnetischen Feld des Photons ein angeregtes Elektron zur Relaxation stimuliert, wobei ein Photon abgegeben wird. Die Energie des einfallenden Photons wird dabei nicht verändert. Ist die Energie des einfallenden Photons größer als die Ionisierungsenergie kann ein Elektron emittiert werden. Beim äußeren photoelektrischen Effekt geschieht dies im Gegensatz zur Compton-Streuung ohne Emission eines Photons. Desweiteren können auch photochemische Reaktionen nach Anregung eines Teilchens erfolgen bzw. ein Energietransfer auf ein anderes Teilchen stattfinden [11]. Die photophysikalischen Prozesse, die zu Lumineszenzerscheinungen, genauer Fluoreszenz, Phosphoreszenz und auch Chemilumineszenz führen, werden im folgenden Jablonski Termschema dargestellt.

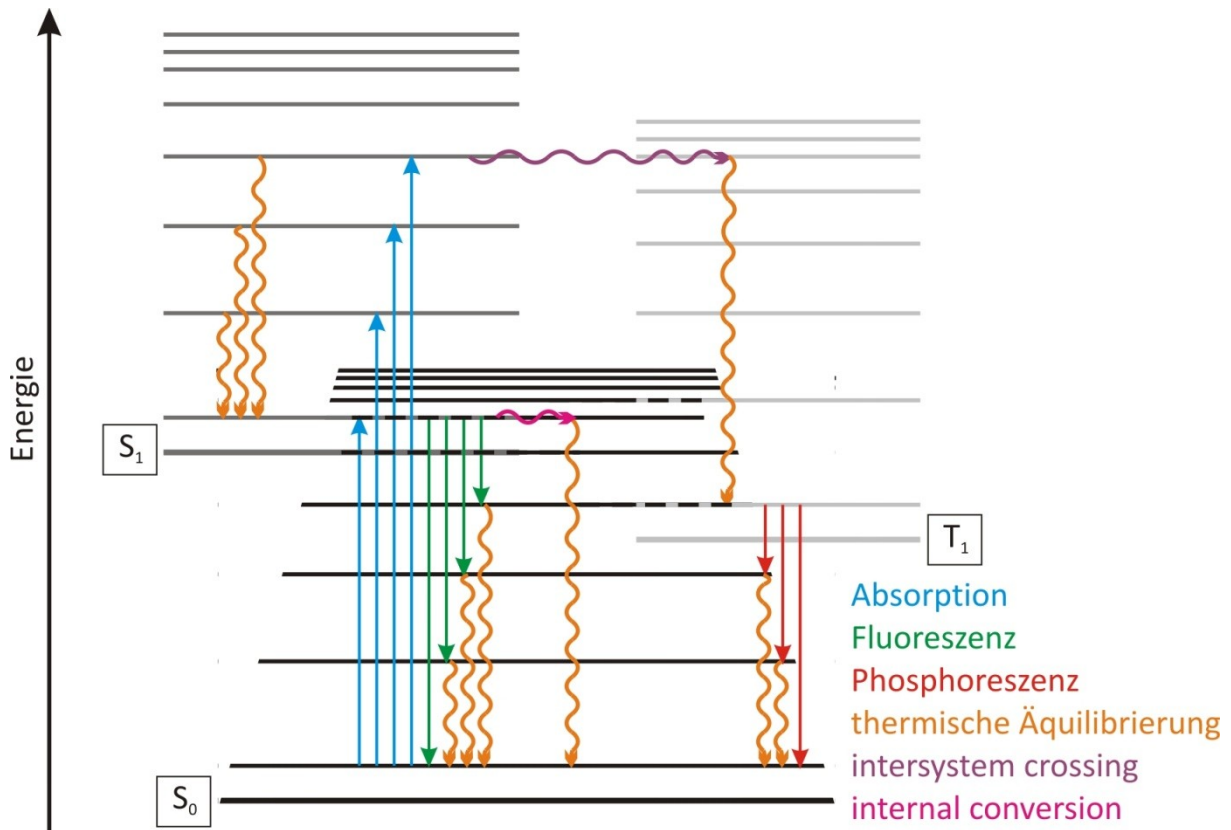


Abbildung 1: Das Jablonski Termeschema zeigt mögliche photophysikalische Prozesse nach Anregung (Absorption) vom Singulettgrundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand. Bei diesen Prozessen handelt es sich im einzelnen um Fluoreszenz, Phosphoreszenz, thermischer Äquilibrierung, das Intersystem Crossing und die Internal Conversion. Bei den zusätzlich zu den elektronischen Niveaus S_0 , S_1 und T_1 eingezeichneten Niveaus handelt es sich um Schwingungszustände.

Nach Resonanzabsorption in einen Schwingungszustand des ersten angeregten Singulettzustands findet im Regelfall thermische Äquilibrierung (te), d.h. strahlungslose Desaktivierung, in den Schwingungsgrundzustand des S_1 -Zustands statt oder eine isoenergetische Interkombination (engl: intersystem crossing, isc) mit anschließender te in den Schwingungsgrundzustand des Triplettzustands T_1 . Von den Schwingungsgrundzuständen der elektronisch angeregten Zustände kann dann unter Photonenaussendung in einen Schwingungszustand des S_0 -Niveaus relaxiert werden. Im Anschluss erfolgt te in einen energetisch günstigen Zustand. Die Relaxation mit Photonenemission zwischen den Singulettzuständen bezeichnet man als Fluoreszenz, zwischen Triplet und Singulettzustand als Phosphoreszenz. Da bei der Phosphoreszenz eine Spinumkehr stattfinden muss, um den Übergang von einem Triplet in einen Singulettzustand zu ermöglichen, und dieser Übergang quantenmechanisch verboten ist, d.h. mit nur sehr geringer Wahrscheinlichkeit stattfindet, ist die Lebensdauer des Triplettzustandes bedeutend länger als die eines angeregten Singulettzustands. Dadurch ist auch die Phosphoreszenz, im Gegensatz zur Fluoreszenz, ein relativ langlebiger Prozess. Aus einem angeregten Singulettzustand kann auch durch innere Umwandlung (engl: internal conversion, ic) in einen hohen Schwingungszustand des niedrigeren Singulett-niveaus gewechselt und durch te strahlungslos Energie abgebaut werden [12]. In Tabelle 1 sind die kinetischen Zusammenhänge dieser Prozesse zusammengefasst.

Prozess	Reaktion	Reaktionsgeschwindigkeit	Zeitintervall [s]
Absorption	$S_0 + h\nu \xrightarrow{k_a} S_1$	$k_a * [S_0]$	10^{-15}
Fluoreszenz	$S_1 \xrightarrow{k_f} S_0 + h\nu$	$k_f * [S_1]$	$10^{-9} - 10^{-7}$
Phosphoreszenz	$T_1 \xrightarrow{k_p} S_0 + h\nu$	$k_p * [T_1]$	$10^{-4} - 10^2$
Thermische Äquilibrierung	$S_x \xrightarrow{k_{te}} S_{x-1} + \text{Energie}$ $S_{x(v_y)} \xrightarrow{k_{te}} S_{x(v_{y-1})} + \text{Energie}$ und weitere	vielfältig	$10^{-14} - 10^{-12}$
Intersystem crossing	$S_1 \xrightarrow{k_{isc(S)}} T_1$ bzw. $T_1 \xrightarrow{k_{isc(T)}} S_1$	$k_{isc(S)} * [S_1]$ bzw. $k_{isc(T)} * [T_1]$	$10^{-8} - 10^{-3}$
Internal conversion	$S_1 \xrightarrow{k_{ic}} S_0$	$k_{ic} * [S_1]$	$10^{-13} - 10^{-10}$

Tabelle 1: Hier werden die kinetischen Zusammenhänge der möglichen photophysikalischen Prozesse des Jablonski Termschemas aus Abbildung 1 zusammengefasst. k ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz. Die Daten sind entnommen aus [12; 13]

2.1.2 Lumineszenz

Unter Lumineszenz versteht man die spontane Lichtemission aus angeregten Zuständen. Man unterscheidet eine Vielzahl von lumineszenten Reaktionen anhand der zugeführten Anregungsenergie, wie z.B. Bio-, Photo-, Chemo-, Elektrochemilumineszenz und zahlreiche weitere Arten. Allgemein ist die Lumineszenzreaktion nicht sehr häufig anzutreffen, da andere Reaktionen, z.B. thermische Äquilibrierung meist eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen und daher schneller zur Relaxation in einen energetisch stabileren Zustand führen. Begünstigt werden Lumineszenzreaktionen durch Einschränkung der „Bewegungsfreiheit“ von Molekülen, erreichbar durch eine Änderung des Aggregatzustands, Verwendung viskoser Flüssigkeiten als Lösungsmittel oder durch Temperaturniedrigung, aber auch bei einer gewissen Starrheit des molekularen Aufbaus [14]. In dieser Arbeit werden hauptsächlich die Fluoreszenz (eine Art der Photolumineszenz) von Dy-647, siehe Abbildung 2, wie auch die Chemolumineszenz von Luminol, siehe Kapitel 2.1.4, genutzt, die im Folgenden betrachtet werden.

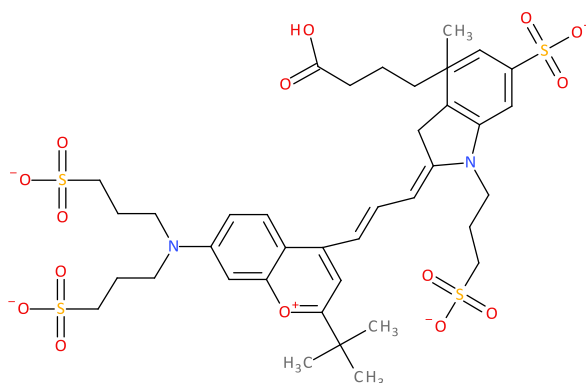


Abbildung 2: Struktur des Fluoreszenzmarkers Dy-647.

2.1.3 Fluoreszenz

Grundlegende Eigenschaften der Fluoreszenz wurden bereits in Kapitel 2.1.1 diskutiert. Eine wichtige Kenngröße für fluoreszierende Teilchen ist die Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_f . Sie ist definiert nach

$$\Phi_f = \frac{N_f}{N_a} = \frac{I_f}{I_a}, 0 \leq \Phi_f \leq 1 \quad (2.1)$$

N_f bzw. a Anzahl emittierter (f) bzw. absorbierter (a) Photonen

I_f bzw. a Lichtintensität emittierter (f) bzw. absorbierter (a) Photonen

Eine weitere Definition der Quantenausbeute ergibt sich aus kinetischen Betrachtungen als

$$\Phi_f = \frac{\tau_f}{\tau} \quad (2.2)$$

τ tatsächliche Lebensdauer

τ_f Fluoreszenzlebensdauer

Bei der Fluoreszenzlebensdauer wird die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenzreaktion k_f betrachtet:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f} \quad (2.3)$$

Für die tatsächliche Lebensdauer müssen alle Prozesse, die zu einer Änderung des strahlenden Moleküls führen einbezogen werden.

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_{isc}^s + k_{ic} + k_q + k_{res}} \quad (2.4)$$

k_q Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Quenching-Reaktion

k_{res} Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des resonanten Energietransfers

Je größer die Quantenausbeute, desto mehr absorbiertes Licht wird auch wieder emittiert, infolgedessen sind hohe Quantenausbeuten wünschenswert. Um einen Zusammenhang zwischen gemessener Fluoreszenzintensität und Konzentration bei statischen Fluoreszenzmessungen herzustellen, d.h. bei kontinuierlicher Anregung mit monochromatischem Licht, kann Gleichung (2.1) auch geschrieben werden als

$$I_f = \Phi_f * I_a \text{ bzw. } I_f = \Phi * (I_0 - I_t) \quad (2.5)$$

I_0 eingestrahlte Lichtintensität

I_t transmittierte Lichtintensität

Unter Einbeziehung des Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetzes

$$I_a = (I_0 - I_t) = I_0 \left(1 - e^{-a(\lambda) * c * d}\right) \quad (2.6)$$

$a(\lambda)$ Extinktionskoeffizient oder auch Absorptionskoeffizient

c Konzentration

d durchstrahlte Weglänge

ergibt sich aus Gleichung (2.5)

$$I_f = \Phi * I_0 \left(1 - e^{-a(\lambda) * c * d}\right) \quad (2.7)$$

Es ist ersichtlich, dass keine lineare Abhängigkeit zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration gegeben ist, allerdings resultiert eine Erhöhung der Anregungsintensität auch in einer gesteigerten Fluoreszenzintensität. Daher ist es von Vorteil bei der Verwendung der Fluoreszenz bzw. Fluoreszenzmarkern zur Quantifizierung mit hohen Lichtintensitäten zu arbeiten. Es werden meist Laser zur Anregung verwendet. Für stark verdünnte Lösungen, bei denen der Exponent der Exponentialfunktion klein ist, gilt exakt:

$$e^x = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{x^n}{n!} \quad (2.8)$$

bzw. genähert

$$e^x \approx 1 + x \quad (2.9)$$

und damit

$$I_f = \Phi * I_0 * a(\lambda) * c * d \quad (2.10)$$

Durch Umformen des natürlichen Logarithmus in den dekadischen ergibt sich das nach dem Entdecker benannte Parker Gesetz

$$I_f = 2,303 * \Phi * I_0 * \varepsilon(\lambda) * c * d \quad (2.11)$$

$\varepsilon(\lambda)$ molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bzw. dekadischer Absorptionskoeffizient

Gleichung (2.11) sagt somit für stark verdünnte Lösungen einen linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration voraus. Üblicherweise wird deshalb in einem Extinktionsbereich von $\varepsilon(\lambda) * c * d \leq 0,01$ gemessen. Es gilt allerdings zu bedenken, dass dies nur für störungsfreie Systeme ohne Fluoreszenzquenching gilt. Für die dynamische Fluoreszenzmessung, wie auch bei der Anwendung auf Bioassays kann das Gesetz nicht angewendet werden, da hier noch die Fluoreszenzlebensdauern und biomolekulare Interaktionen der Moleküle berücksichtigt werden müssen und somit kein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität gegeben ist [12; 15; 16].

2.1.4 Chemilumineszenz

Bei der Chemilumineszenz tritt infolge einer exergonen Reaktion, deren Temperatur unter der Temperatur des thermischen Leuchtens liegt (ca. 450 °C), elektromagnetische Strahlung auf. Viele für in der Analytik verwendete Chemilumineszenzsysteme emittieren im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Mit Hilfe der Einsteinschen Gleichung

$$E = h \cdot \nu \quad (2.12)$$

E Energie

und

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2.13)$$

c Lichtgeschwindigkeit im Vakuum

λ Wellenlänge

lässt sich eine nötige Reaktionsenthalpie von 168 kJ/mol – 294 kJ/mol berechnen [17]. Diese wird dann in einem einzigen Reaktionsschritt freigesetzt. In den meisten Fällen befindet sich das Molekül in einem angeregten Singulettzustand. Daher kann die Chemilumineszenz, z.B. in Bezug auf mögliche Konkurrenzreaktionen, ähnlich der Fluoreszenz betrachtet werden, siehe Kapitel 2.1.1 und 2.1.2. Es sind aber auch Systeme bekannt, bei denen Chemilumineszenz aus Triplettzuständen stattfindet. Die Quantenausbeute ist meist sehr gering und gegeben durch

$$\Phi_{CL} = \Phi_p \cdot \Phi_{p^*} \cdot \Phi_f \quad (2.14)$$

Φ_{CL} Chemilumineszenzquantenausbeute

Φ_p Ausbeute an Produkt der Reaktion

Φ_{p^*} Ausbeute an Produkt im angeregten Zustand

Heutzutage wird den meisten Systemen ein „Enhancer“ zugefügt, der die Chemilumineszenzquantenausbeute erhöht, z.B. durch Erhöhung der Ausbeute des Produktes im angeregten Zustand oder durch Stabilisierung bzw. Destabilisierung bestimmter Zwischenstufen. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die infolge eines Resonanzenergietransfers des angeregten CL-Produkts, das als Donor fungiert, fluoreszieren. Für diese sensibilisierte CL lässt sich die Quantenausbeute bestimmen nach

$$\Phi_{CL} = \Phi_p \cdot \Phi_{p^*} \cdot \Phi_{res} \cdot \Phi_{f^*} \quad (2.15)$$

Φ_{res} Energietransfer-Ausbeute

Φ_{f^*} Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptorfluorophors

Bei den in der Analytik eingesetzten CL-Systemen handelt es sich meist um Oxidationsreaktionen mit Sauerstoff oder auch Wasserstoffperoxid. Beispiele hierfür sind das Luciferin/Luciferase- oder das in dieser Arbeit verwendete Luminol-System [18; 19].

Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, Sauerstoff und geeigneten Katalysatoren wie z.B. der Meerrettichperoxidase (HRP) zu 3-Aminophthalat umgewandelt. In der Forensik wird Luminol als Indikator für Blut verwendet, da auch Ein-Elektronen-Akzeptoren, wie sie im Hämoglobin vorliegen, die Reaktion katalysieren. Das Reaktionsschema für den Fall $c(\text{HRP}) < c(\text{H}_2\text{O}_2)$ ist analog [20; 21] in Abbildung 3 dargestellt.

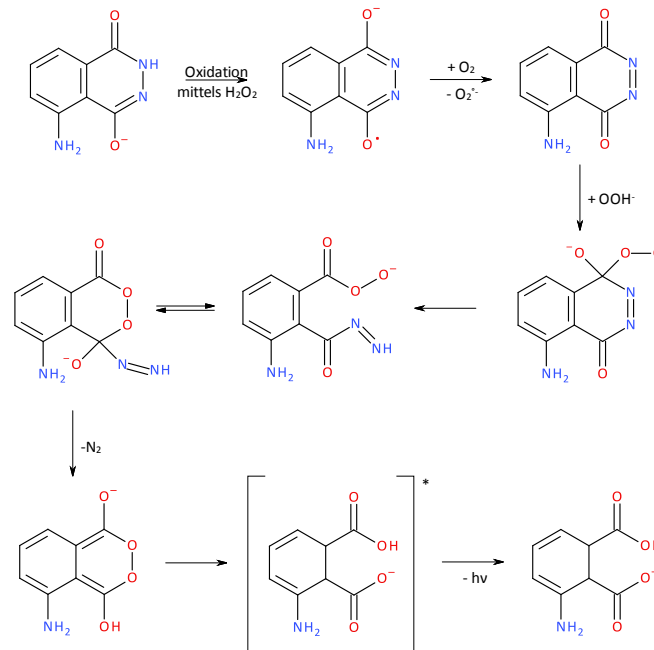


Abbildung 3: Mechanismus der Chemiluminesz von Luminol. Ein intermediär entstehendes α -Hydroxy-hydroperoxid zerfällt in mehreren Reaktionsschritten zum 3-Aminophthalat. Dieses liegt vermutlich im Triplettzustand vor und wird durch isc in den Singulettzustand überführt. Aus dem Singulettzustand kann in protischen Lösemitteln blaues Licht, mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 425 \text{ nm}$, ausgesendet werden. Abbildung analog [20].

Als Enhancer finden Peroxosäuren [20], Natriumchlorid [22], Phenolderivate [23] oder auch Chrom(III)halogenide [13] Verwendung. Die Fluoreszenzquantenausbeute ohne Enhancer liegt bei 1-2 %, mit Enhancer kann die Quantenausbeute versechsfacht werden.

2.1.5 Totalreflexion und evaneszentes Feld

Unter Totalreflexion versteht man die vollständige Reflexion von Licht an der Phasengrenze zweier Stoffe [24]. Trifft ein Lichtstrahl auf eine Phasengrenze, kann er reflektiert oder auch gebrochen (transmittiert) werden. Nach dem Reflexionsgesetz gilt, dass der Lichtstrahl in der Einfallsebene verbleibt und der Einfallswinkel θ_e betragsmäßig gleich dem Ausfallswinkel θ_r ist. Das Brechungsgesetz besagt, dass

$$n_1 \cdot \sin\theta_e = n_2 \cdot \sin\theta_t \quad (2.16)$$

n_1 bzw. n_2 Brechungsindex Medium 1 bzw. 2
 θ_t Winkel des gebrochenen Lichtstrahls

Die Zusammenhänge sind auch grafisch in Abbildung 4 veranschaulicht.

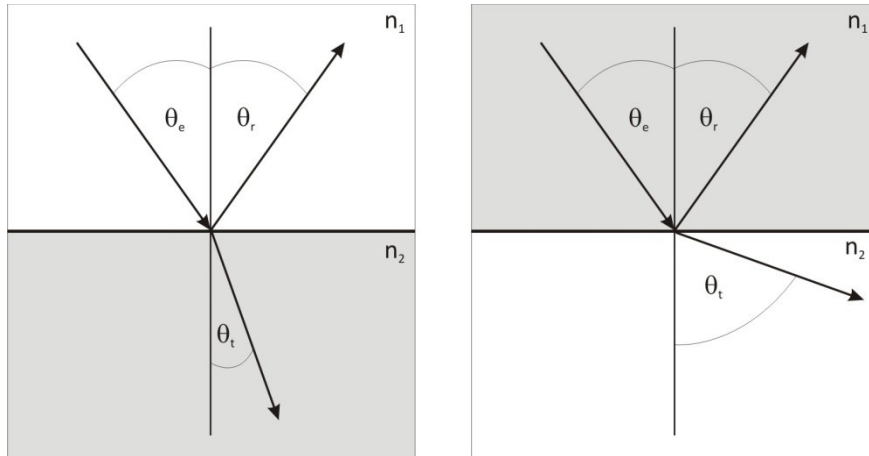


Abbildung 4: Grafische Darstellung des Reflexions- und des Brechungsgesetzes. Auf der linken Seite ist der Fall $n_1 < n_2$ gezeigt, bei dem zum Lot hin gebrochen wird, auf der rechten Seite $n_1 > n_2$, wo der Lichtstrahl vom Lot weggebrochen wird [25].

Betrachtet man nun den Fall $n_1 > n_2$ so wird die Reflektivität $R = 1$ für $\theta_e = \theta_t < 90^\circ$. Der Totalreflexionswinkel (kritischer Winkel θ_{krit}) lässt sich aus dem Snelliusschen Brechungsgesetz nach Gleichung (2.16) mit der Bedingung $\theta_t = 90^\circ$, d.h. der gebrochene Lichtstrahl läuft entlang der Phasengrenzfläche, berechnen. Für den Winkel ergibt sich somit:

$$\theta_e = \theta_{\text{krit}} = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (2.17)$$

Wird $\theta_e > \theta_t$ auf das Snelliussche Brechungsgesetz angewandt, ergeben sich keine Lösungen. Wird allerdings ein komplexer Brechungswinkel angesetzt, dann ergibt sich ein imaginärer Anteil senkrecht zur brechenden Oberfläche. Mit Hilfe der Fresnelschen Gleichungen können nun sowohl die elektrischen, wie auch magnetischen Felder berechnet werden. Eine ausführliche Abhandlung ist in [26] zu finden. Das Ergebnis ist ein gedämpftes elektromagnetisches Feld im optisch dünneren Medium, das sogenannte evaneszente Feld. In Abbildung 5 sind zur folgenden Betrachtung die nötigen elektrischen Feldvektoren dargestellt.

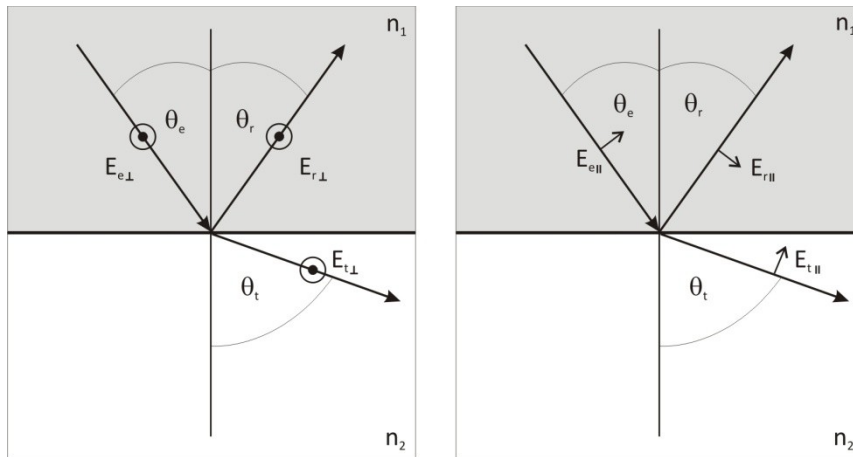


Abbildung 5: Links sind die elektrischen Feldvektoren für senkrechte Polarisation, rechts für parallele Polarisation dargestellt. In beiden Fällen gilt $n_1 > n_2$.

Allgemein gilt aufgrund der Energieerhaltung für die elektrischen Felder E und die magnetischen Felder H für die senkrecht polarisierte Komponente:

$$E_{t\perp} + E_{r\perp} = E_{e\perp} \quad (2.18)$$

Und für parallel polarisiertes Licht:

$$E_{t\parallel} \cos\theta_t + E_{r\parallel} \cos\theta_e = E_{e\parallel} \cos\theta_e \quad (2.19)$$

Für das magnetische Feld im sichtbaren Bereich des Spektrums gilt für die Permeabilität $\mu \approx 1$, und somit vereinfacht sich die Berechnung des Brechungsindex zu

$$n^2 = \varepsilon * \mu \approx \varepsilon \quad (2.20)$$

Für den Zusammenhang von mag. und el. Feld ergibt sich damit

$$|H| = \sqrt{\varepsilon} * |E| = n * |E| \quad (2.21)$$

Mit den Gleichungen (2.18) und (2.19) ergibt sich für das mag. Feld:

$$n_1 * E_{e\parallel} + n_1 * E_{r\parallel} = n_2 * E_{t\parallel} \quad (2.22)$$

und

$$n_1 * E_{e\perp} \cos\theta_e + n_1 * E_{r\perp} \cos\theta_e = n_2 * E_{t\perp} \cos\theta_t \quad (2.23)$$

Aus den gerade erstellten Bedingungen lassen sich nun mit Hilfe der Fresnelgleichungen die Reflektivität R und die Transmission T ableiten.

$$R_{\perp} = |r_{\perp}|^2 = \left| \frac{E_{r\perp}}{E_{e\perp}} \right|^2 = \left| \frac{n_1 \cdot \cos \theta_e - n_2 \cdot \cos \theta_t}{n_1 \cdot \cos \theta_e + n_2 \cdot \cos \theta_t} \right|^2 \quad (2.24)$$

$$R_{\parallel} = |r_{\parallel}|^2 = \left| \frac{E_{r\parallel}}{E_{e\parallel}} \right|^2 = \left| \frac{-n_2 \cdot \cos \theta_e + n_1 \cdot \cos \theta_t}{n_2 \cdot \cos \theta_e + n_1 \cdot \cos \theta_t} \right|^2 \quad (2.25)$$

$$T_{\perp} = \left| \frac{E_{t\perp}}{E_{e\perp}} \right|^2 = \frac{n_2 \cdot \cos \theta_t}{n_1 \cdot \cos \theta_e} \cdot |t_{\perp}|^2 = \frac{n_2 \cdot \cos \theta_t}{n_1 \cdot \cos \theta_e} \cdot \left| \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \theta_e}{n_1 \cdot \cos \theta_e + n_2 \cdot \cos \theta_t} \right|^2 \quad (2.26)$$

$$T_{\parallel} = \left| \frac{E_{t\parallel}}{E_{e\parallel}} \right|^2 = \frac{n_2 \cdot \cos \theta_t}{n_1 \cdot \cos \theta_e} \cdot |t_{\parallel}|^2 = \frac{n_2 \cdot \cos \theta_t}{n_1 \cdot \cos \theta_e} \cdot \left| \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \theta_e}{n_2 \cdot \cos \theta_e + n_1 \cdot \cos \theta_t} \right|^2 \quad (2.27)$$

- r Fresnelkoeffizienten der Reflexion
t Fresnelkoeffizienten der Transmission

Dass sich für Winkel $\theta_e > \theta_t$ angewandt auf das Snelliussche Brechungsgesetz keine Lösungen ergeben wurde bereits erwähnt. Wird der kritische Winkel überschritten gilt:

$$\cos^2 \theta_t + \sin^2 \theta_t = 1 \quad (2.28)$$

$$\cos^2 \theta_t = -(\sin^2 \theta_t - 1) \quad (2.29)$$

$$\cos \theta_t = \pm i \sqrt{(\sin^2 \theta_t - 1)} \quad (2.30)$$

Der Cosinus besitzt somit einen rein imaginären Anteil. Aus (2.16) und (2.17) folgt

$$\sin \theta_t = \frac{\sin \theta_e}{\sin \theta_{\text{krit}}} \quad (2.31)$$

mit (2.30) folgt

$$\cos \theta_t = -i \sqrt{\frac{\sin^2 \theta_e}{\sin^2 \theta_{\text{krit}}} - 1} = -i |\cos \theta_t| \quad (2.32)$$

und damit enthalten die Gleichungen (2.24) bis (2.27) auch einen imaginären Anteil durch $\cos \theta_t$. Bei der Totalreflexion gilt $R = 1$ für R_{\perp} wie auch R_{\parallel} , wohingegen T_{\perp} wie auch T_{\parallel} verschwinden. Schaut man sich die Transmissionskoeffizienten an

$$t_{\perp} = \frac{E_{t\perp}}{E_{e\perp}} = \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \theta_e}{n_1 \cdot \cos \theta_e + i n_2 \cdot |\cos \theta_t|} \quad (2.33)$$

$$t_{\parallel} = \frac{E_{t\parallel}}{E_{e\parallel}} = \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \theta_e}{n_2 \cdot \cos \theta_e + i n_1 \cdot |\cos \theta_t|} \quad (2.34)$$

sind diese durch den imaginären Anteil ungleich Null und somit befindet sich das elektromagnetische Feld auch im optisch dünneren Medium [27].

Nach [26] lässt sich die Feldstärke des evaneszenten Feldes E_{ev} berechnen nach

$$E_{ev} = E_{0t} * \exp(-\beta y) * \exp(ik_{tG}x - i\omega t) \quad (2.35)$$

E_{0t}	Feldstärke an der Grenzschicht
$\exp(-\beta y)$	Dämpfungsterm
$\exp(ik_{tG}x - i\omega t)$	Periodische Welle

Die Einfallsebene bzw. Grenzschicht ist die Ebene, die durch x und y aufgespannt wird. Die zweite e-Funktion beschreibt die periodische Propagation einer Welle ohne Dämpfung in x-Richtung entlang der Grenzschicht. Die erste e-Funktion beschreibt die exponentielle Dämpfung des Feldes in z-Richtung ins optisch dünnere Medium. Es wird also eine quergedämpfte Welle entlang der Grenzschicht beschrieben mit einer Komponente in z-Richtung, die nach dem Eindringen, wenn keine Wechselwirkungen im optisch dünneren Medium stattfinden, wieder vollständig, d.h. ohne Energieverlust ins optisch dichtere Medium übertragen wird. Die vollständige Reflexion, die Totalreflexion, bleibt bei dieser Betrachtungsweise erhalten. In der ausführlichen Beschreibung nach [26] ist die Eindringtiefe in das optisch dünnere Medium d_t abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts, dem Einfallswinkel und den Brechungsindizes der zwei Medien.

$$d_t = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_e - n_2^2}} \quad (2.36)$$

Abbildung 6 verdeutlicht den Zusammenhang.

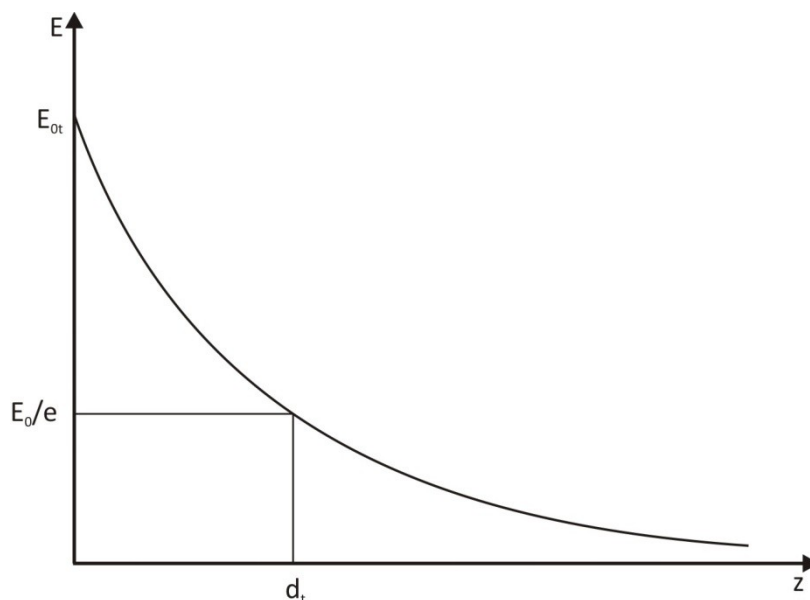


Abbildung 6: Es ist die Abhängigkeit der elektrischen Feldstärke von der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes dargestellt. Bei d_t ist die el. Feldstärke im Vergleich zur el. Feldstärke direkt an der Grenzfläche auf $1/e$ abgesunken.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Eindringtiefen, die immer kleiner sind als die Wellenlänge des verwendeten Lichts, das somit örtlich sehr begrenzt an der Oberfläche lokalisiert ist.

Wellenlänge [nm]	Brechungsindex n_1	Brechungsindex n_2	Kritischer Winkel [°]	Einfallswinkel [°]	Eindringtiefe [nm]
633	1,458 (Glas)	1 (Luft)	43,3	45	402
633	1,458 (Glas)	1 (Luft)	43,3	85	96
633	1,458 (Glas)	1,33 (Wasser)	65,8	85	173

Tabelle 2: Abhängigkeit der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes vom Medium und Einfallswinkel bei einer Wellenlänge von $\lambda = 633$ nm. Die Daten sind entnommen aus [26].

Nach den bisherigen Ausführungen muss Abbildung 4 für den Fall der Totalreflexion neu betrachtet werden, siehe Abbildung 7.

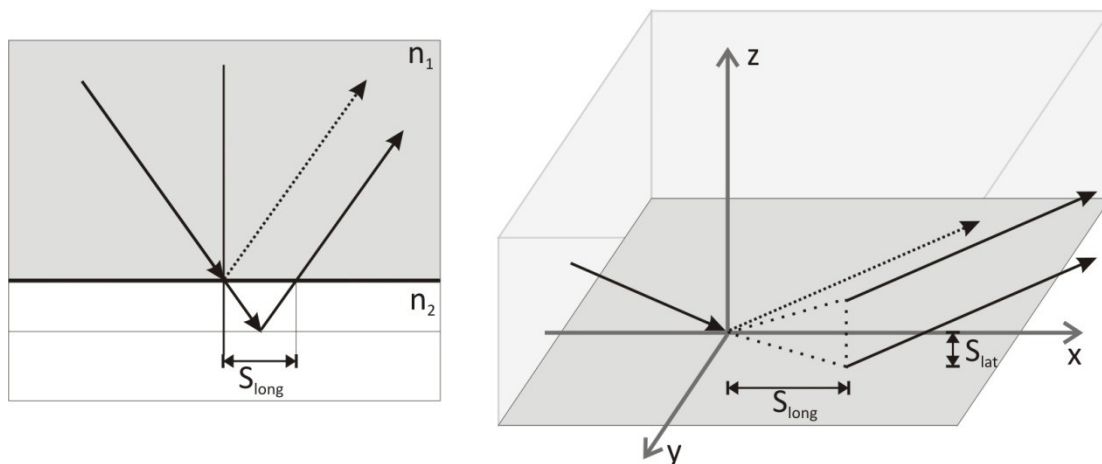


Abbildung 7: Links ist die longitudinale Verschiebung S_{long} , die Goos-Hänchen Verschiebung in einer Seitenansicht auf die zx -Ebene, eingezeichnet. Gestrichelt ist der klassische Strahlenverlauf, durchgezogen der reale Strahlenverlauf eingezeichnet. Rechts ist der Strahlenverlauf in einer 3D-Ansicht im optisch dichteren Medium aufgezeigt. Zusätzlich ist hier auch die laterale Verschiebung S_{lat} aufgeführt, analog zu [26].

Die nach F. Goos und H. Hänchen benannte Goos-Hänchen-Verschiebung ist eine Folge des evaneszenten Feldes durch Interferenz des einfallenden und reflektierten Lichts und drückt sich in einer longitudinalen Verschiebung des reflektierten Lichtstrahls aus [28; 29] und wurde 1947 das erste Mal störungsfrei beobachtet. In Abbildung 7 links ist dies mit Hilfe der geometrischen Optik dargestellt. Einige Jahre später wurde auch eine laterale Verschiebung aufgrund eines Trägheitseffekts des Protonenspins, nachgewiesen [26].

2.1.6 TIRF - Fluoreszenzanregung mit innerer Totalreflexion

Die totale innere Reflexionsfluoreszenz (TIRF) ist eine Methode, bei der ein Lichtstrahl innerhalb eines Mediums durch Totalreflexion geführt und das an den Reflexionspunkten entstehende evaneszente Feld verwendet wird, um oberflächennahe Fluorophore anzuregen [30]. Abbildung 8 verdeutlicht das Prinzip.

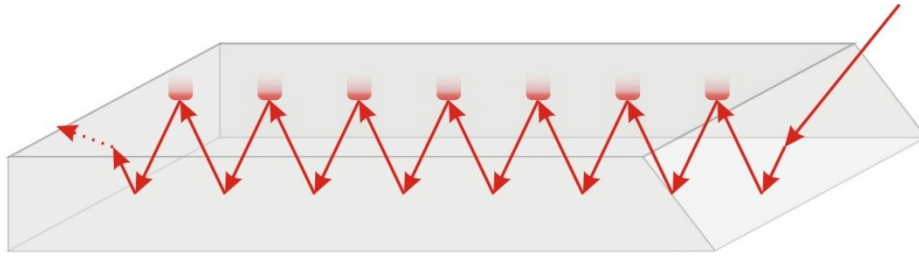


Abbildung 8: Prinzip von TIRF. An jedem Reflexionspunkt entsteht ein evaneszentes Feld, das genutzt werden kann, um Fluorophore anzuregen. Hier ist nur auf der Oberseite eines Transducers das evaneszente Feld eingezeichnet.

Wird dem evaneszenten Feld keine Energie entnommen, findet im Mittel kein Energieübertrag durch das evaneszente Feld statt, wird aber z.B. durch Anregung von Fluorophoren Energie entnommen wird der Lichtstrahl abgeschwächt und nachfolgende Reflexionspunkte haben ein energieärmeres evaneszentes Feld. Man spricht auch von abgeschwächter Totalreflexion.

2.2 Chemische und biochemische Grundlagen

2.2.1 Wechselwirkungen

Die Atome eines Moleküls werden mittels chemischer Bindungen zusammengehalten. Im Falle der Biomoleküle handelt es sich dabei meist um kovalente Bindungen. Allerdings gibt es auch andere intra- und intermolekulare Wechselwirkungen (WWs). Die nicht-kovalenten WWs innerhalb eines Moleküls sind maßgeblich für die dreidimensionale Struktur des Moleküls verantwortlich z.B. in Makromolekülen wie Proteinen; die intermolekularen WWs für den Zusammenhalt der Moleküle, wie z.B. in kondensierten Phasen oder in der bekannten Induced-Fit-Theorie. Die unspezifischen, nichtkovalenten WWs lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen:

- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Induktionswechselwirkungen
- Dispersionswechselwirkungen

und als spezifische WW soll hier noch die Wasserstoffbrückenbindung erwähnt werden [31].

Die elektrostatischen WWs beruhen auf Coulomb- und Keesom-Kräften. Bei den Coulombkräften wechselwirken Ionen mit Ionen oder Ionen mit Permanentdipolen. Das zugrundeliegende Potential der Coulomb-Kräfte zwischen Ionen errechnet sich aus

$$|V_{(r)}| = \frac{q_1 * q_2}{4 * \pi * \epsilon_0 * r} \quad (2.37)$$

q_x	Ladung
ϵ_0	elektrische Feldkonstante (Permittivität im Vakuum)
r	Molekülabstand

Die zugrundeliegende Kraft

$$F_{(r)} = \frac{dV}{dr} = \frac{q_1 * q_2}{4 * \pi * \epsilon_0 * r^2} \quad (2.38)$$

weist eine r^{-2} -Abhängigkeit auf. Betrachtet man die Wechselwirkungen zwischen Ionen und Dipolen so muss berücksichtigt werden, dass die Wechselwirkungskräfte orientierungsabhängig sind. Durch die thermische Bewegung werden die räumlichen Orientierungen gemittelt und es errechnet sich

$$V_{(r)} = -\frac{1}{3 * k * T} * \frac{q^2 * \mu^2}{(4 * \pi * \epsilon_0)^2 * r^6} \quad (2.39)$$

k Boltzmannkonstante

μ Dipolmoment

und die Abstandsabhängigkeit der zugehörigen Kraft ist somit proportional zu r^{-6} [32]. Insgesamt kann man hier also eher von Wechselwirkungskräften mit kurzer Reichweite sprechen.

Die Keesom-Kräfte wirken zwischen permanenten Dipolen und weisen im räumlichen Mittel eine Energie von

$$V_{(r)} = -\frac{2}{3 * k * T} * \frac{\mu_1^2 * \mu_2^2}{(4 * \pi * \epsilon_0)^2 * r^6} \quad (2.40)$$

auf. Somit haben sie ebenfalls eine kürzere Reichweite als Coulombkräfte.

Den Induktions-WWs liegen die Debye-Kräfte zwischen induzierten Dipolen und Ionen

$$V_r = -\frac{\alpha * q^2}{8 * \pi * \epsilon_0 * r^4} \quad (2.41)$$

α Polarisierbarkeit

oder induzierten Dipolen und Permanentdipolen zugrunde:

$$V_r = -\frac{\alpha * \mu^2}{5 * \pi * \epsilon_0} \quad (2.42)$$

Sie treten meist bei leicht polarisierbaren Molekülen oder ausgedehnten π -Elektronensystemen auf.

Die dispersiven WWs haben ihre Ursache in der London-Kraft zwischen Molekülen ohne permanentes Dipolmoment. Das Potential errechnet sich zu

$$V_r = V_0 * \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - 2 * \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad (2.43)$$

und ist somit stark abstandsabhängig. Der Term $\sim r^{12}$ spiegelt die attraktiven, der Term $\sim r^6$ die repulsiven WWs wieder. Auch diese WW ist sehr stark abstandsabhängig. Gleichung (2.43)

bezeichnet man auch als Lennard-Jones-Potential, die Londonsche Dispersionswechselwirkung auch als eigentliche Van-der-Waals-Kraft, wobei hierzu auch die Keesom- und Debye-WW gehören [33].

Bei allen bisher besprochenen WWs muss beachtet werden, dass die Potentialgleichungen nur für das wechselwirkungsfreie Vakuum gültig sind. Betrachtet man diese WWs in wässrigen Medien, so muss immer auch die relative Permittivität ϵ_r , früher auch als Dielektrizitätskonstante bezeichnet, berücksichtigt werden. Die relative Permittivität ist temperatur- und frequenzabhängig, für das Vakuum liegt sie bei $\epsilon_r = 1$, für Wasser ergibt sich $\epsilon_r \approx 80$. Ersetzt man die elektrische Feldkonstante durch die Permittivität

$$\epsilon = \epsilon_0 * \epsilon_r \quad (2.44)$$

so ergibt sich in Wasser eine achtzigfach schwächere WW als im Vakuum. Daher sind all diese WWs im Vergleich zu kovalenten Bindung relativ gering. Da Biomoleküle häufig in Pufferlösungen vorliegen muss hier zusätzlich der Salzgehalt, gegeben durch die Ionenstärke I

$$I = \frac{1}{2} * \sum_i c_i * z_i^2 \quad (2.45)$$

z Ladung

berücksichtigt werden.

Allerdings kann die Kraft bei Makromolekülen, aufgrund der großen Wechselwirkungsfläche, Dimensionen im Bereich kovalenter WWs annehmen.

Wasserstoffbrückenbindungen können als Sonderfall einer elektrostatischen WW angesehen werden, da der Hauptteil der WW darauf beruht. Sie tritt zwischen stark elektronegativen Atomen auf, die Wasserstoff binden können, wie z.B. Stickstoff, Sauerstoff und Halogenen. Im ansonsten wechselwirkungsfreien Raum zählt die Wasserstoffbrückenbindung nach den kovalenten Bindungen als die stärkste WW. Betrachtet man allerdings die Wasserstoffbrückenbindung in wässrigen Medien, so muss der Prozess als Ligandenaustausch angesehen werden, da Wasser hier mit seinen Wasserstoffatomen immer beteiligt ist. Somit sind auch hier relativ geringe Wechselwirkungsenergien zu erwarten. Die zu erwartenden Energien unterscheiden sich stark in verschiedenen Literaturstellen [34; 35], allerdings gelten die kovalenten Bindungen als die stärksten WWs, gefolgt von den ionischen (elektrostatischen) WWs, Wasserstoffbrückenbindungen, Induktions-WWs und Dispersions-WWs. Zu erwähnen sind noch die hydrophoben Wechselwirkungen, die auf Verdrängung von Wasser und dem damit verbundenem Entropiegewinn basieren.

2.2.2 Polyelektrolyte

Polyelektrolyte (PEL) sind wasserlösliche Polymere, die je nach pH-Wert, kationisch oder anionisch geladen vorliegen. Es gibt einige natürlich vorkommende PEL wie z.B. Alginate, Pektine oder auch die DNA. Polykationische Verbindungen besitzen als funktionelle Gruppe u.a. Amino- oder Hydroxyreste,

Polyanionische Verbindungen hingegen weisen in der Struktur Carbonsäure- oder Sulfonsäurereste auf. Die in dieser Arbeit verwendeten Polyionen sind in Abbildung 9 abgebildet.

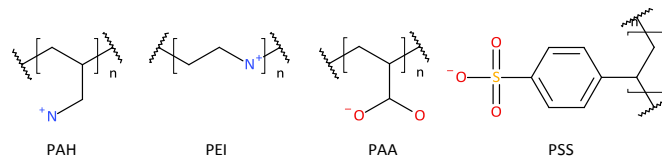


Abbildung 9: Strukturen verschiedener Polyelektrolyte. Als polykationische Verbindungen werden unter anderem gelöste Salze von Polyallylamin (PAH) und Polyethylenimin (PEI) verwendet. Polyanionische Verbindungen sind z.B. gelöste Salze der Polyacrylsäure (PAA) und der Polystyrensulfonsäuren (PSS).

Eine Unterteilung in starke und schwache PEL analog der Einteilung von Säuren und Basen, deren Dissoziationsgrad maßgeblich von Konzentration und pH-Wert bestimmt wird, ist möglich. Demnach ist PSS ein starker PEL, die anderen drei verwendeten Polyionen schwache PEL.

Polyelektrolyte werden dazu verwendet Multischichtsysteme aufzubauen und können als Oberflächenbeschichtung in der Sensorik verwendet werden. Eine Vielzahl von Anwendungen, auch aus anderen Bereichen, finden sich in [36; 37]. Polyelektrolytmultischichten (PEMs) bilden sich durch selbstorganisierenden Schichtaufbau (engl. layer-by-layer self-assembly) auf geladenen Oberflächen, wie Glas, verschiedenen Metalloberflächen und vorbehandelten Kunststoffen. Da es sich hierbei um einen selbstorganisierenden Aufbau handelt ist es ausreichend, das zu beschichtende Substrat in eine wässrige Lösung eines entgegengesetzt geladenen Elektrolyten zu tauchen oder die Oberfläche zu benetzen. Anschließend kann der Überschuss des PEL abgespült und auf gleiche Weise mit einem weiteren entgegengesetzt der vorherigen Schicht geladenen PEL beschichtet werden. Dieses Verfahren kann bis zu einigen hundert Mal wiederholt werden. In Abbildung 10 ist der Multischichtaufbau grafisch veranschaulicht.

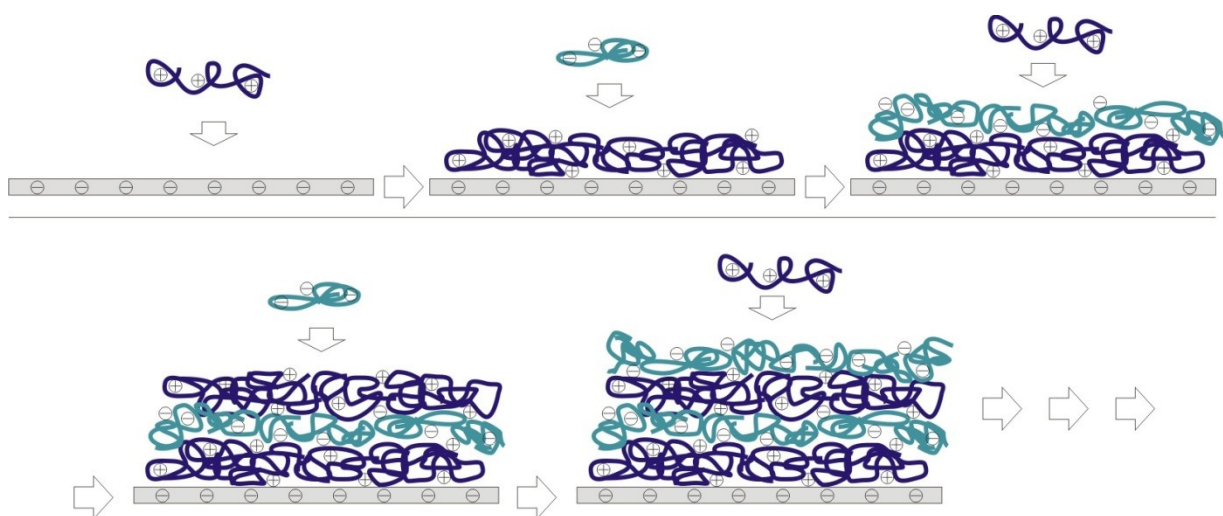


Abbildung 10: Aufbau eines Polyelektrolytmultischichtsystems. Es werden dabei abwechselnd entgegengesetzt geladene PEL auf die Oberfläche gegeben und zwischendurch der Überstand an nicht gebundenen PEL mit einer wässrigen Lösung abgespült.

Beim Aufbau der Schichtsysteme gibt es einige Faktoren, die maßgeblich an dem Prozess beteiligt sind. Dies sind mit absteigender Einflussstärke [38]:

- Salzkonzentration
- Permittivität des Lösungsmittels
- chemische Zusammensetzung der gelösten Salze im Lösungsmittel
- Zeit
- Konzentration der PEL
- Molekulargewicht der PEL
- Ladung der PEL und Ladungsverteilung innerhalb der PEL

Es gibt nun mehrere Modelle, mit denen der Schichtaufbau beschrieben werden kann. Ein sehr einfaches Modell ist das Modell der „hit-and-stick“-Adsorption, das von einer irreversiblen Adsorption der PEL aufgrund der starken elektrostatischen WWs ausgeht. Die PEL adsorbieren mit derselben Konformation wie sie in der Lösung vorliegen an die Oberfläche. Die belegte Fläche ist damit exakt so groß wie der Querschnitt des PEL in Lösung. Für dieses Modell spricht die Tatsache, dass es sich bei Multischichtsystemen um Nicht-Gleichgewichtsstrukturen handelt, da sie sich niemals spontan bilden und zudem eine Konformationsänderung in einem PEL eine Vielzahl von Bindungen gleichzeitig beeinflussen würde, was sehr unwahrscheinlich ist.

Die Flexibilität eines PEL beeinflusst die Schichtdicke der entstehenden Multischicht. Ein wichtiger Parameter hierfür ist die Bjerrum Länge l_b

$$\frac{e^2}{4 * \pi * \epsilon * l_b} = k * T \quad (2.46)$$

die als der Abstand definiert ist, bei dem die elektrostatischen Abstoßungskräfte innerhalb des PEL gleich seiner thermischen Energie sind. Betrachtet man nun die Länge l_τ eines PEL ist diese im Vergleich zu der Länge l_0 eines ungeladenen Makromoleküls aufgrund der innermolekularen Abstoßungskräfte, die die freie Beweglichkeit einschränken und die Starrheit erhöhen, verlängert. Die Länge errechnet sich aus

$$l_\tau = l_0 + \frac{\tau * l_b}{32 * \pi * c * l_b} \quad (2.47)$$

- τ Verhältnis der geladenen Monomerbausteine des PEL zu ungeladenen Monomeren
 c Salzkonzentration

Daraus lässt sich schließen, dass die Starrheit des PEL zunimmt bei einer Erhöhung der Ladungszahl des PEL und bei Verkleinerung der Salzkonzentration. Zusammen mit der „hit-and-stick“-Adsorption lässt sich nun schlussfolgern, dass bei größerer Ladungszahl des PEL oder bei niedriger Salzkonzentration eher „großflächige“ PELs adsorbiert werden und damit eine große Oberflächenbelegung erzielt werden kann, aber mit einer geringen Packungsdichte, siehe auch Abbildung 11. Somit ergeben sich insgesamt dünnere PEMs [37]. Bei schwachen PEL hat der pH-Wert einen ähnlichen Einfluss wie die Salzkonzentration und die Schichtdicke der PEM kann dadurch beeinflusst werden [39].

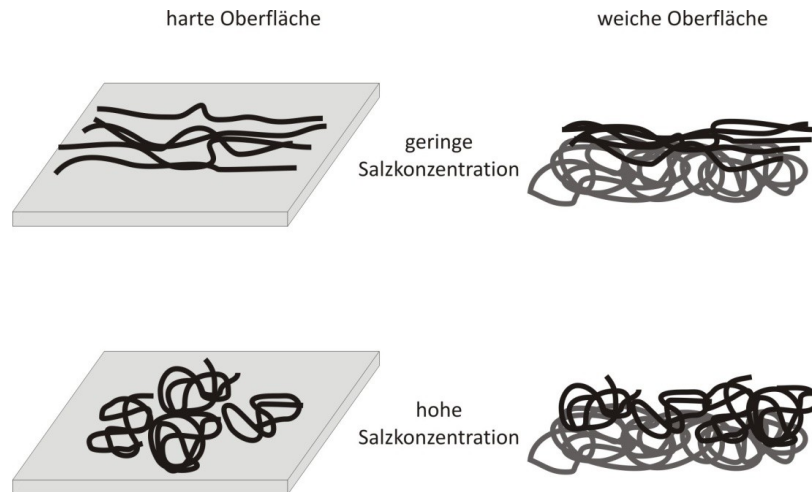


Abbildung 11: Einfluss der Salzkonzentration auf die Konformation der PEL und damit die Oberflächenbelegung bei der Multischichtbildung, analog [37]. Der Unterschied zwischen harten und weichen Oberflächen wird später in diesem Kapitel behandelt.

Bei diesen Betrachtungen werden Volumeneffekte außer Acht gelassen und somit können einige Effekte nicht ausreichend beschrieben werden. Der relativ geringe bis nicht vorhandene Einfluss der molaren Masse des PEL kann durch das elektrostatische Tropfen-Modell (engl. electrostatic blob) beschrieben werden, indem der PEL mathematisch in kleine Einheiten unterteilt wird [40; 41].

Bei der Adsorption eines PEL muss zwischen harten und weichen Oberflächen unterschieden werden. Bei der Adsorption auf eine harte Oberfläche, wie sie ein Transducer aus Glas oder Kunststoff darstellt, hängt die adsorbierte Menge maßgeblich von der Oberflächenladung ab. Ein nur schwach geladener, flexibler PEL kann sich auf dieser Oberfläche eng packen und auch weit in den Raum hinausragen. Durch diese Schleifen im Raum resultiert eine leichte Überkompensation der Oberflächenladung. Diese kann noch durch eine hohe Ionenstärke vergrößert werden, da die abstoßenden Kräfte innerhalb des PEL abgeschirmt werden. Die attraktiven WW der Oberfläche werden zwar ebenfalls abgeschirmt, aber durch Van-der-Waals-WW mit kurzer Reichweite, wie sie in den Gerüsten der PEL, vor allem mit großen aromatischen Strukturen, zu finden sind, überkompensiert [42]. Bei der Adsorption auf weichen Oberflächen, z.B. PEL auf PEL beim Schichtaufbau, kann der PEL in die vorherige Schicht eindringen. Für das PAH/PSS-Multischichtsystem wurden diese Effekte beobachtet. Ein Drittel der Ladungen des PEL werden benötigt, um die Ladung der unteren Schicht zu kompensieren. Dies geschieht durch Ionenpaarbildung und kann durch das Eindringen des PEL in die untere Schicht erklärt werden. Somit bleiben zwei Drittel der Ladungen übrig und werden durch Gegenionen kompensiert oder bleiben völlig unkomplexiert. Wird eine weitere Schicht aufgebracht, werden nun von den zwei Drittel der Ladungen die Hälfte für Ionenpaarbildung verwendet. Schlussendlich bleiben ein Drittel der Ladungen in einem Multischichtsystem frei oder werden durch Gegenionen kompensiert [43; 44; 45]. Für die Kinetik der Schichtbildung wird ein schneller Transport der PEL an die Oberfläche angenommen, der durch die Diffusion bestimmt wird. Die Wanderung auf der Oberfläche und das Eindringen in die tiefere Schicht ist ein viel langsamerer Prozess. Er wird aber durch das Aufbringen der nächsten Schicht und der Ionenpaarbildung beendet und als irreversibel angesehen [46]. Die Dicke einer PEM wird auch durch die Menge an Wasser bestimmt, da die Ladungen hydratisiert vorliegen. Somit haben auch trockene PEM einen relativ hohen Wasseranteil. Bei PSS/PAH-Schichten wurden im trockenen Zustand 6-8

Wassermoleküle pro Ionenpaar nachgewiesen [37]. Auch der Salzgehalt über einer PEM beeinflusst die Schichtdicke, da die Ionen in die PEM eindringen können und dort mit den anderen Ionen und PEL wechselwirken. Zusammenfassend lässt sich bei Erhöhung des Wassergehaltes wie auch des Salzgehaltes ein Anschwellen der PEM beobachten. Zuletzt hat auch die Temperatur einen maßgeblichen Einfluss auf die Formierung von PEMs, da hierdurch die Beweglichkeit verändert wird und auch thermodynamische Größen wie die Entropie, die einen großen Anteil an der Triebkraft bei der Ionenpaarbildung durch Freisetzung der Gegenionen ausmacht, verändert werden. Alle vorgestellten Theorien und zum Teil vereinfachten Modelle sind bisher nicht ausreichend, um das Verhalten der PEL und der PEM-Bildung zu erklären, helfen aber beim Verständnis der wichtigsten Eigenschaften.

