

**Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines
homogenen Fluoroimmunoassays für die Affinitätsanalytik
in Nanolitervolumina**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

1999

vorgelegt von

Uwe Schobel

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Dezember 1999

Dekan:

Prof. Dr. U. Nagel

Erster Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Gauglitz

Zweiter Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Oelkrug

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die interessante Themenstellung, sein stetes Interesse an der Arbeit und für das große Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat.

Herrn Dr. Andreas Brecht gilt mein ganz besonderer Dank für die kompetente Anleitung, die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen, die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben und für seinen Einsatz, der mir einen sehr arbeitsreichen aber auch sehr erfolgreichen Forschungsaufenthalt in Holland ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. D. Oelkrug danke ich für stete Diskussionsbereitschaft, die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe Fluoreszenzabklingkurven aufzunehmen und für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. H.-J. Egelhaaf aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Oelkrug danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven und für die vielen fruchtbaren Diskussionen, die uns zu einem detaillierten Verständnis der physikalisch-chemischen und photophysikalischen Eigenschaften der Cyanin-Farbstoffe führten.

Allen Kollegen im Arbeitskreis, insbesondere der Biogruppe, danke ich für das ausgesprochen gute Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft. Namentlich danken möchte ich Frau Dipl.-Chem. Ingrid Coille und Herrn Dr. Ivo Stemmler für die gute und ergänzende Zusammenarbeit im LINDAU Projekt, Herrn Dipl.-Chem. Hans-Martin Haake für seine Unterstützung bei den zahlreichen gemeinsamen Auslandsaufenthalten, sowie Herrn Dipl.-Chem. Dieter Fröhlich für seine stete Hilfe bei der Durchführung der Berechnungen. Frau Sabine Reder danke ich für die engagierte Hilfe als studentische Hilfskraft und Herrn Jochen Mehne für die Aufnahme der zahllosen RfS-Titrationskurven.

Allen LINDAU Projektpartnern danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit. In besonderer Weise danke ich Herrn Dr. Michael Steinwand für die stets prompte Hilfe und Unterstützung in allen projektrelevanten Fragestellungen.

Der DFG danke ich für die Teilnahme und das Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Analytische Chemie“ an der Universität Tübingen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Motivation der Arbeit</i>	1
1.2 <i>Zielsetzung und Gliederung der Arbeit</i>	4
2 Theoretischer Teil.....	8
2.1 <i>Optische Spektroskopie</i>	8
2.1.1 Absorption.....	8
2.1.2 Emission.....	10
2.1.3 Fluoreszenzpolarisation.....	14
2.1.4 Excitonen-Modell.....	15
2.1.5 Resonanter-Energie-Transfer (RET).....	17
2.2 <i>Antigen-Erkennung</i>	22
2.2.1 Rezeptor-Typen.....	22
2.2.2 Antikörper.....	23
2.3 <i>Immunanalytische Testverfahren</i>	34
2.3.1 Direkte Verfahren.....	35
2.3.2 Markierte Verfahren.....	37
2.3.3 Miniaturisierung immunanalytischer Systeme.....	45
2.3.4 Fluorophore für homogene Fluoroimmunoassays.....	47
2.4 <i>Markierung von Proteinen</i>	48
2.5 <i>Signalerzeugung und statistische Datenauswertung im Immunoassay</i>	51
3 Material und Methoden.....	56
3.1 <i>Materialien</i>	56
3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien.....	56
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	57
3.1.3 Lösungen.....	58
3.1.4 Geräte.....	58
3.2 <i>Methoden</i>	60
3.2.1 Meßmethoden.....	60
3.2.2 Synthesemethoden.....	66
3.2.3 Bestimmungsmethoden.....	72

4 Ergebnisse und Diskussion	76
4.1 <i>Charakterisierung des Resonanten-Energie-Transfer-Immunoassays</i>	<i>76</i>
4.1.1 Auswahl und Charakterisierung der Fluorophore	76
4.1.2 Charakterisierung der proteingebundenen Fluorophore	79
4.1.3 RET im Antigen-Antikörper-Komplex	90
4.1.4 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.....	98
4.2 <i>Simulationsrechnungen zum RETIA.....</i>	<i>99</i>
4.2.1 Berechnung der Kalibrierkurven	99
4.2.2 Simulation der Optimierungsmöglichkeiten.....	101
4.2.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.....	105
4.3 <i>Etablierung des RETIA im Mikroliterbereich.....</i>	<i>106</i>
4.3.1 Charakterisierung der Antikörper	106
4.3.2 Kalibrierung der Modellanalyte.....	110
4.3.3 Validierung	121
4.3.4 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.....	129
4.4 <i>Transfer des Assays in den Nanoliterbereich.....</i>	<i>131</i>
4.4.1 Probenhandhabung und Probenträger.....	131
4.4.2 Referenzierung und Nachweisgrenze des Nanotiterplattenlesers - BioScan.....	135
4.4.3 Kalibrierung von Simazin.....	136
4.4.4 Validierung	140
4.4.5 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.....	144
5 Zusammenfassung und Ausblick	145
6 Literatur	150
7 Anhang.....	168
7.1 <i>Abkürzungen.....</i>	<i>168</i>
7.2 <i>Publikationen</i>	<i>170</i>
7.3 <i>Akademische Lehrer.....</i>	<i>171</i>
7.4 <i>Lebenslauf.....</i>	<i>172</i>