2.2.3 Prinzip eines Festphasen-Immunoassays

Bei einem Festphasen-Immunoassay wird ein Antikörper (AK) als biomolekulare Erkennungsstruktur verwendet und entweder der AK oder das Antigen (AG) auf einer festen Phase immobilisiert. Es gibt eine Vielzahl von Assay-Formaten für die unterschiedlichsten Anwendungen. Im Bereich der optischen Biosensorik, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird, sind hauptsächlich vier Assay-Formate etabliert:

- Direkter Assay
- Verdrängungsassay
- Bindungsinhibitionsassay
- Sandwichassay

Beim direkten Assay wird entweder der AK oder das AG auf einer Transduceroberfläche immobilisiert, je nachdem ob der AK oder das AG der nachzuweisende Analyt ist. Anschließend wird die Probe auf die Oberfläche gegeben und der enthaltene Analyt bindet an die spezifische Oberfläche. Handelt es sich bei dem Analysesystem um ein markierungsfreies Verfahren wird bei der Anbindung bereits das Messsignal generiert. Handelt es sich um eine markierte Methode muss nun, nachdem die Oberfläche vom nichtgebundenen Analyten gereinigt wurde, in einem weiteren Schritt ein markiertes Analytderivat oder markierter Bindungspartner hinzugegeben werden, der die freien Bindungsstellen der Oberfläche absättigt bzw. den Analyten markiert. Je nach markierter Methode folgen noch einige Zwischenschritte, z.B. muss bei der Fluoreszenzmarkierung eine Anregung des Fluoreszenzlabels erfolgen. Aus der Höhe des dadurch erzeugten Messsignals kann dann auf die in der Probe enthaltene Konzentration zurückgeschlossen werden. Ein hohes Signal entspricht einer hohen Analytkonzentration, sofern der Analyt markiert wurde. Sollten die noch freien Bindungsstellen markiert worden sein, entspricht ein hohes Messsignal einer geringen Analytkonzentration.

Beim Verdrängungsassay wird analog zum direkten Assay ein Bindungspartner auf der Oberfläche immobilisiert. Dieser wird dann mit einem spezifisch bindenden Molekül abgesättigt. Nach Aufgabe der Probe mit Analyt konkurriert der Analyt mit dem spezifischen Molekül um die Bindungsstelle und kann verdrängt werden. Dieses Assayprinzip wird nahezu ausschließlich bei den markierten Methoden angewendet, da hier eine eindeutige Unterscheidung zwischen spezifischem Molekül und Analyt stattfinden muss, um ein von der Konzentration des Analyten abhängiges Messsignal zu

erzeugen. Ein hohes Signal entspricht hier einer niedrigen Analytkonzentration. Als Variante kann auch eine zuvor nicht abgesättigte Oberfläche verwendet werden und das spezifisch bindende Molekül zur Probe gegeben werden; es findet dann eine direkte Konkurrenzreaktion statt.

Beim Bindungsinhibitionsassay wird ein Oberflächenderivat des Analyten auf der Transduceroberfläche immobilisiert. Die Probe wird mit dem Antikörper vorinkubiert und anschließend auf die Oberfläche gegeben. Bei markierten Methoden folgt dann der Schritt der Signalerzeugung. Signal und Analytkonzentration verhalten sich auch hier antiproportional, d.h. ein hohes Messsignal entspricht einer niedrigen Analytkonzentration. Das Prinzip ist in Abbildung 12 nochmals dargestellt.

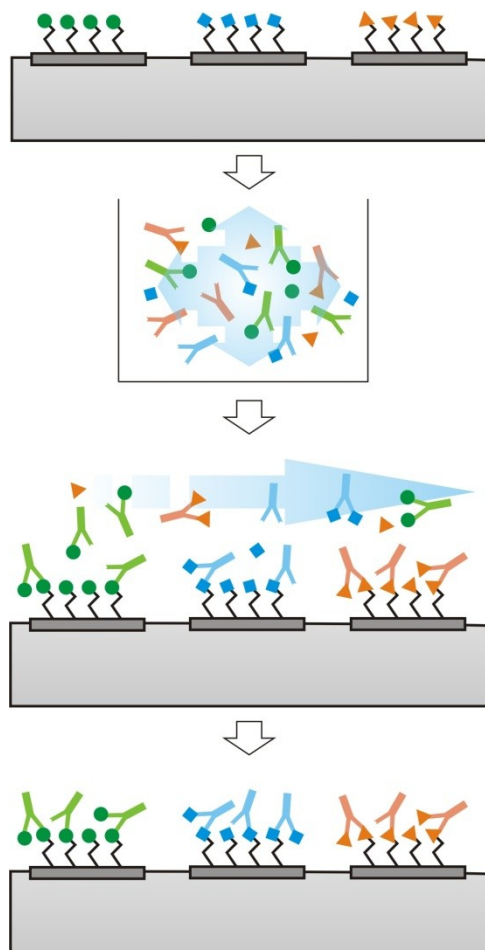


Abbildung 12: Prinzip des Bindungshemmtests. Als biomolekulare Erkennungsstruktur wird in diesem Beispiel ein Antikörper verwendet

Beim Sandwichassay wird der Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert. Es gibt nun zwei verschiedene Vorgehensweisen. Bei der ersten wird zuerst die Probe aufgegeben, dann gespült und in einem weiteren Schritt wird ein Sekundärantikörper auf den Transducer gegeben, der ein weiteres Epitop des AG oder den immobilisierten AK bindet, der noch kein AG gebunden hat. Beim zweiten Verfahren wird der Sekundärantikörper mit der Probe vorinkubiert und danach auf den Transducer gegeben. Der Vorteil des ersten Verfahrens besteht bei den markierten Methoden darin, dass auch

bei einer hohen AG-Konzentration und einem Verhältnis $AK \ll AG$ das Messsignal nicht wieder kleiner wird und somit jedem Signal nur eine Konzentrationen zugeordnet werden kann. Das Absinken des Messsignals resultiert daher, dass aufgrund des Überschusses an AG freies AG ohne sekundären AK an die Oberfläche bindet und die Bindungsstelle blockiert. Für den AG-Sekundär-AK-Komplex sind daher keine Bindungsstellen mehr frei und es kann kein Signal generiert werden, da die Markierung sich am Sekundär-AK befindet. Ein hohes Signal entspricht bei beiden Vorgehensweisen einer hohen Analytkonzentration. Beide Verfahren werden in Abbildung 13 erklärt.

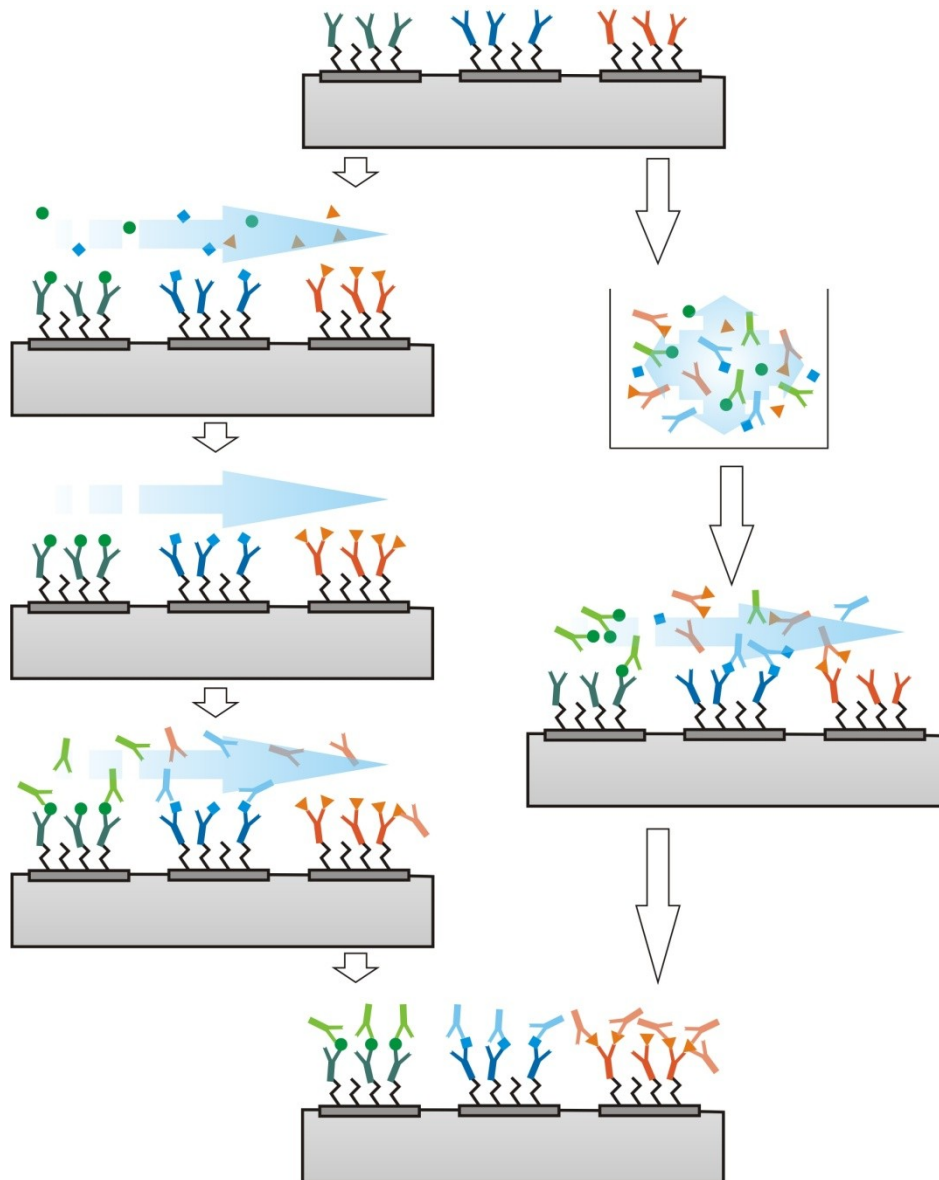


Abbildung 13: Prinzip des Sandwichassays mit Antikörpern. Auf der linken Seite werden das Antigen und der Detektionsantikörper separat über die Transduceroberfläche gegeben, auf der rechten Seite werden das Antigen und der Detektionsantikörper zuerst vorinkubiert und das Reaktionsgemisch zusammen auf die Transduceroberfläche gegeben.

Die verschiedenen Assayformate werden auch häufig als kompetitiv oder nicht-kompetitiv klassifiziert. Die ursprünglich Definition von kompetitiv, „auf einen Wettbewerb ausgerichtet“ bedeutet in diesem Fall, dass verschiedene Analyten um einen Bindungspartner konkurrieren. Häufig

wird in der Literatur der Bindungshemmtest unter den kompetitiven Testformaten aufgezählt. Dies trifft zu, wenn die Inkubation nicht vollständig verläuft bzw. sich noch nicht im Gleichgewicht befindet und nach der Inkubation eine Konkurrenzreaktion stattfinden kann. Allerdings lassen sich einige Fälle finden, bei denen davon ausgegangen wird, dass diese Reaktion sich im GG befindet bzw. weitestgehend abgeschlossen ist, z.B. wenn aus den Messwerten kinetische Daten berechnet werden. Daher kann der Bindungshemmtest hier als nicht-kompetitives Format angesehen werden, genauso wie der direkte Assay und der Sandwichassay. Der Verdrängungsassay ist dagegen als kompetitives Testformat zu betrachten.

Wichtig ist bei allen Assayformaten, dass genug Zeit zur Verfügung gestellt wird, damit AK und AG miteinander wechselwirken können. Alle genannten Assayformate können natürlich auch mit anderen Erkennungsstrukturen wie DNA, Proteinen, Aptameren und Scaffolds durchgeführt werden und sind nicht auf AK beschränkt. Die Assayformate und weitere Anwendungen finden sich auch in [3; 47; 48]. Einige Vor-, Nachteile und Beschränkungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

	Direkter Assay	Verdrängungs-assay	Bindungsinhibitions-assay	Sandwich-assay
markierungsfreie Methoden	***	*	***	**
markierte Methoden	*	***	***	***
kleine Moleküle	**	**	***	*
hohe Selektivität	**	**	**	***
Vorinkubation	*	*	***	* bzw. ***
Automatisierbarkeit	***	**	**	**
Regenerierbarkeit	**	**	***	*

Tabelle 3: Vergleich verschiedener Assayformate. Die Klassifizierung reicht von ***= sehr gut geeignet bzw. ja, über **= geeignet, bis zu *=schlecht geeignet bzw. nein

2.3 Evaluierung

2.3.1 Kenngrößen

Zur Evaluierung von Daten gibt es verschiedene Kenngrößen, deren gemein ist, mit einer bestimmten Fehlertoleranz Werte, z.B. minimale oder maximale Grenzen einer Messmethode oder eines Messgeräts, zu ermitteln. Ziel hierbei ist es Werte zu erhalten, die zum Vergleich mit anderen Messmethoden oder Gerätschaften herangezogen werden können und die Möglichkeiten und Grenzen der eigenen Methode aufzuzeigen. In den vergangenen Jahrzehnten haben viele Organisationen versucht mit unterschiedlichen Methoden, aber oft mit den gleichen Begrifflichkeiten, Standards zu etablieren. In der heutigen Zeit haben sich zwei Systeme durchgesetzt. Die zwei heute gebräuchlichen Systeme sind die der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und die der International Organization for Standardisation (ISO). Seit 1995 findet eine Harmonisierung der Begrifflichkeiten statt, die inzwischen auch von anderen Organisationen als Basis verwendet werden [6; 49]. Die grundlegenden Definitionen nach ISO werden aus der Norm DIN ISO 11843-1 bis 5 [50; 51; 52; 53; 54] zitiert.

<p>Fehler 1. Art Bei einem Fehler 1. Art wird eine Nullhypothese zurückgewiesen, obwohl sie wahr ist. Man spricht auch von falsch-positiven Ergebnissen</p>		<p>Fehler 2. Art Bei einem Fehler 2. Art wird eine Nullhypothese beibehalten, obwohl sie falsch ist. Man spricht hier von falsch-negativen Ergebnissen</p>	
<p>Istzustand (actual state) Beschaffenheit eines Systems zum Betrachtungszeitpunkt</p>		<p>Grundzustand (basic state) Zustand eines Systems zur Anwendung als Ausgangspunkt für die Ermittlung von Istzuständen</p>	
<p>Zustandsgröße (state variable) Größe zur Beschreibung des Zustands eines Systems</p>			
<p>Zustandsgrößendifferenz (net state variable) Differenz zwischen dem Wert der Zustandsgröße und ihrem Wert im Grundzustand</p>			
<p>Messgröße (response variable) Variable, welche die ermittelten Ergebnisse eines experimentellen Vorgehens zeigt</p>			
<p>Kalibrierfunktion (calibration function) Funktionelle Beziehung zwischen dem Erwartungswert der Messgröße und dem Wert der Zustandsgrößendifferenz</p>			
<p>Erkennungsgrenze (critical value of the response variable) Die Erkennungsgrenze y_c definiert den „Wert der Messgröße Y, dessen Überschreitung“ bzw. Unterschreitung „für eine festgelegte Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art α zum Schluss führt, dass das betrachtete System nicht in seinem Grundzustand ist“</p>	<p>Erfassungsgrenze (critical value of the net state variable) Die Erfassungsgrenze x_{EG} definiert den „Wert der Zustandsgrößendifferenz, dessen Überschreitung“ bzw. Unterschreitung „für eine festgelegte Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art α zum Schluss führt, dass das betrachtete System nicht in seinem Grundzustand ist“</p>	<p>Erfassungsvermögen (minimum detectable value) Das Erfassungsvermögen x_{EV} definiert den „Wert der Zustandsgrößendifferenz beim Istzustand, der mit einer Wahrscheinlichkeit $(1 - \beta)$ zum Schluss führt, dass sich das System nicht im Grundzustand befindet“</p>	

Tabelle 4: Definitionen wichtiger Begriffe für die qualitative und quantitative Analytik nach ISO 11843-1 bis 5

Auf die Erkennungsgrenze wird im Folgenden nicht weiter eingegangen. Sowohl die Erfassungsgrenze wie auch das Erfassungsvermögen werden mit der Verteilung der Zustandsgrößendifferenz definiert und sind somit für lineare wie auch nicht-lineare Kalibrierfunktionen gültig, sofern die Kalibrierfunktion stetig, differenzierbar und monoton steigend oder fallend ist. Abbildung 14 veranschaulicht den Zusammenhang der Größen.

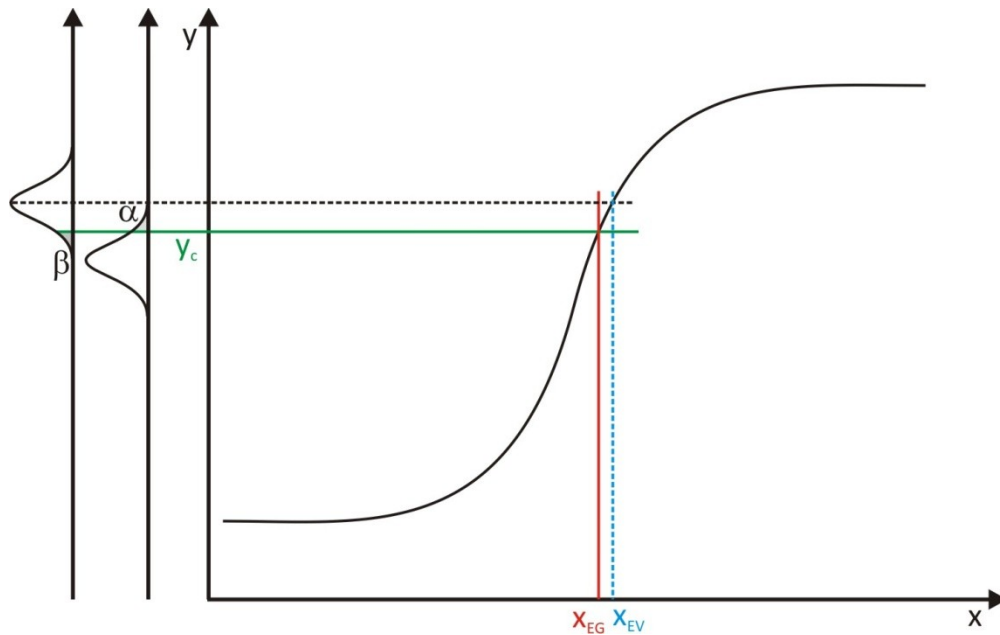


Abbildung 14: Schematische Darstellung von Erkennungsgrenze, Erfassungsgrenze und Erfassungsvermögen nach DIN/ISO

Mathematisch lassen sich die Erfassungsgrenze und das -vermögen auf der X-Achse, bei Kalibrierfunktionen klassischerweise die Konzentrationsdomäne, auch wie folgt darstellen:

$$\text{Erfassungsgrenze} \quad x_{EG} = k_{EG} \sigma_0 \quad (2.48)$$

$$\text{Erfassungsvermögen} \quad x_{EV} = x_{EG} + k_{EV} \sigma_{EV} \quad (2.49)$$

- k_{EG} Koeffizient zur Festlegung von α
- σ_0 Standardabweichung bei $x=0$
- k_{EV} Koeffizient zur Festlegung von β
- σ_{EV} Standardabweichung bei x_{EV}

Für lineare Kalibrierfunktionen finden sich ausführliche Beschreibungen in [51] und [55].

Die bisher definierten Größen dienen hauptsächlich der Entscheidung, ob bzw. mit welcher Sicherheit ein Stoff detektiert worden ist. In DIN 32645 [56] werden die Größen Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenze definiert, die Begriffe aus der Norm DIN ISO 11843-1 bis 5 wiederaufgreifen und um einige wichtige Kenngrößen erweitern. Die Erfassungsgrenze nach DIN ISO 11843-1 wird in DIN 32645 auch als Nachweisgrenze (Limit of detection) bezeichnet, während das Erfassungsvermögen (Identification limit) nach DIN ISO 11843-1 in DIN 32645 auch als Erfassungsgrenze bezeichnet wird. Dies sind die häufiger gebräuchlichen Begriffe. Die Nachweisgrenze ist die Entscheidungsgrenze für die An- bzw. Abwesenheit eines gesuchten Analyten, statistisch betrachtet abhängig von einem Fehler 1. Art. Nach der empfohlenen Bestimmung über die Leerwertmethode (Leerwert siehe weiter unten) ergibt die Schnellbetrachtung

$$x_{\text{NG}} = \frac{3s_{\text{B}}}{b} \quad (2.50)$$

- s_{B} Standardabweichung des Leerwerts
 b Steigung der Kalibriergeraden

Die Erfassungsgrenze ist die untere Grenze für die Quantifizierung eines Analyten; die kleinste Konzentration, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann, statistisch betrachtet abhängig von einem Fehler 2. Art.

$$x_{\text{EG}} = \frac{6s_{\text{B}}}{b} \quad (2.51)$$

Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification) ist die kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einem vorgegebenen relativen Fehler bestimmt werden kann. Sie entspricht der unteren Grenze für die Quantifizierung abhängig von einem Fehler 1. Art.

$$x_{\text{BG}} = \frac{10s_{\text{B}}}{b} \quad (2.52)$$

Zusammengefasst lässt sich folgende Beziehung zwischen den eben definierten Größen herstellen: Liegt die gefundene Konzentration eines Analyten unterhalb der Nachweisgrenze ist der Analyt nicht nachweisbar und liegt quantitativ unterhalb Erfassungsgrenze. Liegt die gefundene Menge zwischen Nachweis- und Erfassungsgrenze ist der Stoff zwar nachgewiesen aber nicht quantifizierbar. Ein Gehalt zwischen Erfassungs- und Bestimmungsgrenze ist quantifizierbar, aber erst oberhalb der Bestimmungsgrenze quantifizierbar mit Angabe des Konfidenzintervalls. Dieses Schema lässt sich auch auf andere Systeme, die mit ähnlichen Begriffen arbeiten (IUPAC) übertragen. Die mathematischen Betrachtungen in DIN 32645 sind strenggenommen nur gültig für homoskedastisch, d.h. mit konstanter Varianz über den gesamten Messbereich, normalverteilte und mit einem linearen funktionellen Zusammenhang zwischen Messgröße und Gehalt verteilte Messwerte. Da, wie in 2.3.2 diskutiert, in dieser Arbeit vorrangig nicht lineare Zusammenhänge betrachtet werden, wird keine genauere mathematische Betrachtung vorgenommen.

Die folgende Betrachtung der wichtigen Kenngrößen für die qualitative und quantitative Beschreibung eines Analyten der IUPAC sind dem Gold Book [57], dem gültigen Standardwerk der chemischen Nomenklatur, sowie auch dem etwas älteren Orange Book [58], das allerdings noch keine Neuauflage erfahren hat und nur zu kleinen Teilen in das Gold Book übernommen wurde, entnommen. Zu Evaluierungszwecken wurden auch hier Kenngrößen definiert. Um ein chemisches Signal vom Rauschen unterscheiden zu können wird der „critical value“ oder das „critical level“ verwendet. Der „Minimum Detectable Value“ (MDV), auch als „detection limit“ bezeichnet, gibt den Wert des minimalen detektierbaren (wahren) Wertes bzw. Konzentration des chemischen Messprozesses an. Eine weitere Größe ist der „Minimum Quantifiable (true) Value“, auch als „quantification limit“ bezeichnet. Für diese zwei Parameter, die einen Teil des Leistungspotentials eines chemischen Messprozesses im Hinblick auf Signalerkennung widerspiegeln, finden auch die Begriffe „Limit of detection“ (LOD) und „Limit of quantification“ (LOQ) Anwendung, wie sie bereits (nach ISO) im Verlauf des Kapitels besprochen wurden. Unter der Annahme eines Fehlers 1. Art gleicher Größe wie der Fehler 2. Art kann das LOD nach IUPAC definiert werden als:

$$L_D = 2t_{1-\alpha, \nu} \sigma_D \text{ bzw. } L_D = 2t_{1-\alpha, \nu} \sigma_0 \quad (2.53)$$

$t_{1-\alpha, \nu}$ t-Wert für das Signifikanzniveau α mit den Freiheitsgraden ν

σ_D Standardabweichung bei L_D

σ_0 Standardabweichung bei $x=0$

Bei homoskedastisch verteilten Daten (Normalverteilung mit bekannter, über den Messbereich konstanter Varianz) ist die zweite Definition anwendbar. Man muss beachten, dass im Regelfall nur die Standardabweichung der Stichprobe bestimmt werden kann und somit die Standardabweichung s der Stichprobe noch um den Faktor (s/σ) abweicht. Die IUPAC Empfehlung ist $\alpha = \beta = 5\%$. Im weiteren Verlauf wird, wenn nicht anders angegeben, immer dieses Signifikanzniveau verwendet. Sehr häufig werden Mehrfachmessungen durchgeführt, um die Messunsicherheit zu verringern. Die folgende Tabelle soll einen Überblick über den Einfluss der Anzahl der Messungen, der Stichprobenanzahl, auf das LOD geben. Es muss dabei beachtet werden, dass die Anzahl der Freiheitsgrade ν hier der Anzahl der Messungen minus der Anzahl der aus der Stichprobe geschätzten Parameter der Grundgesamtheit entspricht.

Anzahl der Messungen	Freiheitsgrade	L_D (für $\alpha=\beta=5\%$)	L_D (für $\alpha=\beta=1\%$)
1	0	-	-
2	1	$12,62\sigma_0$	$63,64\sigma_0$
3	2	$5,84\sigma_0$	$14,92\sigma_0$
4	3	$4,70\sigma_0$	$9,08\sigma_0$
5	4	$4,26\sigma_0$	$7,50\sigma_0$
7	6	$3,88\sigma_0$	$6,28\sigma_0$
∞	∞	$3,29\sigma_0$	$4,66\sigma_0$

Tabelle 5: Übersicht über das LOD nach IUPAC Definition, abhängig von der Anzahl der Messungen. Als vereinfachende Annahme wurde über den Messbereich eine konstante Varianz und ein Fehler 1. Art gleicher Größe wie die des Fehlers 2. Art angenommen. Alle notwendigen statistischen Daten wurden entnommen aus [59].

Man sieht deutlich, dass für $\alpha = \beta = 5\%$ bereits ab 7 Messungen ein Wert für das LOD erreicht wird, der nur noch um 18 % von dem Wert der unendlichen Messungen abweicht, wohingegen bei einer Dreifachmessung, wie sie gängige Praxis ist, die Abweichung 78 % beträgt. Wird ein Signifikanzniveau von 1 % angenommen, sind gerade bei geringer Wiederholungsanzahl der Messungen die t-Werte recht groß und somit das LOD sehr groß. In älteren Versionen des Orange Books und auch in der heute noch gängige Praxis wird das LOD als $L_D = 3s_b$ definiert, wobei es sich bei s_b um die Standardabweichung des Leerwerts handelt. Als „blank“ (engl. für Leerwert) bezeichnet man einen Messdurchlauf ohne Zugabe der zu testenden Substanz, genannt „reagent blank“ oder „procedural blank“. Eine weitere Möglichkeit ist die Testmatrix ohne Analyt zu verwenden, den sogenannten „field blank“. Ein blank bzw. eine Leerprobe kann durch folgende drei Faktoren beschrieben werden: Den instrumentellen Hintergrund in Abwesenheit des Analyten, die Basislinie, die sich aus der Summation des instrumentellen Hintergrunds mit interferierenden Spezies ergibt und den chemischen Leerwert, der durch Kontaminationen der Reagenzien oder während der Probenvorbereitung entsteht. Wie bereits 1995 in [60] gezeigt wurde, wird bei der Definition $L_D = 3s_b$ die Größe, die darüber entscheidet ob „Signal“ oder „nicht Signal“ gleich der Entscheidung das Signal

vom Hintergrund zu unterscheiden gesetzt. Das gilt nur für normalverteilte Messwerte mit vielen Wiederholungsmessungen ab ca. 30 [59] und der Fehler 1. Art ist hierbei auf 0,15 % festgelegt, wohingegen der Fehler 2. Art 50 % beträgt. Dies widerspricht eigentlich den neueren Definitionen der IUPAC. Es wird allgemein davon abgeraten feste Koeffizienten für die Standardabweichung zu verwenden. Sollten die bereits gemachten Annahmen gelten, gilt bei kleinem Wert der Leerprobe und unendlich vielen Wiederholungsmessungen der Wert $L_D = 3,29\sigma_B$ bzw. $L_D = 3,29s_B$ [58].

Das Limit of Quantifikation (LOQ) ist ein Parameter des chemischen Messprozesses, der die Fähigkeit den Analyten zu quantifizieren angibt und angegeben wird als:

$$L_Q = k_Q \sigma_Q \quad (2.54)$$

k_Q Multiplikator

σ_Q Standardabweichung bei L_Q

Der Multiplikator k_Q ist das Reziprok der vorgegebenen relativen Standardabweichung (RSD). Die IUPAC empfiehlt eine relative Standardabweichung von 10 % = 0,10, somit ist $k_Q = 10$. Ist die Standardabweichung bekannt und über den Messbereich konstant, dann kann σ_Q auch durch σ_0 ersetzt werden, und somit wird auch hier die geschätzte Standardabweichung aus der Stichprobe der Leerproben verwendet und es ergibt sich

$$L_Q = 10\sigma_B \text{ bzw. } L_Q = 10s_B \quad (2.55)$$

Für heteroskedastisch verteilte Daten, bei denen die Streuung bzw. Varianz der Residuen unterschiedlich ist, muss diese Heteroskedasität bei der Berechnung von LOD und LOQ mit in die Bestimmung einbezogen werden [8]. Bei Immunoassays wird häufig eine Zunahme der Varianz bei größer werdenden Messwerten beobachtet [61]. Dieser Effekt wird bei der Berechnung oft ignoriert, sollte aber beachtet werden. Unter der Annahme einer linearen Zunahme der relativen Standardabweichung (RSD) ergibt sich für das LOD:

$$\sigma_D = \sigma_B + k_{(RSD)} L_D \quad (2.56)$$

$K_{(RSD)}$ Zunahme der RSD

Eingesetzt in (2.53)

$$L_D = 2t_{1-\alpha, \nu} \left(\sigma_B + k_{(RSD)} L_D \right) \text{ bzw. } L_D = \frac{2t_{1-\alpha, \nu} \sigma_B}{\left(1 - 2t_{1-\alpha, \nu} k_{(RSD)} \right)} \quad (2.57)$$

Für das LOQ ergibt sich mit

$$\sigma_Q = \sigma_B + k_{(RSD)} L_Q \quad (2.58)$$

Eingesetzt in (2.54) folgt:

$$L_Q = 10 \left(\sigma_B + k_{(RSD)} L_Q \right) \text{ bzw. } L_Q = \frac{10\sigma_B}{\left(1 - 10k_{(RSD)} \right)} \quad (2.59)$$

Tabelle 6 soll einen Eindruck vermitteln wie sich LOD bzw. LOQ bei steigender RSD ändern.

Messanzahl	RSD [%]	LOD	LOQ
Dreifachmessung	0	5,84 σ	10,00 σ
	1	6,20 σ	11,11 σ
	5	8,25 σ	20,00 σ
	8	10,96 σ	50,00 σ
Siebenfachmessung	0	3,88 σ	10,00 σ
	1	4,04 σ	11,11 σ
	5	4,81 σ	20,00 σ
	8	5,63 σ	50,00 σ

Tabelle 6: Änderung des LOD und LOQ bei steigender relativer Standardabweichung in Abhängigkeit der Messanzahl.

Bei steigender RSD ist auch ein Anstieg des LOD zu erkennen und sollte somit in jeder Bestimmung Berücksichtigung finden. Das LOQ ändert sich bei Änderung der Messanzahl nicht, da diese hier nicht über den t-Wert bestimmt wird. Allerdings tritt auch hier bei heteroskedastisch verteilten Daten eine Änderung ein. Rein mathematisch ist es nur bis 9,99 % RSD möglich eine LOQ zu berechnen, da sonst durch Null geteilt werden müsste. Aber bereits vor Erreichen der 10 % RSD werden sehr hohe LODs erreicht und somit kann diese Methode dann nicht mehr herangezogen werden. Dies kann als Einschränkung der Methode angesehen werden.

Wie bereits erwähnt, sind die Ansätze nach IUPAC und ISO streng genommen nur für lineare Funktionszusammenhänge definiert worden, werden üblicherweise aber auch für nicht lineare Funktionszusammenhänge verwendet. [62] beschreibt eine Möglichkeit das LOD, definiert nach Gleichung (2.50), nach IUPAC auch mit dem Faktor 3,29, auf nichtlineare Kalibrierfunktionen anzupassen. Hierbei wird die konstante Steigung einer angenommenen Kalibriergeraden durch die sich ändernde Steigung einer nicht linearen Funktion ersetzt.

$$L_D = 3,3 * s * \frac{dY}{dX} \quad (2.60)$$

s Standardabweichung von Y

$\left| \frac{dY}{dX} \right|$ Steigung der Funktion mit der Randbedingung $\left| \frac{dY}{dX} \right| < 0$

Durch eine Grenzwertbetrachtung kann Gleichung (2.60) umgeschrieben werden zu

$$L_D = 3,3 * \frac{s}{\left| \frac{dY}{d \ln X} \right| * \frac{1}{X}} = \frac{s * X}{\left| \frac{dY}{d \ln X} \right|} \quad (2.61)$$

Gesucht ist der Fall, dass $L_D = X$, somit vereinfacht sich Gleichung (2.61) zu

$$\left| \frac{dY}{d \ln X} \right| = 3,3 * s \text{ bzw. } \left| \frac{dY}{d \log X} \right| = \frac{s}{0,13} \quad (2.62)$$

Dies ist eine allgemein gültige Formulierung für die Bestimmung des LODs aus nicht linearen Funktionen nach [62]. Wird zum Beispiel eine Kalibrierfunktion für Immunoassays verwendet wie Gleichung (2.70), bzw. die normalisierte Form,

$$\frac{Y}{Y_0} = \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{X}{C} \right)^B \right)}, \quad (2.63)$$

die als Randbedingungen nur $0 \leq Y \leq 1$ und $Y_{\min} \approx 0$ hat, kann Gleichung (2.62) geschrieben werden als

$$\left| \frac{d \frac{Y}{Y_0}}{d \log X} \right| = \frac{s}{0,13} \quad (2.64)$$

Durch Einsetzen der Standardabweichung bei niedrigen Konzentrationen kann die Steigung der Kalibrierfunktion bei dem LOD bestimmt werden. Durch mathematische Differenzierung der halblogarithmischen Auftragung dieser Kalibrierfunktion kann die Steigung der Kalibrierfunktion direkt ermittelt werden und der zugehörige Konzentrationswert bestimmt werden. Desweiteren gibt es auch Verfahren, bei denen ein festgelegter Wert der Maximalsteigung nicht überschritten werden darf [63], z.B.

$$\text{LOD entspricht Konzentration bei } 0,25 * \left| \frac{dY}{dX} \right|_{\max} \quad (2.65)$$

oder

$$\text{LOD entspricht Konzentration bei } 0,5 * \left| \frac{dY}{dX} \right|_{\max} \quad (2.66)$$

Ein weiterer Ansatz, um Kenngrößen für die Evaluierung des chemischen Messprozesses zu bestimmen, wird in [64] beschrieben. Ausgegangen wird von einer Vier-Parameter-Logistik-Funktion (4PL). Es wird die „minimum detectable concentration“ (MDC) und das „reliable detection limit“ (RDL) als konkurrierende Größen zu den zum Teil bereits erwähnten Evaluierungskennwerten beschrieben. Die MDC ist beschrieben als die niedrigste Konzentration, die in einem erwarteten Ansprechverhalten resultiert, das sich signifikant von dem erwarteten Ansprechverhalten bei Konzentration gleich Null unterscheidet. Dies kann so interpretiert werden, dass ein von einer unbekannt Probe erhaltenen Messwert mit einer Sicherheit von $100 * (1 - \alpha) \%$ nicht Null ist, wenn der Wert größer oder gleich MDC ist. Das RDL beschreibt die niedrigste Konzentration, die eine bestimmte Wahrscheinlichkeit hat, ein Ansprechverhalten, das signifikant größer ist als das Ansprechverhalten bei null, zu generieren. Um also in einer Probe mit einer Wahrscheinlichkeit von $100 * (1 - \alpha) \%$ ein Ansprechverhalten zu generieren, das größer ist als das Nullsignal, muss die Konzentration größer oder gleich groß wie das RDL sein. Die mathematischen Details hierzu können in [64] nachgelesen werden. Beide Werte lassen sich grafisch durch die Interpolation des linearen Anfangsbereichs der Grenze des Konfidenzintervalls bestimmen, wie Abbildung 15 zeigt. Der

Schnittpunkt mit der Kalibrierfunktion entspricht in der Konzentrationsdomäne der MDC, der Schnittpunkt mit der zweiten Grenze des Konfidenzintervalls dem RDL. Ob jeweils die obere oder untere Grenze des Konfidenzintervalls verwendet werden muss, hängt vom Verlauf der Kalibrierfunktion ab, der je nach Assayformat unterschiedlich ist. Theoretisch ist es mit diesem Verfahren möglich untere und obere Grenzen, d.h. für den niedrigen Konzentrationsbereich untere Grenzen, für den hohen Konzentrationsbereich obere Grenzen, aufzustellen.

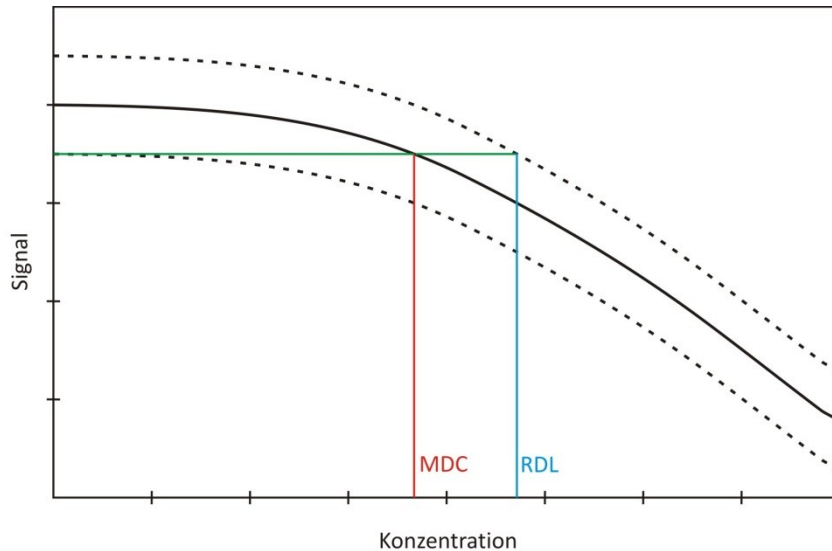


Abbildung 15: Bestimmungsmöglichkeit von RDL und MDC auf grafischem Weg. Es ist ersichtlich dass im Regelfall $RDL > MDC$.

2.3.2 Kalibrierfunktionen

Eine Kalibrierfunktion stellt wie in Kapitel 2.3.1 bereits definiert eine „funktionale Beziehung zwischen dem Erwartungswert der Messgröße und dem Wert der Zustandsgrößendifferenz“ her. „Die Kalibrierfunktion ist eine gedankliche (Modell-)Vorstellung. Sie kann durch einen Versuch nicht ermittelt werden. Sie wird durch Kalibrierung geschätzt [50].“ Eine ideale Kalibrierfunktion würde exakt dem wahren Verlauf der Messwert-Konzentrationsbeziehung entsprechen. Dies ist allerdings nur gegeben bei infinitesimalem Abstand zwischen den gemessenen Konzentrationen und einer unendlichen Anzahl an Wiederholungsmessungen. Praktischerweise kann nur eine begrenzte Anzahl an Konzentrationen mit einer gewissen Repetitionsrate gemessen werden. Daher sollte der Verlauf der Kalibrierfunktion so nah wie möglich an den wahren Verlauf approximiert werden können [65]. Der einfachste Fall einer Kalibrierfunktion ist eine lineare Abhängigkeit des Messwerts von der eingesetzten Konzentration, aus der sich eine Kalibriergerade ergibt. Ausführliche Abhandlungen zu linearen Kalibrierfunktionen finden sich in [51], [66] und [9]. Assays die auf Proteinwechselwirkungen beruhen, wie z.B. Immunoassays, weisen in großen Konzentrationsbereichen keinen linearen Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration auf. Eine Möglichkeit ist es, nicht-lineare Bereiche außen vor zu lassen und nur die linearen Bereiche zu betrachten. Dies führt allerdings meist zu einer Einschränkung des gültigen Konzentrationsbereichs der Methode. Es existieren daher zahlreiche Vorschläge, welche Art von Kalibrierfunktionen verwendet werden können. Bei einer

logarithmischen Auftragung der Konzentration gegen den Messwert wird typischerweise ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration beobachtet [67]. Die logistische Funktion, ein Spezialfall einer sigmoidalen Funktion, wird häufig als „die“ sigmoidale Funktion bezeichnet. Es existieren allerdings zahlreiche Parametrisierungen, die sich in ihrer Anpassungsfähigkeit an sigmoidale Verläufe unterschiedlichster Art eignen [68]. Je mehr Freiheitsgrade einer sigmoidalen Funktion zugrunde liegen, desto genauer kann eine Anpassung an einen Datensatz, der nicht ideal sigmoidal verläuft, erfolgen [69; 70]. Tabelle 5 fasst einige dieser Parametrisierungen, zusammengestellt aus [69; 71; 72], zusammen.

Parametrisierung	Freiheitsgrade	mathematische Darstellung
Hill-Funktion	3	$Y = A * \frac{x^B}{C^B + x^B} \quad (2.67)$
Richards oder Generalisierte Logistikkfunktion	4	$Y = \frac{A}{[1 + \exp(B - C * x)]^{1/D}} \quad (2.68)$
Logistik (3PL)	3	$Y = \frac{A}{[1 + \exp(B - C * x)]} \quad (2.69)$
Logistik (4PL)	4	$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} \quad (2.70)$
Logistik	4	$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \exp(B * C - B * \log(x))\right)} \quad (2.71)$
Logistik	4	$Y = M - \left(\frac{R}{2}\right) \tanh\left[\left(\frac{B}{2}\right) * (C - \log(x))\right] \quad (2.72)$
Logistik (5PL)	5	$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)^E} \quad (2.73)$
Logistik (r5PL)	5	$Y = D + \frac{A - D}{\left[1 + \left(2^{1/E} - 1\right) * \left(\frac{x}{C}\right)^B\right]^E} \quad (2.74)$

Tabelle 7: Parametrisierungen verschiedener Funktionen mit sigmoidalen Signalverlauf. Für die mathematische Darstellung gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Für die häufig verwendete 4PL sind drei verschiedene Darstellungen aufgezeigt, wobei Gleichung (2.70) am häufigsten verwendet wird. Je nach Assayformat und damit auch Steigung der Funktion müssen evtl. einige Vorzeichen vertauscht werden.

Bei der Auswahl des Modells sollte darauf geachtet werden, eine Parametrisierung zu verwenden, die den wahren Verlauf ausreichend gut wiedergibt. Als Kriterien hierfür können eine Residuenanalyse durchgeführt werden bzw. die Genauigkeit oder auch die Wiederfindungsrate in den durch das Modell interpolierten Bereichen bestimmt werden. Zudem sollte auf Ausreißer und Überanpassung bzw. Unteranpassung geprüft werden. Überanpassung kann bei Modellen mit vielen Parametern auftreten und die Anpassungsgüte der Kalibrierfunktion verringern, indem z.B. in den interpolierten Bereichen nicht der wahre Funktionsverlauf abgebildet wird, allerdings alle

Kalibrierpunkte mit geringer Abweichung durchlaufen werden. Bei der Unteranpassung werden bestimmte Einflussgrößen auf die Kalibrierfunktion unzureichend oder gar nicht abgebildet [73; 74]. Es gilt also weder zu wenige noch zu viele Parameter zu verwenden. Sigmoidale Funktionen gibt es bereits mit nur einem variablen Parameter. Allerdings sind die 4PL und 5PL wohl die am häufigsten verwendeten Formen bei dieser Art der Kalibrierung. Bei der 4PL gibt es unterschiedliche Parametrisierungen, die Gleichung (2.70) wird wohl am häufigsten verwendet, da die Parameter der Kalibrierfunktion ohne weitere Umformung zusätzliche Informationen liefern wie z.B. Minimum und Maximum des Signals (D und A in Abbildung 16), die Konzentration auf halber Höhe im Wendepunkt (Testmittelpunkt), die bei Ligand-Rezeptor Assays auch als IC_{50} oder EC_{50} je nach Aussagekraft, bezeichnet wird (C in Abbildung 16) und die Steigung am Wendepunkt (D in Abbildung 16). Die schnelle Zugänglichkeit dieser Daten hat aus der 4PL wohl das populärste Modell gemacht, das sowohl in der Chemie, Biologie, Medizin als auch Pharmakologie weit verbreitet ist. Die Einflüsse der Parameter auf die Kalibrierfunktion sind in Abbildung 16 dargestellt.

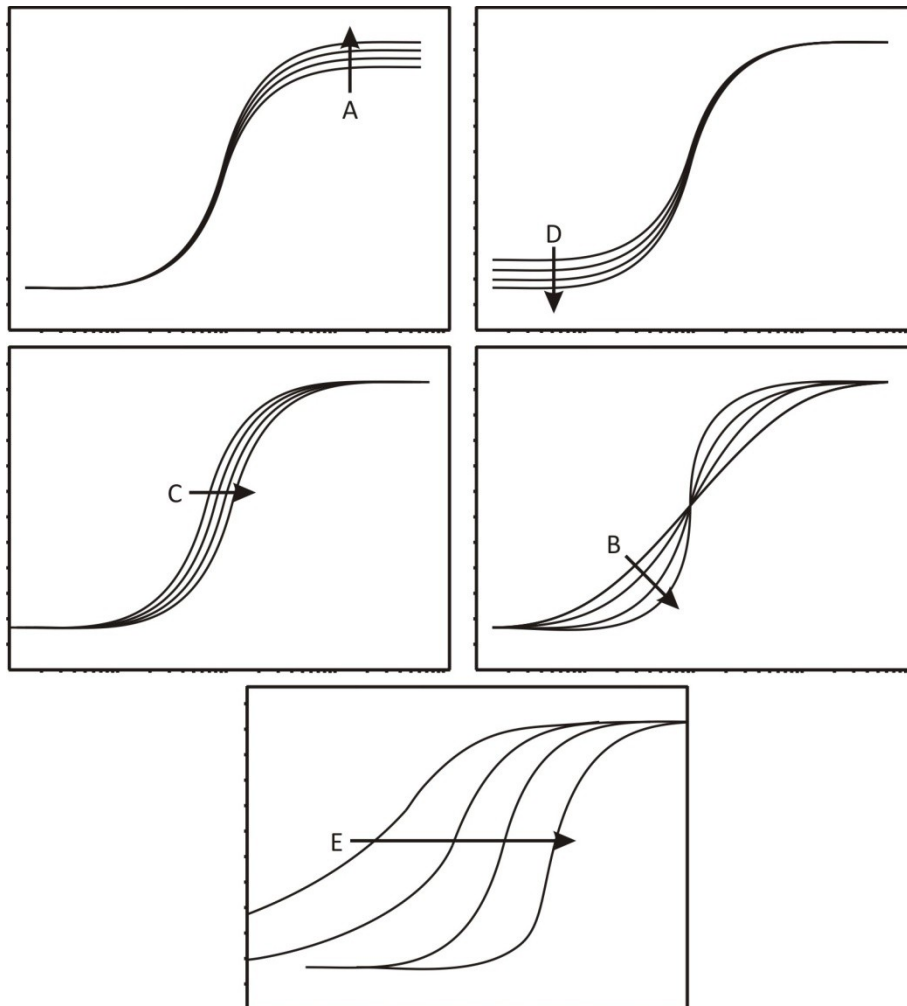


Abbildung 16: Einfluss der vier Parameter auf die 4PL nach Gleichung (2.70). Der Parameter A beeinflusst die obere Asymptote, der Parameter D die untere Asymptote. Der Parameter C gibt die Konzentration bei halber Signalhöhe und Parameter B die Steigung bei halber Signalhöhe an [65]. Parameter E beeinflusst maßgeblich die Symmetrie, wenn die 4PL nach Gleichung (2.73) zur 5PL erweitert wird.

Eine Eigenschaft der 4PL ist die Punktsymmetrie im Wendepunkt. Es wird also von einem symmetrischen Verlauf bei niedrigen wie auch hohen Konzentrationen ausgegangen. Da dies nicht immer der Fall ist [65; 72] kann die Kalibrierfunktion nicht dem wahren Verlauf der Konzentration - Messwertbeziehung folgen und liefert somit auch ungenaue Ergebnisse. Auch die exakte Bestimmung der Parameter, vor allem des Wendepunkts, der in Pharmazie und Toxikologie als Größe verwendet wird, um Dosis-Wirkungsbeziehungen auszudrücken, wird erschwert. Das Modell der 4PL wurde deshalb um einen Parameter, der der Asymmetrie Rechnung trägt, erweitert. Somit kann die 5PL der wahren Kalibrierfunktion in vielen Fällen weiter angenähert werden. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass die 5PL wegen ihrer hohen Anpassungsfähigkeit bei bestimmten, z.B. stark verrauschten Datensätzen nicht geeignet ist bzw. die 4PL und sogar die 3PL geeigneter sind [65]. Ein weiterer Nachteil ergibt sich bei der Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung. Konnte bei der 4PL der Wert des Wendepunkts direkt übernommen werden, muss beim 5PL dieser zuerst nach Gleichung (2.75) berechnet werden.

$$ED_{50} = C * \left(2^{\frac{1}{E}} - 1 \right)^{\frac{1}{B}} \quad (2.75)$$

Die Bestimmung der zugehörigen Varianz gestaltet sich aufwendig und ist in [72] beschrieben. Auf der logarithmischen Konzentrationsskala ergibt sich für den Mittelpunkt bei halber maximaler Signalthöhe MID:

$$MID = \ln(C) + \frac{1}{B} \ln \left(2^{\frac{1}{E}} - 1 \right) \quad (2.76)$$

Dieser Wert entspricht jetzt nicht mehr dem Wendepunkt wie bei der 4PL. Der Wendepunkt IP wird nach Gleichung (2.77) definiert:

$$IP = MID + \Delta \quad (2.77)$$

wobei

$$\Delta = -\frac{1}{B} \ln \left[E * \left(2^{\frac{1}{E}} - 1 \right) \right] \quad (2.78)$$

Der Asymmetriefaktor Δ kann als Maß für die Asymmetrie, die Abweichung von der 4PL, herangezogen werden. Je größer er wird, desto asymmetrischer ist der Funktionsverlauf.

Eine reparametrisierte 5PL (r5PL) nach Gleichung (2.74) aus [72] stellt die Unabhängigkeit der fünf Parameter wieder her. Damit kann wie bei der 4PL direkt aus den Parametern, z.B. aus dem Parameter C, die Dosis-Wirkungsbeziehung abgelesen werden.

All diesen Modellen liegt die Annahme eines homoskedastisch verteilten Datensatzes zugrunde. Wie bereits in Kapitel 2.3.1 und [75] erläutert, ist dies nicht immer der Fall. Daher kann eine Gewichtung der Daten zu einer Verbesserung der Kalibrierfunktion führen. Zwischen der Varianz und dem Mittelwert des Messwertes besteht oft ein einfacher funktionaler Zusammenhang [61]. In einer doppellogarithmischen Auftragung der Varianz gegen den Mittelwert des Messwertes kann die Steigung einer Kalibriergeraden als Maß für eine Gewichtung herangezogen werden. Dies entspricht der Potenz des Mittelwerts vom Messwert in der Proportionalitätsbeziehung

$$\sigma * \gamma \propto \mu^\Theta \tag{2.79}$$

- σ Varianz
- γ Proportionalitätskonstante
- μ Mittelwert des Messwerts
- Θ Potenz

Nach [67] ergibt sich der in Tabelle 8 dargestellte Zusammenhang für eine Gewichtung der Kalibrierfunktion nach dem Verfahren der kleinsten Fehlerquadrate [73].

Zusammenhang	Potenz	Gewichtung
$\sigma * \gamma \propto \mu^2$	2	$\frac{1}{\mu^4}$
$\sigma * \gamma \propto \mu^1$	1	$\frac{1}{\mu^2}$
$\sigma * \gamma \propto \mu^{0,5}$	0,5	$\frac{1}{\mu}$
$\sigma = \text{konstant}$	0	1

Tabelle 8: Hier sind die Gewichtungsfaktoren für eine Anpassung der logistischen Funktion, abhängig von der Heteroskedastizität aufgezeigt

Diese Gewichtung kann auch wieder zu einer Verbesserung der Kalibrierfunktion, einer Verbesserung der Genauigkeit und der Präzision führen.

Eine weitere Möglichkeit der Anpassung einer Kalibrierfunktion an den ermittelten Datensatz ist die vorherige Linearisierung der Daten. Die wohl verbreiteteste Methode der Linearisierung ist die Datenanpassung mit Hilfe des logit (engl. Abkürzung für „logistic unit“) Verfahrens. Eine ausführliche Beschreibung der Grundlagen findet sich in [76]. Vereinfacht lässt sich der logit nach Normalisierung der Messwerte berechnen durch

$$\text{logit}(P) = \ln\left(\frac{P}{1-P}\right) \tag{2.80}$$

P normalisierte Messwerte

Durch Auftragung in einem log-logit-Diagramm erhält man, in gewissen Grenzen, einen linearisierten Zusammenhang zwischen Konzentration und Messwert.

Weitere verwendete Funktionen sind Polynome n-ter Ordnung, Splines, die aus Polynomen n-ter Ordnung zusammengesetzt sind oder auch Parametrisierungen des Massenwirkungsgesetzes für verschiedene Assayformate [3].

2.3.3 Empfehlungen für Methodvalidierung

Unter Validierung versteht man nach [77] „eine durch Überprüfung erlangte Bestätigung, dass alle Voraussetzungen für eine beabsichtigte Anwendung erfüllt sind“. Dies beinhaltet die Festlegung der analytischen und chemischen Anforderungen, die Bestimmung der Methodenparameter, die Überprüfung, dass die Methode die Anforderungen erfüllt, sowie die Angabe der Gültigkeit. Ziel des ganzen Prozesses ist es Kenndaten, Grenzen und mögliche Störeinflüsse auf die Methode zu erfassen. Die Validierung dient der Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse, ist auch Voraussetzung für die Akkreditierung nach [77] und dient der juristischen Absicherung. Abseits der rechtlichen Grundlagen (DIN/ISO-Normen) gibt es einige Verbände und auch Behörden in anderen Ländern, die sich mit dem Thema Methodvalidierung auf dem Gebiet der Bioassays beschäftigen. Diese haben Anleitungen und Vorschläge zur Methodvalidierung ausgearbeitet, um Hilfestellung zu geben, oft anhand der bereits bestehenden Normen. Hierzu gehört in Europa die Eurachem, in der Partner aus Industrie, Forschung, Ämter und Behörden aus ganz Europa vertreten sind oder in den USA das U.S. Department of Health and Human Services, die FDA und einige Forschungseinrichtungen. Die „Eurachem – A focus for analytical chemistry in Europe“ hat einige Dokumente, die sich mit Methodvalidierung beschäftigen, zusammengestellt „The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics“ [9] und „Guide to Quality in Analytical Chemistry – An Aid to Accreditation“ [66]. Hier werden geeignete Vorgehensweisen zur Methodvalidierung vorgestellt. Allerdings wird hier immer von einer linearen Kalibrierung ausgegangen, daher werden im folgenden Abschnitt die wichtigsten Parameter einer Validierung zusammengefasst, allerdings ohne die vorgeschlagene Vorgehensweise im Falle einer linearen Kalibrierung, da diese Form der Kalibrierung in dieser Arbeit kaum Berücksichtigung findet.

- **Selektivität und Spezifität**
Eine Methode ist selektiv, wenn sie einen Analyten neben verschiedenen, nebeneinander existierenden Stoffen ohne gegenseitige Störung erfassen kann. Eine Methode ist spezifisch, wenn der Analyt „ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandenen Komponenten“ erfasst werden kann. Zur Prüfung sollte der Analyt möglichst ohne Störsubstanzen, später mit steigender Konzentration möglicher Störsubstanzen, bestimmt werden, um den Einfluss auf die Methode festzustellen [78].
- **Arbeitsbereich**
Der Arbeitsbereich definiert den durch Randbedingungen festgelegten und experimentell überprüften Gültigkeitsbereich einer Methode [78].
- **Kalibrierung und Rückverfolgbarkeit**
Eine Kalibrierung stellt einen funktionalen Zusammenhang zwischen dem Messsignal und den Konzentrationen der eingesetzten Standards her. Die eindeutige Zuordnung des Messergebnisses zur entsprechenden Probe oder Standard muss dabei gewährleistet sein [66].
- **Richtigkeit und Wiederfindungsrate**
Abweichung des Messwerts vom wahren Wert aufgrund eines systematischen Fehlers [79].
- **Linearität**
Direkte Proportionalität zwischen Signal und Analytkonzentration [79].
- **LOD und LOQ**
Siehe 2.3.1
- **Robustheit**

Unempfindlichkeit einer Methode gegenüber Änderungen der analytischen Rahmenbedingungen [9]

- Präzision

Zufällige Streuung der Analysewerte [79]. Es kann zwischen der Wiederhol- (repeatability) und Vergleichspräzision (reproducibility) unterschieden werden. Die Wiederholpräzision wird exakt unter denselben Bedingungen durchgeführt, auf dem gleichen Gerät vom selben Mitarbeiter, bei der Vergleichspräzision wird dieselbe Methode angewandt, aber z.B. auf einem anderen Gerät oder von einem anderen Mitarbeiter [9].

Da hier ausschließlich auf lineare Bereiche von Kalibrierfunktionen eingegangen wird, werden hier die Vorgehensweisen des Dokuments, Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation des U.S. Department of Health and Human Services vorgestellt und zusammengefasst [10]. Diese Anleitung wurde für eine Vielzahl von Anwendungen geschrieben u.a. auch für Methodenentwicklung bioanalytischer Methoden im humanklinischen Bereich und der Methodvalidierung in vorklinischen Studien. Es wird explizit erwähnt, dass es sich dabei um quantitative Bestimmungsmethoden in biologischen Matrices wie z.B. Blut, Urin, Plasma oder Serum und weiteren biologischen Proben handeln soll. Desweiteren wird vorgeschlagen, diese Anleitung generell für bioanalytische Methoden einzusetzen und je nach analytischer Methode entsprechend anzupassen. Hier wird also keine starre Vorgehensweise vorgegeben, sondern ein Gerüst, an dem man sich orientieren kann bzw. sollte. Es wird hierbei noch unterschieden zwischen einer vollständigen Validierung, einer Teilvalidierung und der Vergleichsprüfung, die sich in ihrer Zielsetzung und Aufwand unterscheiden. Näheres findet sich dazu in [10]. Die folgenden Definitionen sind, wenn nicht anders angegeben, alle [10] entnommen. Im Kern werden unter der Validierung einer bioanalytischen Methode alle Vorgehensweisen verstanden, die zeigen, dass eine bestimmte Methode für die quantitative Messung eines Analyten in einer biologischen Matrix für den gedachten Einsatzzweck verlässlich und reproduzierbar ist.