1 Einleitung

1.1 *Motivation der Arbeit*

Wasser ist ein sehr wichtiger Bestandteil des Ökosystems der Erde. 97.5 % der globalen Gesamtwassermenge ist Salzwasser. Von den 2.5 % Süßwasser sind 70 % in den Polkappen eingefroren, von den verbleibenden 30 % ist der Großteil als Bodenfeuchte oder Tiefenwasser für den Menschen unzugänglich. Nur 0.007 % allen Wassers auf der Erde befindet sich in Flüssen, Seen (Oberflächenwasser) und Grundwasserreservoirs, die eine Nutzung durch den Menschen erlauben (Fischer, 1997). Die Qualität dieser Frischwasserquellen zu überwachen und zu überprüfen wird in Anbetracht zunehmender anthropogener Verschmutzung immer wichtiger. Die Verunreinigungen des Wassers reichen von pathogenen Organismen (*Escherichia coli*, Coliforme Keime, Fäkalstreptokokken) über anorganisches Material wie Nitrite, Ammonium, Nitrate, Phosphate, Sulfate, Chloride und Schwermetalle bis hin zu organischen Verbindungen wie gelöste und emulgierte Kohlenwasserstoffe, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Tenside, Phenole, organische Halogenverbindungen (AOX/POX) und Pflanzenschutzmittel.

Besonderes Augenmerk verdient dabei die ständig wachsende Belastung des Brauch- und Trinkwassers durch Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel, PPSM (Pestizide) und deren toxische Abbauprodukte. Etwa 340 Pestizide sind heute zugelassen und auf dem Markt (Lehotay, 1997). Die dramatische Expansion des weltweiten Pestizidmarktes von Mitte 1960 bis 1997 wird durch die Angaben der US EPA (US Environmental Protection Agency) (Aspelin, 1997) und dem Industrieverband Agrar e. V. (IVA, 1997) dokumentiert. Zwischen Mitte 1960 und 1997 nahm das jährliche Marktvolumen von 0.580 Milliarden \$ auf 28.5 Milliarden \$ zu. Etwa dreiviertel des Pestizidverbrauchs konzentriert sich auf die Industrienationen v.a. in Nordamerika, Westeuropa und Japan. Hier befinden sich die Applikationsraten auf einem konstant hohen Niveau. Der Pestizideinsatz in den Entwicklungsländern ist daran gemessen gering, jedoch ist hier ein stetiger Zuwachs festzustellen. So nahm in China beispielsweise die Produktionskapazität von 1995 bis 1996 um 40 % zu. Den weitaus größten Marktanteil der Pestizide nehmen die Herbizide (Unkrautbekämpfungsmittel) ein. In Deutschland lag 1997 der Anteil der Herbizide bei 55 % gefolgt von den Fungiziden (30 %) und Insektiziden (3 %) (IVA, 1997).

Der Transport der versprühten Pestizide vom Applikationsort in die Umwelt erfolgt durch Diffusion, Sickerprozesse, Auswaschungen und Erosion des behandelten Bodens, aber auch durch Verteilung von leichtflüchtigen Pestiziden, Pestizidtröpfchen und -nebeln über die Atmosphäre (Baker, 1992, Beitz et al., 1994). Diese Transportprozesse führen dazu, daß häufig mehr als 70 - 80 % der Pestizide nicht ihr Target erreichen (Pimentel und Levitan, 1986), sondern in der Umgebung Böden, Oberflächen- und Grundwasser verschmutzen und so letztendlich ins Trinkwasser gelangen (Ro und Chung, 1994). Die daraus resultierende Gefährdung von aquatischen Organismen und der Gesundheit des Menschen hängt von den toxikologischen und ökotoxikologischen Eigenschaften der Pestizide und von deren Persistenz in der Umwelt ab. Von der WHO und der US EPA wurden deshalb für jedes Pestizid individuelle Grenzwerte im Trinkwasser festgelegt, die in einem Bereich von 2 µg/l bis 700 µg/l liegen (Cohen, 1990, Barceló, 1993). Die Europäische Union (EU) setzte 1980 in ihrer Trinkwasser-richtlinie über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (EEC, 1980) wesentlich strikere Höchstwerte fest. Für Einzelwirkstoffe wurde ein einheitlicher Grenzwert von 0.1 µg/l und für die Gesamtbelastung ein Wert von 0.5 µg/l festgelegt. Diese Grenzwerte beruhen nicht auf der wissenschaftlichen toxikologischen Basis, sondern entspringen der politischen Motivation der EU, das Trinkwasser in Europa möglichst pestizidfrei zu erhalten (Guyot, 1994). Die biologische und chemische Überwachung des Trinkwassers in Deutschland richtet sich nach der Vorgabe der Trinkwasserverordnung von 1974, letztmalig novelliert 1990 (TrinkwV, 1990). Die TrinkwV setzt die EU-Richtlinie in nationales Recht um.

Der sehr niedrige Grenzwert von 0.1 µg/l für Einzelwirkstoffe birgt für manche Pestizide auch heute noch analytische Probleme. Die konventionellen Analysemethoden (DIN-Verfahren) wie Gaschromatographie (GC) und Superkritische Fluidchromatographie (SFC) (Berger, 1994), gekoppelt mit selektiven Detektionsmethoden wie Massenspektrometrie (MS), Elektrodeneinfang (ECD) und Stickstoff-Phosphor-Detektion (NPD) (Sherma, 1995), beziehungsweise Flüssigkeitschromatographie (LC) mit nachgeschalteter UV (Diodenarray), Fluoreszenz, refraktometrischer- oder Leitfähigkeits-Detektion (Schröder, 1993) oder kombiniert mit Tandemmassenspektrometer (Thermospray-MS/MS) (Schröder, 1989) bzw. „fast atom bombardment“ (FAB) MS (Rivera et al., 1987) sind nicht in der Lage Pestizide in diesem Konzentrationsbereich nachzuweisen. Erst durch eine vorgeschaltete Aufkonzentration der Probe durch flüssig/flüssig-Extraktion (liquid-liquid-extraction, LLE) oder Festphasenextraktion (solid-phase extraction, SPE) mit Anreicherungsfaktoren von 350 bis 2500 (Pihlström et

al., 1997, Schröder, 1989), werden Bestimmungsgrenzen von 0.05 - 0.1 µg/l erreicht (Fischer et al., 1997). In vielen Fällen ist eine zusätzliche Reinigung und Derivatisierung der Probe erforderlich. Die gesamte Vorgehensweise ist sehr zeit- und kostenintensiv und erfordert hochqualifiziertes Personal. So dauert die Quantifizierung eines Pestizids in einem akkreditierten Umweltlabor ca. 6 Stunden und kostet 150 bis 300 DM.

Wesentlich kostengünstiger sind dagegen die 1989 erstmals kommerziell eingeführten immunologischen Testverfahren (Wittmann und Hock, 1989, Avrameas, 1992, Van Emon und Lopez-Avila, 1992). Verschiedene „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA) Testkits für die Wasseranalytik im Mikrotiterplattenformat werden angeboten, kosten ca. 10 DM pro Probe (bei Doppelbestimmungen) und lassen sich binnen ca. 2 Stunden durchführen (Riedel-deHaën, 1999). Die Nachweisgrenzen dieser Methoden liegen (ohne zeitaufwendige Probenvorbereitungsschritte wie z.B. Aufkonzentration) im Bereich zwischen 0.015 µg/l und 0.4 µg/l (Nunes et al., 1998). 1994 wurde von der US EPA eine Richtlinie für die Umweltanalytik mit Hilfe immunologischer Testverfahren veröffentlicht (Gee et al., 1994). 1997 erschien die ISO/CD 15089 Richtlinie für selektive Immunoassays zur Bestimmung von Pestiziden (ISO/CD15089, 1997).

Die bisher diskutierten Methoden zur quantitativen Erfassung relevanter Umweltparameter stoßen bei einer weiteren Ausweitung der Anzahl der Analysen im Hinblick auf eine flächendeckende und kontinuierliche Schadstofffassung auf die Grenzen der Finanzierbarkeit. Hinzu kommt, daß die bei der klassischen Laboranalytik benötigten Lösungsmittel und Reagenzien ihrerseits nach der Messung als Sondermüll entsorgt werden müssen und die Umwelt zusätzlich belasten. Betrachtet man die Vielfalt der umweltanalytischen Messungen, deren Komplexität und deren ungeheure Anzahl, die zur lückenlosen Überwachung von Wasser, Boden und Luft notwendig sind, so kann eine ökonomische Lösung nur in der Bereitstellung intelligenter, miniaturisierter, dem Masseneinsatz zugänglicher und damit preiswerter Meßmethoden liegen. Experten schätzen den Weltmarkt für die Analytik im Umweltschutz auf mehrere 10 Mrd. DM. Infolge der gesetzlich vorgeschriebenen Überwachungsaufgaben erreicht dieser Markt jährlich zweistellige Zuwachsraten.

1.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Zielsetzung

Vor dem in Kapitel 1.1 geschilderten Hintergrund entstand die vorliegende Arbeit. Das spezifische Ziel läßt sich wie folgt formulieren:

Es soll ein immunanalytisches Testverfahren aufgebaut, charakterisiert und optimiert werden, welches in Nanolitervolumina die Signalerzeugung und -detektion umweltrelevanter Analyte erlaubt.

Dabei sollte die Detektion der Zielanalyte (siehe unten) in *homogener Phase* erfolgen, da durch die angestrebte Dimensionierung der mikrostrukturierten Probenträger (NTP) Waschschritte, wie sie in konventionellen ELISA-Mikrotiterplattentechniken üblich sind um „gebunden“ von „ungebunden“ zu trennen, nicht mehr praktikabel sind (siehe Abbildung 1-1). Um den Vorteil der geringen Nachweisgrenze *fluoreszenzbasierter* Methoden auszunutzen, wurde als Detektionsprinzip der *Resonante-Energie-Transfer* (RET) gewählt.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) geförderten Verbundprojektes „Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektion auf mikrostrukturierten Probenträgern für die Analytik im Umweltbereich“, kurz LINDAU durchgeführt. Im Verbundprojekt LINDAU kooperierten fünf Projekt-

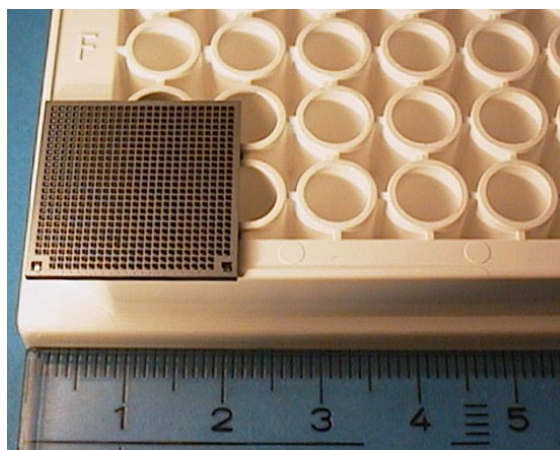


Abbildung 1-1: Ein mikrostrukturierter Probenträger (Nanotiterplatte, NTP) mit 625 Kavitäten und einer Dimension von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ im Vergleich zu einer Standardmikrotiterplatte mit 96 Kavitäten.

partner¹ eng miteinander, darunter drei Forschungseinrichtungen und zwei Anwenderfirmen.