Die dabei wichtigen Parameter sind:

- Selektivität (selectivity)
- Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision; accuracy and precision)
- Wiederfindung (recovery rates)
- Stabilität (stability)

auf die im einzelnen eingegangen wird. Im Folgenden wird vor allem eine Vorgehensweise vorgestellt, wie diese Parameter untersucht werden können.

Um die Selektivität zu bestimmen wird vorgeschlagen sechs „field blanks“ zu messen. Jede dieser Leerproben sollte auf Störeinflüsse überprüft werden. Dazu können verschiedene Störsubstanzen hinzugefügt werden.

Die Genauigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Differenz des Messwertes zum wahren Wert. Sie kann als Gesamtfehler einer Analyse angesehen werden und setzt sich aus Präzision und Richtigkeit zusammen [80]. Die Richtigkeit kann durch Wiederholungsmessungen, die die gleiche Menge Analyt enthalten, bestimmt werden. Es wird empfohlen drei verschiedene Konzentrationen, möglichst im Bereich der zu erwartenden Konzentration einer Realprobe je fünffach zu bestimmen. Der Mittelwert der Abweichung vom wahren Wert sollte nicht mehr als 15 % betragen. Am Lower

Limit of Quantifikation (LLOQ) sollte die Abweichung 20 % nicht übersteigen. Genaueres über die Bestimmung des LLOQ kann in [81] nachgelesen werden. Der LLOQ entspricht hier aber dem bereits definierten LOQ nach IUPAC. Im Folgenden wird von der bereits in Kapitel 2.3.1 diskutierten Definition der IUPAC für das LOQ ausgegangen. Zu beachten ist dabei, dass all diese Angaben nur Sinn machen, wenn vorher der Messwert von der Signaldomäne in die Konzentrationsdomäne umgerechnet wird. Kleine Abweichungen in der Signaldomäne können bereits zu sehr großen Änderungen in der Konzentrationsdomäne führen. Die Bestimmung der Präzision erfolgt durch „wiederholte Analyse einer homogenen Probe.“ [82] . Es wird empfohlen drei verschiedene Konzentrationen, möglichst im Bereich der zu erwartenden Konzentration einer Realprobe je fünffach zu bestimmen. Die Abweichung vom Mittelwert sollte auch hier nicht größer als 15 % sein. Am LLOQ sollte die Abweichung 20 % nicht übersteigen. Die Präzision kann für verschiedene Szenarien bestimmt werden, z.B. innerhalb oder nach einem Messdurchlauf, oder auch die evtl. auftretende Änderung mit fortschreitender Zeit oder durch Änderung einer Charge der nötigen Materialien bzw. Chemikalien.

Die Wiederfindung sollte für drei Konzentrationen, je im unteren, mittleren und hohen Konzentrationsbereich für die jeweilige Testmethode bestimmt werden. Idealerweise wird eine Wiederfindung von 100 % erhalten. Genauere Angaben bezüglich der tolerierten Abweichung werden hier nicht gemacht. Für die bei Immunoassays typischen nicht-linearen Kalibrierfunktionen sollten nicht weniger als sechs Konzentrationen und eine Nullprobe mindestens zweifach bestimmt werden, wobei eine Erhöhung der Wiederholungsmessungen die Genauigkeit im Regelfall erhöht. Es sollte für eine quantitative Bestimmung einer Probe, die sich auf die Kalibrierfunktion bezieht, dieselbe Anzahl an Messungen für die Probe vorgenommen werden wie für die Kalibrierung. Außerdem sollte immer das einfachste Modell, das die Konzentrations-Signal-Beziehung hinreichend beschreibt verwendet werden. Für Immunoassays wird die 4PL oder 5PL vorgeschlagen, aber auch andere Funktionen sind möglich.

Als letzter Punkt wird empfohlen die Probenstabilität bei Kurz- und Langzeitlagerung, bei verschiedenen Temperaturen, sowie die Stabilität bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Probe zu untersuchen. Auch die Stabilität der eingesetzten Chemikalien sollte untersucht werden.

Diese hier in Kurzform dargestellten Empfehlungen können auch nach der Methodvalidierung im Routinebetrieb als Akzeptanzkriterien für Kalibrierungen oder für Funktionsprüfungen eingesetzt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Aufbauten

3.1.1 Allgemeine Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Eismaschine	AF 80	Scotsman
Gefrierschrank -20 °C	Premium no frost	Liebherr
Gefrierschrank -20 °C	Okö Super	Liebherr
Kontaktwinkelmessgerät	CAM 200	KSV
Kühlschrank	Premium	Liebherr
pH-Meter	CG843	Schott
Pipetten	Reference	Eppendorf
Pipetten	Pos D	Rainin
Plasmaverascher	100-E Plasma System	TePla TechnicsPlasma GmbH
Reinstwasseranlage	Purelab classic	ELGA LabWater
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	Bandelin
Waage	Micro	Sartorius
Waage	XS 205 DualRange	MettlerToledo
Zentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge 15	Heraeus

3.1.2 Spotter

Für die Präparation der Oberflächen wurde das in Kapitel 3.5.1 aufgezeigte Verfahren verwendet. Der letzte Schritt, VI(g+k), kann als vollflächige Beschichtung oder als selektive punktförmige Beschichtung erfolgen. Bei dem für die selektive Beschichtung verwendeten Kontaktdrucker (engl. „contact printer“ oder auch „Spotter“) handelt es sich um den BioOdyssey™ Calligrapher™ MiniArrayer von bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland. Verwendet wurde eine 310 µm durchmessende Nadel („solid pin“), die in ein Vorratsgefäß einer Microtiterplatte mit der verwendeten Lösung für die Beschichtung eintaucht und den Tropfen dann auf die spezifizierte Stelle auf dem Transducer durch Vollkontakt (500 ms) wieder absetzt. Das für die Beschichtung verwendete Schema ist in Abbildung 17 dargestellt. Für Fluoreszenz-, wie auch CL-Messungen wurde dasselbe

„Spotting“-Schema verwendet, wobei die CL auch andere Schemata erlaubt. Bei der Fluoreszenzmessung muss hingegen der eingekoppelte Laserstrahl exakt auf das Spotting-Schema passen, damit Anregung stattfinden kann.

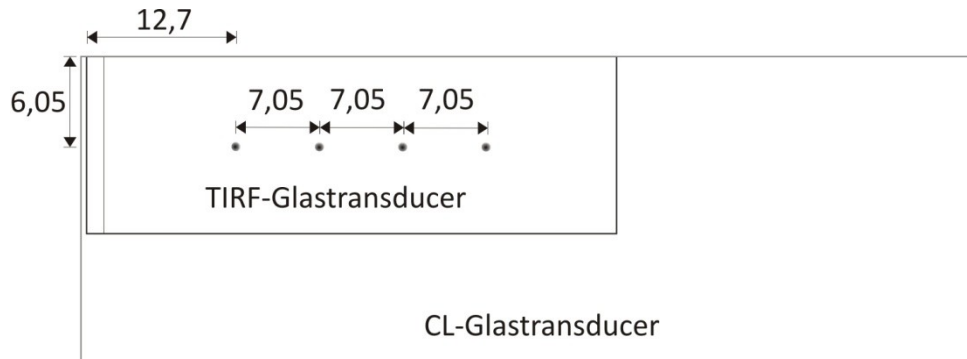


Abbildung 17: Spotting-Schema mit Abständen in mm. Sowohl für die TIRF Transducer wie auch die Glastransducer wurde dasselbe Spotting-Schema verwendet.

3.1.3 TIRF-Biosensorsystem

Das verwendete TIRF-Biosensorsystem wurde im Rahmen des EU-Projekts CARE-MAN maßgeblich von Siemens, Erlangen, Deutschland in Kooperation mit BIT Analytical Instruments GmbH, Schwalbach, Deutschland entwickelt und die Hardwarefunktionen getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Einsatzfähigkeit des Systems für Bioassays im klinischen Bereich getestet und optimiert. Der eigentliche Name des Sensorsystems lautet SMPWG-System (Single-/Multipath- Planar WaveGuide-System), da auch Transducer mit integriert optischen Strukturen verwendet werden können, die aber im Rahmen dieser Arbeit keine Anwendung finden. Das System wird im Folgenden als FABIAN (Fluoreszenz-Assay-Binding-Inhibition-Assay-Analyser) oder einfach Biosensorsystem bezeichnet. In der Außenansicht, Abbildung 18, sind einige fluidische Komponenten zu erkennen, das eigentliche Sensorsystem ist unter dem Deckel bzw. im Gerät zu finden. Abbildung 19 zeigt FABIAN zusammen mit einem Probengeber und PC-Ansteuerung.

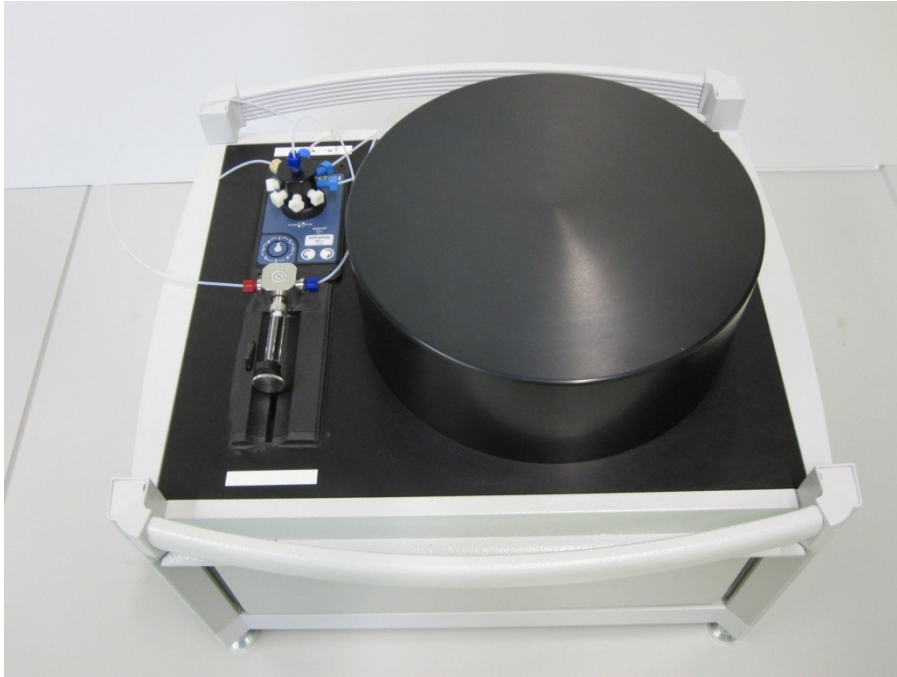


Abbildung 18: Foto des TIRF-Biosensorsystems, kurz FABIAN. Zu sehen sind eine Spritzenpumpe und ein 8-Wege-Ventil. Alle weiteren Komponenten sind im Betrieb unter dem Deckel verborgen.

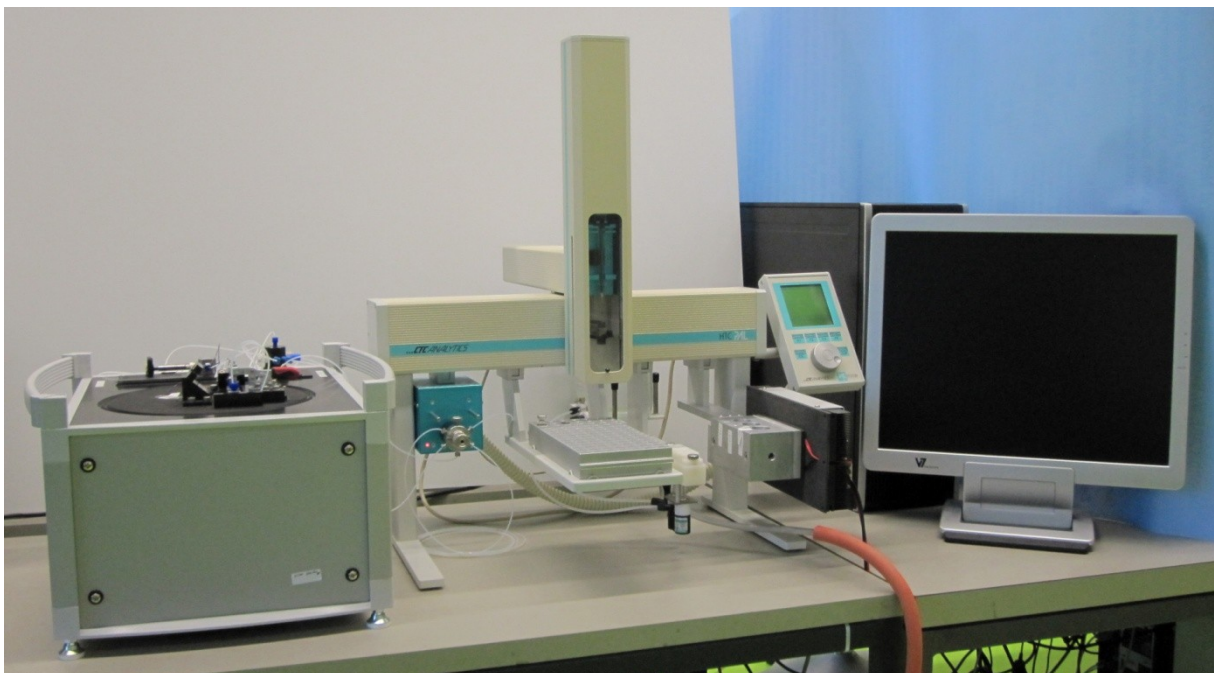


Abbildung 19: Foto von FABIAN incl. Probengeber und Steuerung.

Der schematische Aufbau, in Abbildung 20, zeigt die verschiedenen Komponenten FABIANs, die im Folgenden näher beschrieben werden.

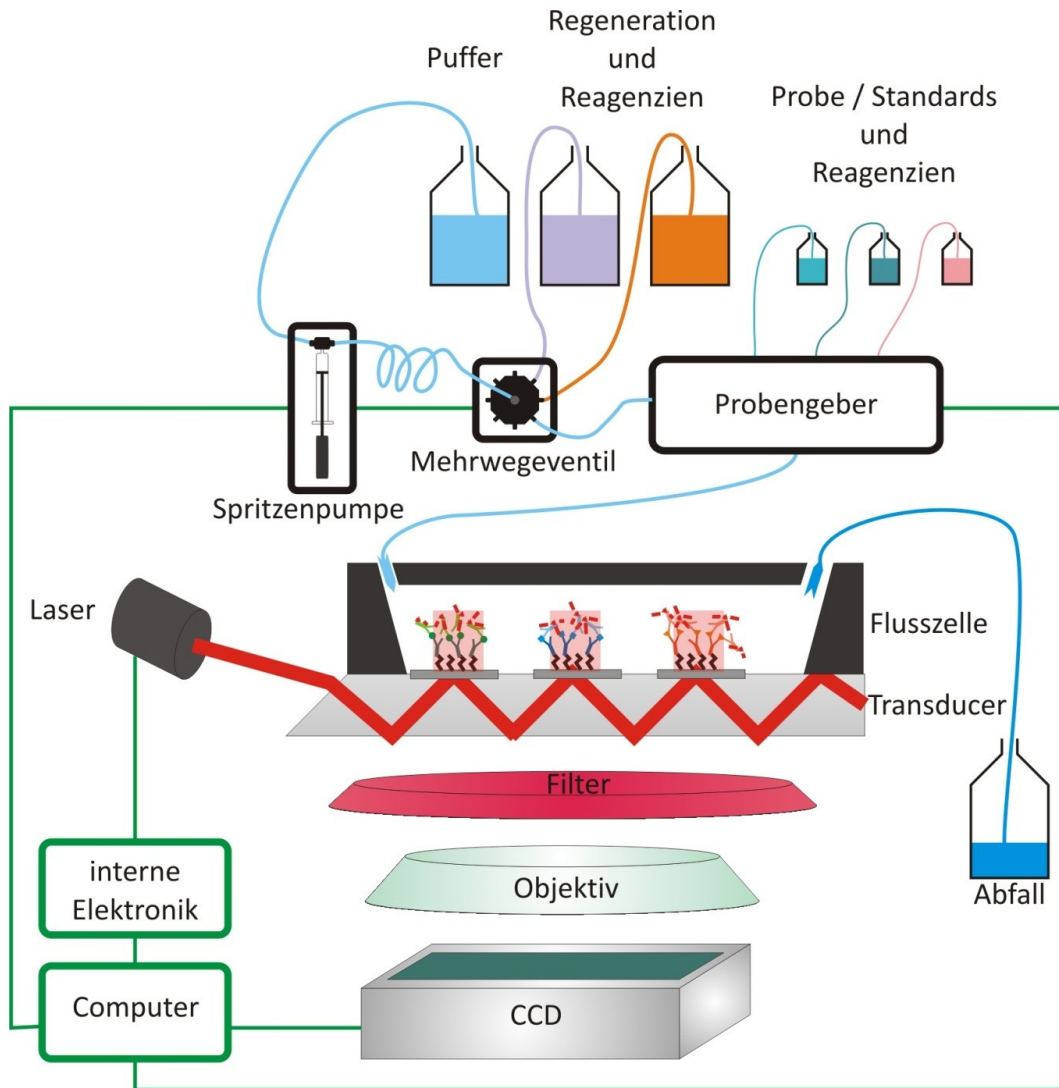


Abbildung 20: Schematischer Aufbau des TIRF-Biosensorsystems, kurz FABIAN inkl. aller fluidischer Komponenten und Steuerung.

FABIAN ist ein modular aufgebautes Biosensorsystem. Als Hauptkomponenten lassen sich die Anregungs-, Detektions-, Elektronik- und Fluidikmodule unterscheiden. Das Anregungsmodul besteht aus einem fasergekoppelten Laser ($\lambda = 635 \text{ nm}$), der aus dem Inneren des Gerätes mittels Faser auf die Deckplatte geführt wird. Dort ist ein Kollimator fest verbaut, über den der Laserstrahl wieder ausgekoppelt wird und auf einen fixen Punkt gerichtet ist. Mittels Software lässt sich die Leistung des ausgekoppelten Laserstrahls zwischen 1 und 20 mW festlegen. Der Transducer wird so angebracht, dass der Laserstrahl über die abgeschrägte Fläche in den Transducer eingekoppelt wird. Auf der Deckplatte befinden sich mehrere Verstelleinrichtungen, mit denen die optimale Lage für den Transducer eingestellt werden kann. Durch eine Öffnung unter dem Transducer wird evtl. entstehendes Fluoreszenzlicht durch einen Filter (Bandpass $710 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$), der einen Großteil der eingestreuten Anregungsstrahlung filtert, durch eine Linse auf eine CCD Kamera fokussiert. Die CCD nimmt zur Onlineüberwachung kontinuierlich Bilder mit frei wählbaren Belichtungszeiten auf. Für die eigentliche Auswertung sind zwei Bilder ausreichend, eines vor Inkubation (mit Streulicht, Rauschen etc.) und eines nach der Inkubation (max. Fluoreszenzsignal). Dieses Detektionsmodul ist theoretisch

austauschbar mit einem Photodiodenmodul, das in dieser Arbeit keine Anwendung findet. Innerhalb des Gerätes befinden sich noch einige elektronische Komponenten u.a. eine A/D-Karte mit der der Laser angesteuert werden kann und auch Temperaturdioden etc. ausgelesen werden können. Die verbaute Fluidik besteht aus einer Spritzenpumpe und einem Ventilblock, auf den ein 8-Wege-Ventil aufgesetzt ist; es können aber auch andere Ventile mit weniger oder mehr Anschlüssen verwendet werden. Das Anschlusschema des 8-Wege-Ventils und der Spritzenpumpe ist in Abbildung 21 abgebildet.

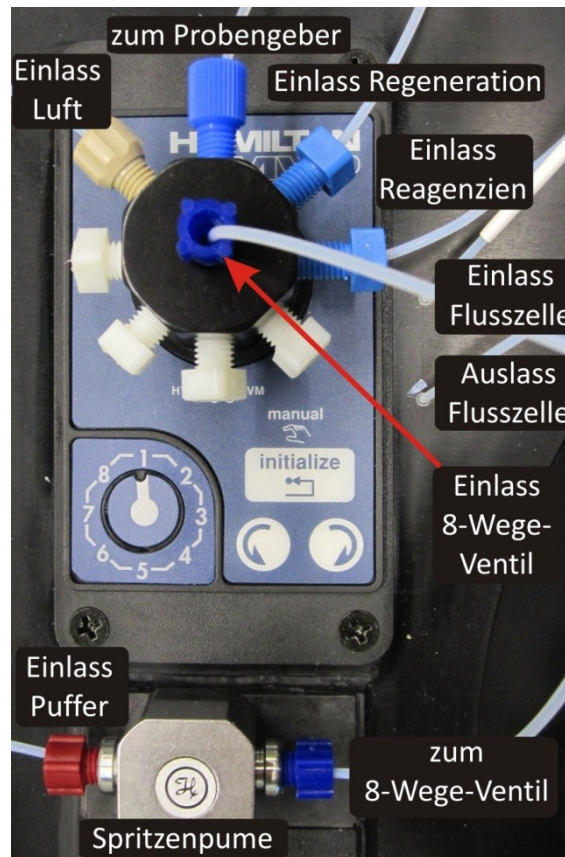


Abbildung 21: Anschlusschema des Fluidikmoduls.

Für den Laborbetrieb, für größeren Durchsatz und längere Messreihen kann die interne Fluidik noch mit einem Probengeber (HTC PAL, CTC Analytics, Schweiz), der die Probenkühlung und Probenvorbereitung (Mischen) übernimmt, verbunden werden (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

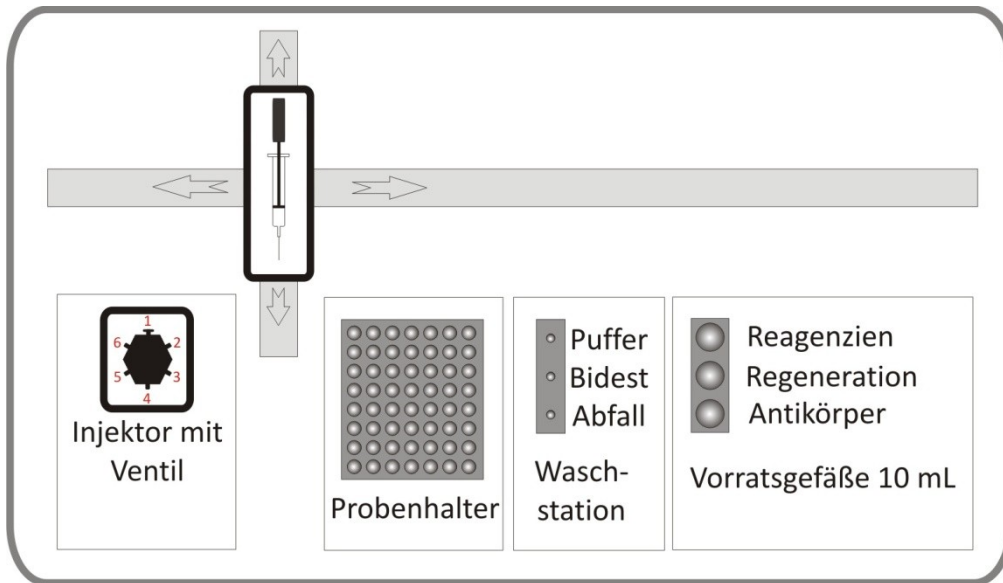


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Probengebers, bestehend aus einem Injektorblock mit Ventil, einem Probenhalter für bis zu 98 1mL Gefäße (kühlbar), einer Waschstation mit Puffer und Wasseranschluss und einer Reagenzienstation mit 10 mL Vorratsgefäßen (kühlbar).

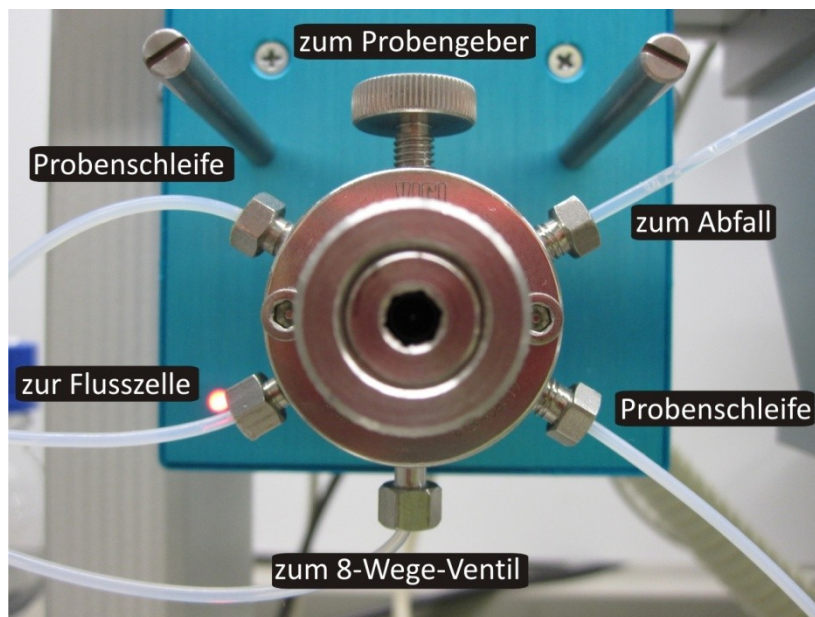


Abbildung 23: Zuordnung der verschiedenen Anschlüsse des Injektors mit Ventil vom Probengeber

Zum Fluidikmodul kann noch die Flusszelle, die mit Hilfe eines Spannhebels über dem Transducer fixiert wird, zugeordnet werden. Die Flusszelle besteht aus einem 44 mm langen, 13 mm breiten und 12 mm hohen PMMA-Block, der mit zwei Bohrungen für den Ein- und Auslass und einem 36 mm langen, 4,5 mm breiten und 30 μ m hohen ovalen Flusskanal versehen wurde (siehe auch Abbildung 24). Bei den verwendeten Schläuchen handelt es sich um PTFE-Schläuche mit 1/16 Zoll Außendurchmesser und 0,5 mm Innendurchmesser von Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe,

Deutschland. Die Schläuche wurden so kurz wie möglich gehalten. Am Probengeber befindet sich eine Probenschleife von 500 μL , um die Probe aufnehmen zu können. Direkt vor der Spritzenpumpe befindet sich ebenfalls eine Schleife mit 1000 μL Fassungsvermögen, um zu verhindern, dass angesaugte Flüssigkeit in die Spritzenpumpe gelangt.

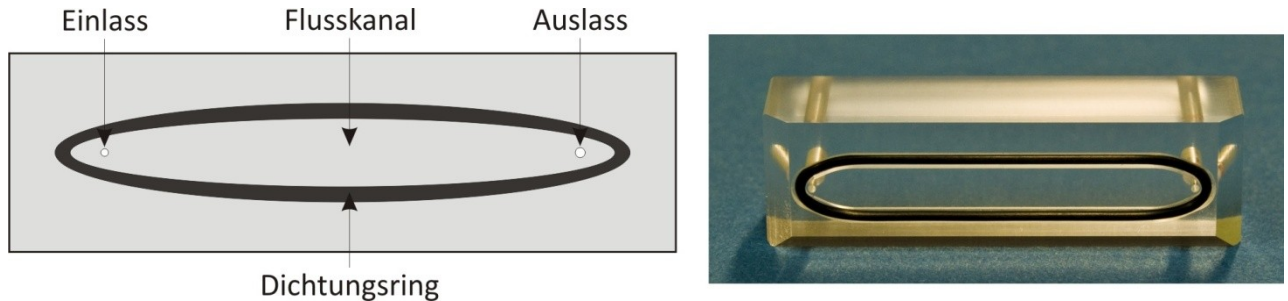


Abbildung 24: Links ist eine Ansicht der Flusszelle von unten, rechts ein Foto der Flusszelle von schräg unten dargestellt. Der Anschluss erfolgt durch direktes Verkleben der PTFE-Schläuche mit der Flusszelle oder durch Bohrungen in der Flusszelle für PTFE-Fittings für 1/16 Zoll Schläuche. Die hier abgebildete Version ist für das Einkleben ausgerichtet.

Einige Komponenten des Anregungs- und Fluidikmoduls sind bei geöffnetem Deckel auf der Deckplatte zu sehen (siehe Abbildung 25).

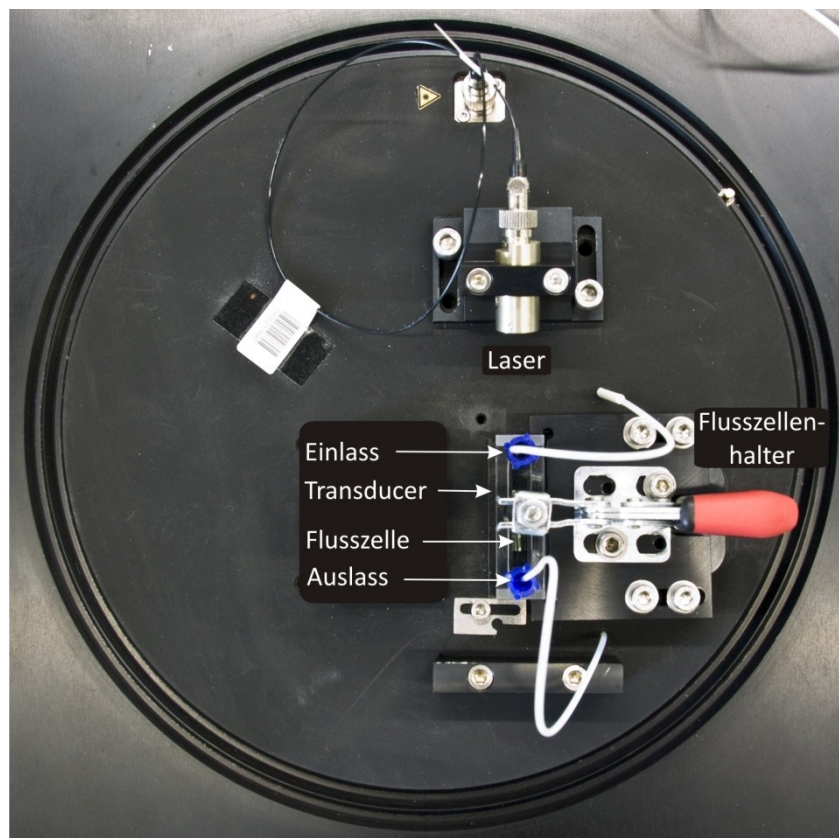


Abbildung 25: Deckplatte mit Laserkollimator, Transducer und Flusszelle inklusive Halterung bei geöffnetem Deckel.

Alle essentiellen Bauteile des Anregungs- und Detektionsmoduls, des elektronischen Moduls und des Fluidikmoduls sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Darüber hinaus wurden in und an das Gehäuse noch weitere (individual angefertigte) mechanische Bauteile wie Halterungen etc. und elektronische Bauteile wie Stromversorgung, Steckerbuchsen, Kabel und Sicherungen verbaut, die hier nicht explizit aufgezählt werden.

Komponente	Bezeichnung	Hersteller
Anregungsmodul		
Lasert	FiberMOD VIS, 635	Blu Sky Research
FC/PC PM cable	Monomode 635 nm	Diamond
FC collimator	Kollimator	Schäfter & Kirchhoff
Detektionsmodul		
CCD C-Mount camera	Lu160m	Lumenera
Linse	Xenon 17/0,9	Schneider Kreuznach
Filter	HQ710, 1" Durchmesser	LOT
Elektronikmodul		
ACD card	USB-6218	National Instruments
Fluidikmodul		
8-Wege-Ventil	HVXM 8-5 H36766	Hamilton
Ventil-Antrieb	MVP valve drive	Hamilton
Spritzenpumpe	PSD/3 H5175-01	Hamilton
Glasspritze	500µl TTLX-Spritze 1001.5	Hamilton
Schläuche	PTFE-Schläuche (1/16" x 500µm)	Klaus Ziemer
Verbindungsstecker	PTFE 1/4", 28UNF	div. Hersteller

Tabelle 9: Zusammenfassung der essentiellen Bauteile FABIANS.

FABIAN kann durch einfache Modifikationen auch für Chemilumineszenzmessungen verwendet werden. Hierzu wird das Anregungsmodul während der Messung deaktiviert und der Filter im Strahlengang des Detektionsmoduls zur CCD ausgebaut, um kleinere Wellenlängen, wie sie bei der CL von Luminol auftreten, passieren zu lassen.

Gesteuert wird der Biosensor inkl. Fluidik und Probengeber von einer eigens hierfür entwickelten Software. Mit Hilfe dieser Software ist es möglich Grundparameter der Kamera zu verändern und Skript-Dateien einzuladen, die den kompletten Messablauf definieren. Die Software stellt die Ergebnisse der Onlinemessung zeitaufgelöst dar und speichert die Messdaten in Tabellen und

zusätzlich als RAW-Bilder ab. Desweiteren ist es möglich standardisierte Parameter (sowohl Hardwareeinstellungen, wie auch Informationen zu den verwendeten Assays wie z.B. Batchnummer der Chemikalien etc.) aus einer Datenbank, entwickelt im Projekt CARE-MAN, zu laden. Die erhaltenen Messdaten können anschließend auch wieder in diese Datenbank hochgeladen werden. Die Software wurde betrieben auf einem Intel 2,7 GHz Dual Core CPU mit 2 GB Speicher auf dem Betriebssystem WinXP SP3. Der Schnappschuss in Abbildung 26 zeigt die Oberfläche der Software. Weitere Einzelheiten zur Bedienung, Skriptsprache und den Einstellmöglichkeiten können aus der dafür mitgeschriebenen Bedienungsanleitung („Draft version of the user manual for the SMPWG II instrument“) entnommen werden.

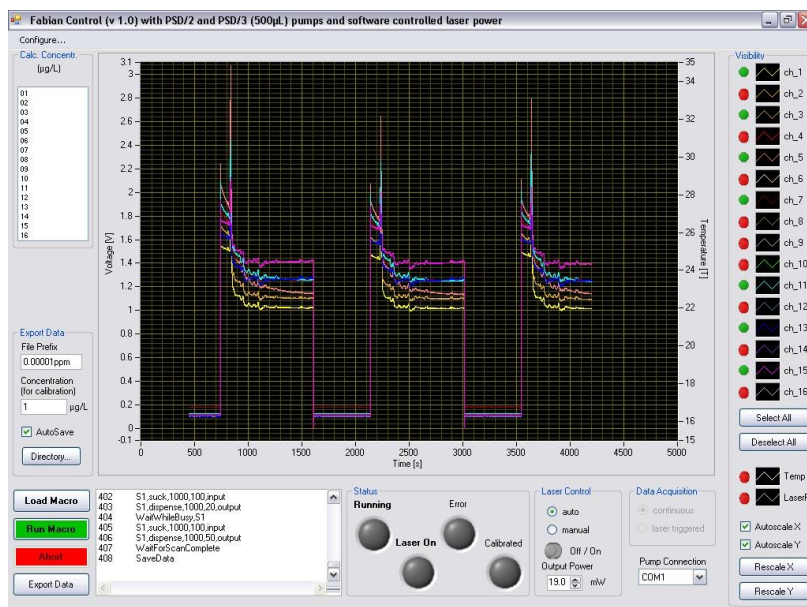


Abbildung 26: Schnappschuss der Bedieneroberfläche der Fabian Software

Tabelle 10 zeigt das Standardskript einer Neopterin-Messung (Bindungshemmtest) inkl. einer Erklärung des Messablaufs. Das Standardmessprogramm benötigt ca. 18 min für einen Durchlauf inkl. der Reinigung der Fluidik mit Probengeber und wurde mit einer Konzentration von 20 ng Neopterin-AK pro Messung und 100 µg BSA, als Hintergrundprotein, durchgeführt.

AutoSave,On	Grundeinstellungen, Initialisierung der Fluidik
Init	
PAL,Port,COM3	
MVP3,1	System mit 500 µL Puffer spülen
S2,suck,500,100,input	
S2,dispense,500,20,output	Der Laser wird aktiviert
LaserOn	
StartBackgroundScan,1100	Messung starten, Beginn der Basislinienaufnahme
PAL,Macro,Makro1.txt	Probengeber pipetiert AK zur Probe und wartet 60 s
PAL,Wait	

Material und Methoden

Wait,60	
S2,suck,450,50,input	System zieht Puffer auf und ein Luftblase zur Trennung von Puffer und vorinkubierter Probe
WaitWhileBusy, S2	
MVP3,8	
S2,suck,50,50,output	
WaitWhileBusy, S2	
MVP3,1	
PAL,Macro,Makro2.txt	Probengeber injiziert die vorinkubierte Probe in die Probenschleife
PAL,Wait	
LaserOff	Der Laser wird deaktiviert, Ende der Basislinienaufnahme
S2,dispense,160,20,output	Die vorinkubierte Probe wird sehr langsam (1 µL/s) über den Transducer geleitet. Anschließend wird Puffer über den Transducer gepumpt, um die Flusszelle zu spülen
S2,suck,160,100,input	
S2,dispense,500,1,output	
S2,suck,500,100,input	
S2,dispense,500,20,output	
WaitWhileBusy, S2	
LaserOn	Der Laser wird aktiviert
MVP3,2	Das Bild direkt nach der Aktivierung des Lasers wird zur Auswertung herangezogen. Nach einer kurzen Wartezeit wird das System zur Reinigung und evtl. Regeneration mit SDS und Puffer gespült. Während der ganzen Zeit ist der Laser aktiviert. Es kann somit am Anfang online die Photodegradation des Fluoreszenzlabels, später die Reinigung des Transducers verfolgt werden.
S2,suck,500,50,output	
WaitWhileBusy, S2	
Wait,20	
MVP3,1	
S2,dispense,500,50,output	
WaitWhileBusy, S2	
MVP3,2	
S2,suck,500,50,output	
WaitWhileBusy, S2	
MVP3,1	
S2,dispense,500,20,output	
S2,suck,500,100,input	
S2,dispense,500,20,output	
S2,suck,500,100,input	
S2,dispense,500,20,output	
S2,suck,500,100,input	
S2,dispense,500,40,output	
PAL,Macro,Makro3.txt	Der Probengeber startet ein internes Reinigungsprogramm
PAL,Wait	
LaserOff	Der Laser wird deaktiviert
WaitForScanComplete	Am Ende der Messung Daten speichern
SaveData	

Tabelle 10: Messablauf einer Fluoreszenzmessung nach dem Standardprotokoll. Links ist der Befehl der Skriptsprache zu sehen, rechts die Erklärung hierzu.

Abbildung 27 zeigt eine exemplarische Messkurve.

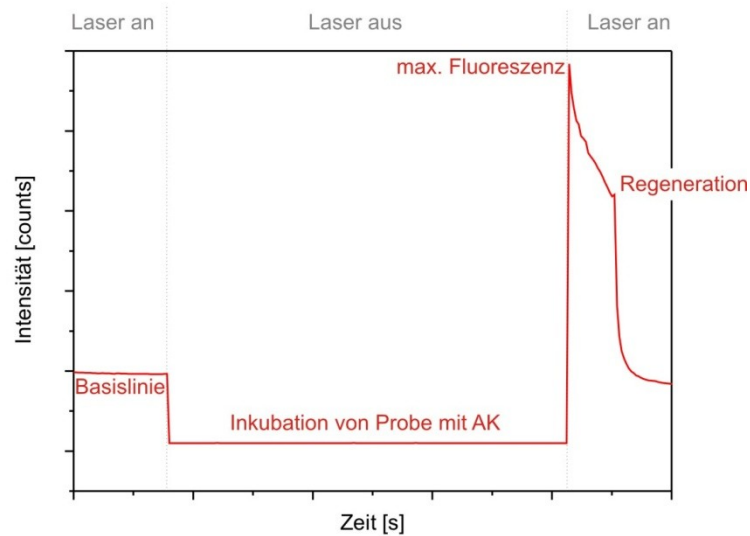


Abbildung 27: Exemplarische Messverlauf einer Fluoreszenzmessung mit Basislinie, Inkubationszeit ohne Laser und damit ohne Signal, der max. Fluoreszenz direkt nach dem Wiedereinschalten des Lasers, der darauffolgenden Photodegradation und der Regeneration.

Für die Durchführung eines Sandwich-Assays wurde das Skript angepasst. Zuerst wurde das AG ohne Vorinkubation über den Transducer geleitet, anschließend der Sekundär-AK. Dadurch verlängert sich die Messzeit auf nahezu 30 min, da sowohl das AG wie auch der AK sehr langsam über den Transducer gepumpt werden. Die Entscheidung für den Sandwich-Assay ohne Vorinkubation wurde getroffen, da es beim Sandwich-Assay mit Vorinkubation bei sehr großer AG-Konzentration und einer dazu relativ niedrigen AK-Konzentration, wie sie hier verwendet wurde, passieren kann, dass der AK „verdünnt“ wird. Es bindet zu viel AG ohne AK an die Transduceroberfläche und die Signalintensität sinkt. Bei einer hohen Konzentration entsteht so der Effekt einer Signalabnahme und damit einer Konzentrationsfehlbestimmung. Dies kann mit dem verwendeten Sandwichassay ohne Vorinkubation, allerdings mit Verlängerung der Messzeit, umgangen werden. Für die Durchführung des Chemilumineszenzassays (Bindungshemmtest) wurde der Messablauf ebenfalls modifiziert. Der Laser wird nicht benötigt. Desweiteren wird kurz vor der Vorinkubation dem biotinylierten AK das Enzymlabel [Streptavidin-HRP) hinzugefügt. Nach der Durchführung des Assays wird ein Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Luminol auf die Transduceroberfläche gegeben um CL zu produzieren. Auch hierbei verlängert sich der Messablauf auf ca. 25 min.

3.1.4 RlFS

Beim RlFS-Sensorsystem (Reflektometrische Interferenzspektroskopie) handelt es sich um ein optisches Sensorsystem, das im Gegensatz zu TIRF zu den markierungsfreien Methoden gezählt wird. In Abbildung 28 ist die Funktionsweise zusammenfassend dargestellt, ausführliche Beschreibungen finden sich in [83; 84; 85]

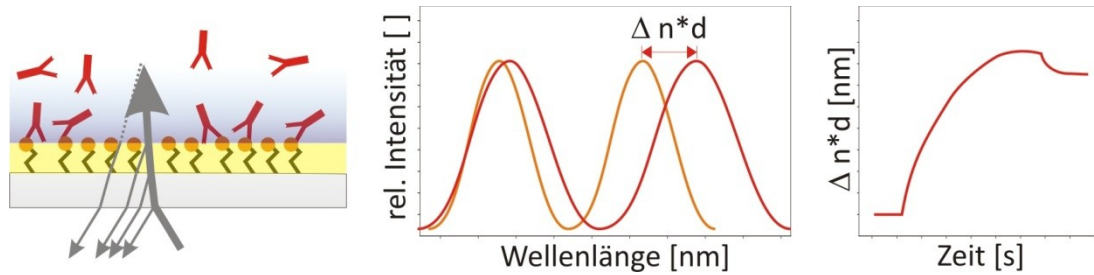


Abbildung 28: Links: Anbindung an die Oberfläche, bei der sich die Superposition, der an den einzelnen Schichten gebrochenen Lichtstrahlen ändert. Mitte: Die daraus resultierende Änderung der Interferenz verändert das Reflektionsspektrum. Rechts: Beobachtet man nun die Verschiebung der Extrema, die als Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke angesehen werden kann und trägt diese gegen die Zeit auf, erhält man eine Bindungskurve, die Informationen über die Assoziation und Dissoziation an die Oberfläche enthält.

Beim apparativen Aufbau handelt es sich um Eigenkonstruktionen. Hierbei wird das Licht einer Halogenlampe in einen Wellenleiter eingekoppelt und zum Transducer, der in einer Flusszelle eingespannt ist, geführt. Der Lichtleiter steht dort senkrecht auf dem Transducer, das Licht fällt somit im 90 °Winkel auf den Transducer. Das reflektierte Licht koppelt wieder in den Y-Wellenleiter ein und wird durch den Strahlenteiler zu einem Diodenzeilenspektrometer geleitet. Die Steuerung und Auswertung erfolgt über die eigens dafür entwickelten Programme Measure und IFZ. Der Aufbau ist in Abbildung 29 dargestellt.

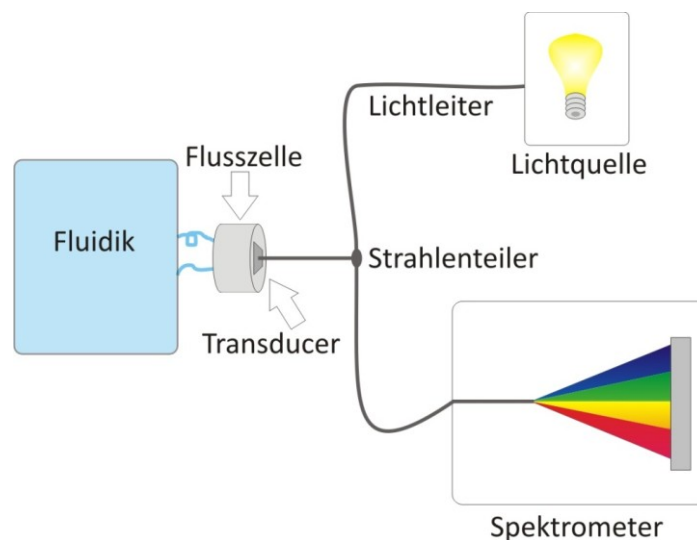


Abbildung 29: Schematischer RfS-Aufbau, analog [86]

Der Messablauf orientiert sich an dem in Kapitel 3.1.3 verwendeten Messprotokoll und ist auch in ähnlicher Weise in [84; 85] beschrieben.

3.2 Transducer

3.2.1 TIRF-Transducer

Für TIRF wurden Transducer aus verschiedenen Gläsern und Kunststoffmaterialien eingesetzt. Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen den Aufbau der TIRF-Transducer. Allen Transducern gemein ist die abgeschrägte und polierte Fläche, über die der Laserstrahl eingekoppelt wird. Zusätzlich sind die Ober- und Unterseite des Transducers poliert. Ansonsten bestehen die Transducer nur aus dem genannten Material und enthalten keine weiteren optischen Strukturen.

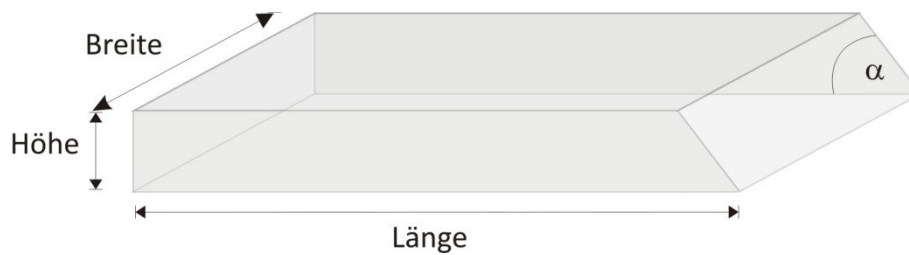


Abbildung 30: Schematische Darstellung der verwendeten TIRF-Transducer.

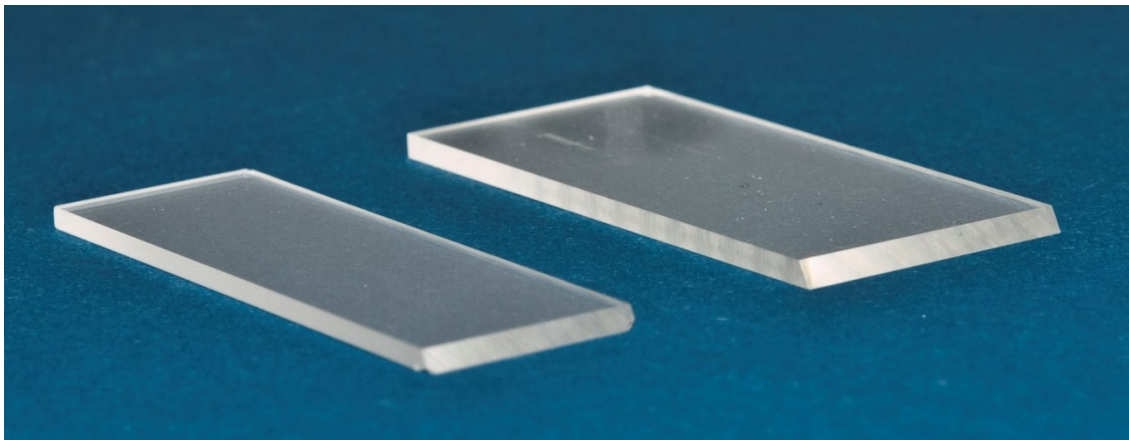


Abbildung 31: In diesem Foto der TIRF-Transducer sind diese von schräg vorne, auf die abgeschrägte Fläche fotografiert, abgebildet (links: Glastransducer, rechts Kunststofftransducer). Die unterschiedliche Größe kommt durch verschiedene Wafergrößen zustande. Transducer aus unterschiedlichen Materialien können auch gleich groß sein.

Die Transducer wurden bezogen von:

- Reichmann Feinoptik GmbH, Brokdorf, Deutschland
- Feinoptik Meyer, Berlin, Deutschland
- Krombach Optische Werkstätte KG, Wetzlar-Naunheim, Deutschland
- Siemens, Erlangen, Deutschland

In Tabelle 11 sind die Dimensionen und das verwendete Material der TIRF-Transducer zusammengestellt.

Lieferant	Reichmann	Mayer	Krombach	Krombach	Siemens
Länge [mm]	45,0±0,2	45,0±0,15	45	45	45
Breite [mm]	15,0±0,2	15,0±0,1	15	15	22
Höhe [mm]	1,45±0,05	1,45±0,05	1,45	1,45	1,6
Winkel α [°]	65°±0,5°	65°	65°	65°	65°
Material	BK 7-Glas	BK 7-Glas	BK 7-Glas	B270-Glas	Zeonor

Tabelle 11: Zusammenfassung der Dimensionen und Materialien der verschiedenen TIRF-Transducer

3.2.2 CL-Transducer

Für die Chemilumineszenzmessungen wurden Objektträger im Standardformat aus Glas und Kunststoff verwendet. Es könnten auch deutlich kleiner Transducer verwendet werden, allerdings ist durch den Preis und die hohe Verfügbarkeit dem Standardformat der Vorzug vor Einzelanfertigungen gegeben worden. Die Transducer wurden bezogen von:

- Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig, Deutschland
- microfluidic ChipShop GmbH, Jena, Deutschland

In Tabelle 12 sind die Dimensionen und das Material der CL-Transducer zusammengestellt.

Lieferant	Menzel	MFCC
Länge [mm]	76	
Breite [mm]	26	
Höhe [mm]	1	1,5
Winkel α [°]	-	
Material	Kalknatron Glas	Zeonex E48R

Tabelle 12: Zusammenfassung der Dimensionen und Materialien der verschiedenen CL-Transducer

3.2.3 RIFs-Transducer

Für die RIFs- Messungen wurden spezielle Interferenzgläser verwendet. Es handelt sich um ein Mehrschichtsystem mit reflexionsverstärkender Schicht bestehend aus Substrat D 263, 10 nm Ta₂O₅ und 330 nm SiO₂. Bei den Referenztransducern fehlt die letzte SiO₂-Schicht. Der genaue Schichtaufbau und die Dimensionen sind in Abbildung 32 und Tabelle 13 dargestellt.

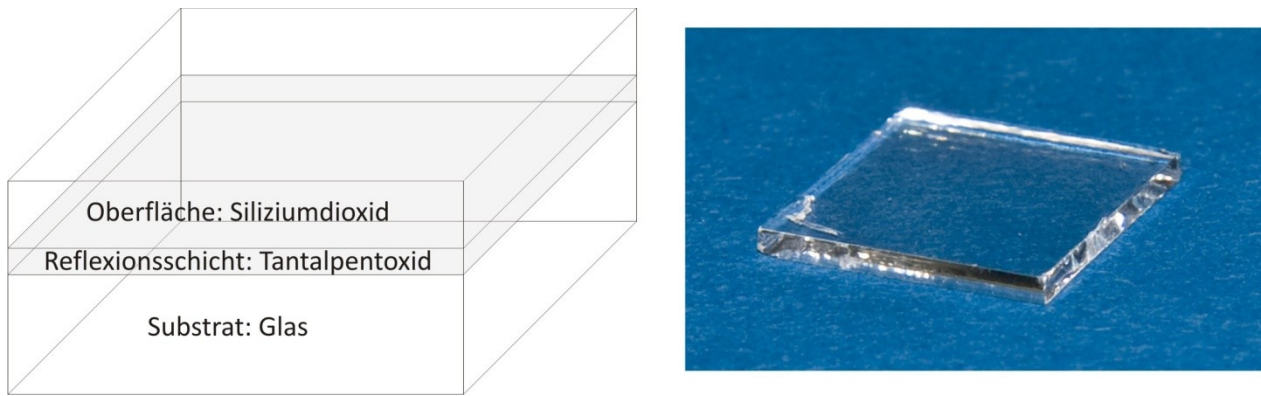


Abbildung 32: links: Schematische Darstellung der verwendeten RfS-Transducer; rechts Foto eines RfS Transducers.

Die Transducer wurden bezogen von:

- MSO Mikroschichtoptik, Jena, Deutschland
- MICROS Coatings GmbH & Co. KG, Schmiedefeld, Deutschland

Lieferant	MSO	MICROS
Länge [mm]	12	
Breite [mm]	12	
Höhe [mm]	1,1	
Substrat	D263	BK7
Reflexionsschicht	10 nm Ta ₂ O ₅	
Oberfläche	330 nm SiO ₂	

Tabelle 13: Zusammenfassung der Dimensionen und Materialien der verwendeten RfS-Transducer

3.3 Software

CorelDraw X3	Corel
Endnote X4	Thomson Reuters
Excel 2007	Microsoft
Fabian Steuersoftware	Siemens
Firefox	Mozilla Foundation, Freeware
IFZ	AK Gauglitz
ImageJ 1.43U	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, Freeware
MathType	Design Science

Measure	AK Gauglitz
Origin 7	OriginLab
Photoshop CS3 und CS4	Adobe
Powerpoint 2007	Microsoft
R 2.13.0	The R Foundation for Statistical Computing
SciFinder (web-Ressource)	CAS
Symics/Accelrys Draw 3,4	Accelrys
Word 2007	Microsoft

3.4 Chemikalien

3.4.1 Analyte, Derivate und Antikörper

Anti-CRP(C5)	Monoklonaler Antikörper gegen CRP (Maus, IgG2a), M86005M (Bioscience International, Memphis, USA); markiert mit Dyomics 647, Dy/IgG=4,0 (Dyomics, Jena, Deutschland), Exbio, Prag, Tschechien
Anti-CRP(C7)	Monoklonaler Antikörper gegen CRP (Maus, IgG2a), M86007M (Bioscience International, Memphis, USA); markiert mit Dyomics 647, Dy/IgG=4,1 (Dyomics, Jena, Deutschland), Exbio, Prag, Tschechien
Anti-Neopterin	Monoklonaler Antikörper gegen Neopterin, Klon 3E2 (Milan Franek, Universität Brno, Brno, Tschechien); markiert mit Dyomics 647, Dy/IgG=2,7 (Dyomics, Jena, Deutschland), Exbio, Prag, Tschechien
CRP	C-reaktives Protein, A97201H, Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland
CRP-Scaffold	verschiedene Polypeptide, Lars Baltzer, Universität Uppsala, Uppsala, Schweden
Neopterin	D-(+)-Neopterin, CAS: 2009-64-5, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
BSA-5-Neopterin	BSA-Neopterin-Konjugat, Milan Franek, Universität Brno, Brno, Tschechien
BSA-6-Neopterin	BSA-Neopterin-Konjugat, Milan Franek, Universität Brno, Brno, Tschechien

3.4.2 Verbrauchsmaterialien

AMD	Aminodextran, 100 kDa, 50 %, Innovent e.V., Jena, Deutschland
Plasma	Pooled Human Plasma, Na Heparin, Lot 27-IR 11, Dunn Labortechnik, Asbach, Deutschland

Sämtliche nicht explizit erwähnten Verbrauchskemikalien und Lösungsmittel wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland bezogen.

3.4.3 Lösungen und Puffer

NaOH-Lösung	6 mol NaOH-Plätzchen werden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst
10fach PBS-Puffer	87,6 g NaCl und 16,6 g KH_2PO_4 werden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst und mit KOH auf pH 6,8 titriert.
AMD-Lösung	Aminodextran und bidestilliertes Wasser werden im Verhältnis w:w=1:7 gemischt
Bidestilliertes Wasser	Herstellung mittels Filtrationsanlage Purelab classic, ELGA LabWater, Celle, Deutschland
Deionisiertes Wasser	Hauseigene Filtrationsanlage
EDC/sulfo-NHS-Lösung	Aus bidestilliertem Wasser wird eine Lösung mit 0,1 M EDC und 0,05 M sulfo-NHS hergestellt
HEPES	Es wird eine 10nM HEPES Lösung mit 5mM CaCl_2 hergestellt und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
NHS-Lösung	5,7 mg NHS werden in 37 μL DMF gelöst
PAC-Lösung	2 mg PAC werden in 1 mL 0,5 M NaCl-Lösung gelöst
PAH-Lösung	2 mg PAH werden in 1 mL 0,5 M NaCl-Lösung gelöst
PBS-Puffer	1 Teil 10fach PBS werden mit 9 Teilen bidestilliertem Wasser gemischt und mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
PEI-Lösung	2 mg PEI werden in 1 mL 0,5 M NaCl-Lösung gelöst
Piranha	Es werden 95 %ige H_2SO_4 und 30 %ige H_2O_2 -Lösung im Verhältnis V:V=3:2 gemischt
PSS-Lösung	2 mg PSS werden in 1 mL 0,5 M NaCl-Lösung gelöst
SDS-Lösung	Es wird eine 0,5 %ige SDS Lösung aus SDS und bidestilliertem Wasser hergestellt und mit HCl auf pH 1,8 eingestellt

3.5 Präparation

3.5.1 Oberflächenchemie

In dieser Arbeit wurden Transducer aus verschiedenen Materialien so wie auch unterschiedliche Immobilisierungsstrategien verwendet. In diesem Abschnitt sind die Standardprotokolle für die unterschiedlichen Transducer und verschiedenen Immobilisierungsstrategien zusammengefasst. In Abbildung 33 ist eine Zusammenfassung der Vorgehensweise für Glas- und Kunststofftransducer gegeben. Zuerst werden die Transducer gereinigt und aktiviert, d.h. reaktive Gruppen auf der Oberfläche erzeugt. Im zweiten und dritten Schritt wird ein Biopolymer aufgebracht, so dass später die Probe nicht in direkten Kontakt mit der Transduceroberfläche kommt. Außerdem erlaubt das Biopolymer durch seine funktionellen Gruppen eine weitere chemische Modifizierung. Die Umfunktionalisierung ist nötig, da aminofunktionalisierte Liganden gebunden werden sollen bzw. die anschließende Aktivierung der Oberfläche für den Liganden schonender ist, wenn sie auf der relativ robusten Oberfläche durchgeführt wird und nicht am Liganden selbst, sollte dieser ebenfalls Carboxyfunktionen in der Struktur aufweisen. Im letzten Schritt findet die Anbindung des Liganden statt.

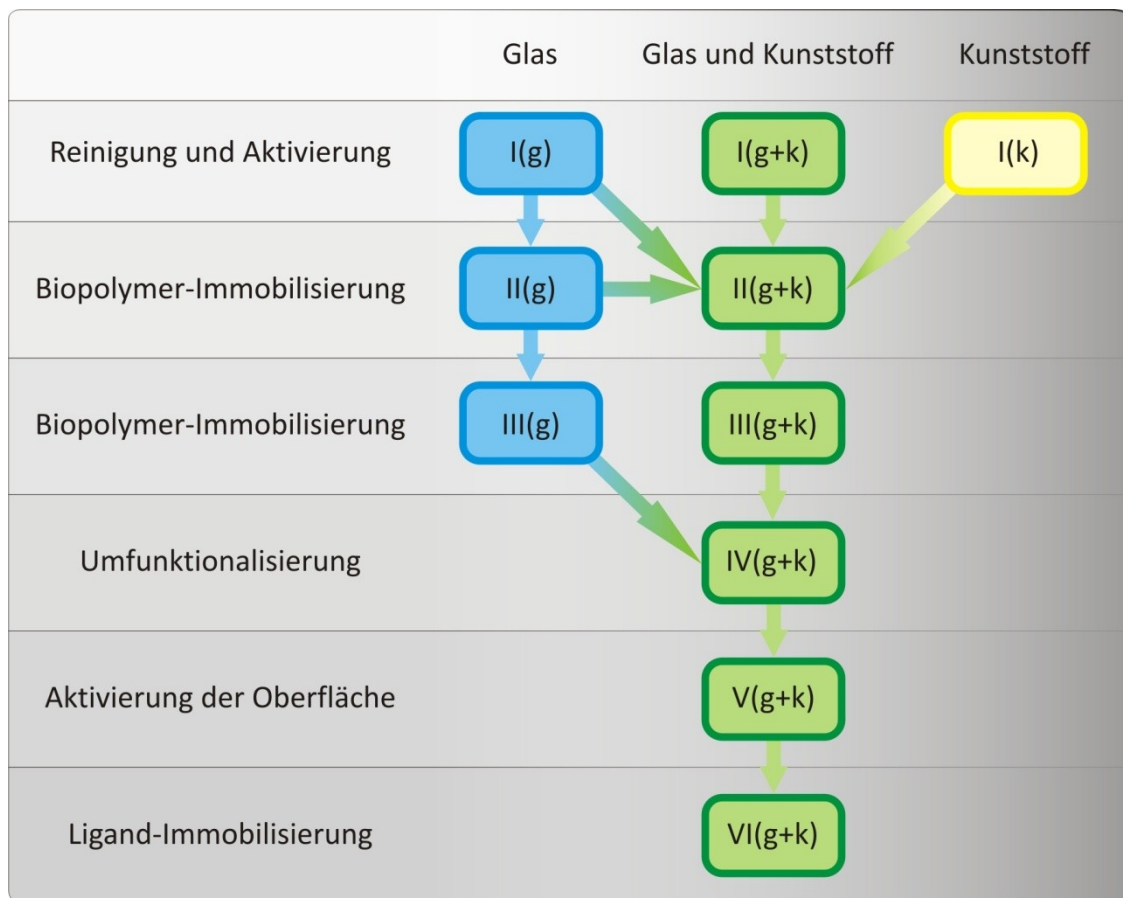


Abbildung 33: Schema der Oberflächenchemie. Es ist jeweils in Klammern angegeben, für welche Art Transducermaterial, (g) für Glas und (k) für Kunststoff, der entsprechende Schritt geeignet ist. Es gibt nun verschiedene Vorgehensweisen, die auch miteinander kombinierbar sind.

I(g): Reinigung und Aktivierung der Transducer-Oberfläche

Die Transducer werden 15 min im Ultraschallbad mit Piranha behandelt, mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Bei sichtbarer Verunreinigung werden die Transducer vor der Piranha-Behandlung 1 min in 6 M NaOH gelegt und danach mit deionisiertem Wasser gespült. Die Transducer müssen nach dieser Behandlung vollständig hydrophil sein (Kontaktwinkel mit Wasser < 5°) und sollten gleich weiterverwendet werden.

I(g+k): Reinigung und Aktivierung der Transducer-Oberfläche

Mittels Sauerstoffplasma können beide Transducertypen gereinigt und aktiviert werden. Die Grundeinstellungen sind dieselben für beide Transducertypen (Zündleistung: 300W, Sauerstofffluss: 5 sccm), die Dauer beträgt bei Kunststoff 60 s, bei Glas 300 s.

II(g): Silanisierung

Je nach Größe des Transducers werden 5 (für RfS-Transducer)-120 µL (für Objektträger) GOPTS auf die gereinigten Transducer gegeben, mit einem weiteren Transducer abgedeckt und 60 min in einer trockenen, wasserfreien Umgebung inkubiert. Anschließend wird mit trockenem Aceton gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die silanierten Transducer werden wegen der Hydrolyseempfindlichkeit zügig weiterverarbeitet.

III(g): Umsetzung mit Aminodextran

Auf einen Transducer werden 10 (RfS-Transducer)-120 µL (Objektträger) AMD-Lösung gegeben und mit einem zweiten Transducer abgedeckt. Die Transducer werden dann für 12-24 h in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Transducer werden anschließend mit bidestilliertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Mit dieser Beschichtung wurden die Transducer sofort weiterverarbeitet oder mehrere Monate bei 4°C gelagert. Es zeigten sich hierbei keine Veränderungen an den Messergebnissen.

IV(g+k): Umfunktionalisierung des Aminodextrans

Die AMD-funktionalisierten Transducer werden mit 5 (für RfS-Transducer)-120 µL (für Objektträger) GA-Lösung beschichtet, mit einem weiteren Transducer abgedeckt und mindestens 6 h in einer DMF gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Transducer werden anschließend mit DMF und bidestilliertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

V(g+k): Aktivierung der umfunktionalisierten Oberfläche

Die Transducer werden mit 10 (für RfS-Transducer)-120 μL (für Objektträger) einer Mischung aus NHS-Lösung und DIC (v:v = 10:3) beschichtet und mit einem zweiten Transducer abgedeckt. Nach einer Inkubation von 4-6 h in einer DMF-gesättigten Atmosphäre werden die Transducer mit DMF und Aceton abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die aktivierten Transducer sollten zügig weiterverarbeitet werden.

VI(g+k): Immobilisierung eines Liganden mit Aminofunktionen

Es werden 5 (für RfS-Transducer)-100 μL (für Objektträger) des in DMSO oder Wasser gelösten Liganden auf die Oberfläche pipettiert und mit einem weiteren aktivierten Transducer abgedeckt. Die Inkubationszeit fällt je nach Ligand unterschiedlich lang aus, beträgt im Regelfall 1 – 12 h in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre. Zusätzlich zu dieser „flächigen“ Beschichtung der ganzen Transduceroberfläche kann auch nur ein kleiner Teil der Oberfläche mittels eines „Spotter“ beschichtet werden, siehe Kapitel 3.1.2. Zur Spottinglösung wurde zur Immobilisierung des Neopterinkonjugates 0,05 % TWEEN20 zugesetzt und zum CRP-Scaffold 0,025 % TWEEN20, um eine bessere Oberflächenbenetzung zu erhalten.

I(k): Reinigung und Aktivierung der Transducer-Oberfläche

Die Transducer werden bei sichtbarer Verunreinigung 30 s in 6 M NaOH gelegt und danach mit deionisiertem Wasser gespült. Anschließend werden die Transducer 20 min in einer Lösung aus 60 % Ethanol, 39 % deionisiertem Wasser und 1 % NaOH bei 50 °C gereinigt und aktiviert. Zum Abschluss wird mit bidestilliertem Wasser gespült.

II(g+k): Polyelektrolyten

Die Oberfläche der Transducer wird mit einer PEI-Lösung (Polykation) für 10 min beschichtet und anschließend mit deionisiertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt werden die Transducer mit PAC- oder PSS-Lösung (Polyanion) für 10 min beschichtet und anschließend mit deionisiertem Wasser gespült. Schließlich folgt die Beschichtung mit PAH-Lösung (Polykation) für 10 min und anschließender Reinigung mit deionisiertem Wasser. Das entstandene Schichtsystem besteht nun aus Polykation – Polyanion – Polykation, kurz (+, -, +). Die letzten zwei Schritte können nahezu beliebig oft wiederholt werden, um dickere Schichten zu erzeugen. Im Regelfall wird ein Schichtsystem der Art (+, -, +, -) aufgebaut und weiterverwendet.

III(g+k): Aktivierung und Umsetzung mit Aminodextran

Die Transducer werden mit 10 (für RfS-Transducer)-120 μL (für Objektträger) einer Mischung aus sulfo-NHS/ EDC-Lösung beschichtet und mit einem zweiten Transducer abgedeckt. Nach einer Inkubation von 3h in einer DMF gesättigten Atmosphäre werden die Transducer mit deionisiertem Wasser abgespült. Anschließend werden auf einen Transducer 10 (RfS-Transducer)-120 μL (Objektträger) AMD-Lösung gegeben und mit einem zweiten Transducer abgedeckt. Die Transducer

werden dann für 2-4 h in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Transducer werden anschließend mit bidestilliertem Wasser abgespült. Mit dieser Beschichtung sind die Transducer mehrere Wochen bei 4°C unter PBS lagerfähig.

Die Standardvorgehensweise für Glastransducer ohne PELs ist: I(g), II(g), III(g), IV(g+k), V(g+k), VI(g+k) [87]. Diese Schritte sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 abgebildet.

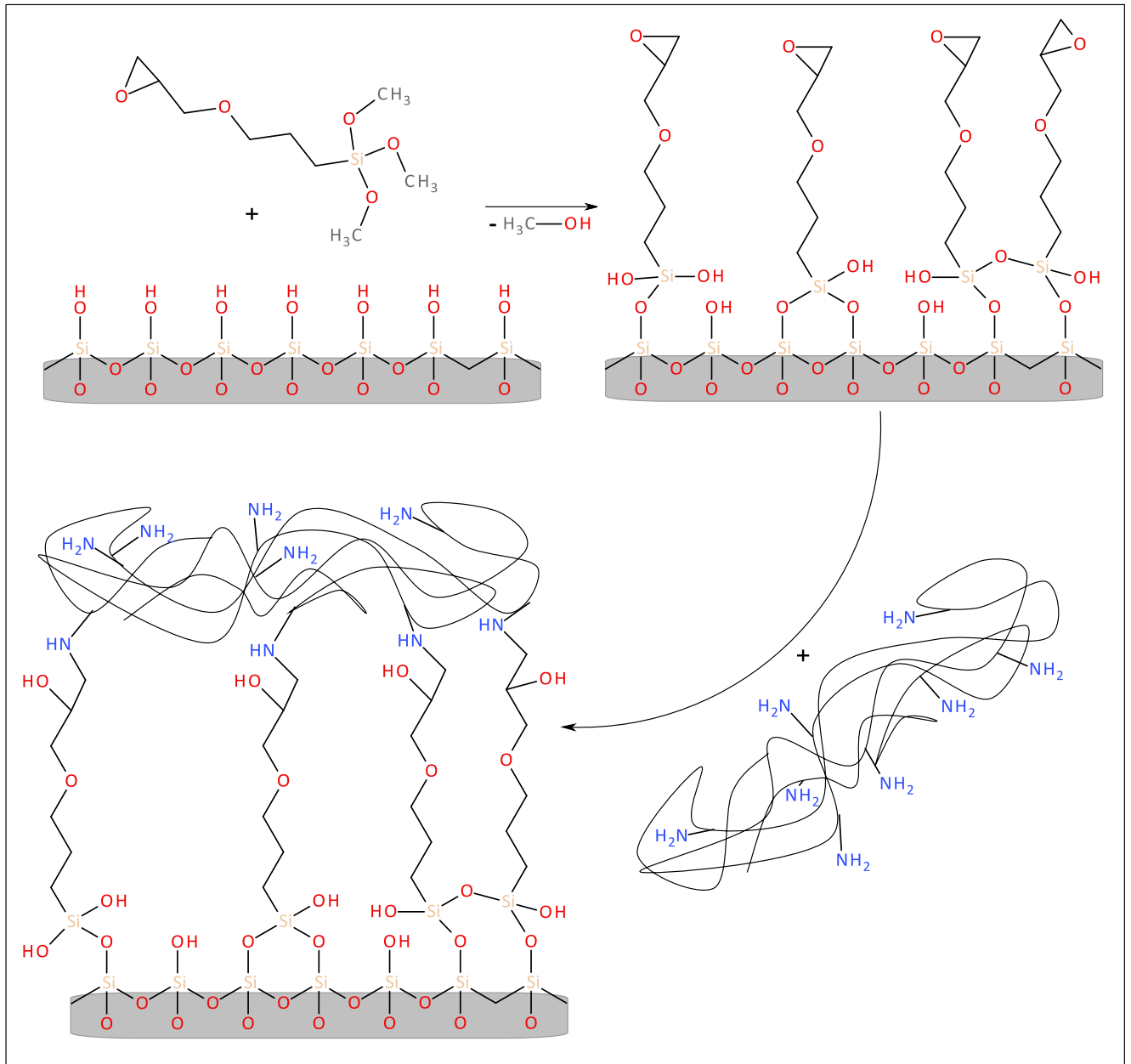


Abbildung 34: Standardvorgehensweise für die Oberflächenmodifikation von Glastransducern. Es ist die Silanisierung der Oberfläche II(g) und die Biopolymeranbindung mit AMD III(g) dargestellt.

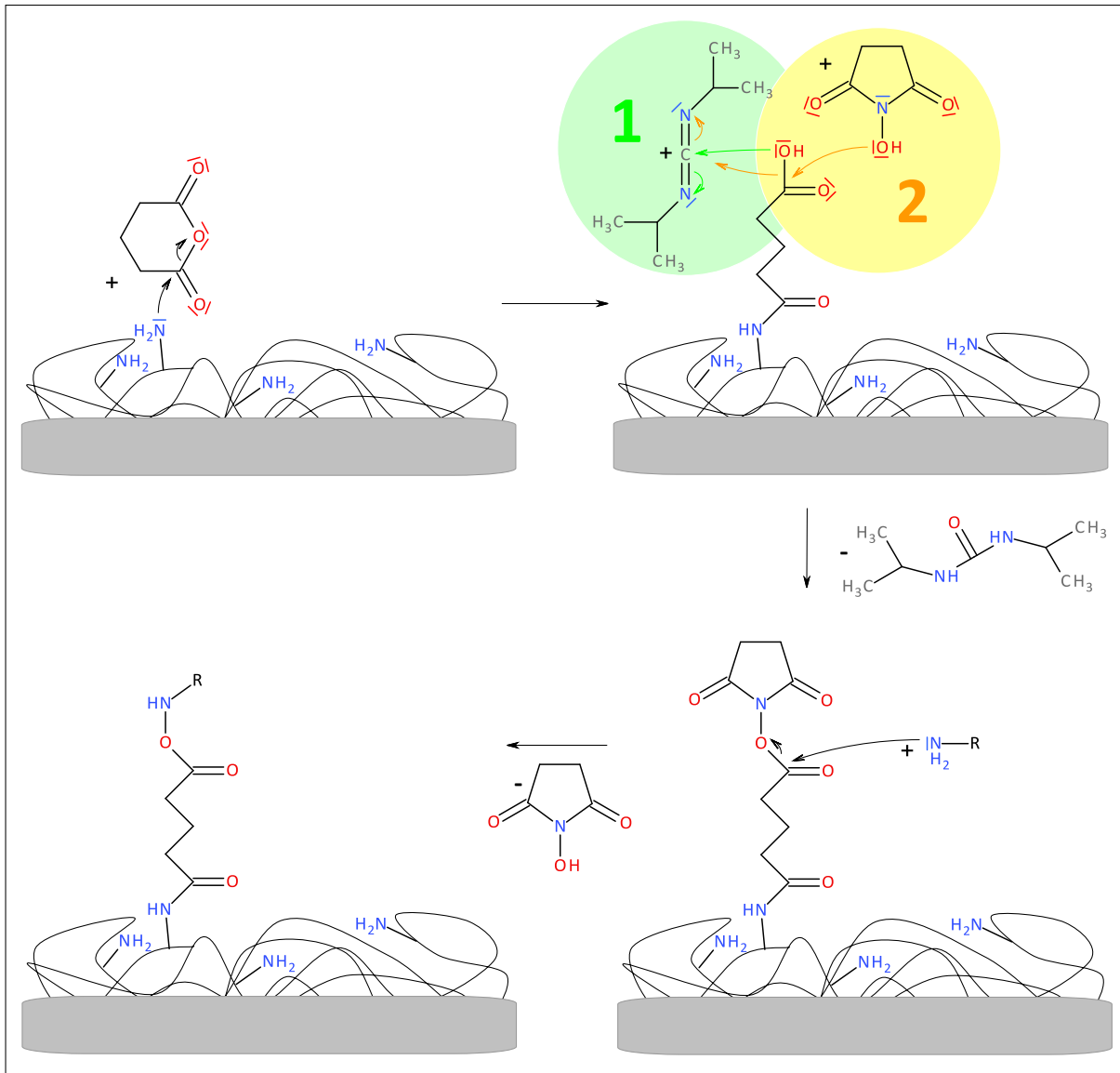


Abbildung 35: Standardvorgehensweise für die Oberflächenmodifikation von Glas- und Kunststofftransducern. Es ist die Umfunktionalisierung des AMDs IV(g+k), die Aktivierung der Carboxylgruppen des umfunktionalisiertem AMDs V(g+k) und die Ligand-Immobilisierung VI(g+k) dargestellt.

Die Standardvorgehensweise für Glastransducer mit PELs ist: I(g), II(g), III(g), IV(g+k), V(g+k), VI(g+k) und für Kunststofftransducer mit PELs: I(k), II(g+k), III(g+k), IV(g+k), V(g+k), VI(g+k). Die Schritte I(k) und II(g+k) sind auch in [88] beschrieben. Diese Schritte sind in Abbildung 10, Abbildung 36 und Abbildung 35 abgebildet.

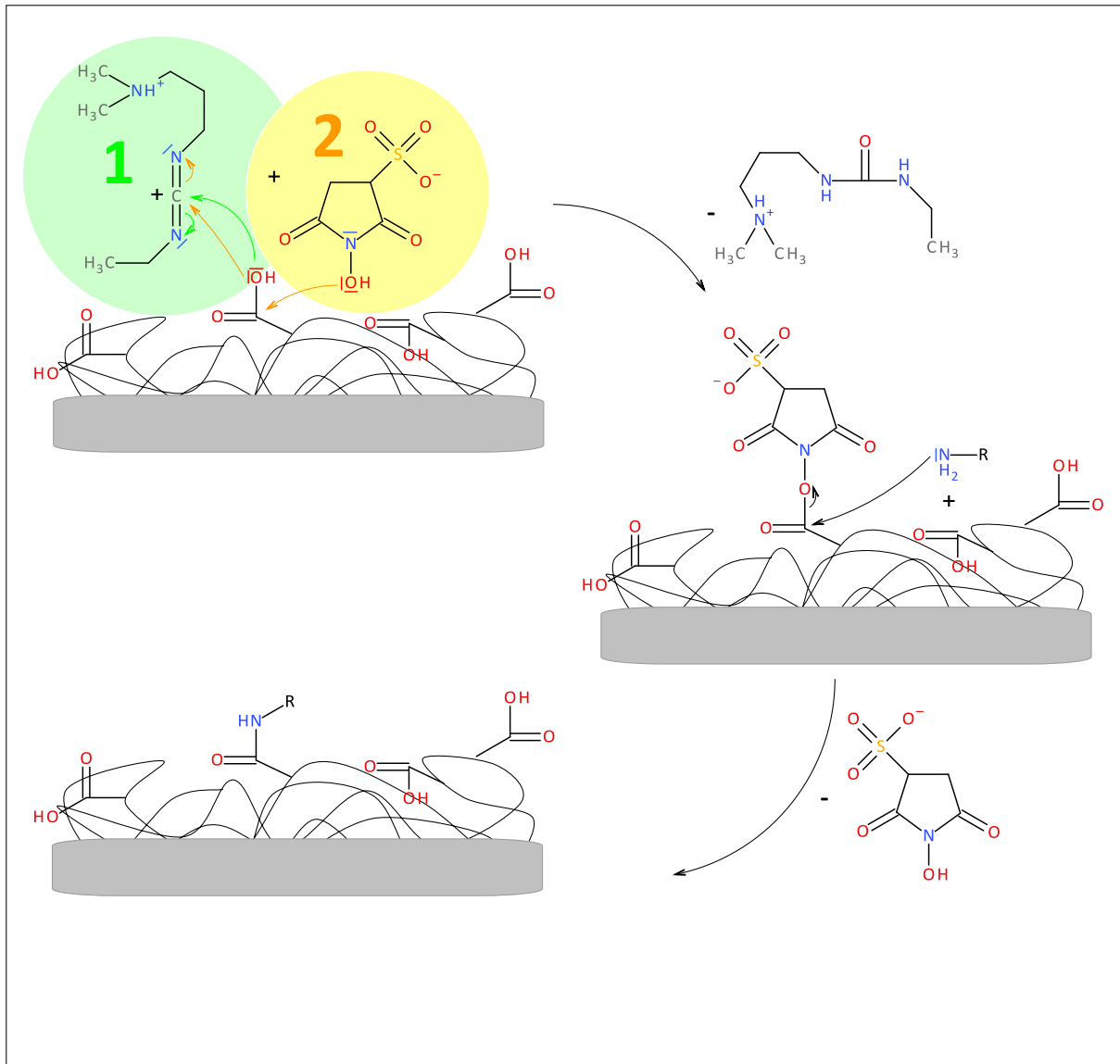


Abbildung 36: Standardvorgehensweise für die kovalente Anbindung von AMD an ein carboxylhaltiges Polymer III(g+k).

3.6 Auswertung

Die Methode zur Auswertung der Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und wird in Kapitel 4.1.1 beschrieben.

4. Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines immunochemischen Assay auf einem vollständig neu entwickelten optischen Biosensorsystem. Der Assay wurde auf verschiedenen Transducermaterialien mit verschiedenen Oberflächenmodifizierungen etabliert. Zuerst wird eine Charakterisierung verschiedener gerätespezifischer Eigenschaften vorgenommen und eine Messwertaufzeichnungs- bzw. Bilderauswertemethode entwickelt. Anschließend werden die Assays auf den verschiedenen Transducermaterialien des Biosensorsystems mit verschiedenen Oberflächenmodifikationsstrategien vorgestellt. Um die analytische Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit des Biosensorsystems zu beurteilen wurden einige statistische Tests und die in Kapitel 2.3 vorgestellten Systemcharakterisierungsmethoden auf die Messergebnisse angewandt, um eine für diesen Biosensor effektive und zuverlässige Auswertestrategie zu erhalten.

4.1 Systemcharakterisierung

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse der Charakterisierung und Prinzipien des Biosensorsystems vorgestellt. Dies umfasst die Stabilität und Abhängigkeit der Messwerte von der verwendeten Laserleistung und Integrationszeit der CCD-Kamera, Einflüsse der Fluidik und das Signalrauschen. Andere grundlegende Fragestellungen, wie z.B. der Einfluss der verschiedenen Transducermaterialien auf das Messergebnis, werden für das bessere Verständnis später in ihrem logischen Zusammenhang behandelt. Weitere für die Hardwarecharakterisierung wichtige Fragestellungen wurden hauptsächlich im Projekt CARE-MAN von SIEMENS durchgeführt und werden in dieser Arbeit nicht ausführlich dargestellt, da der Fokus hier auf der Assayimplementierung, Oberflächenchemieentwicklung und den verschiedenen Auswertestrategien liegt.

4.1.1 Messwerterfassung

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, werden in bestimmten Abständen Bilder mit der internen CCD-Kamera erfasst. Zur Online-Überwachung der Messung wird das ebenfalls in Kapitel 3.1.3 beschriebene implementierte Softwaremodul verwendet. Die dort erhaltenen Daten werden auch als Tabelle gespeichert und können für die Kontrolle des korrekten Messablaufs herangezogen werden, da hier eine driftende Basislinie, Unregelmäßigkeiten in der Fluidik, eine unvollständige Regeneration, etc. beobachtet werden können. Um die Daten aber voll quantitativ auswerten zu können, wurde ein Makro für die Software ImageJ programmiert, das die Messpunkte wesentlich genauer erfasst als die implementierte Software. Die Funktion des Makros besteht darin, Bilder zu öffnen, bestimmte Regionen auf dem Bild auszuwählen, die Pixelwerte zu summieren und die Daten dann in einer Tabelle auszugeben. Die Bilder sind als unkomprimierte RAW Dateien gespeichert. Zuerst wird ein Bild zum Anfang der Messung geöffnet. Da zu diesem Zeitpunkt nur Puffer über den Transducer geflossen ist, werden die ermittelten Daten als Hintergrundsignal, das sich hauptsächlich aus Streustrahlung zusammensetzt, gewertet und später von den Daten nach der Interaktion an der Oberfläche subtrahiert. Über dieses Bild wird eine Maske gelegt, die vier Regionen, sog. ROI (Region of Interest) oder auch Spots genannt, auf dem Transducer spezifiziert. In diesen vier Regionen findet

die Anregung durch TIR statt. Anschließend werden folgende Daten für jede ROI bestimmt und in einer Tabelle ausgegeben:

- Anzahl der Pixel innerhalb der ROI
- Summe der Counts aller Pixel in der ROI
- Mittelwert der Counts aller Pixel in der ROI
- Maximalwert der Counts in der ROI
- Minimalwert der Counts in der ROI

Dieselbe Auswertung wird auch auf das Bild für den Zeitpunkt nach der Interaktion an der Oberfläche ausgeführt, nachdem der Laser wieder eingeschaltet wurde. Die Standardauswertung besteht darin, die Summe der Counts aller Pixel der ROI vor der Interaktion von denen nach der Interaktion zu subtrahieren. Dieser Wert wird im folgenden Messwert genannt. Es wurden noch diverse andere Auswertestrategien untersucht, z.B. die Bestimmung einer weiteren ROI um die „Mess“-ROI herum, um weitere Strahlungseinflüsse zu bestimmen oder eine variable ROI-Größe, die über die Fläche normiert werden kann, wie es die Standardauswertung vieler Fluoreszenzscanner vorsieht. Da diese aber nicht zu besseren Ergebnissen geführt haben und zum Teil einen erheblichen Mehraufwand bedeuteten, werden diese Strategien hier nicht weiter behandelt. Grundsätzlich ist aber die optimale Bestimmung der ROI-Größe und Form von entscheidender Bedeutung für eine spätere quantitative und vor allem reproduzierbare Auswertung einer Messreihe. In Abbildung 37 sind zwei Messungen aufgezeigt, bei der gut die typische Form der ROIs zu erkennen ist.

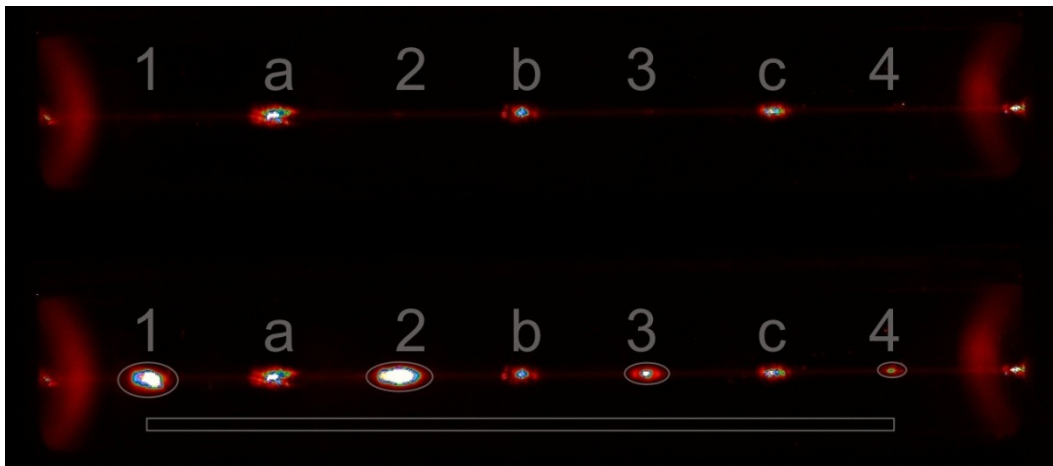


Abbildung 37: Falschfarbendarstellung zweier Messungen. 1-4 sind die ROIs mit dem Fluoreszenzsignal, a-c die Laserreflexionen auf der Transducerunterseite und das rechteckige ROI definiert das Hintergrundsignal. Oben: Aufnahme am Anfang der Messung. Es ist nur gestreutes und reflektiertes Laserlicht zu sehen. Unten: Aufnahme nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper. Zusätzlich ist die Fluoreszenz sichtbar.

Die zwei Halbkreise rechts und links, sowie die durchgängige Linie kommen durch Reflexion und Streuung des Lasers an den Gewinden für die Fluidikanschlüsse bzw. am Glas selbst zustande. In der oberen Reihe des Bildes sind die Reflexionen an der Transducerunterseite durch den Laser zu erkennen. Durch geeignete Filterwahl wurden diese unerwünschten Effekte weitestgehend eliminiert. In der unteren Reihe ist im Vergleich zur oberen die Fluoreszenz in den ROIs (graue Ellipse) gut zu erkennen. Die längliche Form kommt durch die Art der Einkopplung und die Reflexion innerhalb des Transducers zustande. Gut zu erkennen ist außerdem die Abnahme der

Reflexionsspotgröße, sowohl auf der Transducerober- wie auch -unterseite. Durch die Streuverluste, sowie Energieentnahme aus dem evaneszenten Feld nimmt die Laserintensität stetig ab (hier von links nach rechts). Genaugenommen muss deshalb von frustrierter Totalreflexion ausgegangen werden. Zudem wird eine nicht abbildungsgetreue Optik verwendet, die zu zusätzlichen Verzerrungen und Maßstabsänderungen führt. Daher wurde auch die Ellipse als ROI Grundform gewählt. Die Ausdehnung der ROI wird vor allem durch die Laserintensität, die Belichtungszeit, das Transducermaterial und die Menge des fluoreszenzmarkierten AKs an der Oberfläche bestimmt. Die Laserintensität und die Integrationszeit werden in Kapitel 4.1.2 und das Transducermaterial allgemein später besprochen. Je mehr AK an der Oberfläche bindet, desto größer ist die sichtbare Lichtintensität, betrachtet man die Fläche. Daher wurde für eine Charge an Transducern bei der verwendeten Laserintensität und verwendeten Integrationszeit mit jener AK-Konzentration, die auch für die Messung verwendet wurde, eine Nullmessung, ohne Antigen, durchgeführt. Man erhält so für einen Bindungshemmtest das maximal mögliche Signal. Bei einem Sandwich Assay müssen die immobilisierten BRES zuerst mit Antigen gesättigt werden und dann der AK hinzugefügt werden. Die Grenzen der elliptischen ROI wurden nun so festgelegt, dass sie einen Bereich einschließen, in dem die Werte jedes Pixels möglichst mindestens dem dreifachen Wert der Pixel des allgemeinen Hintergrundsignals entsprechen. Auf pixelgenaue Anpassung wurde aufgrund des hohen Aufwandes, bei jeder einzelnen Messung bzw. Messreihe die ROIs neu definieren zu müssen, zugunsten der einfacheren, aber evtl. auch leicht ungenaueren Ellipse verzichtet. Das allgemeine Hintergrundsignal wird bestimmt, indem eine Fläche weit außerhalb des Anregungsstrahls gewählt wird und hier der Mittelwert der Counts bestimmt wird, siehe Abbildung 37. Zu beachten ist noch, dass kein Pixel innerhalb der ROI den Maximalwert der 12-bit Kamera von 4095 Counts erreichen darf. Bei einem gesättigtem Pixel ist es nicht möglich festzustellen, ob tatsächlich 4095 Counts erreicht sind oder tatsächlich die Grenzen des Detektors überschritten wurden. Somit wäre eine genaue Quantifizierung nicht mehr möglich.

4.1.2 Einflussgrößen auf die Messwerterfassung: Laserintensität und Integrationszeit

Als grundlegend, auch für die technische Funktion des Biosensorsystems, sind die Einflussgrößen Laserintensität und Integrationszeit der CCD-Kamera zu betrachten. Daher wurden mehrere Messreihen durchgeführt, bei denen ein Transducer ohne jegliche Beschichtung eingebaut und die Flusszelle mit bidestilliertem Wasser gefüllt wurde, um den Einfluss bei Variation dieser Parameter abzuschätzen. Zuerst wurde mit BK7-Glastransducern gearbeitet, die auch später für alle weiteren Messungen auf Glas verwendet wurden. Die B270 Transducer haben sich als mechanisch instabil erwiesen. Vor allem bei der Reinigung im Ultraschallbad entstehen Kratzer auf der Oberfläche, die während der Messung als Streuzentren fungieren und so die Messung stören. Daher wurde im Folgenden bei den Messungen auf Glas BK7-Substrat verwendet. Abbildung 38 zeigt den Einfluss durch die Variation der Integrationszeit, bei konstanter Laserleistung exemplarisch für einen Transducer. Diese Messungen wurden mit gleichem Ergebnis für mehrere Transducer verschiedener Chargen durchgeführt und dienten auch als Qualitätskontrolle, um Transducer auszusortieren, die eine auffällige Abweichung ergaben.

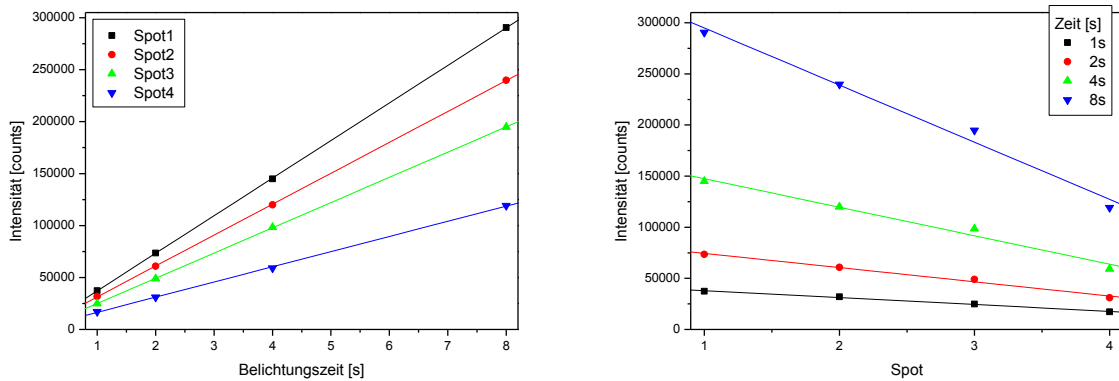


Abbildung 38: Einfluss der Integrationszeit der CCD-Kamera (Laserleistung konstant bei 1 mW). Links: Für alle vier Spots (ROIs) wurde die Summe aller Pixel der ROIs addiert. Rechts: Die Abhängigkeit der Counts vom Spot für eine definierte Integrationszeit zwischen 1 und 4 s ist dargestellt. Hier wird die Dämpfung des Transducers sichtbar.

Erwartungsgemäß wird bei einer Verdopplung der Integrationszeit auch eine Verdopplung des Signals erreicht, da sonst keine Linearität der CCD im Messbereich gewährleistet wäre. Kleinere Abweichungen von bis zu 1,9 % bei Spot 4 sind vor allem auf die ungenaue Anpassung der ROI zurückzuführen. In Tabelle 14 wurde die Summe aller Pixelcounts jedes Spots auf das Maximalsignal bei 8 s Integrationszeit normiert.

Zeit [s]	Spot 1 [%]	Spot 2 [%]	Spot 3 [%]	Spot 4 [%]
1	12,9	13,3	12,8	14,4
2	25,3	25,4	25,1	26,1
4	49,9	50,0	50,5	49,6
8	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabelle 14: Einfluss der Integrationszeit der CCD-Kamera. Die Werte sind auf das Maximalsignal bei 8s an dem jeweiligen Spot normiert und in Prozent angegeben.

Werden die einzelnen Bilder bzw. Einzelwerte der Pixel innerhalb der ROIs betrachtet erkennt man, dass bei 8 s einige Pixel bereits gesättigt sind und somit keine Quantifizierung mehr möglich ist, siehe Tabelle 15.

Zeit [s]	Max. Spot 1 [counts]	Max. Spot 2 [counts]	Max. Spot 3 [counts]	Max. Spot 4 [counts]
1s	689	616	522	559
2s	1403	1180	1035	1084
4s	2682	2338	2158	2156
8s	4095	4095	4095	4095

Tabelle 15: Dargestellt sind die bei verschiedenen Integrationszeiten beobachteten maximalen Pixelwerte je Spot. Bei 8 s sind bereits einige Pixel gesättigt.

Zusätzlich ist ein möglichst großer dynamischer Bereich bei der Fluoreszenzmessung sinnvoll. Somit sind hohe Integrationszeiten nicht zu empfehlen, da pro Pixel nur der Bereich bis 4095 zur Verfügung steht. Aus Abbildung 38 rechts kann die longitudinale Dämpfung des Transducers berechnet werden, siehe Tabelle 16. Die Dämpfung berechnet sich nach [82; 89]

$$d = 10 * \left(\frac{P_1}{P_2} \right) \quad (4.1)$$

d Dämpfung

P Leistung, hier ersetzt durch Signalstärke/Intensität (in counts) der CCD innerhalb der ROI

Dämpfung [dB]	1 s	2 s	3 s	4 s
von Spot 1 zu Spot 2	-0,69	-0,82	-0,82	-0,83
von Spot 2 zu Spot 3	-1,08	-0,95	-0,86	-0,90
von Spot 3 zu Spot 4	-1,60	-1,97	-2,21	-2,13

Tabelle 16: Dämpfung von Spot zu Spot bei verschiedenen Integrationszeiten

Die Dämpfung von Spot 1 zu Spot 2 beträgt im Mittel $0,79 \pm 0,06$ dB, von Spot 2 zu Spot 3 $0,95 \pm 0,08$ dB und von Spot 3 zu Spot 4 $1,98 \pm 0,23$ dB. Allerdings ist die Dämpfung von Spot 3 zu Spot 4 nicht ganz korrekt angegeben, da bei Spot 4 bereits einige Pixel gesättigt sind. Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich eine Dämpfung von Spot zu Spot von $0,87 \pm 0,11$ dB bzw. 18 ± 2 %. Der Spot zu Spot Abstand beträgt 7,05 mm, somit ist die Dämpfung $1,23 \pm 0,16$ dB/cm.

Um den Einfluss der Laserleistung zu ermitteln wurde analog vorgegangen, siehe Abbildung 39.

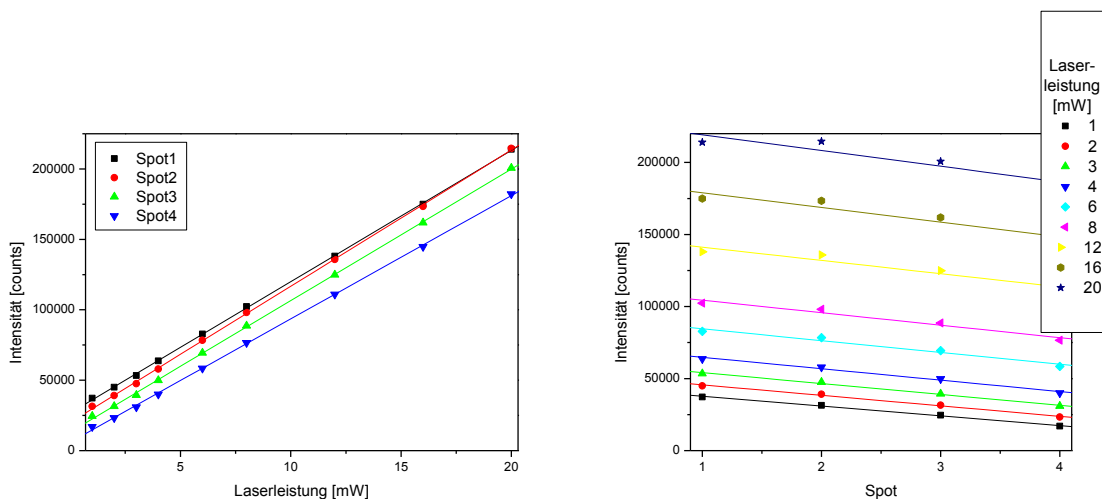


Abbildung 39: Einfluss der Laserleistung (Integrationszeit konstant bei 1 s). Links: Für alle vier Spots (ROIs) wurde die Summe aller Pixel der ROIs addiert. Rechts: Die Abhängigkeit der Signalstärke vom Spot für eine definierte Laserleistung zwischen 1 und 20 mW ist dargestellt. Hier wird die Dämpfung des Transducers sichtbar.

Gut zu erkennen ist, dass eine Verdoppelung der Laserleistung nicht zu einer Verdoppelung der Signalstärke führt. Dies liegt zum einen darin begründet, dass die Kalibrierung des Lasers mit

Labormitteln durchgeführt wurde (einfaches Laserkalibriergerät) und somit keine exakte Kalibrierung möglich war. Allerdings ist die Einstellung reproduzierbar, d.h. bei Einstellung einer Leistung wird immer dieselbe Leistung abgerufen. Da ein linearer Verlauf vorliegt wird von einer korrekten Funktionsweise ausgegangen. Selbst bei niedrigen Laserleistungen wird relativ viel Streulicht von der CCD empfangen, weshalb hohe Laserleistungen vermieden werden sollten; bei 1 s Integrationszeit wird aber auch bei 20 mW Laserleistung keine Pixelsättigung erreicht. In Tabelle 17 sind die berechneten Dämpfungswerte zusammengefasst.

Dämpfung [dB]	1 mW	2 mW	3 mW	4 mW	6 mW	8 mW	12 mW	16 mW	20 mW
von Spot 1 zu Spot 2	0,73	0,60	0,51	0,41	0,24	0,18	0,07	0,04	-0,01
von Spot 2 zu Spot 3	1,07	0,94	0,81	0,66	0,53	0,45	0,37	0,30	0,29
von Spot 3 zu Spot 4	1,61	1,32	1,06	0,96	0,75	0,63	0,51	0,48	0,42

Tabelle 17: Dämpfung von Spot zu Spot bei verschiedenen Laserleistungen

Die Tendenz bei den hinteren Spots eine höhere Dämpfung bei niedriger Laserleistung vorzufinden ist durch erhöhte Streuverluste, durch die Mehrfachreflexion und Aufweitung des Laserstrahls und durch Anpassung der ROI an eine Ellipse begründet. Da für dieses Experiment alle ROIs gleich groß gewählt wurden, sind zu viele Hintergrundwerte (niedrige counts) mit in den Spot gerechnet. Dadurch wird die Dämpfung scheinbar höher. Bei den späteren quantitativen Fluoreszenzmessungen werden die ROIs so klein wie möglich gewählt, um diesen Fehler auszugleichen. Die Dämpfung von Spot 1 zu Spot 2 beträgt im Mittel $0,31 \pm 0,25$ dB, von Spot 2 zu Spot 3 $0,60 \pm 0,27$ dB und von Spot 3 zu Spot 4 $0,86 \pm 0,39$ dB. Es ergibt sich eine gemittelte Dämpfung von $0,59 \pm 0,38$ dB von Spot zu Spot bzw. 12 ± 7 % oder $0,84 \pm 0,54$ dB/cm. Der Vergleich der auf verschiedene Weise ermittelten Dämpfungen zeigt, dass sie sich in derselben Größenordnung bewegen. Man sieht daran deutlich, dass die vorderen Spots erheblich mehr Anregungslicht erhalten und dort somit auch eine höhere Fluoreszenzintensität erreicht werden sollte. Auf die gleiche Weise wurde die Dämpfung der Kunststofftransducer aus ZEONOR ermittelt. Diese ist deutlich höher und errechnet sich im Mittel zu $4,14 \pm 2,41$ dB bzw. $55,7 \pm 21,0$ % von Spot zu Spot.

4.1.3 Hintergrund und Rauschen

Um quantifizierbare Messwerte zu erhalten, müssen die Einflüsse des Rauschens sowie des Hintergrunds bekannt sein. Es gibt viele Arten von Rauschen und verschiedene Arten, Rauschen zu bestimmen [90]. Von Interesse ist, ob ohne Variation der physikalischen Eigenschaften (Laserleistung, Integrationszeit, Fluss und Temperatur) überhaupt ein stabiles, gleichmäßiges, nicht driftendes Signal erhalten wird. Hierzu wurden Langzeitmessungen bei 1 und 4 mW Laserleistung und 1-4 s Integrationszeit über bis zu 60 min durchgeführt, die zeigen, dass das Signal um einen Mittelwert schwankt und keine eindeutige Drift zeigt. Von Interesse ist auch der Absolutwert des Rauschens bzw. des Hintergrunds. In Tabelle 18 sind Experimente hierzu zusammengefasst.

[Counts]	ROI außerhalb des Laserstrahls			ROI direkt auf Messspot	
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5
Mittelwert Transducer 1	6,468 ± 0,156	6,239 ± 0,173	5,668 ± 0,151	9,165 ± 0,325	10,927 ± 0,147
Maximalwert Transducer 1	31	33	37	23	27
Minimalwert Transducer 1	0	0	0	1	3
Mittelwert Transducer 2	6,423 ± 0,184	6,291 ± 0,140	5,997 ± 0,097	9,283 ± 0,218	10,775 ± 0,195
Maximalwert Transducer 2	30	32	34	23	26
Minimalwert Transducer 2	0	0	0	0	2
Mittelwert Transducer 3	6,346 ± 0,213	6,135 ± 0,192	6,058 ± 0,287	9,870 ± 0,366	11,108 ± 0,274
Maximalwert Transducer 3	28	31	32	26	29
Minimalwert Transducer 3	0	0	1	1	2

Tabelle 18: Zusammengestellt sind die Messungen von Hintergrund bzw. Rauschen auf verschiedenen Transducern einer Produktionscharge. Der Maximal- bzw. Minimalwert und deren Differenz zum Mittelwert sind ein Maß für das Rauschen.

Es wurden verschiedene Bereiche auf drei Glastransducern einer Produktionscharge definiert und bei Laseranregung, ohne Oberflächenbeschichtung, beobachtet. Die Auswertung umfasst je 60 Datenpunkte. Die Spots 1-3 befinden sich gleichverteilt auf dem Transducer außerhalb des Anregungslichts, wobei Spot 1 am weitesten von der Anregungsquelle entfernt ist und Spot 3 am nächsten ist. Der Mittelwert hieraus bzw. die Extrema dienen als Maß für das Rauschen und die Signalstabilität. Spot 4 und Spot 5 sind ROIs an denen später auch die Erkennungsstruktur immobilisiert wird und liegen direkt an einem Reflexionspunkt. Spot 5 ist der erste Reflexionspunkt auf der Chipoberseite, Spot 4 der zweite. Diese Werte werden als Hintergrund betrachtet und bei der Berechnung des eigentlichen Signals vom Messsignal subtrahiert. Die Experimente wurden bei 1 mW Laserleistung und 1 s Belichtungszeit durchgeführt. Diese Einstellung wurde auch später bei den meisten Messreihen verwendet. Gemittelt über alle Spots außerhalb des Anregungslichtes ergeben sich $6,180 \pm 0,189$ counts. Damit schwankt das Signal um 3,1 %. Für die Spots 4 und 5 ergeben sich leicht höhere Werte, da diese direkt in derselben Ebene liegen wie der Anregungsstrahl. Die gemittelten Werte über alle Transducer betragen bei Spot 4 $9,439 \pm 0,308$ counts und bei Spot 5 $10,937 \pm 0,136$ counts. Die Abweichungen betragen hier 3,3 % und 1,2 %. Für die spätere Quantifizierung eines Messsignals sind diese Werte ausreichend. Zu beachten ist allerdings, dass die Maximalabweichungen einzelner Pixel innerhalb der Spots deutlich höher sein können. Dies kann durch Effekte der CCD Kamera hervorgerufen werden, allerdings spielt auch die Transducerqualität eine große Rolle. Da die Glastransducer wiederverwendet werden, entstehen bei der Reinigung und der Aufarbeitung kleine Beschädigungen am Transducer. Diese können nun als Streuzentren fungieren und so eine höheres Rauschen bzw. einen höheren Hintergrund erzeugen. Die Experimente

wurden auch bei ausgeschaltetem Laser durchgeführt. Tabelle 19 zeigt die entsprechenden Ergebnisse, und verdeutlicht, dass auch hohe Werte einzelner Pixel bei ausgeschaltetem Laser zu erkennen sind und die Effekte daher eher von der Elektronik und der CCD-Kamera herrühren als etwa von Streuzentren.

	ROI		
[Counts]	Spot 1	Spot 2	Spot 3
Mittelwert	5,297 ± 0,221	6,664 ± 0,219	4,526 ± 0,173
Minimalwert	0	0	0
Maximalwert	33	32	40

Tabelle 19: Zusammengestellt sind die Messungen von Hintergrund bzw. Rauschen auf einem Transducer bei ausgeschaltetem Laser. Der Maximal- bzw. Minimalwert und deren Differenz zum Mittelwert sind ein Maß für das Rauschen und unterscheiden sich nicht signifikant von den Werten mit Laser außerhalb der Anregungsebene.

Für längere Belichtungszeiten bzw. höhere Laserleistung ergibt sich sowohl ein höherer Hintergrund als auch ein höheres Rauschen, dargestellt in Tabelle 20.

[Counts]	ROI außerhalb des Laserstrahls			ROI direkt auf Messspot	
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5
Belichtungszeit 2 s					
Mittelwert	9,360 ± 0,309	8,686 ± 0,327	7,779 ± 0,303	15,255 ± 0,467	18,393 ± 0,536
Minimalwert	0	0	0	2	2
Maximalwert	57	58	64	79	59
Belichtungszeit 8 s					
Mittelwert	23,690 ± 0,278	25,878 ± 0,435	22,450 ± 1,785	55,387 ± 1,785	673490 ± 1,708
Minimalwert	4	7	5	28	33
Maximalwert	176	172	209	286	171

Tabelle 20: Zusammengestellt sind die Messungen von Hintergrund bzw. Rauschen auf einem Transducer bei Belichtungszeiten von 4 s und 8 s

Zusammenfassend ist eine niedrige Belichtungszeit deutlich günstiger, da der niedrigere Hintergrund eine höhere Signaldynamik ermöglicht. Der Hintergrund innerhalb eines Spots in der Laseranregung ist bei 1 s Belichtungszeit um den Faktor 0,3 geringer als bei 2 s und um den Faktor 0,75 geringer als bei 8 s. Das Rauschen bei höheren Belichtungszeiten wird größer, dennoch kann auch bei diesen Einstellungen gearbeitet werden, da im Mittel, bei der Betrachtung mehrerer Pixel innerhalb eines Spots, die Standardabweichungen gering und konstant bleiben. Für die Transducer aus Zeonor wurden ähnliche Betrachtungen angestellt. Tabelle 21 gibt eine zusammenfassende Übersicht.

[Counts]	ROI außerhalb des Laserstrahls			ROI direkt auf Messspot	
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5
Belichtungszeit 1 s					
Mittelwert	6,067 ± 0,154	4,235 ± 0,162	4,219 ± 0,239	170,062 ± 0,478	285,041 ± 0,869
Minimalwert	0	0	0	45	88
Maximalwert	27	26	35	1167	728
Belichtungszeit 2 s					
Mittelwert	10,023 ± 0,161	6,452 ± 0,141	6,402 ± 0,139	337,928 ± 0,622	568,989 ± 0,990
Minimalwert	0	0	0	96	194
Maximalwert	46	45	60	2341	1426

Tabelle 21: Zusammengestellt sind die Messungen von Hintergrund bzw. Rauschen auf einem Kunststoff-Transducer aus Zeonor bei verschiedenen Belichtungszeiten.

Deutlich zu erkennen ist, dass außerhalb des Anregungsstrahls ähnlich niedrige Werte vorliegen, wie bei den Glastransducern. Dies spricht für eine geringe Streuung der Kunststofftransducer, vor allem beim Einkoppelprozess. Allerdings ist innerhalb des Lichtstrahls an den Reflexionspunkten ein deutlich höherer Hintergrund feststellbar. Vergleicht man Kunststoff- mit Glastransducern, dann ist der Hintergrund bei Spot 4 und 1 s Belichtungszeit bei den Glastransducern um 94 % geringer, bei Spot 5 um 96 %, bei 2 s Belichtungszeit jeweils um 95 % bzw. 97 %. Daher besitzen die Glastransducer eine höhere Auflösung/Signaldynamik als die Transducer aus Kunststoff. Bei einer Belichtungszeit von 4 s sind bereits die ersten Pixel in der Sättigung. Eine Auswertung ist hiermit nicht mehr möglich.

4.1.4 Einfluss der Fluidik

Damit ein Biosensor quantitativ arbeiten kann, ist eine zuverlässige Fluidikeinheit nötig. Diese umfasst die Pumpe und das Ventil, genauso wie den Probengeber. Wenn von einer korrekten technischen Funktionsweise ausgegangen wird, ist noch der Einfluss auf das Messsignal bei Änderung der Flussparameter (Pumpgeschwindigkeit), wie auch die Vermischung der in den Schläuchen getrennten Flüssigkeiten (Puffer, Probe, Regeneration) zu überprüfen bzw. zu minimieren. Bei einer Standardmessung wurden PBS, AK- und AG in PBS und SDS in verschiedenen Geschwindigkeiten über den Transducer gepumpt. Dabei wurde kein Einfluss auf das Messsignal, wie z.B. Pulsation, Drift oder Störsignale, festgestellt, siehe auch Abbildung 27. Innerhalb der Schläuche ist die Vermischung von Flüssigkeiten zu vermeiden, damit die Probe zu definierten Zeiten in der Flusszelle und damit auf dem Transducer ankommt. Im System werden Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm verwendet. Die höchsten Pumpraten liegen bei $100 \frac{\mu\text{L}}{\text{s}}$, dies entspricht $0,06366 \frac{\text{m}}{\text{s}}$. Nimmt man für Wasser eine Dichte von $1 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$ und eine Viskosität von $0,000998 \frac{\text{kg}}{\text{m}\cdot\text{s}}$ an, errechnet sich die Reynoldszahl nach Gleichung (4.2) zu $Re = 32$.

$$\text{Re} = \frac{\rho * d * v}{\eta} \quad (4.2)$$

Der kritische Wert ist $\text{Re}_{\text{krit}} = 2300$. Da dieser Wert nicht überschritten ist, kann von einem laminaren Fluss ausgegangen werden und damit keine turbulente Vermischung vorliegen. Desweiteren sind bei einer typischen Messung die verschiedenen Reagenzien (Probe, Antikörper) durch Luftblasen voneinander getrennt, um die noch mögliche Taylor-Dispersion, Mischung durch Diffusion an den vergrößerten Berührungsflächen der Kompartimente, zu vermeiden [91; 92; 93]. Abgebildet ist eine Beispielkurve, Abbildung 40, an der keine Störungen durch die Luftblasentrennung erkennbar werden, da die Luftblasen die Flusszelle während der Inkubationsphase passieren und dadurch keine Anregung stattfindet. Die Luftblasen verlassen die Flusszelle auch sehr leicht (visuelle Kontrolle).

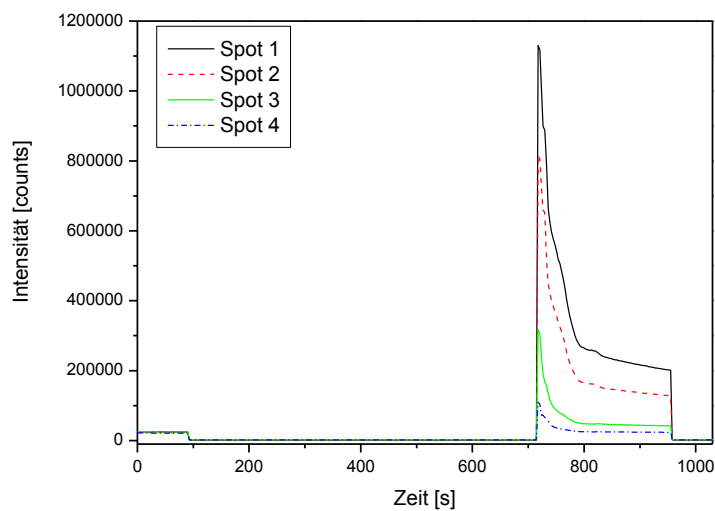


Abbildung 40: Nullmessung von Neopterin mit dem Bindungshemmtest. Die eingesetzte AK-Konzentration betrug hier 8 ng/mL. Es sind keine Störungen durch Luftblasen feststellbar.

4.2 Fluoreszenzmessungen Neopterin

In diesem Kapitel wird die Etablierung eines Neopterinassays auf dem optischen Biosensorsystem beschrieben. Dazu wurde der fluoreszenzmarkierte Neopterinantikörper verwendet. Neopterin wird vom menschlichen Organismus bei einer Immunantwort vermehrt gebildet. Da es sich um ein sehr kleines Molekül handelt (253,2 g/mol) ist die Detektion nicht mit einem Sandwich-Assay, sondern nur mit einem Bindungshemmtest möglich. Es kann in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie z.B. Blut und damit auch in Serum, Plasma, Urin und Liquor detektiert werden. Gerade bei Patienten mit Sepsis, diversen Organentzündungen, aber auch kardiovaskulären Erkrankungen oder Infektion mit dem HI-Virus ist eine Bestimmung zwar sinnvoll [94; 95; 96], gehört bis heute aber nicht zur Routinediagnostik. Vorarbeiten zu flächig beschichteten Transducern und RfS-Messungen zu Neopterin finden sich auch in [48].