Im ersten Schritt sollte das immunanalytische Testsystem aufgebaut und charakterisiert werden. Um dies möglichst frühzeitig im Projekt, d. h. vor der Verfügbarkeit von miniaturisierten Probenträgern und optischer Anregungs- und Detektionseinheit, realisieren zu können, sollte das Testsystem zunächst „makroskopisch“ etabliert werden. Im Vordergrund standen dabei:

- die Auswahl geeigneter Fluoreszenzmarker und deren grundlegende Charakterisierung hinsichtlich der physikalisch-chemischen und photophysikalischen Eigenschaften um eine maximale Signaldynamik und eine minimale Nachweisgrenze zu erreichen,
- die Charakterisierung der an der Signalerzeugung beteiligten photophysikalischen Desaktivierungsprozesse,
- die Etablierung und Optimierung des Testsystems, wobei die Optimierungsmöglichkeiten anhand von Modellrechnungen aufgezeigt werden sollten.

Mit Verfügbarkeit des ersten Komplettbaus für die Probenhandhabung, Anregung und Detektion der Fluoreszenz in den Nanotiterplatten, sollten die Untersuchungen zunächst parallel auf beiden Plattformen durchgeführt werden. Nach Erreichen vergleichbarer Leistungsfähigkeit auf beiden Plattformen, sollte bevorzugt das miniaturisierte System eingesetzt werden. Die Kalibrierkurven, die im Labor mit Standardlösungen erreicht wurden, sollten in Zusammenarbeit mit dem Institut Dr. Jäger an Realproben validiert werden. Als Zielvorgaben sollten bei der Entwicklung der Immunoassays eine Nachweisgrenze von 0.05 µg/l und eine Bestimmungsgrenze von 0.1 µg/l erreicht werden.

Schließlich sollte eine statistische Bewertung der Ergebnisse, zur Ermittlung von analytischen Kenngrößen und Leistungsparametern des Testverfahrens durchgeführt werden. Es sollte ein Abgleich des Verfahrens mit bestehenden oder in Definition befindlichen Normen für analytische Techniken, v. a. die Sicherstellung der Validierbarkeit der Methode und Integration von Validierungsstrategien aufgezeigt werden.

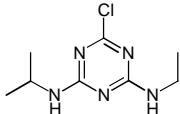
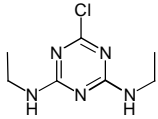
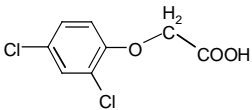
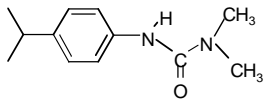
¹ Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen, D-72076 Tübingen.
Laser-Laboratorium Göttingen e. V. (LLG), D-37077 Göttingen.
Bremer Institut für Angewandte Strahltechnik GmbH (BIAS), D-28359 Bremen.
Institut Dr. Jäger, D-72072 Tübingen.
Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH, D-88647 Überlingen.

Zielanalyte

Als Zielanalyte (siehe Tabelle 1-1) wurden aus der Klasse der Herbizide vier umweltrelevante Substanzen nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt. Aus der Gruppe der s-Triazine wurden die beiden wichtigsten Vertreter *Atrazin* und *Simazin* gewählt. Atrazin ist das in den USA und Europa am weitesten verbreitete Herbizid. Allein in Europa beträgt der jährliche Verbrauch über 2000 Tonnen (Fielding et al., 1992). Aufgrund der Stabilität dieser Substanzen und deren hoher Löslichkeit (für Atrazin 33 mg/l) und Mobilität in Oberflächen- und Grundwasser sind sie die am häufigsten nachgewiesenen Pestizide im Trinkwasser (Barceló und Hennion, 1997).

Aus der Klasse der Alkancarbonsäurederivate wurde die *2,4-Dichlorphenoxyessigsäure* (2,4-D) ausgewählt, die 1944 als erstes Herbizid überhaupt eingeführt wurde und heute in Europa mit über 500 Tonnen pro Jahr immer noch breite Anwendung findet (Hatrik und Tekel, 1996). Als letzter Modellanalyt wurde *Isoproturon* als prominentester Vertreter aus der Klasse der Harnstoffderivate ausgewählt. Isoproturon liegt in Europa mit einem jährlichen Verbrauch von über 500 Tonnen unter den „Top Ten“ der Pestizide. Der Verbrauch steigt derzeit weiter an, da die persistenten Triazine zunehmend von den Phenylharnstoffderivaten verdrängt werden.

Tabelle 1-1: Zielanalyte im LINDAU-Projekt aus drei verschiedenen Substanzgruppen.

Substanz-Gruppe	Modellanalyt	Struktur
Triazine	Atrazin	
Triazine	Simazin	
Alkancarbonsäure- derivate	2,4-Dichlorphenoxy- essigsäure (2,4-D)	
Harnstoffderivate	Isoproturon	

Gliederung der Arbeit

In einem einführenden, theoretischen Teil werden die Grundlagen folgender Themengebiete erläutert:

- die Grundprinzipien der optischen Absorptions- und Emissionsspektroskopie,
- das Prinzip der biomolekularen Erkennung basierend auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen,
- eine Einführung in und Übersicht über immunanalytische Testverfahren,
- Methoden zur Markierung von Proteinen,
- statistische Methoden zur analytischen Auswertung von Meßergebnissen.

Nach der Beschreibung der eingesetzten Materialien und verwendeten Methoden werden im Ergebnisteil zunächst die ausgewählten Fluorophore hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften charakterisiert und die Energieübertragung im Antigen-Antikörper-Komplex untersucht. Anschließend folgt eine theoretische Betrachtung des Resonanten-Energie-Transfer-Immunoassays (RETIA), wobei anhand von Modellrechnungen die Optimierungsmöglichkeiten des betrachteten kompetitiven Testformats simuliert werden. Danach werden, eng an die Ergebnisse der Modellrechnungen angelehnt, die erhaltenen Kalibrierkurven der Modellanalyte aufgezeigt und diskutiert. Nach der Validierung des RETIA im Mikroliterbereich folgen in einem weiteren Kapitel die Resultate des Transfers des Assays in den Submikroliterbereich. In einem abschließenden Kapitel werden die wesentlichen Ergebnisse der Simulationsrechnungen und Messungen nochmals zusammengefaßt.