4.2.1 RlFS-Messungen

Zuerst sollte der Neopterinassay auf dem markierungsfreien Biosensorsystem etabliert werden. Die Oberfläche wurde flächig nach der Vorschrift I(g)-III(g), IV(g+k)-VI(g+k) präpariert. Allerdings hat sich gezeigt, dass keine vollständige Regeneration der Transduceroberfläche möglich war. Das Signal wurde von Messung zu Messung bei gleicher AK Konzentration geringer, siehe Abbildung 41.

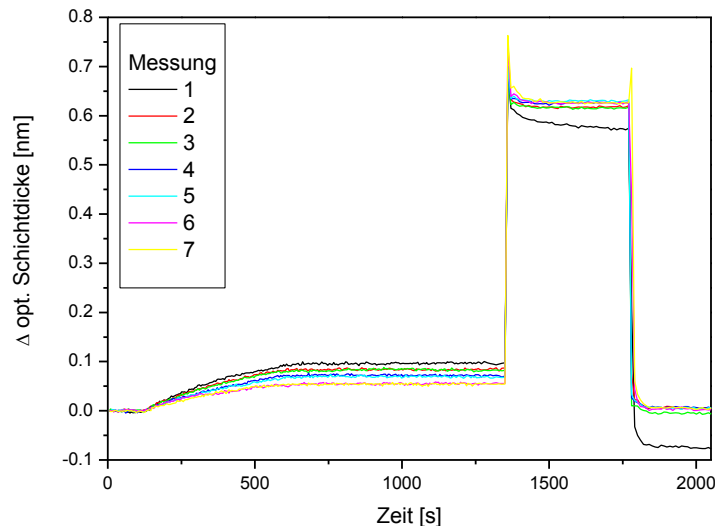


Abbildung 41: Es sind 7 Messungen von Neopterin-AK auf einer Neopterin-BSA-Oberfläche gezeigt. (100 s – 700 s AK-Aufgabe, 700 s – 1350 s Puffer). Nach jeder Messung wurde der Transducer intensiv mit SDS gereinigt (1350 s – 1800 s). Da bei jeder Messung dieselbe Menge AK verwendet wurde, müsste auch dasselbe Signal zu sehen sein (700 s – 1350 s). Zu sehen ist aber eine deutliche Abnahme der optischen Schichtdicke.

Hier ist die Basislinie zu sehen, anschließend die Anbindung des Antikörpers. In der folgenden Phase wird nur PBS über die Oberfläche gegeben und schließlich regeneriert. Diese 7fach-Messung zeigt eine deutliche Signalabnahme bei der nächsten Messung. Damit sind keine größeren Testreihen auf einem Transducer möglich, auch der Einsatz verschiedenster Regenerationsdetergenzien (Glycin, HCL, Acetonitril/Propionsäure etc...) brachte keinen Erfolg. Um in diesem Sensorsystem ein sinnvoll auswertbares Signal zu erhalten, wurden 1,5 μg AK pro Messung eingesetzt. Im FABIAN-System (mit Fluoreszenzanregung) war es möglich, bei einer deutlich größeren Transduceroberfläche, die AK Menge auf 20 ng pro Messung zu verringern. Durch die geringe Beladung war es nun möglich, die Oberfläche vollständig zu regenerieren. Durch die hohe AK-Konzentration im RlFS-System, die allerdings für diese markierungsfreie Methode nötig ist, war es nicht möglich einen Assay für Neopterin zu etablieren bzw. kinetische und thermodynamische Konstanten zu bestimmen. Ein Vorteil der RlFS besteht oft darin, mit nicht markierten Substanzen zu arbeiten und daher auch kostengünstiger arbeiten zu können, auch wenn es um die reine Quantifizierung eines Analyten geht. Durch die geringe AK-Menge pro Messung im TIRF kann hier aber der Aufwand des AK-Markierens für das FABIAN-System gerechtfertigt werden. Zudem sind durch die geringen AK-Konzentrationen überhaupt erst Messungen möglich. Die Oberfläche blieb auch nach mehreren hundert Messungen verwend- und reproduzierbar.

4.2.2 Methodvalidierung – Messungen auf einem Transducer

Alle Kalibrierungen und Analytmessungen wurden hierzu auf einem einzigen Transducer durchgeführt. Der Transducer wurde nach der Vorschrift I(g)-III(g), IV(g+k)-VI(g+k) präpariert (Kapitel 3.5.1) und zwischen den einzelnen Messungen nach der Vorschrift in Kapitel 3.1.3 regeneriert. Es gilt zu beachten, dass alle folgenden Konzentrationsmessungen von 50 μ L Probe/Standard ausgehen. Diese wird dann auf 500 μ L verdünnt und gemessen. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die 500 μ L verdünnte Probe. Daher ist später bei der Kenngrößenberechnung ein Faktor von 10 zu berücksichtigen. Zuerst wird anhand der in Kapitel 2.3.3 vorgestellten Methodvalidierung der Assay bewertet. Hierzu werden die Ergebnisse eines Spots verwendet. Detailliert wird auf die Kalibrierfunktionen und deren Optimierungsstrategien, wie in Kapitel 2.3.2 behandelt, am Beispiel einer 3-fach-Kalibrierung für einen Spot eingegangen. Anschließend werden die Ergebnisse auf mehrere Spots auf dem Transducer und auf die 1-, 3-, 6- und 9-fach Kalibrierung angewendet und der Einfluss der verschiedenen Ein- und Mehrfachkalibrierungen auf die Kenngrößen, Kapitel 2.3.1, untersucht und diskutiert.

Zuerst wird auf Selektivität geprüft. Es wurden 6 „field blanks“ in PBS nach dem Standardprotokoll vermessen. Da es sich bei diesem Format um einen Bindungshemmtest handelt bedeutet dies, dass dem PBS nur der markierte Neopterin-Antikörper zugesetzt wurde. Das erhaltene Signal wurde auf 100 % gesetzt. Die Standardabweichung beträgt 2,48 %. Im zweiten Schritt wurde nur PBS vermessen ohne Neopterin. Das Signal beträgt $2,78 \pm 2,88$ %. Dies ist im Rahmen des Rauschens des Systems. Im dritten Schritt wurde dem PBS ein CRP Antikörper hinzugefügt. Auch hier sollte nahezu kein Signal erhalten werden, da der fluoreszenzmarkierte CRP Antikörper keine Kreuzreaktivität zeigen sollte. Das Signal von $7,38 \pm 5,76$ könnte allerdings auf eine leichte Bindung an die Oberfläche hinweisen. Im Rahmen der relativ hohen Standardabweichung kann darüber aber keine definitive Aussage getroffen werden. Desweiteren wurden dem PBS und Neopterinantikörper auch Störsubstanzen hinzugefügt um deren Einflüsse zu prüfen. Bei den Störsubstanzen handelt es sich um humanes Plasma (10 %) und CRP (0,1 mg/mL). Das Signal für Plasma beträgt $106,30 \pm 2,07$ %, es ist somit höher als für die Leerprobe ohne Störsubstanz. Da mit dem Biosensorsystem nur fluoreszierende Moleküle erfasst werden können weist dies, auch im Rahmen der Standardabweichung, entweder auf eine vermehrte unspezifische Bindung hin oder auch eine stärkere spezifische Bindung. Dies kann u.a. damit erklärt werden, dass der AK in seiner „natürlichen“ Umgebung Plasma eine stärkere Selektivität aufweist. Die Zugabe von CRP beeinflusst das Signal im Rahmen der sdv nicht. Die Ergebnisse sind auch in Abbildung 42 und Tabelle 22 zusammengestellt.

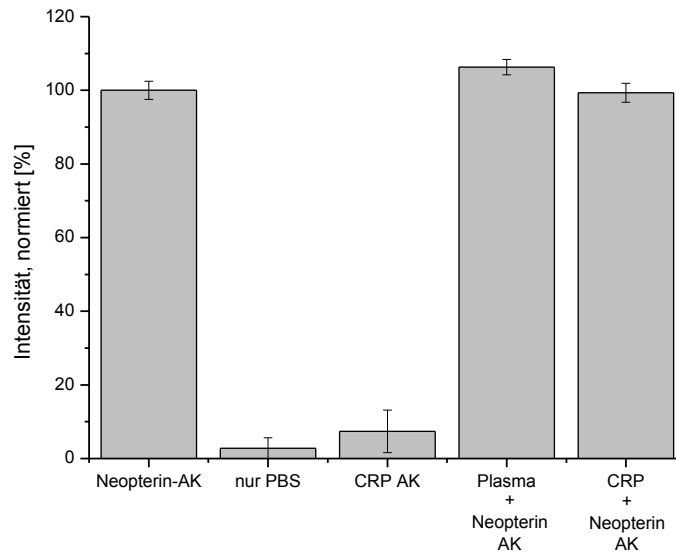


Abbildung 42: Die Selektivität wird mit verschiedenen Störsubstanzen untersucht. Das Signal ist hier normiert auf 100 % Signal bei der Leerprobe.

Probe	Intensität [counts]	sdv [counts]	Intensität, normiert [%]	sdv [%]
Neopterin-AK (Leerprobe)	1184850	29425	100,00	2,48
nur PBS	32912	947	2,78	2,88
CRP-AK	87497	5037	7,38	5,76
Plasma + Neopterin-AK	1259460	26123	106,30	2,07
CRP + Neopterin-AK	1176900	30014	99,33	2,55

Tabelle 22: Zusammenfassung der Messungen auf Selektivität der Methode. Das Signal ist hier normiert auf 100 % Signal bei der Leerprobe. Exemplarisch sind die Intensitäten auch in counts angegeben. In zukünftigen Tabellen werden für eine bessere Vergleichbarkeit nur die normierten Intensitäten angegeben.

Zur Bestimmung der Genauigkeit (Richtigkeit) wurden die Neopterin-Konzentrationen $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-4}$ und 0,05 mg/L bestimmt, siehe Tabelle 23. Die Abweichungen betragen hier 4,20 %, 4,42 % und 9,74 % zum wahren Wert, ermittelt aus der Kalibrierfunktion rPL5 (siehe später in diesem Kapitel) und sind somit weit unter den geforderten 15 % bzw. 20 % im unteren Konzentrationsbereich der Methodenvalidierung der FDA.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
5,00E-06	80,37	1,24	4,79E-06	4,20
5,00E-04	40,29	0,29	4,78E-04	4,42
0,05	20,55	0,80	0,045	9,74

Tabelle 23: Für die Richtigkeit wurden drei Konzentration 5-fach gemessen. Die Konzentrationen verteilen sich über den ganzen erwarteten Kalibrationsbereich. Die Abweichung ist die Differenz vom berechneten zum wahren Wert.

Für die Bestimmung der Präzision wurden ebenfalls drei Konzentrationen je 5-fach bestimmt. Als Testszenario wurde jeweils eine ganze Einfachkalibrierung durchgeführt und im Rahmen der Kalibrierung die drei Konzentrationen vermessen. Für die Präzisionsbestimmung wurden somit fünf Kalibrierungen durchgeführt und die Präzision von Kalibrierung zu Kalibrierung ermittelt. Wie in Tabelle 24 ersichtlich liegen alle Standardabweichungen der Intensitäten unter 1,24 % und die Abweichungen der daraus berechneten Konzentrationen unter den 15 %. Die Kriterien der FDA sind auch hier voll erfüllt.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
5,00E-06	79,43	1,24	5,17E-6	3,49
5,00E-04	40,97	0,58	4,27E-4	14,56
0,05	20,57	0,85	0,045	10,18

Tabelle 24: Für die Ermittlung der Präzision wurden drei Konzentration 5-fach gemessen. Die Konzentrationen verteilen sich über den ganzen erwarteten Kalibrationsbereich.

Die Bestimmung einer Kalibrierfunktion erfordert eine ausführlichere Diskussion. Alle Kalibrierfunktionen wurden mittels Levenberg-Marquardt-Algorithmus mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate angepasst. Dieser Algorithmus wurde verwendet, da er als äußerst robust gilt und zudem auch bei „schlechten“ Startparametern eine hohe Konvergenzwahrscheinlichkeit besteht. Wie bereits in Kapitel 2.3.2 besprochen, gibt es eine Vielzahl an möglichen Kalibrierfunktionen und Datentransformationen, um eine geeignete Kalibrierfunktion zu bestimmen. Als gängig haben sich die 3PL, 4PL und 5PL erwiesen. Die Vorteile dieser Funktionen sind der sigmoidale Verlauf, dessen Steigung zwar nicht konstant ist, dessen Richtung (positiv oder negativ) aber nicht geändert werden kann. Damit wird der Effekt der Überanpassung minimiert, der bei höher parametrisierten Funktionen oft auftreten kann und sich z.B. durch ungewollte „wellenförmige“ Anpassungen zwischen den ermittelten Datenpunkten zeigt. Auf die 3PL wird hier nur kurz eingegangen, da zur Anwendung die Daten zuerst angepasst werden müssen. Alle gängigen 3-parametrischen Kalibrierfunktionen müssen für eine korrekte Anpassung bei null beginnen. Somit müssten die Daten für dreiparametrische Kalibrierfunktionen auf null und 1 bzw. 100 % gesetzt werden. Dies wird als nicht sinnvoll angesehen, da es auch zu einer „Verzerrung“ der Kalibrierfunktion führt. Für den vorliegenden Assay werden die Werte auf 100 % (maximale Intensität bei Konzentration gleich Null) normiert. Damit wird eine Grenze gesetzt, die Signaldynamik aber nicht verändert. Die Normierung auf 100 % ist vor allem später bei der Berechnung des LOD und anderer Kenngrößen wichtig, da es sonst passieren kann, dass diese Kenngrößen, berechnet in der Signaldomäne, keine Entsprechung in der Konzentrationsdomäne mehr haben, da sie nicht auf der Kalibrierfunktion liegen. Daher wird der höchste Wert der Kalibrierfunktion bei einem Bindungshemmtest auf 100 % festgelegt. Für einen Sandwich-Assay müsste dann das Signal auf 0 % normiert und festgelegt werden. Stichprobenartige Tests haben aber gezeigt, dass 3-parametrische Kalibrierfunktionen und die 4PL nach Normierung identisch verlaufen. In Abbildung 43 und Tabelle 26 sind die Hill-Funktion (normiert auf 0 % und 100 %) und die 4PL (normiert auf 0 % und 100 % zwecks Vergleichbarkeit) einer 3-fach Kalibrierung (Tabelle 25) dargestellt. Bei der Hill Funktion ist die Steigung im Wendepunkt negativ. Dies kann aber

durch eine angepasste Hill-Funktion, bei der der Verlauf von vorne herein durch eine negative Steigung beschrieben wird vermieden werden. Die Aussage ist aber dieselbe.

Konzentration [mg/L]	Normiert auf 100 %		Normiert zwischen 0 und 100 %	
	Intensität [%]	sdv [%]	Intensität [%]	sdv [%]
0	100,00	2,11	100,00	2,41
1,00E-07	99,68	2,12	99,63	2,42
1,00E-06	98,63	2,16	98,44	2,48
1,00E-05	70,91	0,99	66,74	1,21
1,00E-04	51,37	1,63	44,41	2,15
1,00E-03	40,80	0,64	32,32	0,92
1,00E-02	23,37	0,81	12,39	1,75
1,00E-01	13,40	0,73	1,00	11,09
1,00E+00	13,07	0,77	0,62	18,48
1,00E+01	12,53	0,75	0,00	-

Tabelle 25: Daten der 3-fach-Kalibrierung. Links sind die Intensitäten auf 100 % normiert. Diese Daten werden bei allen folgenden Kalibrierungen verwendet. Rechts sind die Intensitäten zwischen 0 und 100 % normiert und werden für die 3-parametrischen Kalibrierfunktionen benötigt.

Zum Vergleich der späteren Kalibrierungen wird hier noch für die Daten mit Normierung auf 100 % die gemittelte sdv zu 1,27 % und einer Streuung von 0,43 % ermittelt. Als Streumaß wird hier die Varianz der sdv verwendet.

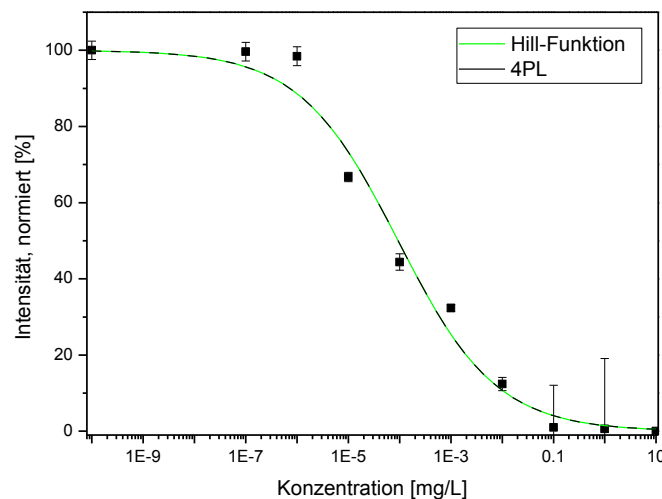


Abbildung 43: Kalibrierfunktionen für eine 3-fach-Bestimmung. Nach Normierung verlaufen die Hill-Funktion als Beispiel für eine 3-Parameter Kalibrierfunktion und die 4-parametrische Logistikkfunktion identisch.

	Hill-Funktion		4PL	
Parameter	Wert	sdv	Wert	sdv
A	100	0	100	0
B	-0,45262	0,05510	0,45262	0,05510
C	0,00009	0,00003	0,00009	0,00003
D	-	-	0	0

Tabelle 26: Parameter der Kalibrierung. Nach Normierung verlaufen die Hill-Funktion und die 4 parametrische Logistikfunktion identisch.

Gut zu erkennen ist der exakt gleiche Verlauf. Daher wird jetzt im Folgenden nur auf die 4PL und 5PL eingegangen. In Abbildung 44 und Tabelle 27 sind die 4PL, 5PL und die r5PL und die Parameter der Anpassung aufgezeigt.

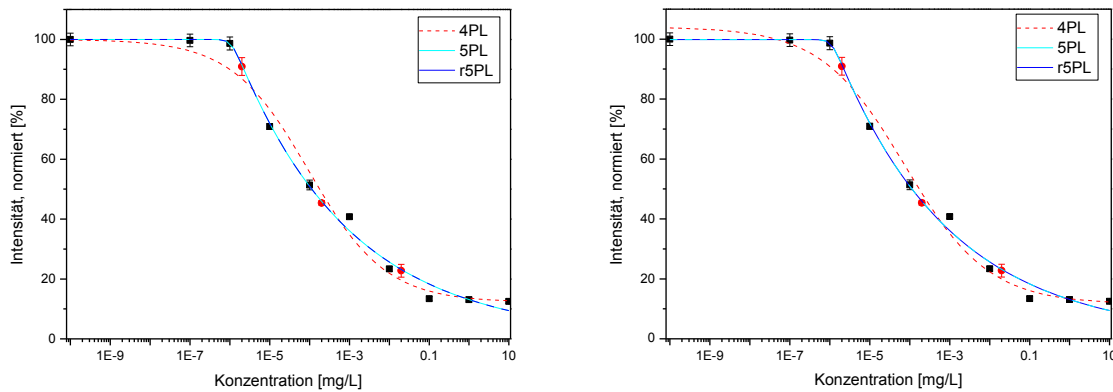


Abbildung 44: Darstellung der Kalibrierfunktionen 4PL, 5PL und r5PL. Die runden Datenpunkte zeigen die Vergleichspräzisionsdaten für die Wiederfindung. Links: Hier wird der Parameter A auf 100 % festgesetzt. Rechts: Es gelten keine Parameterbeschränkungen.

Parameter	Wert	sdv	Wert	sdv	Wert	sdv
	4PL, Parameter A fest		5PL, Parameter A fest		r5PL, Parameter A fest	
A	100	0	100	0	100	0
B	0,44955	0,07123	4,90676	10,38141	4,90567	10,41641
C	0,00010	0,00004	1,1228E-6	6,085E-7	0,00011	0,00007
D	12,25326	3,53581	0,72764	6,66005	0,72984	6,65932
E	-	-	0,03097	0,06949	0,03098	0,06956
	4PL		5PL		r5PL	
A	104,04867	4,59097	99,84007	2,49174	99,84015	2,49173
B	0,41579	0,07831	5,1764	13,40982	5,1752	13,5495
C	0,00008	0,00004	1,1348E-6	6,9729E-7	0,00011	0,00008
D	11,65805	3,81052	0,72779	7,29248	0,72948	7,29187
E	-	-	0,02936	0,07981	0,02936	0,08044

Tabelle 27: Parameter der Kalibrierfunktionen 4PL, 5PL und r5PL. Oben wird der Parameter A auf 100 % festgesetzt, unten gelten keine Parameterbeschränkungen für die Funktion.

Tabelle 28 zeigt die Daten für die Berechnung der Wiederfindungsraten. Die Werte dienen auch zur Charakterisierung der Kalibrierfunktionen.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
2,00E-06	90,94	2,95	2,09E-6	4,55
2,00E-04	45,38	0,79	2.16E-4	7,80
0,02	22,77	2,13	0.022	12,25

Tabelle 28: Intensitäten zur Berechnung der Wiederfindungsraten. Diese werden im Folgenden auch für alle anderen Berechnungen verwendet.

Eindeutig zu erkennen ist, dass sich die 5PL und die r5PL bei Festlegung des Parameters A wie auch bei freien Parametern nahezu identisch verhalten. Dies wurde in [72] ebenfalls festgestellt. Zukünftig wird deshalb die r5PL verwendet, da im Vergleich zur 5PL der Testmittelpunkt, ähnlich zur 4PL, direkt aus dem Parameter C abgelesen werden kann. Zudem ist die Berechnung der Varianz des Testmittelpunkts bei der 5PL sehr aufwendig. Eine erste qualitative Untersuchung zeigt deutliche Unterschiede zwischen der 4PL und der r5PL. Die 4PL ist im Gegensatz zur r5PL eine punktsymmetrische Funktion. Daher wird der hohe Konzentrationsbereich gleich wie der niedrige angepasst. Die r5PL zeigt hier eine deutliche Asymmetrie. Im niedrigen Konzentrationsbereich kann daher der Wert bei $1 \cdot 10^{-6}$ mg/L besser angepasst werden. Zur Beurteilung der Qualität der Kalibrierfunktion kann auch eine Residuenanalyse [97; 98] herangezogen werden. Im einfachen Fall wird die Abweichung der aus der Kalibrierfunktion berechneten Intensität und der gemessenen Intensität gegen die Konzentration aufgetragen. Je kleiner diese Differenz ist, desto genauer folgt die Kalibrierfunktion dem Verlauf der gemessenen Werte.

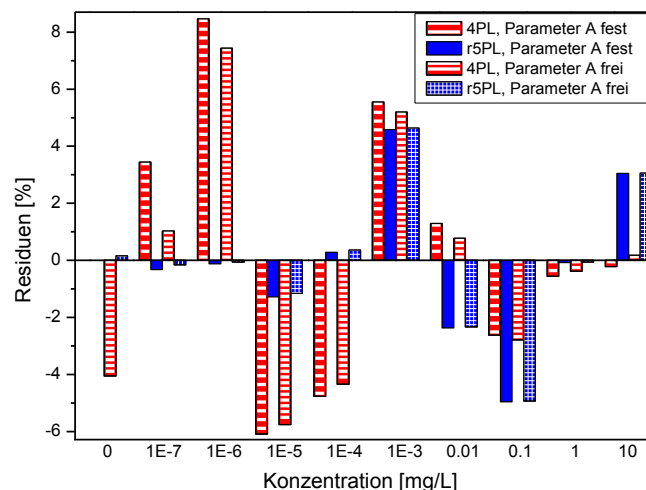


Abbildung 45: Residuenanalyse der verschiedenen Kalibrierfunktionen mit freiem und festgesetztem Parameter A. Bei der Konzentration 0 mg/L gibt es keine Residuen für die Funktionen mit festgesetztem Parameter bzw. die Residuen betragen 0 mg/L.

Konzentration [mg/L]	Residuen [%]			
	4PL, Parameter A fest	r5PL, Parameter A fest	4PL	r5PL
0	0,00	0,00	-4,05	0,16
1,00E-07	3,44	-0,32	1,03	-0,16
1,00E-06	8,46	-0,12	7,44	-0,06
1,00E-05	-6,09	-1,28	-5,76	-1,16
1,00E-04	-4,76	0,28	-4,34	0,36
1,00E-03	5,55	4,58	5,20	4,64
0,01	1,29	-2,37	0,77	-2,33
0,1	-2,62	-4,96	-2,79	-4,93
1	-0,56	-0,08	-0,38	-0,06
10	-0,22	3,05	0,18	3,06

Tabelle 29: Daten der Residuenanalyse.

In Abbildung 45 und Tabelle 29 ist zu erkennen, dass die r5PL den gemessenen Datenpunkten deutlich besser angepasst werden kann. Im Bereich von $1 \cdot 10^{-6}$ mg/L beträgt die Abweichung der r5PL -0,12 %, wohingegen die Abweichung der 4PL 8,46 % beträgt. Im gesamten Bereich von $1 \cdot 10^{-7}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ mg/L folgt die r5PL besser den gemessenen Daten. Im Bereich von 0,01 mg/L bis 0,1 mg/L und bei 10 mg/L ist die 4PL besser an die Datenpunkte angepasst. Die Residuen sind hier aber bei beiden Funktionen teilweise relativ groß mit 3-4 % bei 0,1 mg/L. Nach der bisherigen Analyse ist die r5PL die geeignetere Kalibrierfunktion, da gerade der niedrige Konzentrationsbereich für die Neopterinquantifizierung von Bedeutung ist. Dabei gibt es bei der r5PL nur sehr geringe Unterschiede bei der Funktionen mit festgesetztem Parameter A oder ohne. Bei der 4PL sind hier deutlichere Unterschiede, auch im Testmittelpunkt (Parameter C) feststellbar, Abweichung ca. 20 %. Im weiteren Verlauf wird der Parameter A daher auf 100 % festgelegt, um, wie bereits diskutiert, die Bestimmung bestimmter Kenngrößen zu vereinfachen. Zur weiteren Analyse der Funktion wurden die oben genannten Wiederfindungsraten verwendet. Die Residuen der gemessenen Proben im Vergleich zu den theoretischen Daten der Kalibrierfunktionen sind in Abbildung 46 und Tabelle 30 dargestellt.

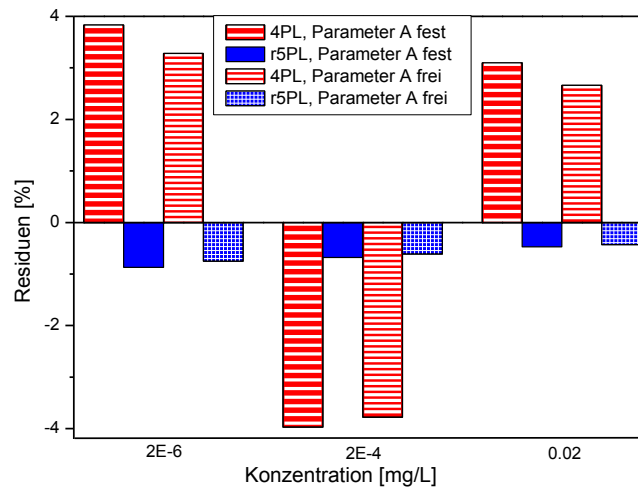


Abbildung 46: Residuen der Vergleichspräzisionsdaten vgl. mit den theoretischen Kalibrierdaten.

Konzentration [mg/L]	Residuen [%]			
	4PL, Parameter A fest	r5PL, Parameter A fest	4PL	r5PL
2,00E-6	3,83	-0,87	3,28	-0,75
2,00E-4	-3,97	-0,68	-3,78	-0,61
0,02	3,10	-0,47	2,66	-0,43

Tabelle 30: Residuen der Vergleichspräzisionsdaten (Wiederfindung) vgl. mit den theoretischen Kalibrierdaten.

Bei $2 \cdot 10^{-6}$ mg/L liegt die r5PL um mehr als den Faktor 4 genauer, bei $2 \cdot 10^{-4}$ mg/L um mehr als den Faktor 5 und bei 0,02 mg/L liegt die r5PL um den Faktor 6 näher am gemessenen Wert. Da im gesamten Kalibrierbereich und auch bei den niedrigen Konzentrationen im medizinisch interessanten Bereich die r5PL näher an den gemessenen Werten ist, wird insgesamt die r5PL als die sinnvollste Funktion für die Kalibrierung des Assays auf diesem Biosensorsystem angesehen. Alle weiteren Betrachtungen finden daher vorrangig mit der r5PL statt. Die 4PL wird weiterhin genutzt, um mit anderen Methoden und Biosensorsystemen, die die 4PL verwenden, Vergleiche aufzeigen zu können. Die 4PL gilt zudem bei vielen Anwendungen als Standard.

Der Vollständigkeit halber wird hier noch eine der häufigsten Linearisierungsmethoden erwähnt, wie sie auch für ELISAs und ähnliche Formate vorgeschlagen wird. In Abbildung 47 sind die Werte als logit aufgetragen, Tabelle 31 zeigt die Anpassung der 4PL zum einen nur zwischen dem linearen Bereich, zum anderen den ganzen gemessenen Wertebereich. Man sieht einen annähernd linearen Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-5}$ mg/L und 0,01 mg/L. Allerdings ist bei dieser Art der Regression der dynamische Bereich im Vergleich zu den anderen Anpassungen eingeschränkt. Gerade im unteren Konzentrationsbereich kann die lineare Anpassung nicht verwendet werden. Diese Strategie wird dennoch häufig angewendet, da durch die Linearisierung mit streng definierten statistischen Evaluationsstrategien gearbeitet werden kann. Aus den erhaltenen Parametern kann auch wieder

der Testmittelpunkt abgelesen werden, wenn über den gesamten Bereich eine Anpassung erfolgt. Die Anpassung erfolgte mit der 4PL. Durch Datentransformation über den logit kann nun auf die Parameter der linearen Kalibrierung zurückgeschlossen werden. Wird, wie im obigen Beispiel, eine Residuenanalyse durchgeführt, ergeben sich ähnliche Abweichungen im linearen Bereich, der allerdings im Vergleich zu den sigmoidalen Funktionen in der halblogarithmischen Auftragung einen stark eingeschränkten Dynamikbereich aufweist. Diese Strategie wird daher in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

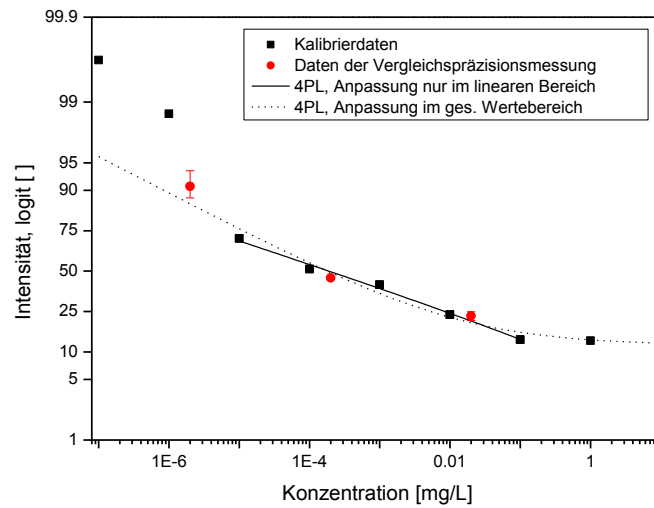


Abbildung 47: Kalibrierung nach logit-Transformation

Parameter	4PL, linearer Bereich		4PL, ges. Bereich	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	100	0	100	0
B	-0,27490	0,06040	-0,43380	0,10072
C	0,00023	0,00025	0,00010	0,00006
D	-2,83772	12,72632	11,77925	6,15586

Tabelle 31: Parameter der Kalibrierfunktionen 4PL für die logit-Auftragung. Links wurde nur der lineare Bereich für die Anpassung verwendet, rechts alle Datenpunkte. Dies ergibt die bessere Anpassung.

Nun können auch die Wiederfindungsraten auf Basis der r5PL bestimmt werden. Dazu wird die Gleichung (2.74) nach der Konzentration X umgestellt und die Konzentrationen aus den gemessenen Intensitäten Y berechnet.

$$X = \sqrt[B]{\frac{\left(\sqrt[E]{\frac{A-D}{Y-D} - 1} \right)}{\left(2^{\frac{1}{E}} - 1 \right)}} * C \quad (4.3)$$

Für die spätere Verwendung wird hier ergänzend die Umkehrfunktion der 4PL angegeben.

$$X = \sqrt[B]{\frac{A-D}{Y-D}} - 1 * C \quad (4.4)$$

Die Wiederfindungsraten betragen bei $2 * 10^{-6}$ mg/L, $2 * 10^{-4}$ mg/L und 0,02 mg/L 106,93 %, 110,42 % und 114,78 %. Die Methodvalidierung der FDA trifft keine Aussagen über den erwarteten Bereich der Wiederfindungsraten. Allgemein wird aber von 70 % bis 120 % ausgegangen. Die Anforderungen werden hier somit bei weitem übererfüllt. Es ist allerdings die Tendenz festzustellen, dass mit steigender Konzentrationen die Ungenauigkeit zunimmt. Dieser Trend wurde auch schon bei der Residuenanalyse in Tabelle 29 festgestellt.

Der letzte Punkt der Methodvalidierung betrifft die Stabilität aller am Assay beteiligten Komponenten. In diesem Fall betrifft dies den Puffer PBS, die Regenerationslösung aus SDS, den AK, das Neopterin-AG, Proben und die fertig präparierten Transducer. Der Puffer, die Regenerationslösung und das Neopterin-AG zur Präparation der Stammlösungen werden jeweils in kleinen Mengen frisch angesetzt und sind dann ohne weiteres mehrere Tage zu verwenden. Die Trockensubstanzen bzw. gekauften Maßlösungen sind mehrere Jahre haltbar. Der AK kann aliquotiert in kleinen Mengen eingefroren werden und ist über mehrere Monate lagerfähig. Aufgetaut wurden die einzelnen Aliquote bis zu 6 Monate bei 4 °C gelagert, ohne dass eine Änderung der Affinität des AK festgestellt werden konnte (Erfahrungswert). Die Proben, allen voran das Plasma, wurde in Aliquoten eingefroren und ist so über mehrere Monate lagerfähig. Aufgetaut sollte das Plasma innerhalb von 3 Tagen verbraucht werden, da sonst Ausflockung stattfindet. Hierzu existieren auch medizinische Erfahrungswerte, die eine Lagerfähigkeit bis zu 2 Jahren bei -30°C aufzeigen. Am interessantesten ist die Lagerfähigkeit der fertig präparierten Transducer. Die Transducer sind im trockenen Zustand nicht lange lagerfähig. Sollte der Transducer nach der Präparation vollständig getrocknet werden, nimmt die sensitive Schicht Schaden und es wird evtl. kein Signal oder ein Signal von nur bis zu $38 \% \pm 16 \%$ (3-fach Bestimmung) des frisch präparierten Transducers erhalten. Werden die Transducer mit Puffer beschichtet, ist auch nach 4 Wochen keine signifikante Änderung der sensitiven Schicht des Transducers feststellbar. Es werden Signale von $\pm 12 \%$ im Vergleich zu einem frisch präparierten Transducer erhalten. Man muss dabei berücksichtigen, dass hier auch die Schwankung der teils manuellen Präparation und die Chip zu Chip Reproduzierbarkeit (siehe später) einen großen Einfluss haben. Deutlich länger unter Flüssigkeit gelagerte Transducer (ca. 5 Monate) zeigen teils deutlich niedrigere Signale.

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass die Methode alle Kriterien der FDA bezüglich Selektivität, Genauigkeit und Präzision erfüllt. Als Kalibrierfunktion hat sich nach Residuenanalyse und mit Hilfe der Vergleichspräzisionsdaten die r5PL als geeignetste Kalibrierfunktion herausgestellt. Die Wiederfindungsraten sind nach allgemein gültigem Standard innerhalb der Toleranzgrenzen. Die Stabilitäten einzelner Komponenten der Methode wurden in Voruntersuchungen geprüft, die Methode ist für den Laboralltag als handhabbar anzusehen.

Die bisherige Validierung wurde am Beispiel einer Dreifachkalibrierung an einem von insgesamt vier vorhandenen Spots durchgeführt. Betrachtet man die anderen drei Spots, so ist die Tendenz dieselbe. Die geforderten Grenzen der Methodvalidierung werden eingehalten und die r5PL ist die geeignetste Kalibrierfunktion. In Abbildung 48 sind die vier Kalibrierfunktionen für die einzelnen Spots aufgezeigt. Es werden sowohl die r5PL als auch die 4PL dargestellt, da diese Ergebnisse später noch benötigt werden. Tabelle 32 fasst die Parameter der Kalibrierung zusammen und in

Tabelle 33 ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der Validierung aufgelistet.

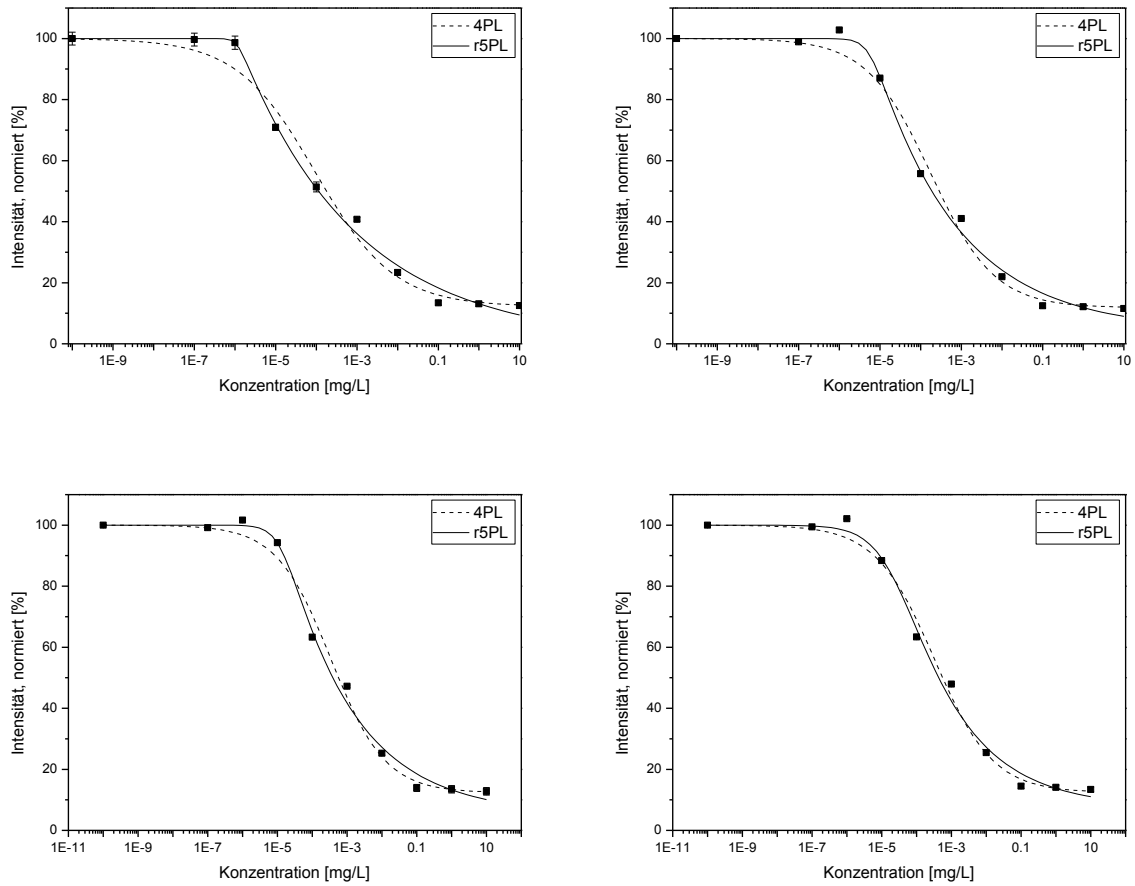


Abbildung 48: Kalibrierfunktionen aller Spots auf dem Transducer bei der 3-fach-Kalibrierung. Von links oben nach rechts unten: Spot 1 bis 4.

	4PL		r5PL	
Parameter	Wert	sdv	Wert	sdv
Spot 1				
A	100	0	100	0
B	0,44955	0,07123	4,90567	10,41641
C	0,00010	0,00004	0,00011	0,00007
D	12,25326	3,53581	0,72984	6,65932
E	-	-	0,03098	0,06956
Spot 2				
A	100	0	100	0
B	0,55412	0,08041	2,55092	6,60647
C	0,00018	0,00005	0,00015	0,00005
D	11,83102	2,88426	4,34246	5,31747
E	-	-	0,08234	0,23104
Spot 3				
A	100	0	100	0
B	0,55573	0,07667	1,74518	1,26748
C	0,00034	0,0001	0,0003	0,00012
D	12,38644	2,84923	5,23848	5,81693
E	-	-	0,12548	0,11545
Spot 4				
A	100	0	100	0
B	0,51494	0,06208	0,85315	0,38484
C	0,00032	0,00009	0,0003	0,00011
D	12,40906	2,6353	7,50999	6,08226
E	-	-	0,29300	0,22697

Tabelle 32: Zusammenfassung der noch verbliebenen drei Spots bei der 3-fach-Kalibrierung. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier nochmals Teile von Tabelle 27 integriert. Spot 1 ist die in diesem Kapitel bereits validierte ROI.

[%]	Spot 1				
	Konzentration [mg/L]	Intensität	sdv	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung
Selektivität	Neopterin-AK	100,00	2,48	-	-
	nur PBS	2,78	2,88	-	-
Richtigkeit	5,00E-06	80,37	1,24	4,79E-06	4,20
	5,00E-04	40,29	0,29	4,78E-04	4,42
	0,05	20,55	0,80	0,045	9,74
Präzision	5,00E-06	80,76	1,24	5,17E-6	3,49
	5,00E-04	40,97	0,58	4,27E-4	14,56
	0,05	21,05	0,85	0,045	10,18
	Spot 2				
	Konzentration [mg/L]	Intensität	sdv	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung
Selektivität	Neopterin-AK	100,00	2,27	-	-
	nur PBS	2,04	1,94	-	-
Richtigkeit	5,00E-06	95,12	1,43	5,30E-6	5,99
	5,00E-04	40,93	1,36	5,39E-4	7,81
	0,05	18,25	1,72	0,0538	7,62
Präzision	5,00E-06	94,96	1,53	5,40E-6	7,96
	5,00E-04	40,67	0,64	5,58E-4	11,50
	0,05	18,69	0,68	0,0465	6,98

[%]	Spot 3				
	Konzentration [mg/L]	Intensität	sdv	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung
Selektivität	Neopterin-AK	100,00	1,93	-	-
	nur PBS	3,10	1,44	-	-
Richtigkeit	5,00E-06	97,67	0,98	5,31E-6	6,25
	5,00E-04	47,79	1,26	4,90E-4	1,98
	0,05	20,55	0,75	0,0521	4,20
Präzision	5,00E-06	97,32	1,18	5,81E-6	16,28
	5,00E-04	48,14	0,86	4,72E-4	5,59
	0,05	20,31	1,03	0,0556	11,96
	Spot 4				
	Konzentration [mg/L]	Intensität	sdv	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung
Selektivität	Neopterin-AK	100,00	2,94	-	-
	nur PBS	1,76	0,85	-	-
Richtigkeit	5,00E-06	93,54	1,35	4,71886E-6	5,62
	5,00E-04	47,79	0,47	5,42335E-4	8,47
	0,05	20,83	0,84	0,04885	2,30
Präzision	5,00E-06	92,86	0,92	5,42285E-6	8,46
	5,00E-04	47,54	0,37	5,56811E-4	11,36
	0,05	21,05	0,42	0,04563	8,74

Tabelle 33: Zusammenstellung der Daten für Selektivität, Richtigkeit und Präzision der Spots 1-4.

Aus den vorliegenden Daten ist ersichtlich, dass die Selektivität bei allen Spots ähnlich ist. Neopterin wird erkannt, allerdings mit geringerer Intensität (absolut), als bei Spot 1. Dies ist auf die Dämpfung zurückzuführen. Desweiteren wird wie bei Spot 1 bei PBS auf den Spots 2 - 4 kein Signal, bzw. Rauschen erhalten. Auch die Werte der Präzision sind ähnlich und differieren um weniger als 1 %. Die sdv der Richtigkeitsmessungen sind bei allen Spots in derselben Größenordnung, allerdings im Vergleich zum wahren Wert ist die Abweichung von Spot 1 deutlich geringer, gerade im unteren Konzentrationsbereich. Die Spots 2 bis 4 verhalten sich dann aber ähnlich. Auch zu erkennen ist, dass die Dynamik der Kalibrierfunktion bei Spot 1 im wichtigen unteren Konzentrationsbereich am größten ist. Sie nimmt zu Spot 2 und 3 dann ab. Bei Spot 4 ist sie dann wieder etwas höher. Dieser Trend der Abnahme ist aufgrund der abnehmenden (absoluten) Signalintensität von Spot 1 nach 4 zu erwarten. Die wieder leicht höhere Dynamik bei Spot 4 kann durch die Kalibrierfunktion oder auch eine „bessere“ Anpassung der ROI begründet sein. An den vorliegenden Daten lässt sich allerdings kein genauer Grund erkennen. Zum besseren Vergleich sind die r5PL Kalibrierfunktionen der vier Spots in Abbildung 49 übereinandergelegt.

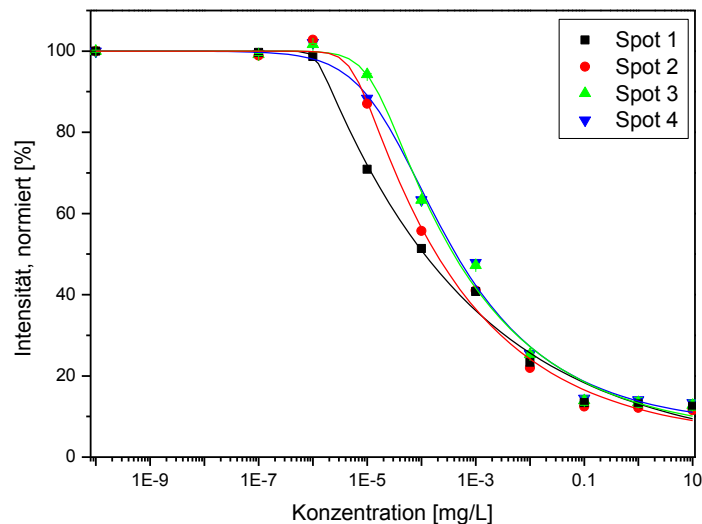


Abbildung 49: r5PL-Kalibrierfunktionen der Spots 1-4. Zu erkennen ist die größere Dynamik im unteren Konzentrationsbereich bei Spot 1 verglichen mit Spot 2 und 3. Spot 4 bildet hier eine Ausnahme.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass eine Auswertung mit allen Spots möglich ist. Um nun zu ermitteln, ob eine 3-fach-Bestimmung ausreichend ist, werden die Spots 1-4 einer 1-, 6-, und einer 9-fach-Bestimmung untersucht. Die folgenden Abbildungen und Tabellen enthalten die Diagramme und Parameter der 4PL und r5PL der Mehrfachbestimmungen (Abbildung 50 - Abbildung 52, Tabelle 34 - Tabelle 36).

Daten der 1-fach-Kalibrierung:

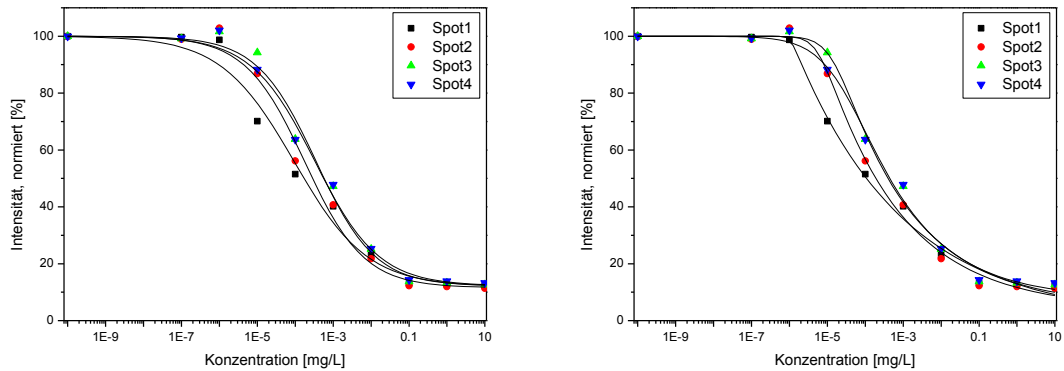


Abbildung 50: Kalibrierfunktionen aller vier Spots der Einfachkalibrierung. Im der linken Abbildung wurde mit der 4PL, in der rechten mit der r5PL approximiert.

	Parameter	4PL		r5PL	
		Wert	sdv	Wert	sdv
Spot 1	A	100	0	100	0
	B	0,45006	0,07162	6,21465	17,14485
	C	0,00009	0,00004	0,00011	0,00006
	D	12,02222	3,55012	0,2874	6,69788
	E	-	-	0,02423	0,07006
Spot 2	A	100	0	100	0
	B	0,55477	0,07799	2,17727	3,7203
	C	0,00018	0,00005	0,00015	0,00005
	D	11,59389	2,80158	4,2354	5,16465
	E	-	-	0,09753	0,18688
Spot 3	A	100	0	100	0
	B	0,55769	0,07464	1,61264	1,05261
	C	0,00035	0,0001	0,00031	0,00012
	D	12,19176	2,76699	5,33048	5,63408
	E	-	-	0,13883	0,11712
Spot 4	A	100	0	100	0
	B	0,51573	0,06069	0,8049	0,33922
	C	0,00033	0,00009	0,0003	0,00011
	D	12,24586	2,57646	7,86051	5,80872
	E	-	-	0,32571	0,24709

Tabelle 34: Parameter der Kalibrierfunktionen 4PL und r5PL aller vier Spots der Einfachkalibrierung.

Daten der 6-fach-Kalibrierung:

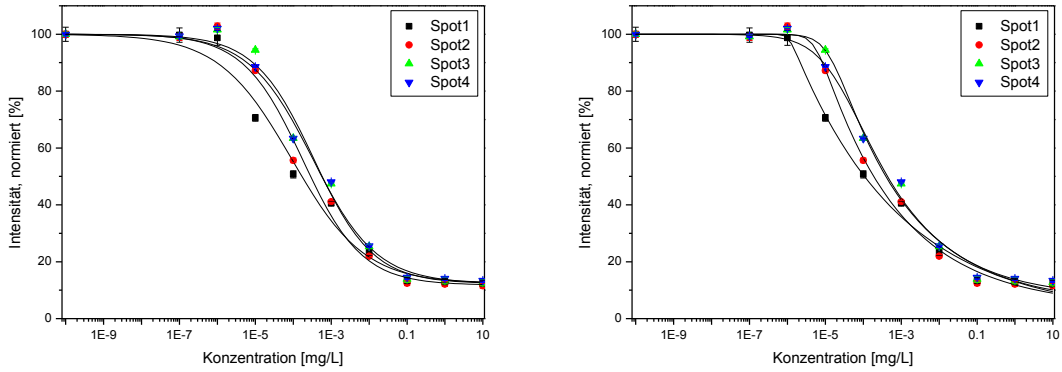


Abbildung 51: Kalibrierfunktionen aller vier Spots der 6-fach-Kalibrierung. Im der linken Abbildung wurde mit der 4PL, in der rechten mit der r5PL approximiert.

	Parameter	4PL		r5PL	
		Wert	sdv	Wert	sdv
Spot 1	A	100	0	100	0
	B	0,45205	0,07312	5,47756	12,91296
	C	0,00009	0,00004	0,00010	0,00006
	D	12,31509	3,57693	0,98277	6,48016
	E	-	-	0,02800	0,06952
Spot 2	A	100	0	100	0
	B	0,55451	0,08112	2,65606	7,60205
	C	0,00018	0,00005	0,00015	0,00005
	D	11,81574	2,90694	4,30485	5,36536
	E	-	-	0,07900	0,24343
Spot 3	A	100	0	100	0
	B	0,55613	0,07714	1,77691	1,31327
	C	0,00035	0,0001	0,00030	0,00012
	D	12,36006	2,86647	5,15784	5,87144
	E	-	-	0,12291	0,11455
Spot 4	A	100	0	100	0
	B	0,51504	0,06233	0,86119	0,39308
	C	0,00033	0,00009	0,0003	0,00012
	D	12,39799	2,64754	7,41885	6,13972
	E	-	-	0,28842	0,22455

Tabelle 35: Parameter der Kalibrierfunktionen 4PL und r5PL aller vier Spots der 6-fach-Kalibrierung.

Daten der 9-fach-Kalibrierung:

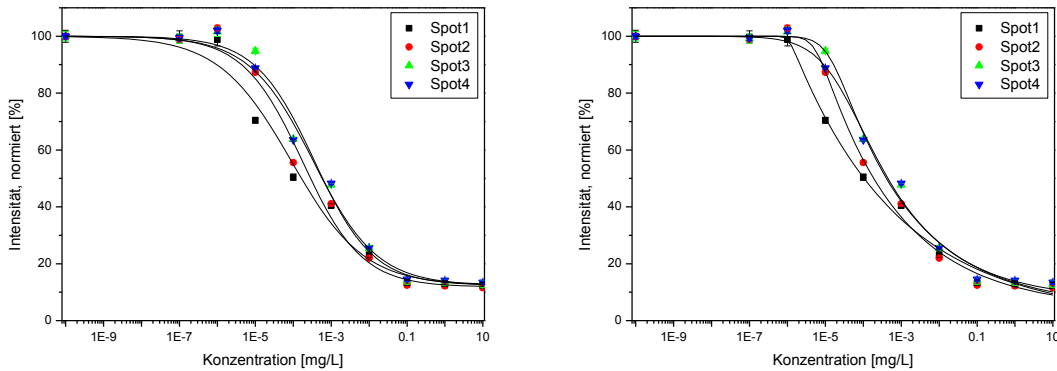


Abbildung 52: Kalibrierfunktionen aller vier Spots der 9-fach-Kalibrierung. Im der linken Abbildung wurde mit der 4PL, in der rechten mit der r5PL approximiert.

	Parameter	4PL		r5PL	
		Wert	sdv	Wert	sdv
Spot 1	A	100	0	100	0
	B	0,45404	0,07437	6,00175	15,43866
	C	0,00009	0,00004	0,00010	0,00006
	D	12,37105	3,60083	1,13648	6,38278
	E	-	-	0,0257	0,06931
Spot 2	A	100	0	100	0
	B	0,55565	0,08183	2,71717	8,18080
	C	0,00018	0,00006	0,00015	0,00005
	D	11,86548	2,91986	4,3742	5,36583
	E	-	-	0,07736	0,25000
Spot 3	A	100	0	100	0
	B	0,55808	0,07769	1,81146	1,34706
	C	0,00036	0,00011	0,00031	0,00013
	D	12,42248	2,87362	5,18711	5,89976
	E	-	-	0,12059	0,11246
Spot 4	A	100	0	100	0
	B	0,51582	0,06231	0,85246	0,38563
	C	0,00033	0,00009	0,00031	0,00012
	D	12,46702	2,64095	7,59389	6,11159
	E	-	-	0,29429	0,22904

Tabelle 36: Parameter der Kalibrierfunktionen 4PL und r5PL aller vier Spots der 9-fach-Kalibrierung.

Vergleich man die Parameter aller Kalibrierungen der verschiedenen Mehrfachmessungen miteinander, lässt sich die Tendenz, die schon vorher bei der 3-fach-Kalibrierung festgestellt wurde, nämlich dass die Konzentrationsdynamik von Spot 1 nach Spot 3 bzw. Spot 4 abnimmt bestätigen. Betrachtet man den Parameter C, also den Testmittelpunkt der Kalibrierfunktion, liegt dieser bei der Verwendung der r5PL bei Spot 2-4 immer bei niedrigeren Konzentrationen, als bei Verwendung der

4PL. Bei Spot 1, verhält es sich andersherum. Allerdings haben die vorherigen Betrachtungen und Validierungen in diesem Kapitel gezeigt, dass die r5PL die exaktere Kalibrierung darstellt. Die sdvs der verschiedenen Mehrfachkalibrierungen unterscheiden sich nicht signifikant. (F-Test, $\alpha = 5\%$). Wird zum Vergleich der Testmittelpunkt von Spot 1 herangezogen, variiert dieser bei der 4PL zwischen 0,00009 und 0,00011 mg/L und bei der r5PL zwischen 0,00010 und 0,00011 mg/L. Für die anderen Spots und auch die anderen signifikanten Parameter gelten ähnlich kleine Schwankungen zwischen den verschiedenen Mehrfachkalibrierungen. Daher kann aus den vorliegenden Daten für die Kalibrierung kein Vorteil einer erhöhten Anzahl an Messungen angenommen werden. Natürlich ist aufgrund von statistischen Schwankungen eine Mehrfachkalibrierung sinnvoll. Üblich sind 2- oder 3-fach-Kalibrierungen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb 3-fach-Kalibrierungen durchgeführt, die auch im Sinne der Praktikabilität eines angewendeten Biosensors sind. Aus dem gesammelten Datensatz kann jetzt zusätzlich noch im Hinblick auf die Methodvalidierung eine Aussage zur „Verschleppung“ von Konzentrationen getroffen werden. Alle Kalibrierungen wurden direkt hintereinander durchgeführt. Es gab zwischen den verschiedenen Kalibrierreihen (inkl. Wiederfindungsmessungen und Leerwertbestimmung) keine gesonderten Reinigungsschritte. Die Konzentrationsreihen wurden auch nicht nach Konzentrationen auf- oder absteigend geordnet bestimmt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass im System keine Verschleppung stattfindet.

Zur Validierung gehören auch die Kenngrößen. Die Anwendbarkeit der Methode auf niedrige Konzentrationen ist hier von großem Interesse. Allgemein gilt für den oberen Konzentrationsbereich der Kalibrierung dasselbe, allerdings wird sich hier auf den unteren Konzentrationsbereich beschränkt. Wie in Kapitel 2.3.1 bereits diskutiert gibt es für die sigmoidal verlaufenden Kalibrierfunktionen keine exakt präzisierten bzw. anwendbaren Definitionen. Daher werden jetzt am Beispiel der 3-fach-Kalibrierung, Spot 1-4, verschiedenen Methoden angewendet um die analytisch bzw. statistisch sinnvolle untere Grenze der Methodvalidierung zu bestimmen und die erhaltenen Ergebnisse diskutiert. Bei einigen Definitionen wird zum Teil nur eine Abweichung errechnet, so z.B. bei den Definitionen nach DIN/ISO. Es gibt keinen Bezug zum niedrigsten gemessenen Messwert, daher wird es als nicht sinnvoll angesehen, diesen berechneten Wert direkt zu übernehmen, da hier keine Aussage über die tatsächliche Konzentration getroffen wird. Die in der Signaldomäne errechnete Kenngröße wird in dieser Arbeit mit dem Signal (Intensität) korreliert, indem sie vom Maximalsignal (100 %) subtrahiert wird. Dadurch wird eine aussagekräftige und praktikable Konzentration erhalten. Dies ist möglich, da die Kalibrierfunktion auf diesen Wert (100 % bei einem Bindungshemmtest) festgesetzt wurde und damit eine Maximalintensität existiert. Tabelle 37 und Tabelle 38 geben eine Übersicht über die verschiedenen berechneten Kenngrößen. Dabei muss beachtet werden, dass die Bestimmung der NG, EG, BG und des LOD/LOQ ohne Berücksichtigung der Steigung durchgeführt wurde, da bei sigmoidalen Funktionen keine konstante Steigung vorliegt (gängige Praxis). Bei der Bestimmung des LOD mit Berücksichtigung der Steigung wurde die Wertetabelle der erhaltenen Kalibrierfunktion differenziert und der Konzentrationswert daraus mit Gleichung (2.64), (2.65) oder (2.66) bestimmt. In Abbildung 54 und Tabelle 40 sind die Diagramme und ermittelten Steigungen aufgezeigt. Für die Bestimmung des RDL und der MDC werden die Kalibrierfunktionen ohne feste Parameter benötigt (Parameter A ist frei und kann daher auch Werte größer oder kleiner 100 % annehmen), da sonst keine sinnvolle Bestimmung der Vertrauensintervalle möglich ist. Die Vertrauensintervalle wurden nach [98] berechnet. In Tabelle 39 und Abbildung 53 sind die dafür nötigen Daten zusammengefasst.

Parameter	Methode	Spot 1 [mg/L]	Spot 2 [mg/L]	Spot 3 [mg/L]	Spot 4 [mg/L]
NG	Gleichung (2.50)	3,42E-07	1,51E-07	7,31E-08	1,61E-08
EG	Gleichung (2.51)	1,91E-06	5,46E-07	2,59E-07	6,24E-08
BG	Gleichung (2.52)	7,77E-06	1,44E-06	6,63E-07	1,71E-07
LOD	$L_D = 3,29 \cdot s_B$ Schnellbetrachtung	4,27E-07	1,79E-07	8,64E-08	1,92E-08
LOD	$L_{D(2F)} = 5,84 \cdot s_B$ t-Wert-abhängig	1,78E-06	5,19E-07	2,46E-07	5,92E-08
LOQ	Gleichung (2.55)	7,77E-06	1,44E-06	6,63E-07	1,71E-07
LOD	$L_{D(1\%RSD)} = 6,20 \cdot s_B$	2,08E-06	5,80E-07	2,75E-07	6,66E-08
LOQ	$L_{Q(1\%RSD)} = 11,11 \cdot s_B$	1,06E-05	1,77E-06	8,06E-07	2,11E-07
LOD	Gleichung (2.64) var. Steigung	6,76E-06	5,82E-07	2,70E-7	7,54E-8
LOD	Gleichung (2.65) 50 %Maximalsteigung	2,72E-07	1,52E-06	2,99E-06	1,94E-6
LOD	Gleichung (2.66) 25 %Maximalsteigung	1,89E-06	7,31E-06	1,44E-05	1,05E-5
MDC	Abbildung 15	5,90E-07	1,71E-06	2,88E-06	1,57E-06
RDL	Abbildung 15	2,85E-06	7,14E-06	1,22E-05	6,28E-06

Tabelle 37: Übersicht über verschiedene Kenngrößen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der jeweiligen 4PL ermittelt.

Parameter	Methode	Spot 1 [mg/L]	Spot 2 [mg/L]	Spot 3 [mg/L]	Spot 4 [mg/L]
NG	Gleichung (2.50)	1,73E-06	3,18E-06	2,75E-06	2,13E-07
EG	Gleichung (2.51)	2,82E-06	4,39E-06	4,19E-06	4,87E-07
BG	Gleichung (2.52)	5,55E-06	5,75E-06	5,78E-06	9,05E-07
LOD	$L_D = 3,29 \cdot s_B$ Schnellbetrachtung	1,82E-06	3,32E-06	2,91E-06	2,38E-07
LOD	$L_{D(2F)} = 5,84 \cdot s_B$ t-Wert-abhängig	2,75E-06	4,33E-06	4,12E-06	4,72E-07
LOQ	Gleichung (2.55)	5,55E-06	5,75E-06	5,78E-06	9,05E-07
LOD	$L_{D(1\%RSD)} = 6,20 \cdot s_B$	2,91E-06	4,46E-06	4,27E-06	5,07E-07
LOQ	$L_{Q(1\%RSD)} = 11,11 \cdot s_B$	6,78E-06	6,12E-06	6,19E-06	1,03E-06
LOD	Gleichung (2.64) var. Steigung	1,10E-06	2,30E-06	2,14E-06	2,97E-7
LOD	Gleichung (2.65) 50 %Maximalsteigung	8,67E-07	3,15E-06	5,17E-06	2,27E-06
LOD	Gleichung (2.66) 25 %Maximalsteigung	1,07E-06	4,65E-06	9,04E-06	6,73E-06
MDC	Abbildung 15	1,72E-06	5,24E-06	9,41E-06	3,40E-06
RDL	Abbildung 15	4,49E-06	1,07E-05	2,50E-05	1,39E-05

Tabelle 38: Übersicht über verschiedene Kenngrößen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der jeweiligen r5PL ermittelt.

	Parameter	4PL		r5PL	
		Wert	sdv	Wert	sdv
Spot 1	A	104,04867	4,59097	99,84015	2,49173
	B	0,41579	0,07831	5,17520	13,5495
	C	0,00008	0,00004	0,00011	0,00008
	D	11,65805	3,81052	0,72948	7,29187
	E	-	-	0,02936	0,08044
Spot 2	A	102,95017	3,35404	100,57409	2,07027
	B	0,52084	0,0867	2,42924	6,49562
	C	0,00015	0,00005	0,00015	0,00006
	D	11,4356	3,03729	4,37288	5,76531
	E	-	-	0,08663	0,25198
Spot 3	A	102,39454	2,97489	100,31438	2,25339
	B	0,52694	0,08447	1,68266	1,36235
	C	0,00030	0,00010	0,00029	0,00013
	D	12,04373	3,03588	5,29103	6,3575
	E	-	-	0,13059	0,13341
Spot 4	A	102,45131	2,74606	101,34416	2,96072
	B	0,48659	0,06862	0,71232	0,35575
	C	0,00028	0,00009	0,00028	0,00011
	D	12,01139	2,80217	8,61214	6,19825
	E	-	-	0,39105	0,35946

Tabelle 39: Parameter der Kalibrierfunktionen bei nicht festgesetzten Parametern. Die Werte werden zur Bestimmung des RDL und der MDC benötigt.

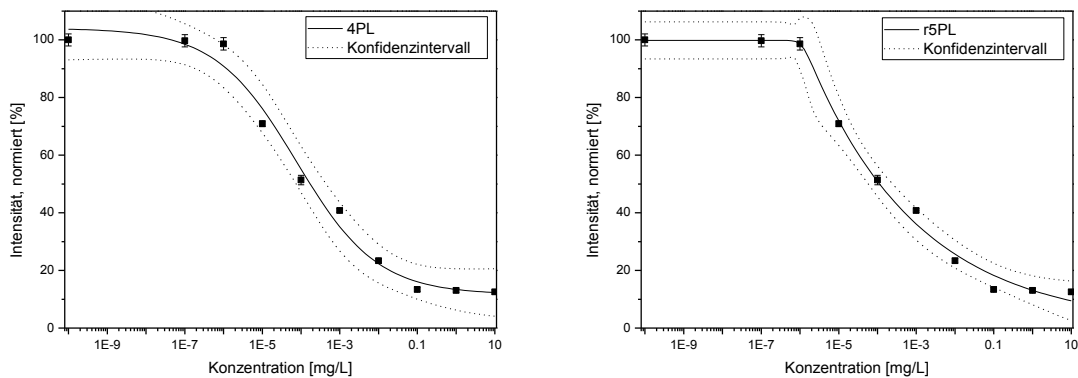


Abbildung 53: Kalibrierfunktionen bei nicht festgesetzten Parametern inklusive der Vertrauensintervalle. Die Vertrauensintervalle werden zur Bestimmung des RDL und der MDC benötigt. Exemplarisch sind hier nur die Ergebnisse von Spot 1 abgebildet.

Spot	4PL		r5PL	
	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]
Spot 1	-22,70728	0,00009	-30,22553	0,00010
Spot 2	-28,123760	0,00018	-34,57264	0,00015
Spot 3	-28,027756	0,00036	-32,23897	0,00031
Spot 4	-25,96400	0,00033	-26,65008	0,00031

Tabelle 40: Zusammenfassung der max. Steigungen der entsprechenden Kalibrierfunktionen. Diese werden für die Berechnung des LOD benötigt.

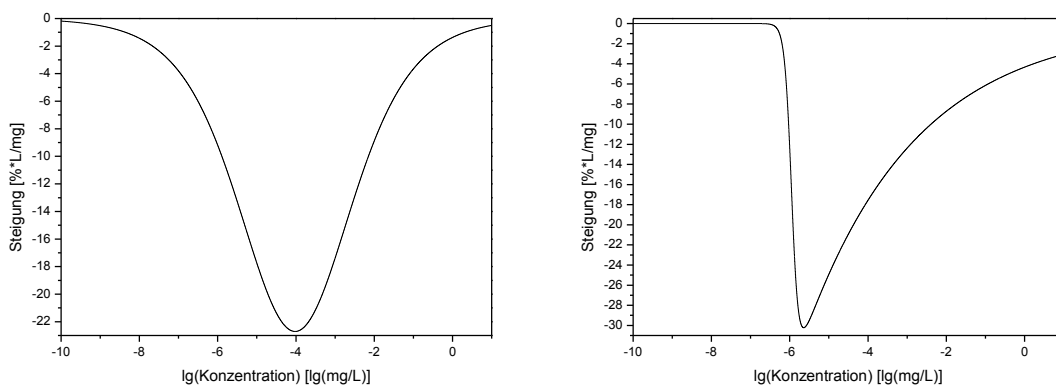


Abbildung 54: Das Diagramm zeigt die Abhängigkeiten der Steigung der 4PL (links) und r5PL (rechts) von der Konzentration exemplarisch für Spot 1. Die Konzentration wurde zuvor logarithmiert, um eine Berechnung mit dem Programm Origin zu ermöglichen. Aus dem Diagramm können die Steigungen für die LOD-Berechnung abgelesen werden.

Als Einführung in die Diskussion der Ergebnisse werden die Grundzusammenhänge von Kapitel 2.3.1 kurz zusammengefasst und die danach erwarteten Ergebnisse aufgeführt. Die Grundidee von NG, LOD und MDC ist dieselbe. Diese Kenngrößen sollen die mit einer gewissen Fehlerwahrscheinlichkeit kleinste detektierbare Konzentration aufzeigen, allerdings auf leicht unterschiedliche Weise. Das LOD kann nach verschiedenen Methoden bestimmt werden. Wird z.B. eine Heteroskedastizität angenommen oder das LOD nicht nach Schnellbetrachtung, sondern mit der statistisch korrekten Verteilungsfunktion anhand der Freiheitsgrade berechnet, sollten sich Werte bei höheren Konzentrationen ergeben. Man würde in diesem Fall von einer „schlechteren“ Konzentration, einem schlechteren“ LOD sprechen. Allerdings geht es hier nicht darum eine möglichst niedrige Konzentration detektieren zu können, sondern eine statistisch sinnvolle untere Konzentrationsgrenze für die verwendete Methode angeben zu können. LOQ und RDL habe vom Grundgedanken ebenfalls dieselbe Aussagekraft und können somit auch miteinander verglichen werden. Beachtet werden sollte, dass alle Rechnungen zunächst in der Signaldomäne (Intensität) stattfinden und dann mittels Kalibrierfunktion in die Konzentrationsdomäne transformiert werden. Somit hat die Kalibrierfunktion einen sehr großen Einfluss auf die erhaltenen Werte. Ohne bekannte Kalibrierfunktion ist somit auch eine gegeben Kenngröße nicht aussagekräftig.

Zunächst wird Spot 1 (4PL) betrachtet (Tabelle 37). Dabei muss beachtet werden, dass es bei diesem Vergleich nicht um kleine Abweichungen geht, sondern hier Abweichungen in größerem Maßstab über eine Zehnerpotenz und mehr möglich sind. Daher werden Abweichungen um 50 % als nicht sehr groß angesehen. Große Abweichungen werden für eine bessere Übersichtlichkeit als Faktor, d.h. Abweichung in Vielfachen vom Vergleichswert, angegeben. Die sdv des Leerwerts bei Spot 1 beträgt 2,11 % und ist damit im Verhältnis zu den Leerwerten bei Spot 2, 3 und 4 verhältnismäßig groß (Vergleich folgt später). Die NG und das LOD nach der Schnellschätzung (IUPAC) differieren nur um 20 %. Auch der MDC kann als ähnlich angesehen werden mit einem Unterschied von 42 % im Vergleich zur NG und 28 % Unterschied zum LOD (Schnellschätzung). Sie haben somit dieselbe Aussagekraft. Sobald man allerdings die Sicherheit steigert (k wird größer), z.B. nicht mehr nach der Schnellschätzung der IUPAC, sondern die korrekten t -Werte anhand der Freiheitsgrade berechnet, wird bei der 3-fach-Bestimmung das LOD um den Faktor 4 zu höheren Konzentration geändert. Das LOD und das LOQ wurden auch berechnet mit der Annahme von 1 % RSD. Es kann keine korrekte Aussage über die Änderung der RSD beim LOD/LOQ, extrapoliert vom Leerwert aus, getroffen werden, da die RSD bei den verwendeten Messungen je nach Konzentrationsbereich unterschiedlich groß ist. Es ist auch keine Tendenz feststellbar, allerdings schwankt die RSD um ca. 1 %. Daher diese Annahme, um die Sicherheit des LOD/LOQs zu erhöhen. Die Auswirkungen auf das LOD, 14 % Abweichung zur Schnellschätzung, bzw. LOQ, mit 27 % Abweichung, sind allerdings so gering, dass sie hier vernachlässigbar sind. Bezieht man aber die Steigung der Kalibrierfunktion mit ein, wie es ursprünglich nach DIN/ISO und IUPAC definiert wurde, verschlechtern sich die LODs deutlich. Wird das LOD in Miteinbeziehung der sdv des Leerwerts nach Gleichung (2.64) berechnet, verschlechtert sich das LOD im vgl. zur Schnellschätzung um den Faktor 15,8 und im Vergleich zur Bestimmung mit korrektem t -Wert immer noch um den Faktor 3,8. Würde hier auch noch der korrekte t -Wert verwendet, würde sich das LOD um mehr als eine Zehnerpotenz zu höheren Konzentrationen verschieben. Werden die fest definierten Grenzen von 50 bzw. 25 % der Steigung verwendet, liegt das LOD mit 36 % Abweichung fast gleichauf mit der Schnellschätzung (50 % Steigung) bzw. mit korrekter t -Wert Bestimmung (25 % Steigung) beträgt der Unterschied nur 6 %. Der RDL liegt nach dieser Betrachtung vom Konzentrationswert eher im mittleren Bereich der bisher ermittelten LODs und somit um Faktor 2,7 hin zu niedrigeren Konzentrationen als bei der LOQ/BG-Bestimmung.

Führt man nun die Betrachtung für einen Spot mit deutlich kleinerer sdv durch, z.B. Spot 3 mit einer sdv des Leerwerts von 0,27 %, dann werden auch die Abweichungen der einzelnen Kenngrößen untereinander kleiner. Obwohl die sdv um nahezu den Faktor 10 kleiner ist als bei Spot 1, verändern sich die Faktoren zwischen den einzelnen Kennwerten im Vergleich zu Spot 1 nur bis max. 50 % bei allen Kenngrößen, die direkt über die sdv ermittelt werden. Wird wiederum das LOD mit Hilfe der festgelegten Steigung von 25 bzw. 50 % der Maximalsteigung ermittelt, wird die Abweichung zu den anderen ermittelten Kenngrößen sehr groß, bis zum Faktor 167 beim Vergleich zwischen LOD-Bestimmung mittels 50 % Maximalsteigung und der LOD-Schnellschätzung nach IUPAC. Man kann somit festhalten, dass die Miteinbeziehung der Steigung bei der 4PL immer den LOD zu größeren Konzentrationen verschiebt. Auch die MDC und der RDL liegen hier bei höheren Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Kenngrößen. Auch diese Werte sind also nicht nur abhängig von der sdv des Leerwertes, wie die anderen Kenngrößen.

Betrachtet man nun Spot 1 und nimmt die r5PL als Kalibrierfunktion ergibt sich ein völlig anderes Bild. Die Abweichungen zwischen den einzelnen Kenngrößen sind viel kleiner. Die größte Schwankung mit dem Faktor 3,3 besteht zwischen der LOD-Bestimmung durch feste Steigung 50 % und LOD-

Bestimmung mit 1% RSD. Die Schwankungen zwischen den LODs nach allen anderen Bestimmungsmethoden sind deutlich geringer. Dies liegt unter anderem an der im unteren Konzentrationsbereich verlaufenden Anpassung der Kalibrierfunktion. Hier ist im Bereich der Kenngrößenbestimmung zwar eine größere Signaldynamik gegeben als bei der 4PL (Steigung der Kalibrierfunktion), aber eine kleinere Konzentrationsdynamik. Dies führt dann dazu, dass bei der Berechnung der Kenngrößen mit höheren Sicherheiten (großem k) zwar ein deutlich anderes Signal (Intensität) berechnet wird als bei kleinen Sicherheiten, aber die Bestimmung der Konzentration mit Hilfe der Umkehrfunktion dann nur eine kleine Konzentrationsänderung ergibt. Somit kann die r5PL bei der Verwendung der vorliegenden verschiedenen Kenngrößen bei dieser Methode als robuster bzw. der Unterschied zwischen den Kenngrößen mit ähnlicher Aussagekraft als vergleichbarer zwischen den verschiedenen Kenngrößen angesehen werden. Die MDC bzw. der RDL liegen nun ebenfalls von der Aussagekraft im Bereich des LODs mit einer Abweichung von 5% bzw. 19% Abweichung vom LOQ/BG. Betrachtet man nun Spot 3 mit niedriger sdv , dann sind die Schwankungen hier untereinander ebenfalls geringer. Die NG und das LOD nach Schnellbetrachtung differieren um 6%, das LOD nach Schnellbetrachtung und das LOD aus der Verteilungsfunktion bestimmt weichen um 29% voneinander ab. Allerdings weichen auch hier wieder die Methoden, die die Steigung mit einbeziehen bzw. die MDC und der RDL zu höheren Konzentrationen ab. Wird das LOD nach der Methode 50% der Maximalsteigung ermittelt, so ist das LOD um Faktor 2 zu höheren Konzentrationen verschoben als nach der Methode der Schnellbetrachtung. Der MDC weicht von der NG um den Faktor 3,4 und der RDL um den Faktor 4,3 vom LOQ ab. Die Kenngrößen lassen sich, den vorhergehenden Betrachtungen nach, durch eine niedrige sdv nicht entsprechend zu niedrigen Konzentrationen hin verschieben. Ganz allgemein ist allerdings eine Tendenz zu erkennen. Ist die sdv klein, werden die Konzentrationsbereiche der Kenngrößen zu niedrigen $sdvs$ hin verschoben, obwohl eine augenscheinliche Betrachtung der Kalibrierfunktionen ergibt, dass die niedrigen Konzentrationsbereiche besser von den Kalibrierfunktionen bezogen auf Spot 1, als auf Spot 3 abgedeckt werden. Zudem sind beim Vergleich zwischen der 4PL und der r5PL die Kenngrößen der 4PL in einem niedrigeren Konzentrationsbereich angesiedelt, z.B. ist das LOD nach Schnellbetrachtung bei der 4PL um den Faktor 4,3 zu niedrigen Konzentrationen verschoben. Bei Betrachtung der Kalibrierfunktionen wird allerdings offensichtlich, dass in diesem Konzentrationsbereich die Anpassung der r5PL deutlich besser verläuft und somit die Kenngrößen der 4PL eher kritisch betrachtet werden müssen. Mit diesen Kenngrößen ist es nun möglich, eine statistisch „sinnvolle“ untere Konzentrationsgrenze anzugeben. Für die obere Konzentrationsgrenze können bei einer Kalibrierfunktion mit sigmoidalem Signalverlauf theoretisch dieselben Betrachtungen durchgeführt werden. Gängige Praxis in vielen Publikationen ist es, den Arbeitsbereich von sigmoidalen Funktionen als 10 – 90% der Signaldynamik zu definieren. Tabelle 41 zeigt die damit erhaltene Konzentrationsgrenze für alle vier Spots bezogen auf die 4PL und die r5PL.

Spot	Konzentration 4PL [mg/L]	Konzentration r5PL [mg/L]
Spot 1	7.54E-07	2.28E-06
Spot 2	3.41E-06	8.04E-06
Spot 3	6.52E-06	1.48E-05
Spot 4	4.49E-06	7.88E-06

Tabelle 41: Zusammenstellung der unteren Konzentrationsgrenze. Diese wurde ermittelt indem bei 10%-Verlust der Signaldynamik die Konzentration ermittelt wurde.

Wird die 4PL herangezogen, so ist die Differenz zwischen der aus 10 %-Signaldynamik ermittelten Konzentration und dem LOD gerade 43 %. Aber bereits hier liegt das LOD unter dem Konzentrationsbereich, der vom Arbeitsbereich vorgegeben ist. Beide Definitionen können nicht nebeneinander verwendet werden. Weitet man die Betrachtung auf Spot 2 bis 4 aus, so steigt der Unterschied zwischen dieser untersten Grenze von Faktor 19 (Spot 2) über Faktor 75 (Spot 3) bis zu Faktor 234 (Spot 4). Wird die r5PL zugrunde gelegt, so liegt auch hier das LOD immer außerhalb des Arbeitsbereiches. Allerdings sind die Unterschiede hier bei weitem nicht so groß, wie bei der 4PL. Die Abweichungen betragen bei Spot 1 20 %, bei Spot 2 steigt es dann über den Faktor 2,4, Faktor 5 bei Spot 3 bis zu Faktor 33 bei Spot 4 an. Es muss damit die Entscheidung getroffen werden welche Methode zur Bestimmung der niedrigsten „verwendbaren“ Konzentration angewendet werden soll. Da die 10–90 % Regel keinen statistischen Hintergrund hat, sondern nur die „extremen“ Signalbereiche außen vorlässt, die aus einer technischen Sichtweise häufig mit Schwierigkeiten in der Mess- und Regelelektronik verbunden sind, kann diese Definition hier bei diesen Abweichungen nicht als sinnvoll angesehen werden. Dies zeigen auch die Messungen in diesem Signalbereich, die ohne größere Schwierigkeiten möglich sind. Aber dies muss von Fall zu Fall entschieden werden. Eine Methode, die sich ebenfalls in der Literatur findet, ist die Bestimmung des Arbeitsbereichs durch Schnittpunkt der Horwitz-Funktion mit dem Präzisionsprofil. Die Horwitz-Funktion wurde aus einer großen Anzahl an Messungen verschiedenster analytischer Systeme bestimmt und gibt die durchschnittliche Präzision in den verschiedenen Konzentrationsbereichen der analytischen Methoden wieder [99; 100]. Da bei der Bestimmung der Horwitzfunktion nahezu keine biosensorischen Systeme beteiligt waren und auch die Technik (Elektronik, Transducer etc.) in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht haben und neue Prinzipien entstanden sind, die in der Horwitz-Funktion nicht berücksichtigt wurden, wird es als nicht sinnvoll angesehen diese Methode zu verwenden [101; 102].

Werden nun die verschiedenen Mehrfachkalibrierungen miteinander verglichen, so ergeben sich dieselben Beziehungen. Einzig bei der 1-fach-Kalibrierung kann nahezu keine Kenngröße berechnet werden, da keine s_{dvs} existieren und somit auch keine Vertrauensintervalle u. ä. berechnet werden können. Bei der Berechnung des LOD nach IUPAC ist ein großer Einfluss der Häufigkeit der Messungen auf das erhaltene Ergebnis gegeben. Natürlich werden auch die anderen Kenngrößen durch Mehrfachbestimmung beeinflusst, da statistisch gesehen bei einer hohen Messanzahl die s_{dv} kleiner werden sollte, allerdings ist der Einfluss bei bis zu neun Messungen noch nicht derart ausgeprägt. Tabelle 42 fasst die Ergebnisse der verschiedenen Mehrfachkalibrierungen auf den LOD nach Gleichung (2.53) zusammen.

Parameter	Messungen	Methode	Spot 1 [mg/L]	Spot 2 [mg/L]	Spot 3 [mg/L]	Spot 4 [mg/L]
4PL						
LOD	3-fach	$L_D = 3,29 * s_B$	4,27E-07	1,79E-07	8,64E-08	1,92E-08
LOD	3-fach	$L_{D(2F)} = 5,84 * s_B$	1,78E-06	5,19E-07	2,46E-07	5,92E-08
LOD	6-fach	$L_D = 3,29 * s_B$	5,86E-07	5,96E-07	5,55E-07	2,07E-07
LOD	6-fach	$L_{D(5F)} = 4,03 * s_B$	9,67E-07	8,74E-07	8,08E-07	3,09E-07
LOD	9-fach	$L_D = 3,29 * s_B$	4,00E-07	4,95E-07	2,70E-06	5,01E-07
LOD	9-fach	$L_{D(8F)} = 3,72 * s_B$	5,37E-07	6,23E-07	3,42E-06	6,42E-07
r5PL						
LOD	3-fach	$L_D = 3,29 * s_B$	1,82E-06	3,32E-06	2,91E-06	2,38E-07
LOD	3-fach	$L_{D(2F)} = 5,84 * s_B$	2,75E-06	4,33E-06	4,12E-06	4,72E-07
LOD	6-fach	$L_D = 3,29 * s_B$	1,89E-06	4,60E-06	5,47E-06	1,02E-06
LOD	6-fach	$L_{D(5F)} = 4,03 * s_B$	2,17E-06	5,09E-06	6,23E-06	1,31E-06
LOD	9-fach	$L_D = 3,29 * s_B$	1,77E-06	4,46E-06	9,99E-06	1,78E-06
LOD	9-fach	$L_{D(8F)} = 3,72 * s_B$	1,89E-06	4,73E-06	1,09E-05	2,09E-06

Tabelle 42: Zusammenfassung der LODs nach Gleichung (2.53) bei einer 3-, 6- und 9-fach-Kalibrierung für die 4PL und r5PL.

Bei der Betrachtung von Spot 1 - 4 (4PL) ergibt sich kein einheitliches Bild. Während bei Spot 1 sich mit Erhöhung der Messhäufigkeit das LOD (Freiheitsgradabhängig) nicht beträchtlich verändert, ist bei Spot 3 und Spot 4 der niedrigste LOD bei der 3-fach-Messung zu finden, der dann über die 6-fach- zur 9-fach-Bestimmung ansteigt. Bei Spot 1 beträgt der Unterschied zwischen der 3-fach- und 6-fach-Bestimmung 84 % und zwischen der 3-fach- und 9-fach-Bestimmung 20 %. Bei den anderen Spots sind die Abweichungen größer. Ein Faktor von 13 ist im ungünstigsten Fall bei Spot 3 zwischen der 3-fach- und 9-fach-Bestimmung ermittelt worden, allerdings ist hier die niedrigste LOD bei der 3-fach-Messung berechnet worden. Werden die Ergebnisse, die mit der r5PL erhalten wurden, betrachtet, so zeigen sich bei allen Spots nur geringere Abweichungen und es ist auch hier keine Tendenz zu niedrigeren LODs bei hoher Messhäufigkeit feststellbar. Die Abweichung im ungünstigsten Fall bei Spot 3 beträgt nur noch Faktor 2,6. Somit zeigt sich auch hier, dass die Anzahl der Messungen noch zu gering ist, um einen statistischen Effekt zu zeigen, und dass auch hier eine 3-fach-Bestimmung ausreichend ist. Bei der r5PL ergeben sich signifikant ähnlichere Ergebnisse bei den verschiedenen Mehrfachmessungen als bei der 4PL, obwohl sie auf denselben Messdaten beruhen. Dies kann wiederum als Argument für die Auswahl der r5PL als die sinnvollere Kalibrierfunktion herangezogen werden.

Von klinischem Interesse ist, ob die NeopterinKonzentration über bzw. unter 2,2 µg/L ist. Alle berechneten Kenngrößen befinden sich im unteren ng/L-Bereich. Wird jetzt noch der Verdünnungsfaktor von 10 mit eingerechnet, so sind im Bezug auf die NG und die BG (sowohl nach der 4PL wie auch der r5PL) eine Detektion und eine Quantifizierung möglich.

Um dieses Kapitel zusammenzufassen: Es wurde ein Neopterinassay für das optische Biosensorsystem validiert. Hierzu wurde analog der Methodvalidierung der FDA vorgegangen. Es wurden alle vier Spots einer 3-fach-Kalibrierung auf Selektivität, Richtigkeit und Präzision hin untersucht und die empfohlenen Grenzen weit (bis zu Faktor 10) unterschritten. Zur Ermittlung der Kalibrierfunktion wurden die 3PL, 4PL, 5PL und r5PL untersucht. Die 3PL und 4PL ergeben nach Normierung denselben Signalverlauf, genauso wie die 5PL und r5PL. Beim Vergleich der 4PL mit r5PL

durch Residuenanalyse und andere Verfahren hat sich die r5PL als geeignetste Kalibrierfunktion, auch aufgrund der direkten Beziehung zwischen den Kalibrierparametern und wichtigen Eigenschaften der Funktion wie dem Testmittelpunkt erwiesen. Es wurde die Stabilität und Haltbarkeit aller verwendeten Chemikalien und Transducer ermittelt und als geeignet eingestuft. Bei der Prüfung des Einflusses einer Erhöhung oder Erniedrigung der Messanzahl konnte keine Tendenz festgestellt werden. Eine Erhöhung der Messanzahl hat in diesem Bereich (von 3-fach- zur 9-fach-Bestimmung) keine signifikante Änderung der Kalibrierung ergeben. Nach der Validierung wurden allgemein verwendete Kenngrößen wie BG, EG und NG nach ISO/DIN, LOD und LOQ nach IUPAC und angenäherten Verfahren und MDC und RDL bestimmt. Der Vergleich der verschiedenen Kenngrößen mit gleicher Aussagekraft untereinander zeigt, dass die Differenzen bei der 4PL deutlich größer sind als bei der r5PL. Zudem liegen bei der 4PL im Vergleich zur r5PL die Kenngrößen in deutlich niedrigeren Konzentrationsbereichen. Ein Blick auf die vorherigen Kalibrierungen und die Residuenanalyse zeigt allerdings, dass hier die Aussagekraft einiger ermittelter Kenngrößen der 4PL bei der bekannten Kalibrierfunktion und den Messwerten angezweifelt werden muss. Zusammenfassend ist die r5PL für die Ermittlung der Kenngrößen für diese Methode als die geeignete anzusehen.

4.2.3 Methodvalidierung – Messungen auf mehreren Transducern

Alle Kalibrierungen und Analytmessungen wurden hierzu auf verschiedenen Transducern durchgeführt, einen Transducer für jede Messung. Dies soll das Potential aufzeigen, sogenannte „Disposables“ (Wegwerfartikel), wie sie häufig im medizinischen Bereich verwendet werden, zu verwenden. Die Transducer wurden nach der Vorschrift I(g)-III(g), IV(g+k)-VI(g+k) präpariert (Kapitel 3.5.1) und anschließend wurde nach der Vorschrift in Kapitel 3.1.3 das System regeneriert bzw. in diesem Fall gereinigt, da der Transducer nach der Messung ausgetauscht wird. Als Probenmatrix wurde dieses Mal dem PBS 10 % Plasma zugesetzt. Dies soll eine „Realproben“-Messung simulieren. Reines Plasma würde auf Dauer die Fluidik des Sensors verstopfen. Daher soll die Anwendbarkeit bei einer 10fachen Verdünnung überprüft werden. Es gilt zu beachten, dass alle folgenden Konzentrationsmessungen von 50 µL Probe/Standard ausgehen. Diese wird dann auf 500 µL verdünnt und gemessen. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die 500 µL verdünnte Probe. Daher ist später bei der Kenngrößenberechnung ein Faktor von 10 zu berücksichtigen. Da die Transducer auf die gleiche Weise präpariert wurden wie bei der vorherigen Kalibrierung auf einem Transducer, wird hier keine vollständige Validierung vorgenommen. Es wurde eine 3-fach-Kalibrierung an einem Spot durchgeführt. Es wurden die Richtigkeit und Präzision bestimmt und die 4PL und r5PL mit Normierung auf 100 % als Kalibrierfunktion für die Bestimmung der Wiederfindung und einiger Kenngrößen ausgewählt. Zuerst musste sichergestellt werden, dass die verwendeten Glastransducer alle ähnliche Dimensionen aufweisen, um reproduzierbare Messungen zu ermöglichen. Die Fertigungsmaße und Toleranzgrenzen sind in Kapitel 3.2.1 zusammengefasst. Zusätzlich wurden die Spots und sonstigen Hardwareeinstellungen, wie in Kapitel 4.1.1 erläutert, optimal eingestellt und dann jeder Transducer mit einem Fluoreszenzfarbstoff vermessen. Aus diesen Messungen wurde ein Signalmittelwert für die einzelnen Spots berechnet und die Abweichungen aller Transducer zu jenem Transducer ermittelt, der die kleinste Abweichung vom Mittelwert zeigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 zusammengefasst.

Transducer	Abweichung [%]	Transducer	Abweichung [%]	Transducer	Abweichung [%]
I1	2,32	I14	1,38	I28	6,58
I2	4,87	I15	4,51	I29	3,48
I3	5,49	I17	4,58	I30	3,37
I4	4,57	I18	2,70	I31	2,81
I5	4,69	I19	2,05	I32	5,89
I6	3,56	I20	4,10	I33	3,11
I7	1,11	I21	5,62	I34	0,27
I8	6,04	I22	5,98	I35	6,21
I9	3,07	I23	7,39	I36	5,17
I10	2,85	I24	4,18	I37	1,58
I11	3,09	I25	5,73	I38	6,82
I12	6,33	I26	2,08	I39	2,84
I13	0,09	I27	1,39	I40	4,34

Tabelle 43: Zusammenstellung der Abweichung der einzelnen Transducer (Hersteller: Krombach-Optik, BK7, Spot 1) vom „Mittelwert“-Transducer (I16). Gemessen wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff beschichtete Transducer.

Dadurch ist es möglich, die Transducer mit der geringsten Abweichung zu ermitteln, um später auch bei den Messungen möglichst ähnliche Bedingungen zu schaffen. Bei der Aufstellung der Tabelle wurden bereits einige Transducer mit noch größeren Abweichungen nicht berücksichtigt. Allerdings sind hier bereits Abweichungen von bis zu 7,39 % möglich. Diese relativ große Abweichung wird sich später auch in der sdv der Mehrfachkalibrierung niederschlagen. Transducer mit kleinerer Fertigungstoleranz sind auf dem freien Markt nur zu relativ hohen Preisen erhältlich und wären für die Massenfertigung eines Wegwerfartikels sicher zu teuer. Daher fand die Kalibrierung trotzdem mit diesen Transducern statt. Versuche, die ermittelte Abweichung der einzelnen Transducer untereinander mit in die Intensitätsberechnung einzubeziehen, führte zu keinem reproduzierbaren Ergebnis mit geringeren sdv zwischen den einzelnen Messungen und wurden daher nicht weiter verfolgt. Die Mittelwerte der 3-fach-Kalibrierung sind in Tabelle 44 zusammengefasst.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]
0	100	6,54
1,00E-07	104,90	8,4
1,00E-06	90,29	10,25
1,00E-05	64,95	8,7
1,00E-04	55,45	10,71
1,00E-03	30,81	4,72
1,00E-02	33,02	9,89
1,00E-01	10,42	5,59
1,00E+00	20,39	4,86
1,00E+01	11,00	6,57

Tabelle 44: : Daten der 3-fach-Kalibrierung. Für jede Messung wurde nur ein Transducer verwendet, dies bedeutet dass für die gesamte Kalibrierung 30 Transducer benötigt wurden. Die Intensitäten sind auf 100 % normiert, dies entspricht dem Maximalsignal bei der Leerprobe.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die gemittelten Intensitäten ähnlich der Kalibrierung auf einem einzigen Transducer verlaufen. Allerdings sind die *sdv* um den Faktor 3 - 10 größer und bewegen sich im Rahmen von 4,72 % - 10,71 %, die gemittelte *sdv* beträgt 7,62 % und ist damit ca. sechsmal größer wie bei der Kalibrierung auf einem Transducer, die Streuung beträgt mit 5,1 % ca. das 12-fache. Daraus ist klar ersichtlich, dass sich die *sdv* von Messwerten, die genau um den Faktor 10 größer oder kleiner sind, überlappen. Dadurch wird es sehr schwierig, in diesem Bereich eine Quantifizierung vorzunehmen. In Abbildung 55 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt und Tabelle 45 fasst die Parameter der Kalibrierfunktionen zusammen. Die Parameter der r5PL weisen ungewöhnlich große Fehler auf, zum Teil sind die Fehler 100-mal größer als der Parameter selbst. Dies weist auf eine schwierige Anpassung hin. Die 4PL zeigt hier kein derartiges Verhalten. Aber auch hier ist der Testmittelpunkt der 4PL bei einer niedrigeren Konzentration zu finden als bei der r5PL, ähnlich wie bei der Kalibrierung auf einem Transducer.

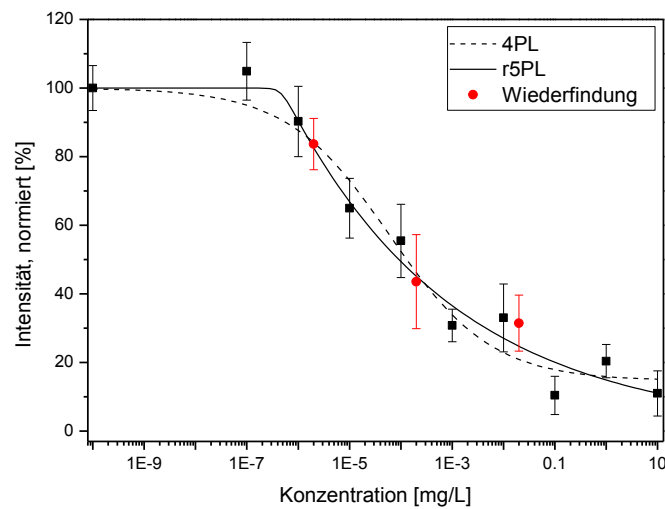


Abbildung 55: Kalibrierfunktionen der Einzeltransducermessungen. Mögliche Kalibrierfunktionen sind die 4PL und die r5PL. Zudem sind die Wiederfindungsmesswerte eingezeichnet (runde Datenpunkte).

Parameter	4PL		r5PL	
	Wert	<i>sdv</i>	Wert	<i>sdv</i>
A	100	0	100	0
B	0,43595	0,10236	5,523	521,00629
C	0,00006	0,00004	0,00009	0,00015
D	14,69671	5,02655	0,31212	17,25191
E	-	-	0,02387	2,26247

Tabelle 45: Parameter der Kalibrierfunktionen 4PL und r5PL. Bei der r5PL weisen die Parameter B, D und E sehr großen Fehler auf.

Allein durch eine visuelle Kontrolle ist es aber möglich, ein ähnliches Verhalten der zwei Kalibrierfunktionen wie bei der Kalibrierung auf einem Transducer festzustellen. Im Bereich 1E-07 - 1E-06 mg/L ist die Anpassung der r5PL deutlich besser als die der 4PL. Allerdings passt sich die 4PL im

höheren Konzentrationsbereich ab ca. 0,1 mg/L besser an die gemessenen Werte an. Die bessere Anpassung der r5PL im niedrigen Konzentrationsbereich ist aber offensichtlich. Im hohen Konzentrationsbereich zeigt die r5PL die Tendenz, immer zu hohe Werte anzugeben, während die 4PL keine Tendenz im gesamten Konzentrationsbereich zeigt. Abbildung 56 und Tabelle 46 fassen die Daten der Residuenanalyse zusammen. Hieraus ist ersichtlich, dass auch im mittleren Konzentrationsbereich die 4PL die bessere Approximation darstellt. Wie bereits erwähnt, sind aber die niedrigen Konzentrationen an Neopterin von medizinischem Interesse, da hier die medizinischen Entscheidungsgrenzen liegen und somit wird die Validierung auch hier hauptsächlich mit der r5PL durchgeführt. Einzelne Rechnungen wurden auch mit Bezug auf die 4PL durchgeführt, brachten aber keine signifikante Verbesserung der Ergebnisse und werden daher hier nicht weiter ausgeführt.

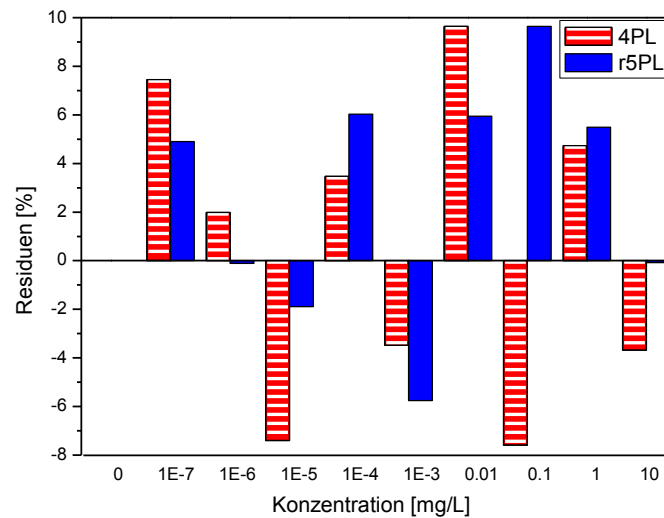


Abbildung 56: Residuenanalyse der verschiedenen Kalibrierfunktionen mit festgesetztem Parameter A. Bei der Konzentration 0 mg/L gibt es keine Residuen für die Funktion mit festgesetztem Parameter bzw. die Residuen betragen 0 mg/L.

Konzentration [mg/L]	Residuen [%]	
	4PL	r5PL
0	0	0
1,00E-07	7,45	4,90
1,00E-06	1,97	-0,11
1,00E-05	-7,40	-1,88
1,00E-04	3,46	6,02
1,00E-03	-3,48	-5,75
0,01	9,63	5,94
0,1	-7,58	9,64
1	4,73	5,49
10	-3,67	-0,07

Tabelle 46: Daten der Residuenanalyse.

Basierend auf der r5PL wurden nun die Richtigkeit, Präzision und die Wiederfindung bestimmt. Da es sich um exakt den gleichen Aufbau des Transducers, inklusive Material und Oberflächenbeschichtung, handelt wie bei den vorherigen Messungen, wurde kein Test mehr auf Selektivität durchgeführt. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 47 zusammengestellt.

	Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
Richtigkeit	5,00E-06	75,30	10,31	4,03E-06	19,35
	5,00E-04	38,01	13,82	7,43E-04	48,57
	0,05	20,17	9,01	0,096	91,70
Präzision	5,00E-06	72,61	12,44	5,32E-06	6,39
	5,00E-04	34,77	9,52	1,47E-03	97,06
	0,05	26,34	6,07	0,012	75,18
Wiederfindung	2,00E-06	83,70	7,48	1,79E-06	64,20
	2,00E-04	43,57	13,73	2,61E-04	47,80
	0,02	31,46	8,16	3,16E-03	93,68

Tabelle 47: Zusammenfassung der Richtigkeits-, Präzisions- und Wiederfindungsmessungen. Die Abweichung gibt die Abweichung vom wahren Wert in der Konzentrationsdomäne in Prozent wieder.

Betrachtet man zunächst die sdv aller Intensitätsmessungen, so sind diese in einer ähnlichen Größenordnung wie die der Kalibrierung selber angesiedelt. Betrachtet man nun die Abweichung des gemessenen Wertes vom vorhergesagten Wert, so sind nahezu alle Messungen außerhalb der Spezifikationen der hier zur Grundlage genommenen Methodenvvalidierung von 15 % bzw. 20 %. Es gibt Abweichungen bis zu 97 % vom Sollwert. Damit ist natürlich keine exakte Quantifizierung möglich. Mögliche Ursachen für diese hohen Abweichungen sind allerdings die bereits genannten Gründe im Bezug auf Fertigungstoleranzen des Transducers, aber auch Toleranzen und die Reproduzierbarkeit im Bezug auf die Oberflächenbeschichtung. Alle nötigen Schritte vom Reinigen und Aktivieren des Transducers, über die Modifikation der Oberfläche mit einem Biopolymer und dessen Umsetzung, bis hin zum Spottingprozess müssen möglichst gleich ausgeführt werden. Sollten in einem der Schritte Abweichungen auftreten, beeinflusst dies natürlich auch die nachfolgenden Schritte. Somit bietet die Oberflächenchemie Optimierungspotential, allerdings sollten hier dann auch sehr ähnliche Transducer verwendet werden. Zudem wurden für alle nötigen Messungen die Transducer mehrfach neu beschichtet und stammen nicht aus einer „Beschichtungscharge“, da für alle Messungen nicht genügend Transducer ähnlicher Fertigung zur Verfügung standen. Für die 3-fach-Kalibrierung wurden die Transducer einmal komplett modifiziert und vermessen. Anschließend wurden die Transducer gereinigt und für die Messung der Präzision, Genauigkeit und der Wiederfindungsraten neu, aber nach demselben Protokoll, beschichtet. Dies kann ebenfalls zu Abweichungen führen. Die anderen hier nicht einzeln aufgeführten Spots des Transducers weisen ähnlich große Abweichungen oder sogar noch größere Abweichungen auf. Dies liegt vor allem daran, dass wenn bereits an Spot 1 des Transducers Abweichungen zwischen zwei Transducern auftreten, diese, mit der Propagation des Laserlichts im Transducer, immer größer werden und auch die Form und Ausdehnung der folgenden Spots beeinflusst. Damit wird die Auswertung erschwert und eine

Anpassung an die in Kapitel 4.1.1 vorgestellte Auswertestrategie immer ungenauer. Tabelle 48 fasst nun die Kenngrößen der Kalibrierung im Bezug auf die 4PL und die r5PL zusammen.

Parameter	Methode	4PL [mg/L]	r5PL [mg/L]
NG	Gleichung (2.50)	3.75E-06	2.47E-06
EG	Gleichung (2.51)	4.15E-05	2.08E-05
BG	Gleichung (2.52)	9.19E-04	1.54E-03
LOD	$L_D = 3,29 * s_B$ Schnellbetrachtung	4.96E-06	2.96E-06
LOD	$L_{D(2F)} = 5,84 * s_B$ t-Wert-abhängig	3.71E-05	1.83E-05
LOQ	Gleichung (2.55)	9.19E-04	1.54E-03
LOD	$L_{D(1\%RSD)} = 6,20 * s_B$	4.78E-05	2.46E-05
LOQ	$L_{Q(1\%RSD)} = 11,11 * s_B$	3.31E-03	9.34E-03
LOD	Gleichung (2.64) var. Steigung	4,64E-10	2,22E-07
LOD	Gleichung (2.65) 50 %Maximalsteigung	1,39E-07	3,72E-07
LOD	Gleichung (2.66) 25 %Maximalsteigung	1,03E-06	4,50E-07
MDC	Abbildung 15	8,50E-07	1,06E-06
RDL	Abbildung 15	5,51E-06	7,04E-06

Tabelle 48: Kenngrößen der Kalibrierung, bezogen auf die 4PL und die r5PL.

Im direkten Vergleich mit den Kenngrößen, die mit der Kalibrierung auf einem Transducer gewonnen wurden, sind nahezu alle Kenngrößen bei dieser Kalibrierung um den Faktor 10 bis 100 zu höheren Konzentrationen verschoben. Betrachtet man zuerst die qualitativen Größen NG, LOD und MDC, so fällt bei der 4PL, wie auch bei der r5PL auf, dass die BG und das LOD nach Schnellbetrachtung kaum differieren. Geht man zu höheren Sicherheiten über, LOD mit Einbeziehung der Freiheitsgrade, oder auch den LOD, der RSD-Schwankungen mitberücksichtigt, die hier wieder nur mit 1 % angenommen wurde, dann verschiebt sich die Grenze um bis zu Faktor 7 zu höheren Konzentrationen. Betrachtet man nun die LOD mit Einbeziehung der Steigung, so ergibt sich ein völlig anderes Bild als bei der Evaluierung auf nur einem Transducer. Dort verschob sich die Grenze mit der Einbeziehung der Steigung zu höheren Konzentrationen, hier zu deutlich niedrigeren. Wird bei der 4PL 50 % der Maximalsteigung angesetzt, so verschiebt sich das LOD um Faktor 4,8 zu niedrigeren Konzentration, bei 25 % um den Faktor 35,6 und bei der Steigung, ermittelt mit Hilfe der sdv der Leerprobe, um 4 Zehnerpotenzen. Diese Methode kann also bei Bezug auf die 4PL als nicht sinnvoll angesehen werden. Im Bezug auf die r5PL ergibt sich eine ähnliche Tendenz zu niedrigeren Konzentrationen, allerdings sind die Unterschiede hier nicht ganz so groß und zeigen keine größeren Abweichungen als den Faktor 13,3. Auch der MDC weicht zu niedrigeren Konzentrationen ab im Vergleich zur BG und zum LOD nach Schnellbetrachtung. Bei der 4PL um den Faktor 4,4 und bei der r5PL um den Faktor 2,3 im Bezug auf die jeweilige NG. Betrachtet man nun die Größen, die eine statistisch sinnvolle Quantifizierung ermöglichen, so weichen diese zwischen der 4PL und der r5PL nur um maximal den Faktor 2,8 ab. Hier verhalten sich die zwei Kalibrierungen sehr ähnlich. Allerdings gibt es einen sehr großen Unterschied zwischen den verschiedenen Kenngrößen. Wird wie oben bereits erwähnt eine Änderung der RSD von nur 1 % angenommen, so verschiebt sich der LOQ um den Faktor 3,6 zu

höheren Konzentrationen (4PL). Der RDL zeigt hier noch viel größere Abweichungen um den Faktor 166 (4PL) und 218 (r5PL). Tabelle 49 und Tabelle 50, sowie Abbildung 57 und Abbildung 58 zeigen die zur Bestimmung der verschiedenen LOD benötigten Steigungen, sowie die Kalibrierfunktionen und Konfidenzintervalle ohne Parameterrestriktionen.

Parameter	4PL, Parameter A frei		r5PL, Parameter A frei	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	105,48787	7,33847	102,44996	4,95502
B	0,39315	0,11072	7,86825	17254,1617
C	0,00004	0,00003	0,00007	0,00013
D	13,91396	5,59837	0,2895	18,45925
E	-	-	0,01674	36,7189

Tabelle 49: Parameter der Kalibrierfunktionen ohne festgesetzte Parameter für die Berechnung der MDC und des RDL.

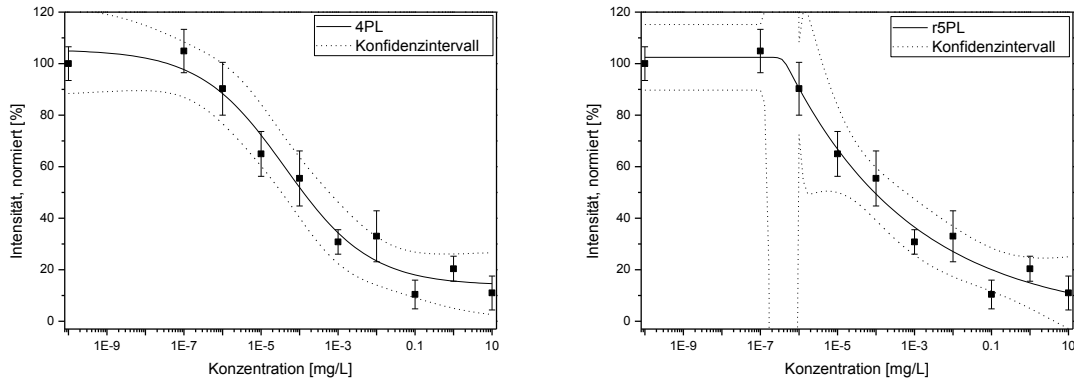


Abbildung 57: Kalibrierungen inklusive Vertrauensintervalle, zur Berechnung MDC und des RDL. Bei der r5PL kommt es durch den verwendeten Algorithmus in Origin im Bereich 1E-07 mg/L bis 1E-06 mg/L zu einem sehr großen Vertrauensintervall. Diese Schwankung beeinflusst aber nicht die Bestimmung der MDC. Das RDL wird nur unwesentlich beeinflusst.

Spot	4PL		r5PL	
	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]
Spot 1	-21,40719	5,87E-05	-27,01966	9,15E-07

Tabelle 50: Maximale Steigungen berechnet aus den ersten Ableitungen der Kalibrierfunktionen.

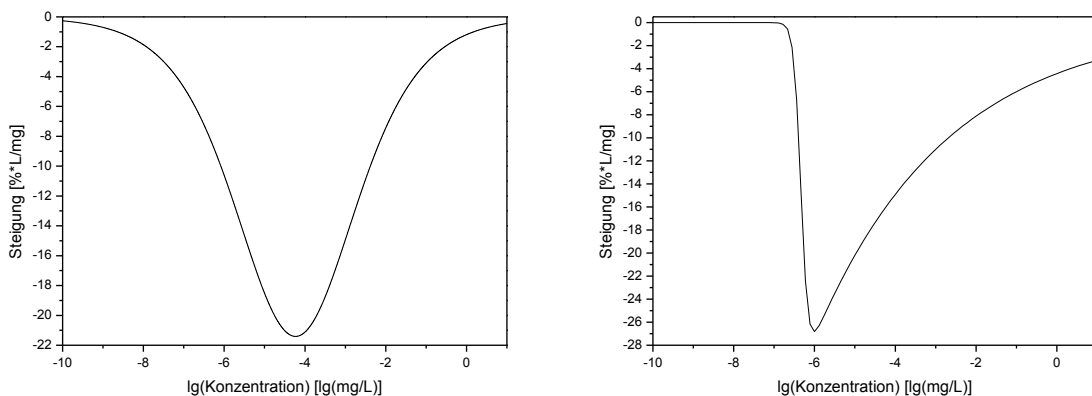


Abbildung 58: Steigungen zur Bestimmung einiger Kenngrößen, berechnet aus den ersten Ableitungen der Kalibrierfunktionen.

Insgesamt ergibt sich also ein sehr viel durchwachseneres Bild als bei der Kalibrierung auf einem Transducer. Es konnten Messungen auf mehreren Transducern durchgeführt und sowohl die 4PL als auch die r5PL angepasst werden. Auch der Verlauf der Messwerte ist klar sigmoidal. Allerdings blieb nach den Kriterien der Methodvalidierung nahezu kein Test auf Richtigkeit, Präzision oder Wiederfindung in den verschiedenen Konzentrationsbereichen innerhalb der geforderten Spezifikationen. Es ist bereits aus den Messdaten ersichtlich, dass sich die sdv der gemittelten Messwerte, die sich in der Konzentration um den Faktor 10 unterscheiden, überlappen. Trotzdem war es möglich, die verschiedenen Kenngrößen zu berechnen. Zum Teil liegen diese bei sehr niedrigen Konzentrationen. Dies kann nicht als sinnvoll angesehen und die Aussagekraft muss bezweifelt werden. Die Unterschiede der Kenngrößen mit ähnlicher Aussagekraft differieren bei der r5PL weit weniger als bei der 4PL, allerdings müssen gerade die Kenngrößen, die eine statistisch gestützte Validierung ermöglichen sollen, hinterfragt werden. Diese Kenngrößen sind im Vergleich zur Kalibrierung auf einem Transducer um den Faktor 100 bis 1000 zu größeren Konzentrationen verschoben, trotzdem ist hier nur eine Quantifizierung mit sehr großer Ungenauigkeit möglich. Somit muss zu einer Kenngröße immer eine Kalibrierung und die Messwerte mit den entsprechenden sdv mit betrachtet werden, sonst kann sich ein falsches Bild der Methodengenauigkeit und Leistungsfähigkeit ergeben.

4.3 Fluoreszenzmessungen mit CRP

CRP ist in der medizinischen Diagnostik ein Routineparameter, der unspezifisch Entzündungen anzeigt und kann in Blut, Serum und Plasma bestimmt werden. Es liegt nativ als Pentamer vor, mit fünf gleichen Untereinheiten und einer Masse von 115 kDa. Damit ist es mit Hilfe eines Sandwichassays detektierbar. CRP kann in sehr hohen Konzentrationen bei pathogenen Individuen vorkommen, somit ist hier auch der hohe CRP-Bereich im oberen mg/L-Bereich von Interesse. Im „high-sensitivity“ Bereich (unterer mg/L-Bereich) kann mit Hilfe von CRP auch auf erhöhte Risiken im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen und auch den Allgemeinzustand eines Individuums zurückgeschlossen werden [103; 104; 105]. Als Fänger-BRE wird hier ein spezielles Polypeptid verwendet, das aus einem Peptid-Grundgerüst und einem spezifischen Binder für CRP besteht.

Vorteile dieser „Scaffolds“ liegen in der hohen Stabilität und auch der einstellbaren Affinität gegenüber dem Analyten, siehe auch [48; 106; 107].