2 Theoretischer Teil

2.1 Optische Spektroskopie

2.1.1 Absorption

Aus der klassischen Behandlung der Wechselwirkung zwischen dem elektromagnetischen Feld und einem elastisch gebunden Elektron, erhält man nach Lorentz die Dispersion der Dielektrizitätskonstanten $\tilde{\epsilon}$ (von Bünau und Wolff, 1987)²

$$\tilde{\epsilon} - 1 = \frac{1}{\epsilon_0} \cdot \frac{N_v q^2 / m}{\omega_0^2 - \omega^2 + i\omega R / m}. \quad (1)$$

Darin sind N_v , ω_0 , m , q , R die Dichte, die Eigenfrequenz, die Masse, die Ladung und die Dämpfungskonstante der Oszillatoren. In kondensierten Phasen ist die makroskopische Polarisierbarkeit $\epsilon_0(\tilde{\epsilon} - 1)$ durch $\epsilon_0 \cdot (\tilde{\epsilon} - 1)/(\tilde{\epsilon} + 2)$ zu ersetzen, da der betrachtete Dipol nicht nur dem äußeren Feld, sondern auch dem Reaktionsfeld aller umgebenden Dipole ausgesetzt ist. Mit der Definition $\tilde{\epsilon} = \tilde{n}^2 = n^2(1 - i\kappa)^2$, wobei n der Brechungsindex und κ der Absorptionsindex ist, und nach Trennung in Real- (ϵ_1) und Imaginärteil (ϵ_2) erhält man

$$\epsilon_1 = n^2(1 - \kappa^2) = 1 + \frac{N_v q^2}{\epsilon_0 m} \cdot \frac{\omega_0^2 - \omega^2}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 R^2 / m^2} \quad (2)$$

$$\epsilon_2 = 2n^2 \kappa = \frac{N_v q^2}{\epsilon_0 m} \cdot \frac{\omega R / m}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 R^2 / m^2}. \quad (3)$$

Dieser klassischen Behandlung zufolge kann nur eine Eigenfrequenz ω_0 vorkommen. Nach der Quantentheorie sind jedoch für ein Elektron mehrere Übergänge von einem gegebenen Zustand i zu anderen Zuständen f möglich. Die Gesamtabsorption verteilt sich daher auf die verschiedenen Übergänge mit der Wahrscheinlichkeit f_{if} , d.h. f_{if} ist die Zahl der klassischen Oszillatoren, die genau so stark absorbieren wie ein Elektron beim Übergang $i \rightarrow f$, und wird daher auch als *Oszillatorenstärke* bezeichnet. Mit $\sum_f f_{if} = 1$ erhält man für Gl. (2) und Gl. (3) die quanten-

² Komplexe Größen sind durch ein hochgestelltes „~“ gekennzeichnet.

mechanisch korrekte Form.

$$\varepsilon_1 = n^2(1 - \kappa^2) = 1 + \frac{N_v q^2}{\varepsilon_0 m} \sum_f f_{if} \frac{\omega_{if}^2 - \omega^2}{(\omega_{if}^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 R^2 / m^2} \quad (4)$$

$$\varepsilon_2 = 2n^2 \kappa = \frac{N_v q^2}{\varepsilon_0 m} \sum_f f_{if} \frac{\omega R / m}{(\omega_{if}^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 R^2 / m^2} \quad (5)$$

Setzt man den gefundenen Ausdruck für die komplexe Dielektrizitätskonstante in die Gleichung einer in einem isotropen Dielektrikum in x-Richtung fortschreitenden Welle \vec{E} ein, so erhält man:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{-\frac{2\pi n \kappa x}{\lambda}} e^{i\omega \left(t - \frac{nx}{c} \right)} \quad (6)$$

d.h. die Gleichung einer mit der Phasengeschwindigkeit $v = c/n$ fortschreitenden gedämpften Welle, wobei c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und λ die Wellenlänge ist. Für die *Intensität* I ergibt sich:

$$I(x) = I_0 e^{-\frac{4\pi n \kappa x}{\lambda}} = I_0 e^{-\frac{2\pi \varepsilon_2 x}{n\lambda}} \quad (7)$$

Die Intensität der einfallenden Strahlung I_0 wird also durch ε_2 verändert. Bei Frequenzen, bei denen das System keine Resonanzenergie aufnehmen kann, ist $\varepsilon_2 = 0$ und $I(x) = I_0$. Bei der Resonanzfrequenz besitzt ε_2 dagegen einen endlichen Wert und I_0 wird geschwächt. Es treten Absorptionsbanden auf, wenn durch Einfluß der elektromagnetischen Strahlung Moleküle von einem Energiezustand in einen anderen übergehen können (Resonanzübergänge).

Ersetzt man in Gl. (7) im Exponenten den Term $4\pi n \kappa / \lambda$ durch den Absorptionskoeffizienten a , so erhält man nach Logarithmieren das Lambertsche Absorptionsgesetz:

$$\ln \frac{I_0}{I} = ax. \quad (8)$$

Mit dem Beerschen Gesetz $a = \varepsilon c$ (gültig für verdünnte Lösungen, deren Lösungsmittel völlig durchlässig sind) erhält man, nach Umschreiben in dekadische Logarithmen, das *Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz*:

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon c x, \quad (9)$$

wobei E die *Extinktion*, ε den *molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten*, c die molare Konzentration und x die Schichtdicke darstellt.