4.3.1 Methodvalidierung – Messungen auf einem Transducer

Für die Durchführung des Assays wurde das Sandwichassayformat gewählt. Prinzipiell ist es auch möglich, einen Bindungshemmtest durchzuführen, der Biosensor sollte aber auch auf die Anwendbarkeit eines Sandwichassayformats getestet werden. Die Kalibrierung wurde auf einem einzigen Transducer durchgeführt. Hierzu muss der Transducer zwischen den Messungen regeneriert und gereinigt werden. Bei der Durchführung eines Bindungshemmtests muss der Analyt oder ein Analytderivat immobilisiert werden. Das CRP als Analyt hat sich zwar als relativ stabil erwiesen, allerdings nicht stabil genug, um die nötige Anzahl an Regenerierungen für eine Dreifachkalibrierung und die darauf folgenden Messungen unbeschadet zu überstehen. Beim Sandwichassay wird hier das Fänger-BRE immobilisiert. Es handelt es sich um ein CRP-Scaffold, das im Vergleich zum CRP-Protein eine äußerst hohe Stabilität hinsichtlich Lagerfähigkeit und Anzahl der Regenerierungen aufzeigt. Die Transducer wurden nach der Vorschrift I(g)-III(g), IV(g+k)-VI(g+k) präpariert (Kapitel 3.5.1) und anschließend wurde nach der Vorschrift in Kapitel 3.1.3 das System regeneriert. Alle Schritte wurden in HEPES als Puffer durchgeführt. HEPES wurde verwendet, da die korrekte Funktionsweise der Scaffolds nur in der Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen gewährleistet und eine Calcium-Zugabe in PBS nicht ohne weitere Zusätze möglich ist. Die Ergebnisse der gemittelten Werte inklusive der sdv aus der 3-fach-Messung von Spot 1 sind in Tabelle 51 aufgeführt. Die Kalibrierung wurde in einem anderen Konzentrationsbereich als die Neopterinmessungen durchgeführt und beginnt erst bei $1\text{E-}05$ mg/L und geht bis 10 mg/L. Die Konzentration an eingesetztem Detektionsantikörper betrug $0,4$ $\mu\text{g/L}$ und somit zwanzigmal so viel wie für eine Neopterinmessung.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]
0	0	0,87
1,00E-05	1,97	0,32
1,00E-04	1,18	1,21
1,00E-03	4,97	0,54
1,00E-02	22,86	1,29
0,1	46,92	0,55
1	83,70	1,48
10	100	1,20

Tabelle 51: Gemittelte Messwerte der CRP-Kalibrierung. Die Werte wurden zwischen 0 und 100 % normiert; dies war für die Berechnung der Kenngrößen nötig.

Im Mittel betragen die sdv der Kalibrierung 0,93 % und die Streuung der sdv nur 0,18 %. Im Vergleich zum Neopterinassay bewegen sich die Abweichungen im selben Bereich und weisen auf eine gute Reproduzierbarkeit hin. Da auch dieser Verlauf sigmoidal, aber steigend verläuft, wurden die 4PL und die r5PL über eine Vorzeichenänderung angepasst, damit die Funktionen den steigenden Verlauf

abbilden können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 59 graphisch dargestellt und die Kalibrierdaten in Tabelle 52 zusammengefasst.

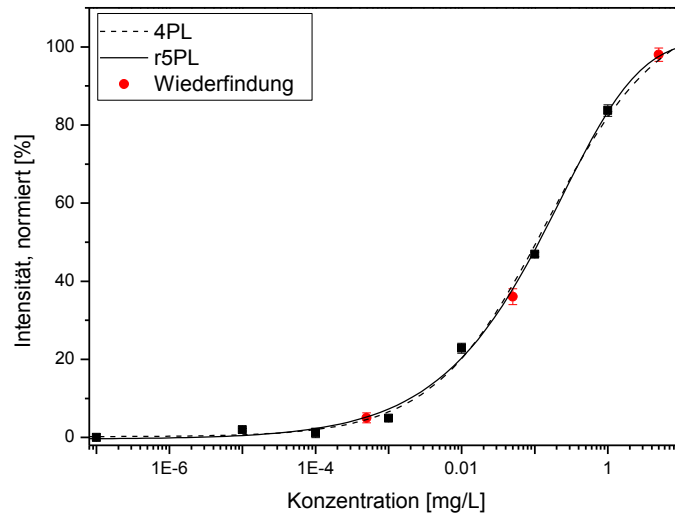


Abbildung 59: CRP 3-fach-Kalibrierung. Eingezeichnet sind die 4PL und die r5PL, sowie die Daten der Wiederfindungsmessungen.

Parameter	4PL		r5PL	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	110,15409	4,933	204,06061	11,25204
B	0,55908	0,05711	0,46593	0,10524
C	0,14759	0,0345	0,11914	0,02367
D	0,20042	1,42599	101,82003	5,87255
E	-	-	6,10283	24,52574

Tabelle 52: Parameter der Kalibrierung. Für die Kalibrierung wurde hier im Gegensatz zum Bindungshemmtest ein Vorzeichen in der Kalibrierfunktion vertauscht um den steigenden Verlauf abbilden zu können. Die Parameter haben dadurch die gleiche Bedeutung wie bei den Neopterinmessungen.

Die Parameter wurden bei dieser Kalibrierung nicht festgesetzt. Eine Festsetzung der oberen Grenze (Parameter A) war nicht nötig, da diese Kenngrößen hier nicht berechnet werden, und im unteren Konzentrationsbereich wurden bereits die Messwerte auf 0 % normiert. Zusätzlich verläuft die Kalibrierfunktion fast genau durch 0 und somit war bei der gegebenen sdv der Leerprobe nicht die Gefahr gegeben, dass keine Kenngrößen berechnet werden können, siehe auch Kapitel 4.2.2. In Abbildung 59 ist der nahezu gleiche Verlauf der beiden Kalibrierfunktionen zu erkennen. Somit sollten auch später bei der Kenngrößenberechnung ähnliche Werte erhalten werden. Dieses Ergebnis ist auch der Residuenanalyse in Abbildung 60 und Tabelle 53 zu entnehmen. Allerdings verhält es sich hier genau andersherum als beim Neopterinassay. Im niedrigen Konzentrationsbereich bis in den einstelligen µg-Bereich ist nach der Analyse die 4PL die bessere angepasste Funktion, darüber die r5PL. Medizinisch von Interesse ist bei CRP der Bereich von 1 mg/L bis 10 mg/L bzw. darüber, für

einige Langzeit- oder Vorhersagemessungen auch der Bereich deutlich unter 1 mg/L. Somit wird auch in diesem Fall die r5pL zur weiteren Validierung herangezogen.

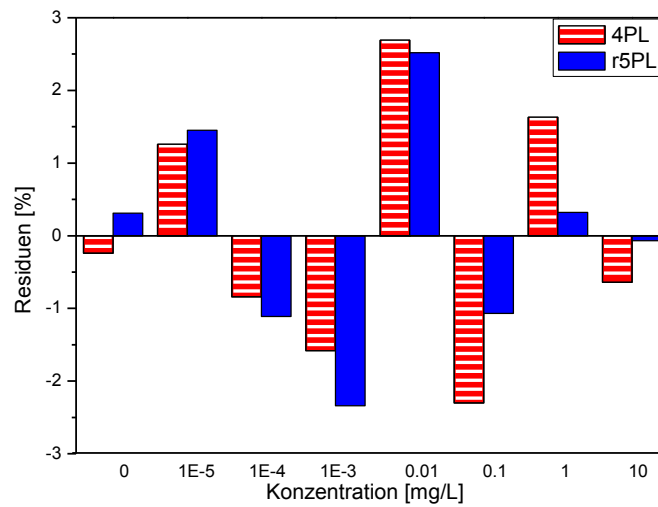


Abbildung 60: Residuenanalyse der Kalibrierfunktionen. Gut zu erkennen sind die Ähnlichkeit im unteren Konzentrationsbereich und die kleineren Abweichungen der r5PL im oberen Konzentrationsbereich.

Konzentration [mg/L]	Residuen [%]	
	4PL	r5PL
0	-0,24	0,31
1,00E-05	1,26	1,45
1,00E-04	-0,84	-1,11
1,00E-03	-1,58	-2,34
0,01	2,69	2,52
0,1	-2,3	-1,07
1	1,63	0,32
10	-0,64	-0,07

Tabelle 53: Residuen der zwei CRP-Kalibrierfunktionen. Die relativ ähnlichen Abweichungen der Kalibrierfunktionen von den gemessenen Werten sind auch hier zu erkennen.

Der Assay wurde gemäß den Regularien der FDA validiert. Zur Messung der Selektivität wurde HEPES als Puffer verwendet und jeder Messung 1 mg/L CRP hinzugefügt. Der Leerprobe wurde dann auch der CRP-AK hinzugefügt. Dieses Signal wurde auf 100 % festgesetzt und alle anderen Selektivitätsmessungen darauf bezogen. Die sdv betrug bei der Zugabe von CRP-AK 1,04 %. Wird nur HEPES hinzugegeben, wird eine Intensität von 1,13 % erreicht bei einer sdv von 0,92 %. Dieser Wert deckt sich mit dem Rauschen des Systems. Wird nun ein anderer AK hinzugefügt, der nur unspezifisch mit der Oberfläche wechselwirken kann, so steigt die Intensität auf 2,14 %. Dieses schwache Signal deutet allerdings auf nur geringe unspezifische Wechselwirkungen hin. Wird nun die Probenmatrix verändert und dem HEPES 10 % Blutplasma beigefügt, steigt die Bindung auf 116,32 %, dies deutet

auf sehr hohe unspezifische Wechselwirkungen durch das Plasma hin. Allerdings konnte vom Plasmalieferanten keine CRP-Freiheit des Plasmas gewährleistet werden, zudem existieren in der Routineanalytik keine Standardmethoden, um CRP auch in sehr geringen Konzentrationen nachzuweisen. Daher ist diese Messung nicht aussagekräftig und sollte mit Vorsicht interpretiert werden. Alle folgenden Messungen wurden daher in reinem HEPES durchgeführt. Die Ergebnisse der Selektivitätsmessungen und auch der weiteren Validierung sind in Tabelle 54 zusammengestellt.

CRP	Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
Selektivität	CRP-AK	100	1,04	-	-
	nur HEPES (Leerprobe)	1,13	0,92	-	-
	Neopterin-AK	2,14	1,29	-	-
	Plasma + CRP-AK	116,32	5,27	-	-
Richtigkeit	2,00E-04	3,52	1,07	2,24E-04	12,00
	0,02	25,29	1,82	0,017	14,80
	2	90,07	0,35	1,79	10,31
Präzision	2,00E-04	3,04	1,28	1,69E-04	15,67
	0,02	26,22	0,77	0,019	6,76
	2	90,78	0,24	1,93	3,56
Wiederfindung	5,00E-04	5,03	1,26	4,59E-04	8,29
	0,05	36,07	2,04	0,045	9,18
	5	98,00	1,7	5,44	8,86

Tabelle 54: Methodenvalidierungsparameter der CRP Kalibrierung bezogen auf die r5PL. Die Abweichungen sind alle innerhalb der FDA geforderten Grenzen.

Zur Messung der Richtigkeit und Präzision wurden die Konzentrationen 2E-04, 0,02 und 2 mg/L je fünffach bestimmt. Alle Richtigkeitsmessungen weichen weniger als 15 % vom vorgelegten Konzentrationswert ab. Bei der Messung der Präzision überschreitet der Wert bei 2E-4 mg/L die gegebene Grenze von 15 %. Allerdings ist diese Konzentration im Bereich des LOD bzw. der NG. Somit darf die Toleranz max. 20 % betragen. Dieser Wert wird hier unterschritten. Die anderen Präzisionsmessungen liegen innerhalb der geforderten Grenze. Für die Messung der Wiederfindung wurden höhere Konzentrationen gewählt, da diese mehr im erwarteten Bereich einer Realprobe liegen. Alle Werte konnten unter 10 % Abweichung von der realen Konzentration bestimmt werden. Somit sind hier alle Kriterien der Methodenvalidierung erfüllt. Für die Stabilität der eingesetzten Chemikalien und Proteinen gelten dieselben Betrachtungen wie in Kapitel 4.2.2. Die präparierten Transducer mit den Scaffolds weisen eine sehr hohe Lagerfähigkeit aus. Selbst nach mehreren Wochen trockener Lagerung bei 4 °C konnte keine Änderung des Transducers innerhalb der eben diskutierten Parameter festgestellt werden.

Die Kenngrößen in Tabelle 55 wurden ähnlich den Kenngrößen der Neopterinmessungen bestimmt. Allerdings wurde hier die berechnete Abweichung für die ISO bzw. IUPAC Größen zum niedrigsten Intensitätswert hinzuaddiert um dem steigenden Verlauf der Kalibrierung genüge zu tragen.

Parameter	Methode	4PL [mg/L]	r5PL [mg/L]
NG	Gleichung (2.50)	1,91E-04	9,11E-05
EG	Gleichung (2.51)	6,91E-04	4,17E-04
BG	Gleichung (2.52)	1,83E-03	1,30E-03
LOD	$L_D = 3,29 * s_B$ Schnellbetrachtung	2,27E-04	1,11E-04
LOD	$L_{D(2F)} = 5,84 * s_B$ t-Wert-abhängig	6,57E-04	3,92E-04
LOQ	Gleichung (2.55)	1,83E-03	1,30E-03
LOD	$L_{D(1\%RSD)} = 6,20 * s_B$	7,35E-04	4,48E-04
LOQ	$L_{Q(1\%RSD)} = 11,11 * s_B$	2,25E-03	1,66E-03
LOD	Gleichung (2.64) var. Steigung	7,55E-04	6,74E-04
LOD	Gleichung (2.65) 50 %Maximalsteigung	1,33E-03	1,48E-03
LOD	Gleichung (2.66) 25 %Maximalsteigung	6,31E-03	8,84E-03
MDC	Abbildung 15	4,14E-04	4,17E-04
RDL	Abbildung 15	1,38E-03	2,04E-03

Tabelle 55: Kenngrößen der CRP 3-fach-Kalibrierungen.

Wie bereits erwähnt weichen die Kenngrößen ohne Einbeziehung der Steigung oder des Konfidenzintervalls zwischen der 4PL und der r5PL nicht mehr als den Faktor 2,1, meist deutlich weniger, voneinander ab. Dies kann durch den sehr ähnlichen Verlauf der Funktionen erklärt werden. Diese Kenngrößen liegen bei der 4PL immer bei höherer Konzentrationen, als bei der r5PL, im Maximum 2,1-fach höher bei der NG, im Minimum 1,4-fach niedriger bei der BG bzw. dem klassisch bestimmten LOQ. Für die Berechnung der MDC und des MDC wurden die Daten aus Abbildung 61 verwendet.

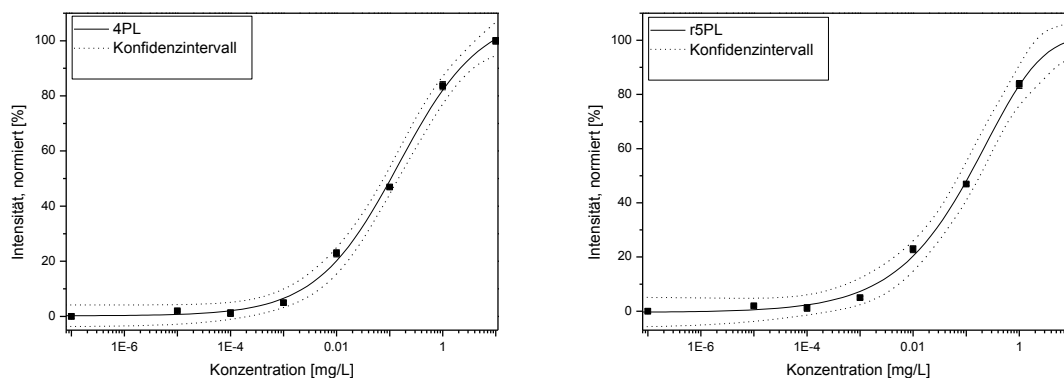


Abbildung 61: Kalibrierfunktionen inkl. ihrer Vertrauensintervalle zur RDL und MDC-Bestimmung.

Der MDC unterscheidet sich zwischen den zwei Kalibrierungen nur um 0,7 %, der RDL liegt bei der r5PL um 32 % höher. Vergleicht man dies nun mit den anderen Kenngrößen, so besteht hier zwischen

Kenngrößen ähnlicher Aussagekraft eher bei der 4PL eine Übereinstimmung. Die Abweichung der MDC von der NG beträgt 117 % und des RDL von der BG 33 %. Bei der r5PL sind die Abweichungen bei der MDC erheblich größer, die Abweichung beträgt das 4,5-fache und die Abweichung der RDL 84 %. Der Unterschied kann durch die schnelle Steigungsänderung der r5PL in diesem Bereich erklärt werden. Insgesamt zeigt sich hier also eine gute Übereinstimmung der beiden Kalibrierfunktionen und auch der Kenngrößen untereinander. Bisher nicht diskutiert wurde das LOD, berechnet aus den Steigungen der Funktionen, siehe Tabelle 56 und Abbildung 62.

Spot	4PL		r5PL	
	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]
Spot 1	35,38642	0,15	37,330435	0,23

Tabelle 56: Maximale Steigungen der jeweiligen Kalibrierfunktionen zur Ermittlung bestimmter Kenngrößen.

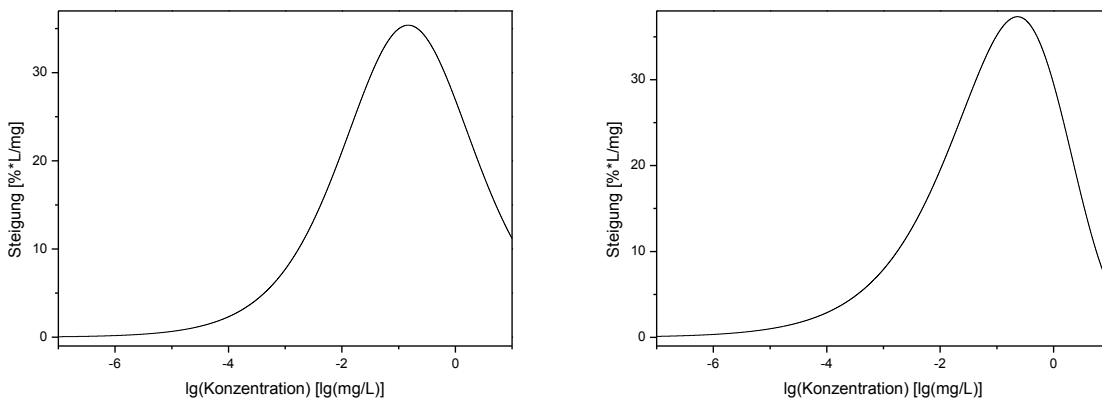


Abbildung 62: Steigungen der Kalibrierfunktionen, links ist die Steigung der 4PL und rechts die Steigung der r5PL abgebildet.

Diese Werte weichen hier erheblich von den anderen Kenngrößen ab. Bei der 4PL ist die Abweichung von der LOD Schnellschätzung Faktor 4,0 bei der Berechnung mit variabler Steigung aus der sdv des Leerwertes, Faktor 7,0 bei 50 % der Maximalsteigung und Faktor 33,0 bei 25 % der Maximalsteigung. Bei der r5PL sind die Abweichungen Faktor 7,4, Faktor 16,2 und Faktor 97,0. Somit ist hier nur eine sehr geringe Übereinstimmung der verschiedenen Kenngrößen gegeben. Berücksichtigt man allerdings die kleinen sdv der Kalibrierung, sowie die Möglichkeit der Präzisions-, Richtigkeits- und Wiederfindungsmessungen in einem Konzentrationsbereich bis Faktor 10 unter den mit der Steigung berechneten Kenngrößen, so ist hier wohl eher den Kenngrößen ohne Mitberücksichtigung der Steigung der Vorzug zu geben. Zusammenfassend konnte hier ein CRP-Assay erfolgreich auf dem Sensorsystem etabliert und validiert werden. Messungen in einem medizinisch relevanten Konzentrationsbereich sind möglich. Es muss auch hier berücksichtigt werden, dass die Kenngrößen bei Einsatz von 50 µL Probe mit zehn multipliziert werden müssen. Der Konzentrationsbereich verschiebt sich somit zu höheren Konzentrationen. Dies ist für den CRP-Assay vorteilhaft und ermöglicht auch eine genaue Bestimmung hoher CRP-Konzentrationen wie sie bei einer Sepsis

vorkommen können. Das Phänomen, dass bei hohen CRP-Konzentrationen zu niedrige Werte bestimmt werden, was bei einer Sepsis zu fatalen Fehldiagnosen führen kann, siehe auch Kapitel 2.2.3, wurde durch den Einsatz eines Sandwichassay ohne Vorinkubation bereits im Vorfeld vermieden.

4.4 Immobilisierungsstrategien auf Kunststoffoberflächen

4.4.1 Polyelektrolytmultischichten

Bisher wurde gezeigt, dass es möglich ist, mit dem entwickelten Biosensorsystem auf einem Glastransducer sowohl einen Bindungshemmtest, wie auch einen Sandwich-Assay auf einem Glastransducer, mit Einschränkungen auch auf mehreren Glastransducern zu messen. Wie bereits erwähnt, sind Glastransducer in den Fertigungstoleranzen nicht als „billiger“ Massenartikel verfügbar. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, besteht darin, auf andere Substrate, die ökonomischer produziert werden können, auszuweichen. Von besonderem Interesse in der optischen Sensorik, wie auch seit Jahren in medizinisch optischen Geräten verwendet, sind Kunststoffe auf Basis der Cycloolefinpolymere bzw. -copolymere. Sie sind kostengünstig zu produzieren und besitzen im Hinblick auf Massenfertigung mittels Spritzgussverfahren gute Eigenschaften. Daher sollte die Anwendbarkeit in diesem System mit dem Neopterinassay untersucht werden. Hierzu musste jedoch ein neues Verfahren zur Oberflächenbeschichtung entwickelt werden, da die bisher verwendete silanbasierte Chemie nicht 1:1 auf die unpolaren und inerten Kunststoffoberflächen in der erforderlichen Reproduzierbarkeit und Haltbarkeit bezüglich der Anzahl an Regenerationszyklen übertragen werden konnte. Somit wurde für die Präparation der Kunststofftransducer auf bereits entwickelte Protokolle des CARE-MAN Partners DCU zurückgegriffen. Hier zeigte sich immer noch das Problem der schlechten Regeneration der Oberflächen. Daher wurde eine Kombination aus Polyelektrolyten und der erfolgreich eingesetzten AMD-Oberfläche entwickelt. Hierfür wurden die bereits bestehenden Protokolle sowohl in den Konzentration wie auch den Reaktionsdauern modifiziert und einige Zwischenschritte eingeführt. Somit ist es möglich, mittels PEMs eine Beschichtung auf nahezu jedem Sensormaterial zu erhalten, wie z.B. Glas und Kunststoffen, aber auch Metallen und Metalloxiden. Durch die weitere Modifikation mit AMD wird eine deutlich höhere Abschirmung der Oberfläche, gerade gegen elektrostatische Wechselwirkungen erreicht und zudem kann an dem AMD nach den bereits etablierten Protokollen weiter modifiziert und immobilisiert werden. Das genaue Verfahren entspricht der Route I(g+k) bis VI(g+k) für Glastransducer und aufgrund der einfacheren Präparation, aber mit gleichem Endergebnis für Kunststofftransducer I(k) und II(g+k) bis VI(g+k). Um hier gleich die Ergebnisse der Haltbarkeit der Transducer für die Methodvalidierung vorwegzunehmen, sind die beschichteten Glas-, wie auch Kunststofftransducer nur unter ständiger Pufferlagerung stabil. Sollten die Transducer eintrocknen, sind sie nicht mehr zu verwenden. Dies kann mit der Rissbildung der PEMs bei Eintrocknen erklärt werden. Weiteres hierzu siehe auch Kapitel 2.2.2. Im folgenden Abschnitt wird die neue Oberflächenchemie zuerst auf Glastransducern und anschließend auf den Kunststoffsubstraten aus Zeonor validiert.

4.4.2 Polyelektrolytmultischichten und Aminodextran auf Glastransducern

Mit dem frisch gespotteten Transducer wurde Neopterin entsprechend Kapitel 4.2.2, mit den gleichen AK-Konzentrationen und Messprotokollen gemessen und der Transducer validiert. Es wurde wiederum ein Spot betrachtet und eine 3-fach Bestimmung für die Kalibrierung durchgeführt. Es ergeben sich ähnliche Messwerte mit sehr ähnlichen sdv. Die durchschnittliche sdv beträgt 1,20 %, die Streuung 0,17 %, siehe Tabelle 57. Damit liegt die sdv im Mittel gleich auf wie bei den Transducern beschichtet ohne PELs, die Streuung ist sogar weniger als halb so groß.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]
0	100	0,78
1,00E-07	99,74	0,59
1,00E-06	95,32	1,24
1,00E-05	72,45	0,59
1,00E-04	53,18	1,66
1,00E-03	41,20	1,80
1,00E-02	23,76	1,34
1,00E-01	10,79	0,91
1,00E+00	8,49	1,04
1,00E+01	8,10	1,27

Tabelle 57: Kalibrierdatensatz der 3-fach-Bestimmung von Neopterin auf Glastransducern und PEM-AMD-Oberflächenbeschichtung.

In Abbildung 63 sind die Signalstärke inklusive sdv dargestellt.

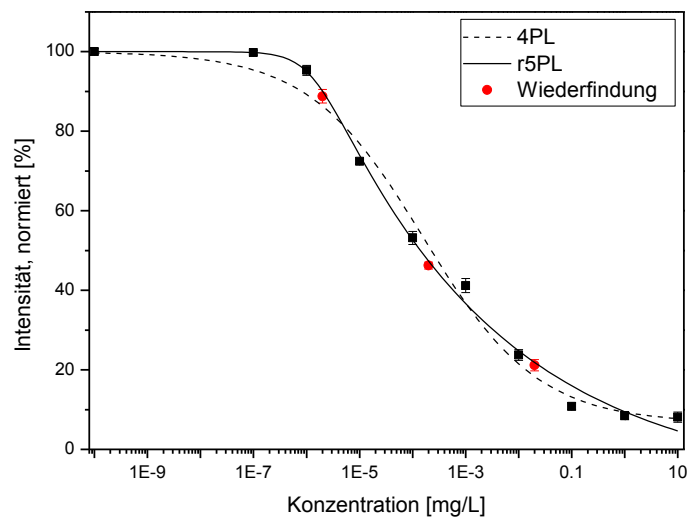


Abbildung 63: Kalibrierung der 3-fach-Bestimmung inklusive der zwei verwendeten Kalibrierfunktionen und den Daten der Vergleichspräzisionsmessungen.

Im Gegensatz zum vorher behandelten CRP-Assay unterscheidet sich der Verlauf der zwei Kalibrierfunktionen hier wieder deutlicher voneinander. Die r5PL zeigt erst bei höheren Konzentrationen einen abfallenden Verlauf, dann aber mit deutlich größerer Steigung. Im höheren Konzentrationsbereich ist im Gegensatz zur 4PL keine Sättigung im gemessenen Konzentrationsbereich erkennbar. Dieses Verhalten wurde bereits bei den anderen Neopterin-Kalibrierungen beobachtet. So kann hier rein qualitativ kein Einfluss der PEL-Schicht auf den Assay festgestellt werden. Die Kalibrierfunktionen wurden wieder mit festgelegten Parameter A bestimmt, siehe Tabelle 58.

Parameter	4PL		r5PL	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	100	0	100	0
B	0,40218	0,05018	1,47589	1,09989
C	0,00016	0,00006	0,00026	0,00022
D	6,67978	3,37796	-9,16359	9,51403
E	-	-	0,0882	0,08068

Tabelle 58: Daten der Kalibrierung normiert auf 100 %.

Sehr deutlich zeigt die Residuenanalyse in Abbildung 64 und Tabelle 59 die sehr gute Anpassung der r5PL im unteren Konzentrationsbereich. Erst ab ca. 0,1 mg/L folgt die 4PL den gemessenen Werten mit einer kleineren Abweichung.

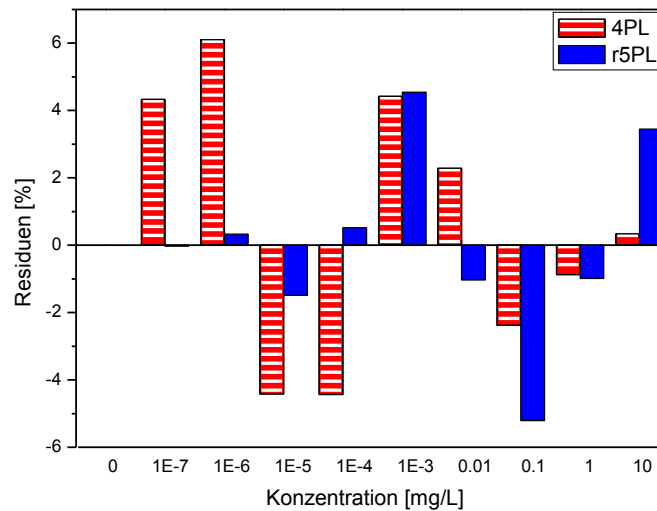


Abbildung 64: Residuenanalyse der Kalibrierfunktionen. Erst bei höheren Konzentrationen passt sich die 4PL besser an als die r5PL.

Konzentration [mg/L]	Residuen [%]	
	4PL	r5PL
0	0	0
1,00E-07	4,33	-0,03
1,00E-06	6,10	0,33
1,00E-05	-4,42	-1,49
1,00E-04	-4,43	0,52
1,00E-03	4,42	4,54
0,01	2,28	-1,03
0,1	-2,38	-5,21
1	-0,87	-0,99
10	0,34	3,45

Tabelle 59: Residuen der Kalibrierfunktionen. Im niedrigen Konzentrationsbereich sind die Abweichungen der r5PL deutlich kleiner als die der 4PL. Im höheren Konzentrationsbereich verhält es sich genau andersrum.

Daraufhin wurde wieder eine Validierung nach den bekannten Regeln durchgeführt. Hier war es wieder nötig, auf Selektivität zu prüfen, da ein Einfluss der PELs auf die Messung sonst nicht ausgeschlossen werden kann. Die in Tabelle 60 zusammengestellten Daten zeigen allerdings nahezu das gleich Selektivitätsverhalten wie auf einem ohne PEL beschichteten Transducer, evtl. kann von einer leicht erhöhten unspezifischen Bindung ausgegangen werden, siehe Messung mit CRP-AK, allerdings überlappen die sdv der Messungen mit und ohne PEL und sind daher nicht signifikant voneinander zu unterscheiden.

	Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
Selektivität	Neopterin-AK (Leerprobe)	100,00	1,94	-	-
	nur PBS	2,87	2,08	-	-
	CRP-AK	8,72	4,69	-	-
	Plasma + Neopterin-AK	103,20	2,18	-	-
	CRP + Neopterin-AK	98,86	1,62	-	-
Richtigkeit	5,00E-06	81,52	0,76	4,83E-06	3,40
	5,00E-04	40,66	1,77	5,25E-04	4,90
	0,05	17,94	1,62	0,056	12,62
Präzision	5,00E-06	81,36	0,95	4,91E-06	1,89
	5,00E-04	41,24	0,96	4,80E-04	3,97
	0,05	17,96	1,81	0,056	12,37
Wiederfindung	2,00E-06	88,79	1,69	2,30E-06	15,13
	2,00E-04	46,32	0,86	2,29E-04	14,73
	0,02	21,14	1,41	0,021	7,45

Tabelle 60: Validierungstabelle der 3-fach-Bestimmung von Neopterin auf Glastransducern und PEM-AMD-Oberflächenbeschichtung bezogen auf die r5PL.

Alle anderen Validierungsparameter liegen auch hier wieder im Rahmen der geforderten 20 % im unteren Konzentrationsbereich bzw. 15 % in allen anderen Konzentrationsbereichen. Die Validierung verlief somit erfolgreich und die Methode kann auf die entwickelte Art und Weise verwendet werden. Die ermittelten Kenngrößen sind in Tabelle 61 aufgelistet.

Parameter	Methode	4PL [mg/L]	r5PL [mg/L]
NG	Gleichung (2.50)	1,78E-08	5,33E-07
EG	Gleichung (2.51)	1,07E-07	9,39E-07
BG	Gleichung (2.52)	4,15E-07	1,53E-06
LOD	$L_D = 3,29 \cdot s_B$ Schnellbetrachtung	2,26E-08	5,72E-07
LOD	$L_{D(2F)} = 5,84 \cdot s_B$ t-Wert-abhängig	9,94E-08	9,17E-07
LOQ	Gleichung (2.55)	4,15E-07	1,53E-06
LOD	$L_{D(1\%RSD)} = 6,20 \cdot s_B$	1,16E-07	9,67E-07
LOQ	$L_{Q(1\%RSD)} = 11,11 \cdot s_B$	5,53E-07	1,71E-06
LOD	Gleichung (2.64) var. Steigung	3,07E-07	4,62E-07
LOD	Gleichung (2.65) 50 %Maximalsteigung	2,26E-07	4,63E-07
LOD	Gleichung (2.66) 25 %Maximalsteigung	1,97E-06	9,16E-07
MDC	Abbildung 15	3,01E-07	1,33E-06
RDL	Abbildung 15	1,37E-06	3,58E-06

Tabelle 61: Kenngrößen der 3-fach-Kalibrierung.

Mit der 4PL werden hier wieder Kenngrößen erhalten, die durchweg bei einer niedrigeren Konzentration liegen als jene, die mit der r5PL berechnet wurden. Bei der 4PL liegen die Größen NG und LOD nach Schnellschätzung recht nah beisammen. Die Abweichung des LOD nach Schnellschätzung von der NG beträgt 47,2 %, die Abweichung vom MDC zur NG beträgt aber bereits das 16,9-fache und ist somit nicht mehr vergleichbar in der Aussage. Die BG bzw. LOQ und RDL liegen nur um das 3,3-fache auseinander. Hier ist die Abweichung nicht mehr ganz so groß. Die Einbeziehung einer RSD-Änderung ändert an den Werten insgesamt sehr wenig, obwohl in diesem Fall 1 % RSD-Änderung sehr angesetzt ist. Der Unterschied von LOD nach Schnellschätzung und LOD, ermittelt aus der Anzahl der Freiheitsgrade, unterscheidet sich um den Faktor 4,4. Wird die Steigung mit einbezogen, ändert sich das LOD hin zu höheren Konzentrationen, je nach Methode um den Faktor 10 bis 87. Im Vergleich hierzu weichen die einzelnen Kenngrößen im Bezug auf die r5PL nicht so weit voneinander ab. Der Unterschied von NG und LOD nach Schnellschätzung beträgt nur 7,3 %, zum MDC sind es 150 %. Damit ist die Aussagekraft dieser Größen wieder sehr ähnlich, LOQ und das RDL weichen nur um den Faktor 2,3 ab. Auch eine Erhöhung der Sicherheit mit 1 % RSD bewirkt nahezu keine Änderung, und der Unterschied zwischen LOD nach Schnellschätzung und nach Verteilungsfunktion beträgt gerade 84,0 %. Die Miteinbeziehung der Steigung resultiert in einer Änderung des LOD zum Teil sogar zu niedrigeren Konzentrationen, die Abweichung beträgt aber maximal, je nach Methode, 23,8 % bis 60,1 %. Die r5PL führt hier also auch zu einer besseren Vergleichbarkeit der Kenngrößen. Werden nun diese Werte mit der Kalibrierung auf einem

Transducer mit der silanbasierten Chemie in Tabelle 37 und Tabelle 38 (Spot 1) verglichen, so sieht man, dass bei der 4PL der silanbasierten Chemie die Kenngrößen in einem niedrigeren Konzentrationsbereich angesiedelt sind, z.B. ist die BG um 87 % geringer. Jedoch sind die Größen alle recht ähnlich. Bei der r5PL sind die Kenngrößen, die auf Transducern mit der silanbasierten Oberflächenchemie gewonnen wurden, um das Zwei- bis Fünffache zu höheren Konzentrationen verschoben. Allerdings sind dies keine sehr großen Änderungen, so dass insgesamt von einem ähnlichen Verhalten ausgegangen werden kann. Jedoch bietet die PEL-basierte Oberflächenchemie die Möglichkeit, auf verschiedenen Materialien zum Einsatz zu kommen, siehe auch im folgenden Kapitel. Nachfolgend sind noch die verwendeten Kalibrierdaten (Tabelle 62 und Tabelle 63) und Diagramme (Abbildung 65 und Abbildung 66) dargestellt, die für die Bestimmung einiger der Kenngrößen notwendig sind.

	4PL, Parameter A frei		r5PL, Parameter A frei	
Parameter	Wert	sdv	Wert	sdv
A	103,87382	3,89654	100,06043	2,72456
B	0,37206	0,05627	1,45907	1,30263
C	0,00013	0,00005	0,00026	0,00025
D	5,88049	3,67148	-9,12639	10,45192
E	-	-	0,08932	0,09604

Tabelle 62: Kalibrierdaten ohne Parameterbeschränkung zur Bestimmung des RDL und der MDC.

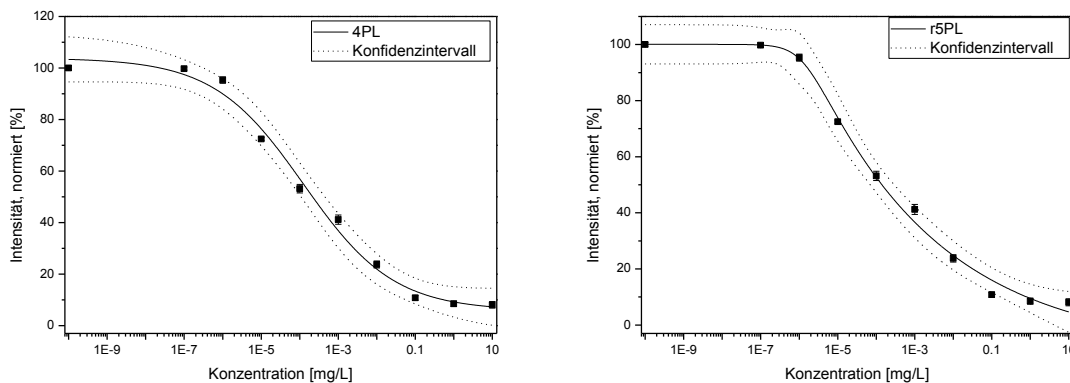


Abbildung 65: Konfidenzintervalle der Kalibrierfunktionen für die MDC und RDL-Bestimmung.

Spot	4PL		r5PL	
	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]
Spot 1	-21,6049335	1,58E-04	-24,0577199	6,6443E-06

Tabelle 63: Steigungsmaxima zur Kenngrößenbestimmung.

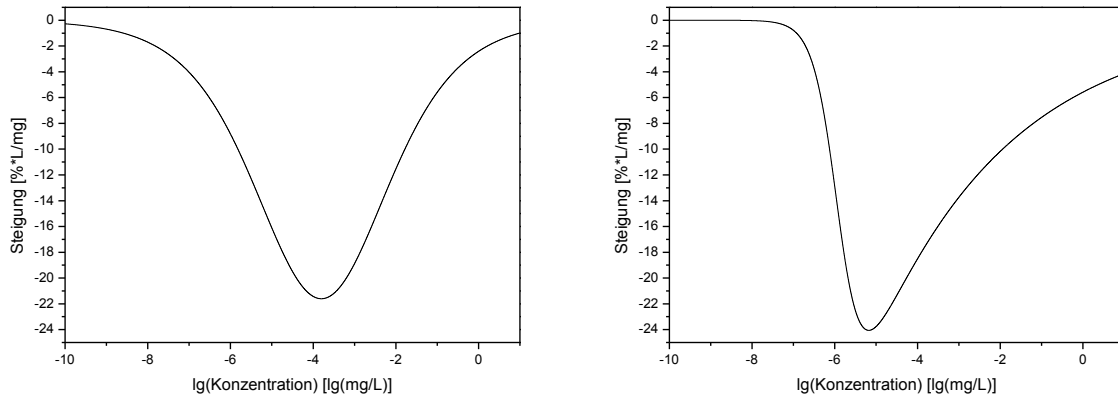


Abbildung 66: Steigungen der 4PL (links) und der r5PL (rechts) für die Bestimmung der Kenngrößen mit Steigungsabhängigkeit.

4.4.3 Polyelektrolytmultischichten und Aminodextran auf Kunststofftransducern

Die in Kapitel 3.5.1 vorgestellte und in Kapitel 4.4.2 auf Glastransducern erfolgreich validierte Oberflächenchemie wird nun auf Kunststofftransducer übertragen. Die Kunststofftransducer können theoretisch mit sehr geringen Fertigungstoleranzen mittels Spritzgussverfahren hergestellt werden. Für die kleine Charge, wie sie hier benötigt wurde, im Idealfall nur ein Transducer, wurde eine kleine Menge dieser Transducer von Hand und mechanisch bearbeitet und in Form gebracht. Somit sind bei diesen Transducern kleine Abweichungen untereinander zu erwarten, desweiteren wurde durch die mechanische Prozessierung der Einkopffläche eine erhöhte Rauigkeit der Transducer unter dem Mikroskop festgestellt. Dies führt zu sichtbaren Streuungen und inhomogener Ausleuchtung der einzelnen Spots. Daher war die Wahl der ROI in diesem Fall nicht immer eindeutig und wurde deshalb oft etwas größer gewählt, um möglichst alles Fluoreszenzlicht in die ROI mit zu integrieren. Eine Auswertung der weiteren Spots war durch hohe Streuverluste nahezu nicht mehr möglich. Im Folgenden wird wieder Spot 1 diskutiert. Die Kalibrierung und Auswertung erfolgte analog den Parametern der bereits durchgeführten Kalibrierungen. Die gemittelte sdv beträgt 2,00 % und ist somit doppelt so hoch wie auf den Glastransducern, die Streuung der sdv beträgt 0,33 % und liegt somit auch fast beim doppelten Wert wie auf den Glastransducern mit PEL-Beschichtung, siehe Tabelle 64.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]
0	100	2,37
1,00E-07	98,55	1,17
1,00E-06	101,16	1,92
1,00E-05	89,49	1,98
1,00E-04	55,27	1,60
1,00E-03	42,09	1,23
1,00E-02	21,26	2,51
1,00E-01	11,90	2,41
1,00E+00	11,22	1,85
1,00E+01	11,32	2,97

Tabelle 64: Gemittelte Messdaten der 3-fach-Kalibrierung von Neopterin auf Kunststofftransducern mit einer Polyelektrolyt-basierten Oberflächenbeschichtung.

Nach grafischer Auftragung wurde wieder die 4PL und die r5PL angepasst (Abbildung 67). Der unterschiedliche Verlauf der zwei Kalibrierungen entspricht dem erwarteten Verhalten wie es bei den Neopterin-Assays auf Glassubstrat beobachtet wurde.

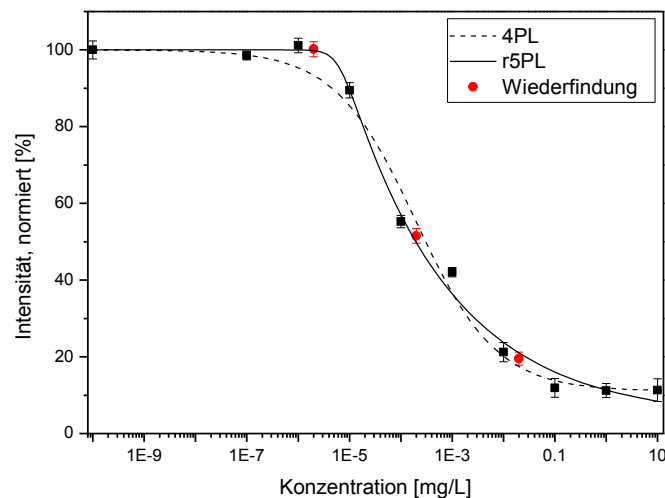


Abbildung 67: Kalibrierfunktionen der 3-fach-Messung. Der Verlauf der zwei Kalibrierfunktionen unterscheidet sich in großen Konzentrationsbereichen deutlich voneinander.

Die 4PL und r5PL unterscheiden sich wieder in ihrem Verlauf. Im Konzentrationsbereich 1E-7 mg/L bis 1E-5 mg/L besitzt die r5PL eine Steigung von annähernd Null, während die 4PL bereits größere fallende Steigungswerte annimmt. Bei der Berechnung der Kenngrößen wird hier wieder eine größere Abweichung erwartet. Die Parameter der Kalibrierung sind in Tabelle 65 gelistet.

Parameter	4PL		r5PL	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	100	0	100	0
B	0,55104	0,08255	3,05778	10,17643
C	0,00019	0,00006	0,00016	0,00006
D	11,06709	3,03582	3,93114	5,77086
E	-	-	0,06996	0,24966

Tabelle 65: Parameter der Kalibrierungen.

Die Residuenanalyse in Abbildung 68 zeigt ebenfalls ein ähnliches Bild wie aus den vorherigen Kalibrierungen. Im unteren Konzentrationsbereich bis ca. 1E-4 mg/L passt sich die r5PL besser den Messungen an, dann ist die 4PL besser den Messungen angenähert.

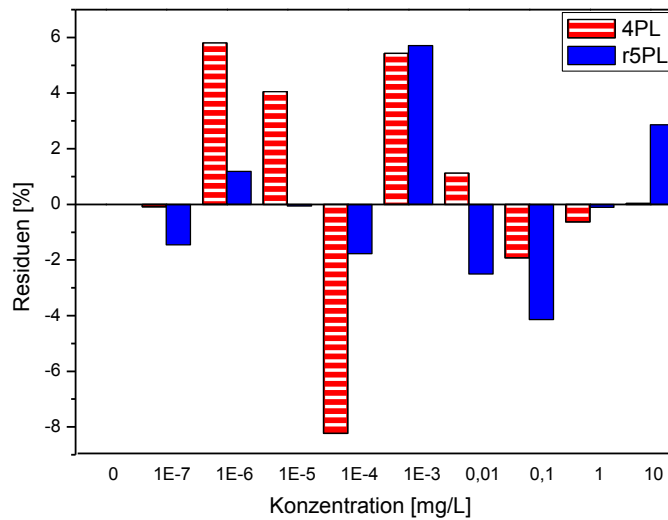


Abbildung 68: Graphische Darstellung der Residuen. Gut zu erkennen ist wieder die bessere Anpassung der r5PL im niedrigen Konzentrationsbereich. Ab 0,01 mg/L passt sich die 4PL besser den gemessenen Werten an.

Die r5PL wurde auch hier für den niedrigen Konzentrationsbereich für die weitere Evaluierung ausgewählt. Die berechneten Werte sind nochmals in Tabelle 66 zusammengestellt.

Konzentration [mg/L]	Residuen [%]	
	4PL	r5PL
0	0	0
1,00E-07	-0,09	-1,45
1,00E-06	5,80	1,19
1,00E-05	4,05	-0,06
1,00E-04	-8,23	-1,77
1,00E-03	5,43	5,71
0,01	1,12	-2,50
0,1	-1,92	-4,14
1	-0,63	-0,11
10	0,03	2,86

Tabelle 66: Residuen der Kalibrierfunktionen basierend auf der 4PL und r5PL. Die größte Abweichung ist bei der 4PL bei 1,00E-04 mg/L zu finden.

Bei Messungen auf Kunststofftransducern kann evtl. ein neues Material in Kontakt mit der Probe gelangen, sobald der Kunststoff durch die Oberflächenchemie nicht vollständig abgeschirmt wurde. Somit wurde auch hier eine Validierung hinsichtlich Selektivität durchgeführt. Alle Messungen blieben aber im erwarteten Bereich und unterscheiden sich nicht signifikant von den vorangegangenen Selektivitätsmessungen. Eine leicht erhöhte Bindung des CRP-AK ist festzustellen, deckt sich aber noch mit den Standardabweichungen der Selektivitätsmessungen auf anderen Transducern, siehe Tabelle 67.

	Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
Selektivität	Neopterin-AK (Leerprobe)	100,00	1,83	-	-
	nur PBS	3,02	1,57	-	-
	CRP-AK	9,51	3,25	-	-
	Plasma + Neopterin-AK	105,72	2,64	-	-
	CRP + Neopterin-AK	101,12	2,04	-	-
Richtigkeit	5,00E-06	96,09	1,07	5,84E-06	16,87
	5,00E-04	42,47	2,19	4,48E-04	10,44
	0,05	18,41	1,81	0,043	13,14
Präzision	5,00E-06	96,69	1,53	5,44E-06	8,76
	5,00E-04	40,50	2,44	5,72	14,43
	0,05	18,54	2,75	0,042	16,62
Wiederfindung	2,00E-06	100,21	1,96	-	-
	2,00E-04	51,52	1,91	1,67E-04	16,47
	0,02	19,52	1,68	0.0308	53,75

Tabelle 67: Zusammenfassung der Validierungen hinsichtlich Selektivität, Richtigkeit, Präzision und Wiederfindung.

Bei der Messung auf Richtigkeit sind alle drei Messungen innerhalb der angelegten Maßstäbe, bei der niedrigsten Konzentration von 5E-6 mg/L ist die Abweichung über 15 %, aber noch unter 20 % und damit zufriedenstellend. Allerdings sind die Abweichungen alle sehr nah am Grenzwert von 15 %. Bei der Präzision überschreitet die Messung von 0,05 mg/L den Grenzwert knapp um 1,62 %. In diesem Konzentrationsbereich wäre nach der Residuenanalyse auch die 4PL die bessere Kalibrierfunktion, die Präzision der Methode kann als nicht optimal eingestuft werden. Bei den Wiederfindungsmessungen zeigt sich, dass keine gemessene Konzentration weniger als 15 % abweicht. Die niedrigste gemessene Konzentration von 2E-6 mg/L liegt deutlich unter dem niedrigsten berechneten LOD, siehe auch Tabelle 68, und konnte daher nicht sinnvoll bestimmt werden. Die Messung bei 2E-4 mg/L überschreitet den Grenzwert um 1,47 % und liegt somit knapp außerhalb der Spezifikation von 15 %. Allerdings gibt es keine strenge Vorschrift in welchem Bereich sich die Wiederfindungsraten bewegen sollen, oft wird von 70 bis 120 % ausgegangen, damit wären sie innerhalb der Spezifikation. Wird aber derselbe Maßstab angelegt wie für die Bestimmung der Genauigkeit und Präzision, so liegt die Messung außerhalb. Bei 0,05 mg/L ist die Abweichung mit 53,75 % noch größer. Der Verlauf der r5PL in diesem Bereich und ein mögliches Ausweichen auf die 4PL wurden bereits diskutiert. Zusammenfassend ergibt sich eine nicht optimale Validierung der Methode besonders im höheren Konzentrationsbereich im Vergleich zu allen anderen Kalibrierungen auf einem Transducer. Dennoch kann im unteren Konzentrationsbereich mit der Methode genau und präzise Neopterin quantifiziert werden. Tabelle 68 fasst alle berechneten Kenngrößen zusammen.

Parameter	Methode	4PL [mg/L]	r5PL [mg/L]
NG	Gleichung (2.50)	2,26E-06	7,86E-06
EG	Gleichung (2.51)	9,36E-06	1,28E-05
BG	Gleichung (2.52)	3,03E-05	2,34E-05
LOD	$L_D = 3,29 * s_B$ Schnellbetrachtung	2,71E-06	8,29E-06
LOD	$L_{D(2F)} = 5,84 * s_B$ t-Wert-abhängig	8,83E-06	1,25E-05
LOQ	Gleichung (2.55)	3,03E-05	2,34E-05
LOD	$L_{D(1\%RSD)} = 6,20 * s_B$	1,00E-05	1,32E-05
LOQ	$L_{Q(1\%RSD)} = 11,11 * s_B$	3,95E-05	2,79E-05
LOD	Gleichung (2.64) var. Steigung	1,61E-05	5,48E-06
LOD	Gleichung (2.65) 50 %Maximalsteigung	1,62E-06	3,95E-06
LOD	Gleichung (2.66) 25 %Maximalsteigung	7,80E-06	5,49E-06
MDC	Abbildung 15	2,10E-06	6,88E-06
RDL	Abbildung 15	9,39E-06	2,30E-05

Tabelle 68: Kenngrößen bestimmt nach DIN/ISO, IUPAC und ähnlichen Verfahren.

Der Vergleich zwischen 4PL und r5PL zeigt, dass bei den Kenngrößen nach ISO und IUPAC ohne und mit Berücksichtigung der Steigung und der MDC und RDL die 4PL wieder niedrigere Kenngrößen liefert, um maximal das 3,48-fache, meist weniger. Für die MDC und RDL Berechnung wurden Tabelle 69 und Abbildung 69 herangezogen.

Parameter	4PL, Parameter A frei		r5PL, Parameter A frei	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	102,51569	3,53602	99,90844	2,18777
B	0,52253	0,09255	3,08546	11,43733
C	0,00017	0,00006	0,00016	0,00007
D	10,72131	3,26517	3,9276	6,33179
E	-	-	0,06932	0,27526

Tabelle 69: Parameter der Kalibrierungen ohne festgesetzte Obergrenze zur Bestimmung von RDL und MDC.

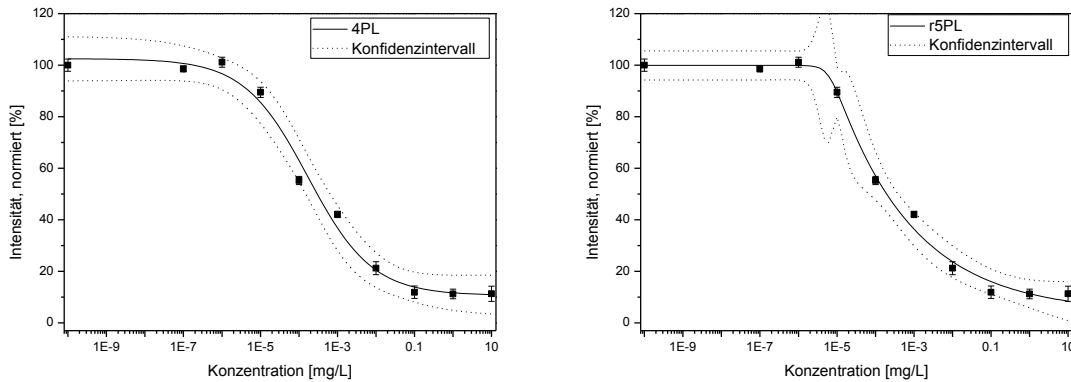


Abbildung 69: Hilfsdiagramme zur MDC/RDL Bestimmung. Gut zu erkennen ist der unregelmäßige Verlauf des Konfidenzintervalls der r5PL bei starker Steigungsänderung.

Einzigste Ausnahme ist das LOD bestimmt mittels 50 % der Maximalsteigung, hier ist das LOD bezogen auf die r5PL um 43,1 % niedriger als bei der 4PL, siehe auch Tabelle 70 und Abbildung 70.

Spot	4PL		r5PL	
	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{\text{mg}} \right]$	Konzentration [mg/L]
Spot 1	-28,21002	1,93E-04	-36,54548	1,49E-05

Tabelle 70: Maximale Steigungen der 4PL (links) und der r5PL (rechts) zur Kenngrößenbestimmung.

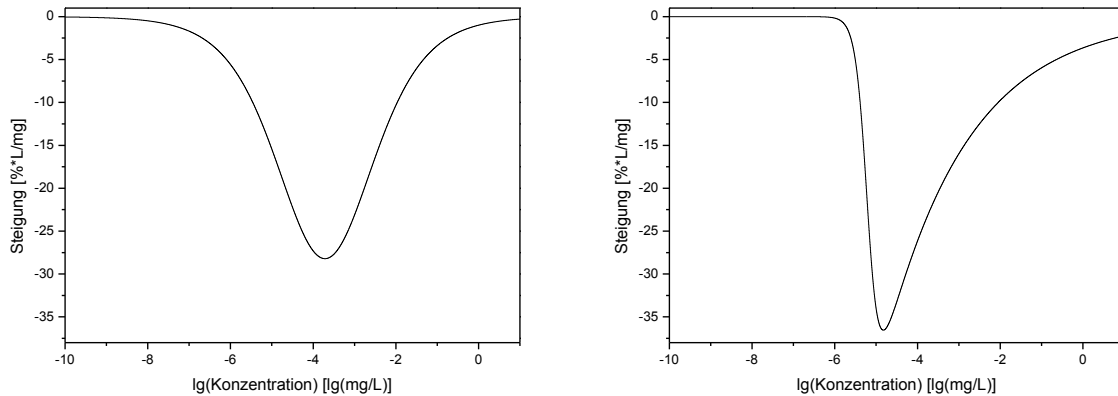


Abbildung 70: Steigungen der Kalibrierfunktionen. Links ist die 1. Ableitung der 4PL, rechts die 1. Ableitung der r5PL abgebildet.

Somit sind die Kenngrößen der zwei Kalibrierfunktionen untereinander doch ähnlicher als bei den vorherigen Kalibrierungen. Dies ist aus dem rein optischen Vergleich der Kalibrierfunktionen nicht sofort ersichtlich. Die Kenngrößen sind hier auch untereinander gut vergleichbar. Die 4PL und r5PL verhalten sich hier ähnlich, deshalb wird nur die r5PL diskutiert. LOD (Schnellbetrachtung) und MDC unterscheiden sich im Bezug auf die NG nur um 4,3 % bzw. 12,5 %. BG und RDL sind mit 1,7 % Abweichung praktisch identisch und eine Erhöhung der Sicherheit mittels RSD-Varianz ändert den LOD und LOQ nahezu nicht. Die Methode der Kenngrößenbestimmung liefert hier in allen Fällen ein ähnliches Ergebnis. Die exakte Methode ist hier somit nicht von essentieller Bedeutung. Auch bei der verwendeten Verdünnung von Faktor 10 ist eine Quantifizierung von Neopterin im medizinisch relevanten Bereich möglich sowohl bei den PEL-AMD beschichteten Kunststoff-, als auch bei Glastransducern.

4.5 Chemilumineszenzmessungen Neopterin

Das Biosensorsystem kann theoretisch auch für Chemilumineszenzmessungen verwendet werden, obwohl es nicht speziell dafür konzeptioniert wurde. Der einzige Unterschied in der Hardware des Sensors ist der Verzicht auf den Laser als Anregungsquelle. Zudem muss der Lasersperrfilter ausgebaut werden, um die Chemilumineszenz von Luminol zur CCD Kamera nicht zu eliminieren. Alle weiteren Modifikationen fanden im Assayablauf statt. Der Assayablauf entspricht zunächst dem Standardneopterinassayablauf in Kapitel 3.1.3 ohne Laseranregung. Einziger Unterschied ist die drei-minütige Vorinkubation des Streptavidin-HRP-Labels mit dem biotinylierten Neopterin-AK (45 ng/Messung). Nachdem die Probe über den Transducer geleitet wurde, werden 500 μ L der frisch zubereiteten Luminol/Wasserstoffperoxid/Enhancer-Lösung auf den Transducer gepumpt und die Lumineszenz des Luminols mit einer Integrationszeit von 4 s aufgenommen. Bei den Transducern handelt es sich um Objektträger, die analog den TIRF-Transducern nach der Vorschrift I(g)-III(g), IV(g+k)-VI(g+k), siehe Kapitel 3.5.1 beschichtet wurden. Die Auswertung fand dann analog zu den Messungen mit Fluoreszenz statt.

4.5.1 Methodenvalidierung – Messungen auf einem Transducer

Für die Validierung wurde wiederum Spot 1 herangezogen, wobei hier bei Betrachtung der weiteren Spots keine großen Unterschiede untereinander bestehen, da die unterschiedliche Anregung aufgrund frustrierter Totalreflexion wegfällt. Tabelle 71 fasst die Daten der 3-fach-Kalibrierung zusammen.

Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]
0	100,00	0,84
1,00E-06	100,07	1,26
1,00E-05	100,21	1,67
1,00E-04	87,31	1,07
1,00E-03	56,45	0,59
1,00E-02	40,58	1,78
1,00E-01	21,00	1,42
1,00E+00	12,58	1,45
1,00E+01	11,79	0,84

Tabelle 71: Zusammenfassung der CL-3-fach-Kalibrierung des Neopterin-Assays basierend auf dem Bindungshemmtest.

Die gemittelte sdv liegt bei 1,21 % und somit ist nahezu kein Unterschied zu der Messung mit derselben Oberflächenchemie auf den TIRF-Transducern gegeben. Die Abweichung beträgt nur 4,7 %. Die Varianz der sdv ist mit 0,16 % die kleinste bei allen gemessenen Assays. Dies kann u.a. mit der Auswahl der ROI begründet werden. Die ROI bei den CL-Messungen konnten im Gegensatz zu den Fluoreszenzmessungen deutlich größer als der tatsächliche Spot gewählt werden, da nicht die Gefahr bestand zu viel Anregungslicht mit einzubeziehen. Somit konnte insgesamt mehr und reproduzierbarer Licht der CL-Reaktion gesammelt werden. Als Kalibrierfunktionen wurden die 4PL und die r5PL gewählt, siehe Abbildung 71.

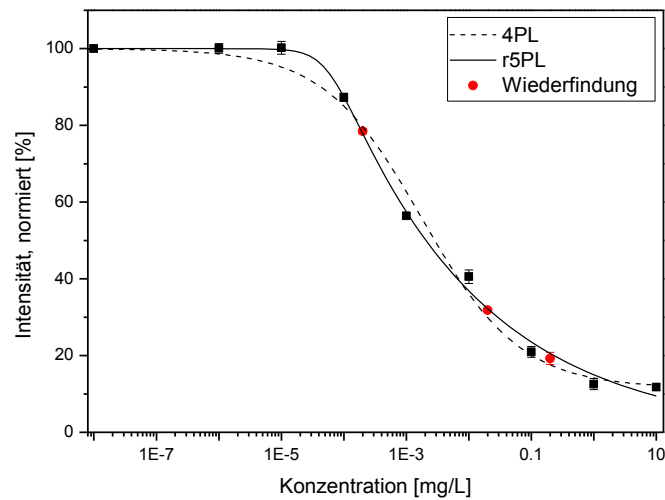


Abbildung 71: Kalibrierfunktionen der CL-Messung. Die Messwerte und die Kalibrierfunktionen haben einen ähnlichen Verlauf, wie bei den fluoreszenzbasierten Messungen.

Der Verlauf entspricht dem schon bereits zuvor bei den Fluoreszenzbasierten beobachtetem Schema. Allerdings beginnt die r5PL hier bei höheren Konzentrationen zu fallen, d.h. die niedrigste messbare Konzentration wird bei höheren Konzentrationen als bei den Fluoreszenzmessungen erwartet. Mögliche Optimierung bietet die Änderung des Biotinylierungsgrades des AK. Eine Senkung der AK-Konzentration oder eine Optimierung des Konzentrationsverhältnisses des Streptavidin-HRP-Labels und des AK brachten keine Verbesserungen. Man muss allerdings beachten, dass die CCD-Kamera für den Emissionsbereich von Luminol nicht optimal gewählt ist, sondern für die Fluoreszenzemission im roten Bereich. Hier bestehen somit auf der Hardware-Seite Optimierungsmöglichkeiten. Die Parameter der Kalibrierung sind in Tabelle 72 gelistet.

Parameter	4PL		r5PL	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	100	0	100	0
B	0,55342	0,07574	2,11843	3,17738
C	0,00177	0,00053	0,00212	0,00101
D	11,58551	3,25688	-0,54842	7,61100
E	-	-	0,09001	0,15525

Tabelle 72: Kalibrierfunktionen für den CL-Assay. Wie auch beim fluoreszenzbasierten Neopterinassay wurden hier die 4PL und r5PL als mögliche Kalibrierfunktionen in Betracht gezogen.

Die Residuenanalyse in Abbildung 72 zeigt die sehr gute Anpassung der r5PL mit Abweichungen bis 1 % bis in den Bereich ab ca. 1 µg/L, dann steigen die Abweichungen an.

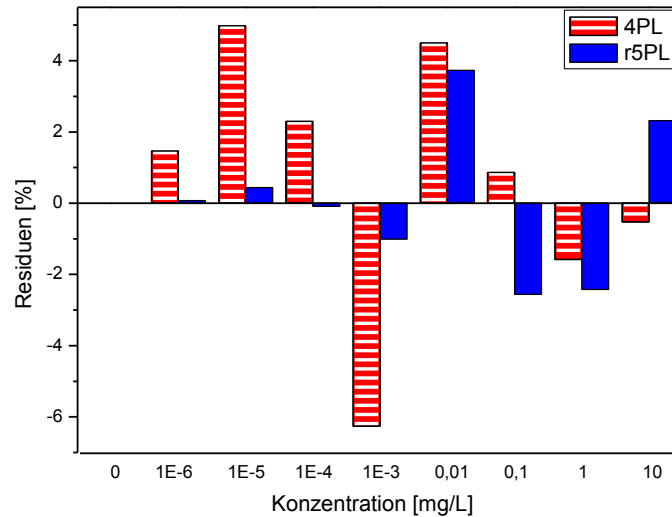


Abbildung 72: Graphische Darstellung der Residuen. Deutlich sind die relativ hohen Abweichungen der 4PL bis 0,001 mg/L zu erkennen.

Ab 0,1 mg/L verläuft die 4PL näher an den gemessenen Werten, siehe auch Tabelle 73. Die r5PL ist somit auch hier die im relevanten Konzentrationsbereich vorzuziehende Kalibrierfunktion. Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lumineszenzreaktion selber und die nötigen Schritte und Chemikalien keinen großen Einfluss auf das Verhalten der Affinitätsreaktion haben. Einzig der Konzentrationsbereich ist anders, dies liegt aber an den genannten Gründen und kann nicht direkt den Änderungen zugeschrieben werden.

Konzentration [mg/L]	Residuen [%]	
	4PL	r5PL
0	0	0
1,00E-06	1,46	0,07
1,00E-05	4,98	0,44
1,00E-04	2,30	-0,09
1,00E-03	-6,26	-1,01
0,01	4,50	3,73
0,1	0,86	-2,56
1	-1,58	-2,42
10	-0,53	2,32

Tabelle 73: Residuenanalyse der Kalibrierfunktionen. Die r5PL weist im unteren Konzentrationsbereich deutlich kleiner Abweichungen auf, als die 4PL. Im höheren Konzentrationsbereich ist es genau umgekehrt.

Zur Bestimmung der Selektivität wurde zunächst eine Leerprobe durchgeführt, ohne Analyt aber mit dem HRP konjugierten AK. Zudem wurde nach der Messung die zur Lumineszenz nötige Luminol/Wasserstoffperoxid/Enhancer-Lösung über den Transducer geleitet. Wird kein AK, sondern nur Puffer verwendet, so ergibt sich ein Signal von 2,86 %. Wird ein mit HRP konjugierter CRP-AK

verwendet, so ergibt sich wieder ein Signal von nahezu 10 %. Dies deutet auch hier auf eine Interaktion des CRP-AK mit der Oberfläche hin. Eine Zugabe von Plasma erhöht das Signal leicht und das CRP Protein beeinflusst den Assay nicht. Diese Daten und die weiteren Ergebnisse der Validierung finden sich in Tabelle 74.

	Konzentration [mg/L]	Intensität [%]	sdv [%]	ber. Konzentration [mg/L]	Abweichung [%]
	Neopterin-AK (Leerprobe)	100	1,06	-	-
	nur PBS	2,86	1,40	-	-
	CRP-AK	9,62	1,55	-	-
	Plasma + Neopterin-AK	103,54	1,10	-	-
	CRP + Neopterin-AK	100,21	1,09	-	-
Richtigkeit	5,00E-04	66,25	0,16	4,75E-04	4,94
	0,05	27,47	0,52	0,046	9,00
	0,5	16,38	1,25	0,639	27,80
Präzision	5,00E-04	65,32	1,43	5,12E-04	2,33
	0,05	26,62	1,38	0,053	6,84
	0,5	16,57	1,81	0,603	20,63
Wiederfindung	2,00E-04	78,49	0,70	1,91E-04	4,49
	0,02	31,81	0,54	0,022	6,90
	0,2	19,25	1,58	0,170	40,34

Tabelle 74: Die Methodvalidierungsparameter in der Tabelle wurden nach den Richtlinien der FDA zusammengestellt und bewertet.

Richtigkeit, Präzision und Wiederfindung wurden, da die Kalibrierung in einem anderen Konzentrationsbereich verläuft, angepasst. Die niedrigste Konzentrationsmessung wurde jeweils gestrichen, die anderen beiden bei 5E-4 bzw. 2E-4 mg/L und 0,05 bzw. 0,02 mg/L durchgeführt. Zusätzlich wurde noch eine höhere Konzentration von 0,2 mg/L gewählt, um den erforderlichen Richtlinien der Methodvalidierung zu genügen. Die Spezifikationen der unteren zwei Konzentrationen sind sowohl bei Richtigkeits- und Präzisions-, als auch bei den Wiederfindungsmessungen erfüllt. Bei 0,2 mg/L ist hingegen keine der Messungen unter den geforderten 15 %. Die Abweichungen betragen 21 % bis 40 %. Somit ist auch hier im höheren Konzentrationsbereich eine Quantifizierung basierend auf der r5PL nicht sinnvoll. Alle Kenngrößen, die den unteren Konzentrationsbereich beschreiben, sind in Tabelle 75 vereinigt.

Parameter	Methode	4PL [mg/L]	r5PL [mg/L]
NG	Gleichung (2.50)	3,01E-06	3,29E-05
EG	Gleichung (2.51)	1,11E-05	4,95E-05
BG	Gleichung (2.52)	3,01E-05	7,06E-05
LOD	$L_D = 3,29 * s_B$ Schnellbetrachtung	3,58E-06	3,47E-05
LOD	$L_{D(2F)} = 5,84 * s_B$ t-Wert-abhängig	1,06E-05	4,86E-05
LOQ	Gleichung (2.55)	3,01E-05	7,06E-05
LOD	$L_{D(1\%RSD)} = 6,20 * s_B$	1,18E-05	5,05E-05
LOQ	$L_{Q(1\%RSD)} = 11,11 * s_B$	3,72E-05	7,67E-05
LOD	Gleichung (2.64) var. Steigung	1,27E-05	2,45E-05
LOD	Gleichung (2.65) 50 %Maximalsteigung	1,52E-05	2,79E-05
LOD	Gleichung (2.66) 25 %Maximalsteigung	7,31E-05	4,46E-05
MDC	Abbildung 15	1,51E-05	4,69E-05
RDL	Abbildung 15	6,15E-05	1,00E-04

Tabelle 75: Für den CL-basierten Assay wurden dieselben Kenngrößen bestimmt, wie für die fluoreszenzbasierten Assays.

Der Unterschied zwischen den Werten berechnet aus der 4PL und der r5PL ist hier zum Teil wieder sehr groß, wobei die 4PL meist die niedrigere Konzentration aufzeigt. Die NG unterscheidet sich um den Faktor 9,1, die BG/LOQ um 2,3 und der MDC um 3,1. Die Vergleichbarkeit von NG und LOD nach Schnellbetrachtung mit einer Abweichung von 18,9 % und vom MDC mit 501,7 % ist eher schwierig. Bei Erhöhung der Sicherheit durch 1 % RSD-Schwankung oder LOD Berechnung nach Verteilungsfunktion ändert sich das LOD um ca. den Faktor 3. Bei der r5PL sind alle Abweichungen ähnlicher Kenngrößen wieder erheblich kleiner. Die Abweichung der NG vom LOD nach Schnellbetrachtung beträgt 5,5 % und vom MDC 42,6 %. RDL und LOQ weichen um 41,6 % ab. Die Erhöhung der Sicherheit führt hier nur zu einer Änderung von maximal 40,1 %. Hier ist also wieder eine gute Vergleichbarkeit gegeben. Tabelle 76 und Abbildung 73 wurden für die Berechnung der MDC und des RDL erstellt.

Parameter	4PL, Parameter A frei		r5PL, Parameter A frei	
	Wert	sdv	Wert	sdv
A	102,79405	3,04384	100,18436	1,78721
B	0,51689	0,08267	2,00349	3,14507
C	0,00157	0,00052	0,00209	0,00113
D	10,9373	3,51015	-0,39534	8,5347
E	-	-	0,09581	0,17501

Tabelle 76: Kalibrierfunktionen ohne Parameterbeschränkung zur RDL und MDC Bestimmung.

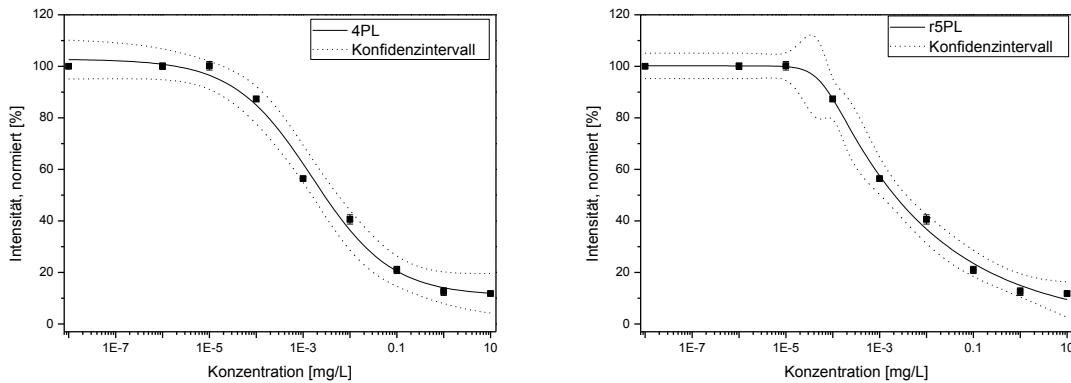


Abbildung 73: Kalibrierfunktionen und Vertrauensintervalle der 4PL und r5PL ohne Parameterbeschränkung.

Wird die Steigung berücksichtigt, ergeben sich bei der r5PL nur Änderungen um ca. 50 %, bei der 4PL sind Änderungen bis Faktor 24,3 möglich. Die Maximalsteigung je nach Kalibrierfunktion ist in Tabelle 77 zu finden, die Steigungsdiagramme sind in Abbildung 74 aufgetragen.

Spot	4PL		r5PL	
	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{mg} \right]$	Konzentration [mg/L]	max. Steigung $\left[\frac{\% \cdot L}{mg} \right]$	Konzentration [mg/L]
Spot 1	-28,16845	1,77E-03	-32,35846	1,74E-04

Tabelle 77: Zusammenstellung der maximalen Steigung der 4PL und r5PL zur Kenngrößenbestimmung. Die r5PL besitzt eine größere Maximalsteigung.

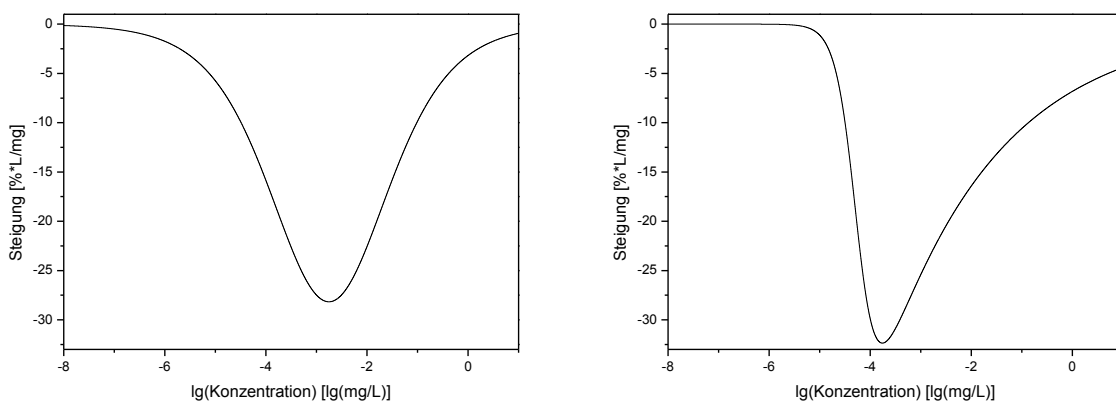


Abbildung 74: Die differenzierte Kalibrierfunktionen der 4PL (links) und r5PL (rechts).

Wird nun der Vergleich zwischen der r5PL bei den CL-Messungen mit den Fluoreszenzmessungen auf einem Glastransducer gezogen (Tabelle 38), so findet man niedrigere Kenngrößen bei der fluoreszenzbasierten Messung. Die NG ist um den Faktor 5,3 niedriger, die BG um das 7,9-fache.

Allerdings wird auch mit der CL-Messung die medizinisch erforderliche BG/LOQ bzw. das RDL erreicht, was eine statistisch verwertbare Quantifizierung erlaubt.

4.6 Zusammenfassung der Neopterinmessungen

Der Neopterinassay wurde in Kapitel 4.2 auf Glastransducern mittels der Oberflächenmodifikation I(g)-III(g), IV(g+k)-VI(g+k) aus Kapitel 3.5.1 etabliert und charakterisiert. In Kapitel 4.4 wurde mittels Oberflächenmodifikation durch PEMs, I(g+k) bzw. I(k) bis VI(g+k), der Assay auf Glas- sowie auf Kunststofftransducern gemessen. Alle Assays basierten auf Fluoreszenzdetektion. In Kapitel 4.5 wurde der Assay auf Glastransducern, präpariert analog I(g)-III(g), IV(g+k)-VI(g+k), charakterisiert. Die Detektion beruhte hierbei allerdings auf CL. Zusammenfassend lässt sich hierbei feststellen, dass es sowohl auf Glas- wie auch Kunststofftransducern möglich ist zu messen. Messungen auf einem einzigen Transducer, mit Regeneration zwischen den einzelnen Messungen, sind bei allen Methoden innerhalb der gesetzten Grenzen der Methodvalidierung im medizinisch relevanten Konzentrationsbereich möglich. Die Messung auf verschiedenen Transducern zeigt eine noch zu hohe Abweichung um innerhalb der gesetzten Grenzen quantifizieren zu können. Die fluoreszenzbasierten Methoden zeigen einen Trend zu besseren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen als die CL-Messungen. Hier gilt allerdings, dass FABIAN ursprünglich auch für Fluoreszenzmessungen mit roter Emission konstruiert wurde und somit nicht für CL-Messungen optimiert ist. Tabelle 78 gibt eine Übersicht über die erreichten NG und BG mit den verschiedenen Methoden immer bezogen auf die r5PL, da diese immer die bessere Anpassung im spezifizierten Konzentrationsbereich zeigte.

Methode	Kapitel	NG [mg/L]	BG [mg/L]
Silanchemie, ein Glastransducer	4.2.2	1,73E-06	5,55E-06
Silanchemie, mehrere Glastransducer	4.2.3	2,47E-06	1,54E-03
PEMs, Glastransducer	4.4.2	5,33E-07	1,53E-06
PEMs, Kunststofftransducer	4.4.3	7,86E-06	2,34E-05
Silanchemie, CL-Messung	4.5.1	3,29E-05	7,06E-05

Tabelle 78: Zusammenfassung der verschiedenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, jeweils des ersten Spots bei den verschiedenen Dreifachbestimmungen.

Auf Glastransducern mit PEMs beschichtet erreicht man die besten NG und BG im Vergleich zu den anderen Methoden. Lässt man die Kalibrierung auf mehreren Transducern außen vor, so ist die Messung basierend auf CL Detektion die mit den höchsten („schlechtesten“) Kenngrößen, aber immer noch innerhalb der spezifizieren Grenzen. Alle anderen Methoden liegen dazwischen. Da alle Methoden einen ähnlichen Aufwand in Präparation und Messung aufweisen, bis auf die CL-Messung die etwas mehr Zeit benötigt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur die Kalibrierung auf mehreren Transducern als ungeeignet klassifiziert werden. Alle anderen Methoden sind geeignet.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit zeigt die Entwicklung einer analytischen Methode zur quantitativen Bestimmung von medizinisch relevanten Parametern. Als Grundlage wurde in einem von der EU geförderten Projekt (CARE-MAN) ein optischer Biosensor für die Lumineszenzdetektion, sowohl für Fluoreszenz- als auch CL-Detektion, neu entwickelt. Die Hardware des Biosensors wurde parallel zur Assayentwicklung in einem Prozess modifiziert, bis es möglich war, die zwei wichtigen Entzündungsparameter CRP als Sandwichassay und Neopterin als Bindunshemmtest voll quantitativ im medizinisch erforderlichen Konzentrationsbereich auf verschiedenen Substraten und mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen zu bestimmen. Als Bewertungsgrundlage wurde anhand der Eurachem und FDA-Richtlinien eine Methodenvalidierung durchgeführt und die Parameter Selektivität, Genauigkeit und Präzision sowie die Wiederfindung und Stabilität bestimmt. Es wurden verschiedene Kalibrierungsstrategien angewendet und die daraus berechneten Kenngrößen diskutiert und bewertet. Dabei zeigte sich, dass es verschiedene anwendbare Kalibrierfunktionen für die sigmoidal verlaufenden Messsignale dieser Assays gibt und dass die häufig angewendete 4PL nicht immer die geeignetste Funktion ist, sondern im relevanten Konzentrationsbereich die r5PL. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Vergleichbarkeit der verschiedenen Kenngrößen mit ähnlicher Aussagekraft untereinander nicht immer gegeben ist und ohne Messwerte und Kalibrierfunktion nicht bewertbar ist.

In Kapitel 4.1 wurde das Biosensorsystem in seiner Endkonfiguration charakterisiert. Hierzu wurde zunächst eine Methode entwickelt, um aus den erhaltenen CCD-Bildern ein verwertbares Signal zu extrahieren. Wichtige Grundeinstellungen, wie die Anregungsintensität bei Fluoreszenzmessungen und die Integrationszeit des CCD wurden im Hinblick auf Hintergrund, Rauschen und erwarteter Signalintensität untersucht und bewertet. Zusätzlich wurde ein Fluidikschema erarbeitet und grundlegend bewertet.

Zuerst wurde die Entwicklung eines Neopterinassays auf dem Biosensorsystem vorgestellt und validiert. Es wurden einige RfS-Messungen vorgenommen, um die entwickelte Oberflächenbeschichtung zu charakterisieren. Die Messungen zeigten, dass die Assay-Entwicklung auf dem RfS-Biosensorsystem auf einem Transducer für den Neopterinassay aufgrund der hohen Menge AK, die nötig ist um ein verwertbares Signal zu generieren, wegen unvollständiger Regeneration nicht möglich war. Hier ist das TIRF Biosensorsystem aufgrund der deutlich geringeren Menge an benötigtem Antikörper besser geeignet. Für die Validierung wurde zunächst eine 1-, 3-, 6- und 9-fach Kalibration und die notwendigen Messungen zur Validierung durchgeführt. Der Vergleich der verschiedenen Mehrfachkalibrierungen untereinander zeigte keine signifikante statistische Auswirkung auf das Messergebnis und die Berechnung der verschiedenen Kenngrößen. Somit wurde die 3-fach Kalibrierung als sinnvolle Kalibrierung für alle weiteren Messungen gewählt. Mit der 3-fach Kalibrierung wurden vier Spots ausgewertet und die Anwendbarkeit von vier verschiedenen Kalibrierfunktion mit einer Residuenanalyse und weiteren Verfahren überprüft. Als geeignet haben sich die 4PL und die r5PL erwiesen. Die r5PL wurde dann auch für alle weiteren Kalibrierungen als Grundlage der Validierung gewählt, da sie für alle in dieser Arbeit gezeigten Kalibrierungen in den spezifizierten Konzentrationsbereichen die bessere Anpassung zeigt. Die 4PL wurde aber ebenfalls zur Kenngrößenberechnung verwendet, da sie in der Wissenschaft sehr häufig Anwendung findet und so Vergleiche möglich sind. Anschließend wurden die Kenngrößen im unteren

Konzentrationsbereich bestimmt. Darunter fallen Größen nach DIN/ISO, wie die BG, die EG und die NG, nach IUPAC wie das LOD und das LOQ, und die Kenngrößen MDC und RDL. Für die Bestimmung des LOD wurden auch Verfahren, die angenommene Verteilungsfunktion und die Heteroskedasizität einbezogen oder auch die Steigung der sigmoidalen Kalibrierfunktionen berücksichtigt. Die Vergleichbarkeit der Kenngrößen untereinander war bei der r5PL, die sich jeweils im spezifizierten Konzentrationsbereich deutlich besser an die Datenpunkte der Messung anpasst, deutlich höher als bei der 4PL. Die Kenngrößen bezogen auf die r5PL lagen alle in einem höheren Konzentrationsbereich im Vergleich zu jenen auf Basis der 4PL, zeigen aber die tatsächliche Leistungsfähigkeit der Methode besser auf. Dies gilt für alle Kalibrierungen in dieser Arbeit, da die Kenngrößen bezogen auf die 4PL nicht immer sinnvolle Werte ergaben.

In Kapitel 4.2 wurde auch die Etablierung und Validierung auf Glastransducern mit einer Silan- und AMD-modifizierten Oberflächenchemie gezeigt. Messungen auf einem Transducer mit Regeneration nach jeder Messung erfüllten die geforderten Spezifikationen der Methodvalidierung, und die errechneten Kenngrößen zeigten, dass eine Quantifizierung im medizinisch relevanten Konzentrationsbereich möglich war. Es wurde auch eine Kalibrierung auf mehreren Transducern durchgeführt. Für jede Messung wurde ein neuer Transducer verwendet. Die Kalibrierung fand zudem in der Probenmatrix Blutplasma statt. Aus den Daten war ersichtlich, dass die sdv der Messung insgesamt sehr groß, der sigmoidale Verlauf und die Konzentrationsabhängigkeit des Messsignals aber klar erkennbar waren. Als mögliche Ursache wurde die Abweichung im Fertigungsprozess der Transducer identifiziert. Hinsichtlich der Methodvalidierung waren die erhaltenen Ergebnisse als nicht ausreichend für eine Quantifizierung einzustufen. Allerdings war es auch hier möglich, die Kenngrößen zu berechnen. Die Vergleichbarkeit der Kenngrößen untereinander war hier sehr viel schlechter. Hier wurde ersichtlich, dass die Berechnung von Kenngrößen natürlich auch bei einer relativ ungenauen Kalibrierung möglich ist und zum Teil einen nicht sinnvollen Wert ergibt. Der zugehörige Fehler einer Messung wird zwar sehr groß sein, aber nur die Betrachtung der Kenngröße kann hier zu einer Fehleinschätzung der Methodenleistungsfähigkeit führen.

In Kapitel 4.3 wurde ein CRP-Sandwichassay auf dem Biosensorsystem etabliert. Die Kalibrierung wies insgesamt sehr kleine Standardabweichungen auf und die 4PL und r5PL verliefen rein optisch sehr ähnlich. Die Residuenanalyse zeigte im unteren Konzentrationsbereich, dass die 4PL hier besser passt, im oberen Konzentrationsbereich die r5PL. Da hier der obere Konzentrationsbereich medizinisch relevant ist, wurde auch hier die r5PL für die weitere Auswertung gewählt. Alle Validierungsmessungen blieben innerhalb der Toleranzgrenze. Die Berechnung der Kenngrößen zeigte meist nur geringe Unterschiede zwischen der 4PL und r5PL. Auch die Kenngrößen untereinander waren vergleichbar. Verlaufen die Kalibrierfunktionen ähnlich, dann sind auch die Kenngrößen ähnlich und vergleichbar. Somit sollte bei einem Methodenvergleich nicht nur auf die Kenngrößen, sondern auch auf den Verlauf der Kalibrierfunktion geachtet werden, unabhängig davon nach welcher mathematischen Methode die Funktion angepasst wurde.

In Kapitel 4.4 wurde die neu entwickelte Oberflächenchemie basierend auf Polyelektrolyten in Kombination mit Aminodextran vorgestellt. Es wurden Kalibrierungen auf einem Transducer, sowohl aus Glas wie auch aus Zeonor, einem Kunststoff, vorgestellt. Diese universell einsetzbare Oberflächenchemie wurde auf den Neopterinassay angewandt und wiederum eine komplette Validierung durchgeführt. Die Ergebnisse ähnelten den Ergebnissen des Neopterinassays mit der Oberflächenchemie basierend auf funktionalisierten Silanen. Es war auf Glas wie auch auf Kunststoff

möglich den Assay innerhalb der spezifizierten Parameter zu validieren und zu kalibrieren. Die Kenngrößenberechnung lieferte sehr ähnliche Werte und Beziehungen der Kenngrößen untereinander wie bei den Kalibrierungen in Kapitel 4.2.2. Insgesamt erreichte man auf den Glastransducern mit PEL-Beschichtung die niedrigsten Nachweisgrenzen, allerdings waren alle Neopterinbestimmungen auf einem Transducer für die Quantifizierung geeignet.

In Kapitel 4.5 wurde der in Kapitel 4.2.2 etablierte Assay und das Biosensorsystem derart modifiziert, dass CL-Messungen möglich waren. Es wurde mit dem Neopterinassay eine 3-fach-Kalibrierung durchgeführt. Bei der Validierung hatte sich gezeigt, dass sowohl die Genauigkeit, Richtigkeit und Wiederfindung im höheren Konzentrationsbereich nicht optimal waren, im unteren Konzentrationsbereich jedoch die Spezifikationen erfüllten. Der Verlauf der Kalibrierung war ähnlich den Kalibrierungen von Neopterin mit Fluoreszenzdetektion, was auf einen geringen Einfluss des Labels auf den Assayablauf schließen ließ. Die Kenngrößenberechnung lieferte auch hier ähnliche Beziehungen. Insgesamt waren jedoch alle Kenngrößen in einem höheren Konzentrationsbereich zu finden, da der Biosensor nicht für CL-Messungen optimiert war. Diese Methode bedarf allerdings noch weiterer Untersuchung und Verbesserung um einen direkten Vergleich mit den Fluoreszenzmethoden durchführen zu können.

Interessant für weitere Untersuchungen ist die Etablierung weiterer Parameter auf dem System. Gerade im Bereich der Entzündungsparameter kann es wichtig sein, als Entscheidungsgrundlage für die weitere Behandlung die Daten mehrerer Parameter vorliegen zu haben. Hierzu in Frage kämen die Interleukine oder auch das Procalcitonin. Erste Arbeiten dazu wurden bereits durchgeführt. Zudem ist eine parallele Detektion von mehreren Analyten auf dem System möglich. Vorarbeiten durch die entwickelte Spottingtechnik und die Kreuztestung der AK auf den verschiedenen Oberflächen wurden hier schon geleistet. Im Bezug auf die Qualität der Transducer hinsichtlich der Eignung als Disposables sind keine weiteren Entwicklungen geplant. Gerade die Messungen mit CL-Detektion sind von großem Interesse, da hier Messungen auf verschiedenen Transducern möglich sind, da die Transducergeometrie eine untergeordnete Rolle spielt. Die vorliegenden Daten haben gezeigt, dass für die vorgestellten Fälle die r5PL die geeignetere Kalibrierfunktion darstellt. Es sollte jedoch in Erwägung gezogen werden für andere Assays oder auch für andere Konzentrationsbereiche andere Kalibrierfunktionen, wie die 4PL, zu verwenden. Wird ein großer Arbeitsbereich benötigt, kann auch über eine Kombination der verschiedenen Kalibrierfunktionen nachgedacht werden. Dazu müssten weitere Messungen in geringerem Konzentrationsabstand durchgeführt werden. Der nächste Schritt nach dieser Validierung wäre auch die Einbeziehung weiterer, nicht nur rein statistisch bedingter Größen, um eine korrekte Unsicherheit und damit Leistungsfähigkeit der Methode zu erhalten.

6. Literatur

1. M. Otto (2011) Analytische Chemie, John Wiley & Sons, Limited
2. K. Doerffel, R. Geyer, et al. (1994) Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen, John Wiley & Sons
3. D. Wild (2005) The Immunoassay Handbook. Heidelberg, Elsevier Science
4. R. Narayanaswamy and O. S. Wolfbeis (2004) Optical sensors: industrial, environmental and diagnostic applications, Springer
5. P. B. Lippa and H. Schlebusch (2008) POCT- Patientennahe Labordiagnostik, Springer
6. L. A. Currie (1999) Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta* **391**: 127-134
7. L. A. Currie (1999) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Anal. Chim. Acta* **391**: 105-126
8. L. A. Currie (1988) Detection in Analytical Chemistry - Importance, Theory, and Practise. Washington, DC, American Chemical Society
9. Eurachem (1998, aktual. December 1998) The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, aufgerufen am 04.07.2011, Quelle: <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>
10. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM (2001, aktual. May 2001) Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, aufgerufen am 04.07.2011, Quelle: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
11. P. A. Tipler and G. Mosca (2004) Physik: für Wissenschaftler und Ingenieure. München, Spektrum Akademischer Verlag
12. P. R. Thomas Engel (2006) Physikalische Chemie. München, Pearson Studium
13. B. M. Krasovitzky and B. M. Bolotin (1988) Organic Luminescent Materials. Weinheim, VCH
14. A. Roda, M. Guardigli, et al. (2003) Analytical bioluminescence and chemiluminescence. *Anal. Chem.* **75**: 462A-470A
15. M. Seidel (2003) Entwicklung und Miniaturisierung heterogener Fluoreszenz-Bioassays basierend auf FRET in Nanoliterkavitäten aus Kunststoff Universität Tübingen, Dissertation
16. L. Papula (1998) Mathematische Formelsammlung: für Ingenieure und Naturwissenschaftler 5. Auflage. Braunschweig/Wiesbaden, Vieweg
17. S. Albrecht, H. Brandl, et al. (1990) Chemilumineszenz-Reaktionen. *Chemie in unserer Zeit* **24**: 227-238
18. U. Hantke (1989) Vereinfachung und Optimierung von Chemilumineszenzassays und deren Komponenten. Dissertation, Technische Universität Clausthal
19. S. Albrecht, H. Brandl, et al. (1996) Chemilumineszenz: Reaktionssysteme Und Ihre Anwendung Unter Besonderer Berücksichtigung Von Biochemie Und Medizin. Heidelberg, Hüthig
20. S. Baj, T. Krawczyk, et al. (2009) The influence of dioxygen on luminol chemiluminescence. *Luminescence* **24**: 348-354
21. G. Merenyi, J. Lind, et al. (1990) Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. *J. Biolumin. Chemilumin.* **5**: 53-56
22. A. B. Collaudin and L. J. Blum (1997) Investigations of the enhancer effect of a high-salt concentration medium on the luminol chemiluminescent reaction. *Photochem. Photobiol.* **65**: 303-308
23. N. Kuroda, R. Shimoda, et al. (2000) Lophine derivatives and analogues as new phenolic enhancers for the luminol-hydrogen peroxide-horseradish peroxidase chemiluminescence system. *Anal. Chim. Acta* **403**: 131-136
24. H. Haferkorn (1980) Optik. Berlin, Dt. Verl. d. Wiss.
25. W. Zinth and U. Zinth (2009) Optik. München, Oldenbourg

26. F. d. Fornel (2001) Evanescent waves. Berlin, Springer
27. S. Reder (2003) Multi-Analyt-Bestimmung von endokrinen Disruptoren im Wasser mit Hilfe eines Fluoreszenz-Immunoassays unter Verwendung von neuronalen Netzen. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
28. F. Goos and H. Hänchen (1943) Über das Eindringen des totalreflektierten Lichtes in das dünnere Medium. *Annalen der Physik* **435**: 383-392
29. F. Goos and H. Hänchen (1947) Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion. *Annalen der Physik* **436**: 333-346
30. G. Gauglitz and G. Proll (2008) Total internal reflection fluorescence sensing - quality assurance and application to water analysis. *Springer Ser. Fluoresc.* **5**: 415-428
31. P. Kurzweil and P. Scheipers (2005) Chemie: Grundlagen, Aufbauwissen, Anwendungen und Experimente, Vieweg
32. G. M. Barrow (1996) Physical chemistry, McGraw-Hill
33. P. Kurzweil (2002) Das Vieweg Formel-Lexikon: Basiswissen für Ingenieure, Naturwissenschaftler und Mediziner, Vieweg
34. B. Alberts, A. Johnson, et al. (2003) Molekularbiologie der Zelle, John Wiley & Sons
35. M. Yan and O. Ramström (2005) Molecularly imprinted materials: science and technology, Marcel Dekker
36. M. Schonhoff (2003) Self-assembled polyelectrolyte multilayers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8**: 86-95
37. M. Schoenhoff (2003) Layered polyelectrolyte complexes: Physics of formation and molecular properties. *J. Phys.: Condens. Matter* **15**: R1781-R1808
38. J. B. Schlenoff and S. T. Dubas (2001) Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution. *Macromolecules* **34**: 592-598
39. L. Kolarik, D. N. Furlong, et al. (1999) Building Assemblies from High Molecular Weight Polyelectrolytes. *Langmuir* **15**: 8265-8275
40. S. S. Shiratori and M. F. Rubner (2000) pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules* **33**: 4213-4219
41. P. G. De Gennes, P. Pincus, et al. (1976) Remarks on polyelectrolyte conformation. *J. Phys. (Paris)* **37**: 1461-1473
42. J. F. Joanny (1999) Polyelectrolyte adsorption and charge inversion. *Eur. Phys. J. B* **9**: 117-122
43. F. Caruso, H. Lichtenfeld, et al. (1999) Investigation of Electrostatic Interactions in Polyelectrolyte Multilayer Films: Binding of Anionic Fluorescent Probes to Layers Assembled onto Colloids. *Macromolecules* **32**: 2317-2328
44. A. Laschewsky, E. Wischerhoff, et al. (1997) Polyelectrolyte multilayer assemblies containing nonlinear optical dyes. *Macromolecules* **30**: 8304-8309
45. C. Tedeschi, F. Caruso, et al. (2000) Adsorption and desorption behavior of an anionic pyrene chromophore in sequentially deposited polyelectrolyte-dye thin films. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 5841-5848
46. A. Plech, T. Salditt, et al. (2000) Investigation of Structure and Growth of Self-Assembled Polyelectrolyte Layers by x-ray and Neutron Scattering under Grazing Angles. *J. Colloid Interface Sci.* **223**: 74-82
47. N. Käppel (2008) Immunoassay-Optimierung für verschiedene Probenmatrices. Dissertation, Berlin, Rhombos
48. C. Albrecht (2011) Vergleichende Entwicklung verschiedener Assays für die medizinische Diagnostik und Charakterisierung der funktionellen Oberflächen. Dissertation, Berlin, Rhombos
49. Richard M. Lindstrom; NIST (2009, aktual. 01.01.2001) Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination, aufgerufen am 21.07.2011, Quelle: <http://nistdigitalarchives.contentdm.oclc.org/cdm4/document.php?CISOROOT=/p15421coll5&CISOPTR=1488&REC=8>

50. DIN-11843-1 (September 2004) ISO 11843-1:1997 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2003 Erkennungsfähigkeit - Teil 1: Begriffe *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
51. DIN-11843-2 (Juni 2006) ISO 11843-2:2000 Erkennungsfähigkeit - Teil 2: Verfahren im Fall der linearen Kalibrierung *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
52. DIN-11843-3 (Juni 2006) ISO 11843-3:2003 Erkennungsfähigkeit - Teil 3 Verfahren zur Ermittlung der Erkennungsgrenze, wenn keine Kalibrierdaten angewendet werden *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
53. DIN-11843-4 (Juni 2006) ISO 11843-4:2003 Erkennungsfähigkeit - Teil 4: Verfahren zum Vergleichen des Erfassungsvermögens mit einem vorgegebenen Wert *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
54. DIN-11843-5 (August 2010) ISO 11843-5:2008 Erkennungsfähigkeit - Teil 5: Verfahren in den Fällen der linearen und der nicht-linearen Kalibrierung *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
55. J. Mocak (1999) Evaluation of IUPAC limit of detection and ISO minimum detectable value - electrochemical determination of lead. *Nova Biotechnologica* **9**: 91-100
56. DIN-32645 DIN 32645:2008-11 Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
57. International Union of Pure and Applied Chemistry - Miloslav Nic (2010, aktual. 22.12.2010) Compendium of Chemical Terminology (Gold Book), aufgerufen am 05.05.2011, Quelle: <http://goldbook.iupac.org/index.html>
58. International Union of Pure and Applied Chemistry - David S. Moore (2002, aktual. 31.07.2002) Compendium on Analytical Nomenclature (The Orange Book), aufgerufen am 05.05.2011, Quelle: http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/
59. M. R. Spiegel (1989) Statistik. Hamburg, McGraw-Hill Book Company GmbH
60. L. A. Currie (1995) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl. Chem.* **67**: 1699-1723
61. F. Feng, A. P. Sales, et al. (2011) A Bayesian approach for estimating calibration curves and unknown concentrations in immunoassays. *Bioinformatics* **27**: 707-712
62. Y. Hayashi, R. Matsuda, et al. (2005) Detection limit estimated from slope of calibration curve: an application to competitive ELISA. *Anal. Sci.* **21**: 167-169
63. M. D. Fernandez-Ramos, L. Cuadros-Rodriguez, et al. (2011) An IUPAC-based approach to estimate the detection limit in co-extraction-based optical sensors for anions with sigmoidal response calibration curves. *Anal. Bioanal. Chem.* **401**: 2881-2889
64. M. A. O'Connell, B. A. Belanger, et al. (1993) Calibration and assay development using the four-parameter logistic model. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **20**: 97-114
65. P. G. Gottschalk and J. R. Dunn (2005) The five-parameter logistic: A characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal. Biochem.* **343**: 54-65
66. CITAC/Eurachem (2002, aktual. 2002) CITAC/Eurachem Guide - Guide to Quality in Analytical Chemistry – An Aid to Accreditation, aufgerufen am 07.07.2011, Quelle: <http://eurachem.org/guides/pdf/CITAC%20EURACHEM%20GUIDE.pdf>
67. J. W. A. Findlay and R. F. Dillard (2007) Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS J.* **9**: E260-E267
68. D. A. Ratkowsky (1990) Handbook of nonlinear regression models. New York, Marcel Dekker, Inc.
69. D. A. Ratkowsky (1983) Nonlinear regression modelling: A unified practical approach. New York, Dekker
70. T. P. Ryan (1996) Modern Regression Methods (Wiley Series in Probability and Statistics). New York, Wiley-Interscience
71. D. A. Ratkowsky and T. J. Reedy (1986) Choosing near-linear parameters in the four-parameter logistic model for radioligand and related assays. *Biometrics* **42**: 575-582

72. J. J. Z. Liao and R. Liu (2009) Re-parameterization of five-parameter logistic function. *J. Chemom.* **23**: 248-253
73. L. Fahrmeir, T. Kneib, et al. (2007) Regression - Modelle, Methoden und Anwendungen. Berlin Heidelberg, Springer
74. K. Backhaus, B. Erichson, et al. (2006) Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung. Berlin, Springer
75. B. A. Belanger, M. Davidian, et al. (1996) The effect of variance function estimation on nonlinear calibration inference in immunoassay data. *Biometrics* **52**: 158-175
76. Z. Govindarajulu (2001) Statistical Techniques in Bioassay - 2nd, revised and enlarged edition. Basel, KARGER
77. DIN-EN-ISO/IEC-17025 (August 2005) ISO/IEC 17025 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
78. Umweltbundesamt (2005, aktual. Januar 2005) Leitlinie zur Methodvalidierung, aufgerufen am 08.07.2011, Quelle: <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/2832.pdf>
79. S. Kromidas (1995) Qualität im analytischen Labor. Weinheim, VCH
80. DIN-ISO-5725-1 (November 1997) DIN-ISO-5725-1 Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen - Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*
81. F. T. Peters and H. H. Maurer (2002) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accredit. Qual. Assur.* **7**: 441-449
82. Thieme (2011, aktual. 16.06.2011) RÖMPP Online, aufgerufen am 04.07.2011, Quelle: <http://www.roempp.com/prod/>
83. A. Brecht, G. Gauglitz, et al. (1992) Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors. *Analisis* **20**: 135-140
84. A. Brecht (1993) Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen. Dissertation, Universität Tübingen
85. G. Marcovic (2008) Einsatz von Nanopartikeln und optimierten Schichtsystemen für die Signalverstärkung in reflektometrischen Biosensoren. Dissertation, Universität Tübingen
86. F. Pröll (2004) Charakterisierung von Oligonukleotid-Hybridisierung mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie. Diplomarbeit, Universität Tübingen
87. J. Piehler, A. Brecht, et al. (1996) Surface modification for direct immunoprobes. *Biosens. Bioelectron.* **11**: 579-590
88. S. D. Spillman, H. M. McEvoy, et al. (2009) Fabrication of Substrate-Independent Protein Microarrays Using Polyelectrolyte Scaffolding. *Langmuir* **25**: 1403-1411
89. F. Pedrotti, L. Pedrotti, et al. (2005) Optik Für Ingenieure: Grundlagen, Springer
90. R. Müller (1990) Rauschen. Berlin, Springer
91. G. I. Taylor (1954) Diffusion and mass transport in tubes. *Proc. Phys. Soc., London* **67B**: 857-869
92. H. Kuchling (2004) Taschenbuch der Physik, Fachbuchverl. Leipzig
93. M. Kemmler (2010) Entwicklung eines präzisen, schnellen und automatischen Biochip-Systems für patientennahe Sepsis-Diagnostik. Dissertation, Universität Freiburg
94. D. Fuchs, P. Avanzas, et al. (2009) The role of neopterin in atherogenesis and cardiovascular risk assessment. *Curr. Med. Chem.* **16**: 4644-4653
95. L. Wang, P. Zhang, et al. (2007) Value of serum neopterin for patients with acute pancreatitis. *Hebei Yike Daxue Xuebao* **28**: 9-11
96. neopterin.net, Dr. Dietmar Fuchs (2011) Neopterin, aufgerufen am 14.11.2011, Quelle: <http://www.neopterin.net/neopterin.de.pdf>
97. EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0 (2006) - Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration *Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics*
98. W. Gottwald (1999) Statistik Für Anwender, John Wiley & Sons, Incorporated

-
99. W. Horwitz and R. Albert (2006) The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC Int.* **89**: 1095-1109
 100. D. L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, et al. (2005) Benchmarking for analytical methods: The Horwitz curve. *LC-GC Eur.* **18**: 528,530-531
 101. T. P. J. Linsinger and R. D. Josephs (2006) Limitations of the application of the Horwitz equation. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **25**: 1125-1130
 102. M. Thompson (2007) Limitations of the application of the Horwitz Equation: A rebuttal. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **26**: 659-661
 103. M. B. Pepys and M. L. Baltz (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.* **34**: 141-212
 104. J. P. Casas, T. Shah, et al. (2008) C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J. Intern. Med.* **264**: 295-314
 105. G. M. Hirschfield and M. B. Pepys (2003) C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJM* **96**: 793-807
 106. L. Baltzer (2007). Polypeptide dimers comprising phosphocholine derivatives as binders for C-reactive protein (CRP), and assay uses thereof, Modpro AB, Swed. . 63pp.
 107. L. T. Tegler, G. Nonglaton, et al. (2011) Powerful Protein Binders from Designed Polypeptides and Small Organic Molecules-A General Concept for Protein Recognition. *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**: 1823-1827, S1823/1821-S1823/1819

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

3PL	Drei-Parameter-Logistik-Funktion
4PL	Vier-Parameter-Logistik-Funktion
5PL	Fünf-Parameter-Logistik-Funktion
α	Fehler 1.Art
β	Fehler 2.Art
AG	Antigen
AK	Antikörper
AMD	Aminodextran
ber.	Berechnet
BRE	Biomelecular Recognition Element (engl.), biomolekulare Erkennungsstruktur
CRP	C-reaktives Protein
dB	Dezibel
DIC	N,N'-diisopropylcarbodiimid
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMF	N,N'-dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.)
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ED ₅₀	mittlere effektive Dosis
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide
FABIAN	Fluoreszenz-Assay-Binding-Inhibition-Assay-Analyser
FDA	U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (engl.)
GG	Gleichgewicht
GOPTS	(3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. Horseradish-peroxidase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IP	inflection point (engl.), Wendepunkt
ISO	International Organization for Standardisation (engl.)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (engl.)
LLOQ	Lower Limit of Quantifikation (engl.), untere Nachweisgrenze
LOD bzw. L _D	Limit of detection (engl.), Erfassungsgrenze
LOQ bzw. L _Q	Limit of quantification (engl.), Nachweisgrenze
MDC	minimum detectable concentration (engl.)
MDV	Minimum Detectable Value (engl.)
MID	Mittelpunkt bei halber maximaler Signalthöhe
MS	Massenspektrometrie
NHS	N-hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (engl.)
PAA	Polyacrylsäure
PAH	Polyallylamin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PEI	Polyethylenimin
PEL	Polyelectrolytes (engl.), Polyelektrolyte
PEMs	Polyelectrolytemultilayers (engl.), Polyelektrolytmultischichten
PMMA	Polymethylmethacrylat
PSS	Polystyrensulfonsäure
PTFE	Polytetrafluorethylen
r5PL	reparametrisierte Fünf-Parameter-Logistik-Funktion
RDL	reliable detection limit (engl.)
RIfS	Reflektometrische Interferenz Spektroskopie
ROI	Region of Interest (engl.), standardisierter Auswertebereich
RSD	relative Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sdv	Standardabweichung
SMPWG	Single-/Multipath- Planar WaveGuide (engl.)
TIR	Total Internal Reflection (engl.), innere Totalreflexion
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence (engl.), innere Totalreflexionsfluoreszenz
WWs	Wechselwirkungen

7.2 Veröffentlichungen

7.2.1 Publikationen

non-reviewed:

„Synthese und Charakterisierung von Cadmiumselenid-Quantenpunkten für den Einsatz in optischen Biosensoren“, Markus Ehni, Günter Gauglitz, *Dresdner Beiträge zur Sensorik* (2005), 24, 165-168

„Grundwasseranalytik in kontaminierten Böden“, Stefanie Jäger, Markus Ehni, Christina Eberhardt, Massimo Rolle, Peter Grathwohl, Günter Gauglitz, *LaborPraxis* (2007), 9, 28-30

„Grundwasseranalytik zur Bestimmung der Schadstoffdispersion in kontaminierten Böden“, Stefanie Jäger, Robert Hermann, Markus Ehni, Christina Eberhardt, Massimo Rolle, Peter Grathwohl, Günter Gauglitz, *Dresdner Beiträge zur Sensorik* (2007), 29, 3-6

“Europt(r)ode IX: Ninth European conference on optical chemical sensors and biosensors”, Stefanie Jaeger, Markus Ehni, Christiane Albrecht, Florian Proell, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2008), 391(5), 1481-1482.

“Analytics swings! ANAKON 2009”, Markus Ehni, Peter Fechner, Dominik Furin, Stefanie Jaeger, Barbara Schwarz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2009), 395(6), 1575-1576.

“CARE-MAN – HealthCARE by biosensor measurements and networking”, Markus Ehni, Günter Gauglitz, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (2009), 47(9), A8

“Vor-Ort-Analyse organspezifischer Laborparameter“, Markus Ehni, *Biophotonics* (2010),1, 40

peer-reviewed:

„Solid-state optical properties of linear polyconjugated molecules: p-stack contra herringbone“, Johannes Gierschner, Markus Ehni, Hans-Joachim Egelhaaf, Begona Milian Medina, David Beljonne, Hadjar Benmansour, Guillermo C. Bazan, *Journal of Chemical Physics* (2005), 123(14), 144914/1-144914/9

“CCD camera image analysis for mapping solute concentrations in saturated porous media“, Stefanie Jaeger, Markus Ehni, Christina Eberhardt, Massimo Rolle, Peter Grathwohl, Guenter Gauglitz, *Analytical & Bioanalytical Chemistry* (2009), 395(6), 1867-1876

“Label-free quantification of cystatin C as an improved marker for renal failure“, Oliver Bleher, Markus Ehni, Günter Gauglitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2012), 402(1), 349-356

Bücher:

“Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch - 10. Neu bearbeitete und erweiterte Auflage“, Hermann P.T. Ammon (Hrsg.), u.a. bearbeitet von Markus Ehni, De Gruyter (2010), Berlin

7.2.2 Vorträge

“Evaluation of TIRF data”, Markus Ehni, CARE-MAN Training Course - Fundamentals of Biomolecular Interaction Processes, 05.-07. April 2006, Tübingen

“Single / multipath waveguide system”, Workshop on Biochips readout for diagnostics, 02.-03. April 2007, Freiburg

“CARE-MAN – a modular biosensor system for POCT”, Markus Ehni, Günter Gauglitz, DECHEMA Technology Forum Diagnostics & Bioanalytical Devices, 09.-10. Dezember 2008, Frankfurt

“CARE-MAN – a modular biosensor system for POCT”, Markus Ehni, Günter Gauglitz, Jahrestagung der Interdisziplinären Gruppe für Labor und Durchflusszytometrie, 12.-14. März 2009, München

„Optischer Biosensor für die medizinische Diagnostik“, Markus Ehni, Christiane Albrecht, Günter Gauglitz, ANAKON 2009, 17.-20. März 2009, Berlin

“All purpose Immobilization technique based on Polyelectrolyte Multilayers for plastic, silica glass and Tantalumpentoxide surfaces”, Markus Ehni, Helen M. McEvoy, Guenter Gauglitz, 6. Deutsches BioSensor Symposium, 29. März-01. April 2009, Freiburg

„Das CARE-MAN Projekt“, Markus Ehni, 6. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 7.-10. Oktober 2009, Leipzig

7.2.3 Poster

„Synthese und Charakterisierung von Cadmiumselenid-Quantenpunkten für den Einsatz in optischen Biosensoren“, Markus Ehni, Günter Gauglitz, 7. Dresdner Sensorsymposium, 12.-14. Dezember 2005, Dresden

„CdSe-ZnS Quantum Dots for optical biosensors“, Markus Ehni, Günther Proll, Günter Gauglitz, Europt(r)ode VIII, 2.-5. April 2006, Tübingen

„Quantum Dots for optical biosensors“, Markus Ehni, Günther Proll, Günter Gauglitz, Analytica, München, 25.-27. April 2006

„AWACSS“, Sensor und Test, 30. Mai-01. Juni 2006, Nürnberg

„Überwachung von Fermentationsprozessen mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RifS)“, Markus Ehni, Martin Mehlmann, Günter Gauglitz, 2. Kolloquium des Arbeitskreises Prozessanalytik, 6-7. November 2006, Dresden

„AWACSS – A EU-Project and beyond“, Markus Ehni, Christiane Albrecht, Nina Käppel, Günter Gauglitz, Riskbase 1st Thematic Workshop, 17.-18. Mai 2007, Lissabon/Portugal

„Grundwasseranalytik in kontaminierten Böden“, Stefanie Jäger, Markus Ehni, Christina Eberhardt, Massimo Rolle, Peter Grathwohl, Günter Gauglitz, GDCh-Wissenschaftforum Chemie 2007, 16.-19. September 2007, Ulm

„Groundwater Monitoring for Determination of Contaminants' Dispersion in Soil“, Stefanie Jäger, Markus Ehni, Christina Eberhardt, Robert Hermann, Massimo Rolle, Peter Grathwohl, Günter Gauglitz, Eurotrode IX, 30.März-02.April 2008, Dublin/Irland

„Immobilisation techniques on plastic surfaces for optical biosensors“, Markus Ehni, Goran Marcovic, Günter Gauglitz, Eurotrode IX, 30.März-02.April 2008, Dublin/Irland

„CARE-MAN“, Sensor und Test, 06.-08. Mai2008, Nürnberg

„Polyelectrolyte multilayers for optical biosensors“, Markus Ehni, Goran Marcovic, Helen M. McEvoy, Guenter Gauglitz, International School of Quantum Electronics: Optical biosensors and biochips for clinical applications, 28. Juni-03. Juli 2008, Erice – Sizilien/Italien

“A new point-of-care testing device for fully automated multianalyte detection in human blood“, Christiane Albrecht, Markus Ehni, Manuela Reichert, Erwin Schleicher, Günter Gauglitz, IFCC World Lab, 28. September-2. Oktober 2008, Fortaleza/Brasilien

“Single / multipath waveguide system“, EuroNanoForum, 2.-5. Juni 2009, Prag/Tschechien

“CARE-MAN“, fms-Regionaltag - Entwicklungen und Perspektiven der Patientennahen Diagnostik, 7. Juni 2010, Tübingen

“Single / multipath waveguide system“, fms-Regionaltag - Entwicklungen und Perspektiven der Patientennahen Diagnostik, 7. Juni 2010, Tübingen

„Optical Biosensor with low cost chips for the detection of inflammation markers“, Markus Ehni, Christiane Albrecht, Barbara Schwarz, Günter Gauglitz, 3rd EuCheMS Chemistry Congress, 29. August-02. September 2010, Nürnberg

„Hochflexibler und modularer Biosensor für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik“, Markus Ehni, Christiane Albrecht, Barbara Schwarz, Günter Gauglitz, 7. Deutsches Biosensorsymposium, 03.-06. April 2011, Bad Heiligenstadt

„Assay transfer to SMPWG instrument“, 2nd fms day - Development and Perspectives of Point-of-care Testing , 15. April 2011, Tübingen

7.3 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Klaus Albert, Prof. Dr. Thomas Chassé, Prof. Dr. Dines Christen, Prof. Dr. Heiner Eckstein, Dr. Hans-Joachim Egelhaaf, Prof. Dr. Günter Gauglitz, Prof. Dr. Günter Häfelinger, Dr. Dietrich Hoffmann, Prof. Dr. Volker Hoffmann, Prof. Dr. Walter Jäger, Prof. Dr. Günther Jung, Dr. Wolfhard Koch, Prof. Dr. Karl-Artur Kovar, Prof. Dr. Detlef Krug, Prof. Dr. Norbert Kuhn, Prof. Dr. Ekkehard Lindner, PD. Dr. Mack, Prof. Martin E. Maier, Prof. Dr. Hermann A. Mayer, Prof. Dr. Hans-Jürgen Meyer, Prof. Dr. Ulrich Nagel, Prof. Dr. Heinz Oberhammer, Prof. Dr. Christian Ochsenfeld, Prof. Dr. Dieter Oelkrug, Prof. Dr. Holm Pauschmann†, PD Dr. Helmut Pommer, PD Dr. Götz Reinhard, Prof. Dr. Volker Schurig, Prof. Dr. Michael Schwarz, Prof. Dr. Eberhard Schweda, Prof. Dr. Bernd Speiser, Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Strähle†, Prof. Dr. Gerhard J. Wagner, Prof. Dr. Udo Weimar, Prof. Dr. Lars Wesemann, Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller, Prof. Dr. Thomas Ziegler