Aus der Fläche unter einer Absorptionsbande läßt sich die Oszillatorenstärke f_{if} als Maß für die Erlaubtheit des entsprechenden Elektronenübergangs berechnen

$$f_{if} = \frac{4mc\varepsilon_0 \ln 10}{N_A e^2 n} \int \varepsilon(\nu) d\nu. \quad (10)$$

Darin sind N_A die Avogadrozahl, e die Elementarladung und ν die Frequenz des absorbierten Lichts.

Da die Gesamtwellenfunktion Ψ_e eines Molekülzustandes das Produkt aus dem Orts- ψ_e bzw. Spinanteil σ_s der elektronischen Wellenfunktion und der Schwingungsfunktion χ_ν ist, erhält man für die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül aus dem Zustand i in den Zustand f anzuregen, das *Übergangsdipolmoment* \vec{M}_{if}

$$\vec{M}_{if} = \langle \Psi_{ie} | \vec{\mu} | \Psi_{fe} \rangle = e \langle \psi_{ie} | \vec{\mu} | \psi_{fe} \rangle \langle \chi_{iv} | \chi_{fv} \rangle \langle \sigma_{is} | \sigma_{fs} \rangle \quad (11)$$

wobei $\vec{\mu}$ der Dipolmomentoperator ist. Daraus resultieren, da für einen erlaubten Übergang alle drei Matrixelemente von Null verschieden sein müssen, die Spin- und Symmetrie-Auswahlregeln.

2.1.2 Emission

Durch *Absorption* (A) von sichtbarer Strahlung im Sinne des Franck-Condon-Prinzips gelangen Moleküle, die sich bei Raumtemperatur fast ausschließlich im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes S_0 befinden, innerhalb von 10^{-15} s in verschiedene Schwingungsniveaus des angeregten Elektronenzustandes S_1 . Die Moleküle relaxieren innerhalb von 10^{-13} s bis 10^{-12} s in den, der Boltzmann-Verteilung im thermischen Gleichgewicht entsprechenden, Schwingungszustand von S_1 . Bei dieser Schwingungsrelaxation wird die Energie durch Stöße in Form von Wärme an das Lösungsmittel abgegeben (thermal equilibration, te). Vom Schwingungsgrundzustand von S_1 kann das Molekül in 10^{-9} s bis 10^{-7} s durch *Fluoreszenz* (F) in die verschiedenen Schwingungsniveaus von S_0 zurückkehren oder durch innere Umwandlung (internal conversion, ic) in 10^{-7} s bis 10^{-5} s und anschließender Schwingungsrelaxation (te) strahlungslos nach S_0 deaktivieren.

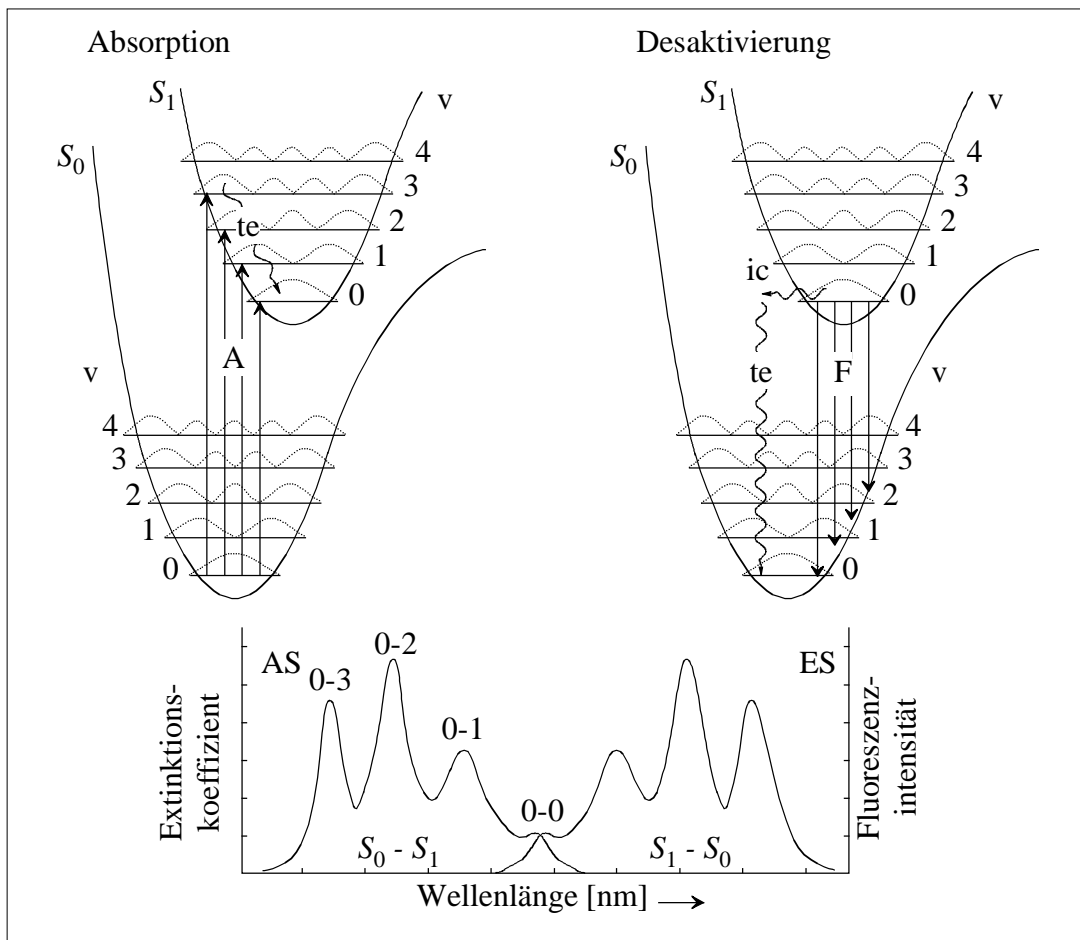


Abbildung 2-1: Vereinfachte Energiepotentialkurven mit den Wahrscheinlichkeitsdichten der Schwingungsniveaus zur Erklärung der Absorption (A), der strahlungslosen Desaktivierung (ic, te), der Fluoreszenz (F) und der Spiegelbildsymmetrie des Emissionsspektrums (ES) bezüglich des Absorptionsspektrums (AS).

Abbildung 2-1 zeigt diese Vorgänge anhand vereinfachter Energiepotentialkurven. Die resultierenden Absorptions- (AS) und Emissionsspektren (ES) zeigen Schwingungsstrukturen, die für S_1 bzw. S_0 charakteristisch sind. Das ES ist im Vergleich zum AS, aufgrund der strahlungslosen Energieverluste in S_1 , zu größeren Wellenlängen verschoben, sogenannte *Stokes-Verschiebung*, und erscheint als Spiegelbild des AS.

Abbildung 2-2 zeigt ein vereinfachtes Termschema mit zwei elektronischen Niveaus (i und f). Die Buchstaben m und n stellen das m -te bzw. n -te Schwingungsniveau der elektronischen Zustände i bzw. f dar. In Strahlungsfeldern der spektralen Energiedichte $\rho(\nu)$ ist die Geschwindigkeitskonstante für einen induzierten Absorptionsübergang $B_{im,fn} \cdot \rho(\nu)$ und für die induzierte Emission $B_{fn,im} \cdot \rho(\nu)$, wobei die Proportionalitätsfaktoren $B_{im,fn}$ und $B_{fn,im}$ als die Einsteinkoeffizienten der Absorption bzw. der induzierten Emission bezeichnet werden. Neben

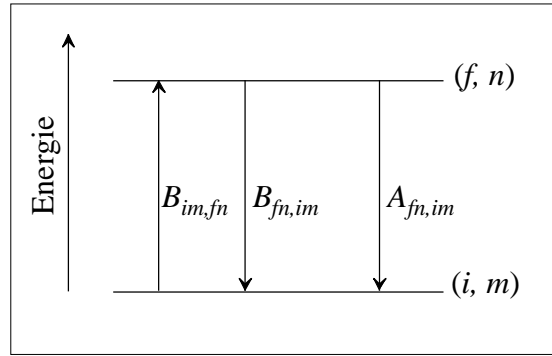


Abbildung 2-2: Veranschaulichung der Einsteinkoeffizienten zwischen dem oberen (f, n) und dem unteren (i, m) vibronischen Niveau. $B_{im,fn}$ stellt die Ratekonstante der induzierten Absorption, $B_{fn,im}$ die Ratekonstante der induzierten Emission und $A_{fn,im}$ die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Emission dar.

der induzierten Emission findet auch die spontane Emission $f, n \rightarrow i, m$ statt. Sie wird durch den Einsteinkoeffizienten der spontanen Emission $A_{fn,im}$ charakterisiert.

Nach Einstein gilt (Pope und Swenberg, 1982):

$$B_{im,fn} = B_{fn,im} \quad (12)$$

und

$$A_{fn,im} = \frac{8\pi h^3 \nu^3 n^3}{c^3} \cdot B_{fn,im} = \frac{1}{\tau_F^0}, \quad (13)$$

wobei ν die Frequenz des Übergangs, h das Planck'sche Wirkungsquantum und τ_F^0 die natürliche Fluoreszenzlebensdauer ist. Gl. (13) gilt dabei streng genommen nur für atomare Übergänge mit schmalbandigen Absorptionsbanden, deren Fluoreszenz die gleiche Wellenlänge wie die Absorption besitzt. Strickler und Berg haben 1962 eine allgemeinere Form der Gl. (13) abgeleitet, die auch auf polyatomare Moleküle anwendbar ist:

$$\frac{1}{\tau_F^0} = A_{f0,i} = 2.881 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \tilde{\nu}_F^{-3} \rangle^{-1} \int \varepsilon(\tilde{\nu}_{Abs}) d \ln(\tilde{\nu}_{Abs}), \quad (14)$$

mit

$$\langle \tilde{\nu}_F^{-3} \rangle^{-1} = \frac{\int I_F(\tilde{\nu}_F) d\tilde{\nu}_F}{\int \tilde{\nu}_F^{-3} I_F(\tilde{\nu}_F) d\tilde{\nu}_F}. \quad (15)$$

Darin sind $A_{f0,i}$ die Ratenkonstante der Emission vom untersten Schwingungsniveau ($m = 0$) des elektronischen Zustandes f in alle Schwingungszustände von i , $\tilde{\nu}_F$ und $\tilde{\nu}_{Abs}$ die Wellenzahl im Fluoreszenz- bzw. Absorptionsspektrum, $I_F(\tilde{\nu}_F)$ die Fluoreszenzintensität bei $\tilde{\nu}_F$ und $\varepsilon(\tilde{\nu}_{Abs})$ der Extinktionskoeffizient bei $\tilde{\nu}_{Abs}$. Die Integration wird dabei über das gesamte Absorptions- bzw. Emissionsspektrum (Gl. (15)) durchgeführt. Mit Gl. (14) kann aus

den experimentell zugänglichen spektralen Daten die natürliche Lebensdauer berechnet werden. Über *zeitaufgelöste Messungen* ist die *Fluoreszenzlebensdauer* τ_F zugänglich (Lakowicz, 1983)

$$I_F(t) = I_0 e^{-t/\tau_F}, \quad (16)$$

wobei I_0 die Fluoreszenzintensität bei $t = 0$ ist. Nur in einer niederviskosen, homogenen Molekülumgebung beobachtet man tatsächlich ein exponentielles Abklingen der Fluoreszenz. In heterogener Umgebung des fluoreszierenden Moleküls findet man Abweichungen vom exponentiellen Verhalten. Die Abklingkurven werden dann an eine Summe von Exponentialfunktionen angepaßt

$$I_F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_{F,i}}, \quad (17)$$

mit den präexponentiellen Faktoren α_i und der mittleren Abklingzeit $\bar{\tau}_F$

$$\bar{\tau}_F = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_{F,i}^2}{\sum_i \alpha_i \tau_{F,i}}. \quad (18)$$

Die partiellen Abklingzeiten $\tau_{F,i}$ kann man in den meisten Fällen nicht zu konkreten Molekülumgebungen zuordnen. Es muß vielmehr angenommen werden, daß in heterogenen Umgebungen eine Verteilung von Abklingzeiten vorliegt.

τ_F ist mit τ_F^0 über die *Fluoreszenzquantenausbeute* ϕ_F verknüpft

$$\tau_F = \phi_F \cdot \tau_F^0. \quad (19)$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist dabei das Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen, bezogen auf die Anzahl der absorbierten Photonen, oder kinetisch ausgedrückt definiert als

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}}. \quad (20)$$

k_F ist dabei die Ratenkonstante der Fluoreszenz (entspricht $A_{j0,i}$) und k_{nr} die Summe der Ratenkonstanten aller strahlungslosen statischen und dynamischen Desaktivierungsprozesse.

Die stationäre Fluoreszenzintensität I_F berechnet sich als Produkt aus ϕ_F , der Intensität des absorbierten Lichts I_{abs} und einem gerätespezifischen Faktor Z

$$I_F = I_{Abs} \cdot \phi_F \cdot Z. \quad (21)$$

I_{Abs} läßt sich mit dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. (9)) zu:

$$I_{Abs} = I_0 - I = I_0 \left(1 - e^{-2.3\epsilon'cx}\right) \quad (22)$$

berechnen, wobei ϵ' der Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge ist. Damit ergibt sich für die Fluoreszenzintensität:

$$I_F = I_0 \left(1 - e^{-2.3\epsilon'cx}\right) \phi_F Z \quad (23)$$

mit Z als gerätespezifischer Faktor. Für geringe Absorptionen kann man den Exponentialterm aus Gl. (23) entwickeln, so daß sich schließlich folgende Gleichung ergibt:

$$I_F = I_0 (1 - (1 - 2.3\epsilon'cx)) \phi_F Z = I_0 (2.3\epsilon'cx \phi_F Z) \quad (24)$$

Die Fluoreszenzintensität ist also unter den genannten Bedingungen proportional zur Konzentration.

2.1.3 Fluoreszenzpolarisation

Regt man die Fluoreszenz eines Moleküls mit vertikal polarisiertem Licht der Intensität I_{0V} an und mißt die Intensität des horizontal (I_{VH}) oder vertikal (I_{VV}) polarisierten Fluoreszenzlichts, so erhält man unter der Voraussetzung, daß die Richtungen des absorbierenden und emittierenden Übergangsdipolmoments zusammenfallen, folgende Ausdrücke für die *Fluoreszenz-polarisation* P bzw. *Fluoreszenz-anisotropie* r (Lakowicz, 1983)

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}} \quad (25)$$

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}}. \quad (26)$$

Die Fluoreszenz-anisotropie gibt dabei die Differenz zwischen den bei vertikal polarisierter Anregung beobachteten Intensitäten der vertikal bzw. horizontal polarisierten Fluoreszenz an, normiert auf die gesamte in der Emissionsebene emittierte Fluoreszenzintensität. Um die unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektors für horizontal und vertikal polarisiertes Licht zu eliminieren, wird

$$I_{VH}^{wahr} = I_{VH}^{beob} \cdot \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (27)$$

in die Gleichungen für die Anisotropie oder Polarisation der Fluoreszenz eingesetzt. Dabei sind I_{HV} und I_{HH} die bei horizontaler Anregung beobachteten Intensitäten der vertikal bzw. horizontal polarisierten Fluoreszenz.

Rotieren die Moleküle im angeregten Zustand, so wird nach Anregung mittels δ -Puls eine zeitabhängige Anisotropie $r(t)$ beobachtet, die als Summe von Exponentialfunktionen dargestellt werden kann

$$r(t) = \sum_i r_{0,i} e^{-t/\tau_{R,i}}, \quad (28)$$

worin τ_R die Rotationskorrelationszeit und r_0 die intrinsische Anisotropie bedeuten. Das zeitliche Mittel \bar{r} ist gegeben durch die sogenannte Perrin-Gleichung (Lakowicz, 1983), die \bar{r} mit der Fluoreszenzabklingzeit, der Rotationskorrelationszeit und der intrinsischen Anisotropie verknüpft

$$\bar{r} = \frac{r_0}{1 + \tau_F / \tau_R}. \quad (29)$$

Sind die Fluoreszenzabklingzeit und die intrinsische Anisotropie bekannt, kann aus der stationären Anisotropie die Rotationskorrelationszeit berechnet werden.

2.1.4 Excitonen-Modell

Mit abnehmender Entfernung zwischen absorptionsfähigen Molekülen verändern sich zunehmend Lage und Intensität der elektronischen Übergänge sowie die Lebensdauer der angeregten Zustände dieser Moleküle. Dieser Effekt kann über die Kopplung der angeregten Zustände beschrieben werden (Pope und Swenberg, 1982). Ein Aggregat (physikalisches Dimer) aus zwei gleichen Molekülen 1 und 2, jeweils mit den Wellenfunktionen ψ_i für den Grundzustand der Energie E_i und ψ_f für den angeregten Zustand der Energie E_f für die wechselwirkungsfreien Moleküle, besitzt die Gesamtwellenfunktion Ψ_{Exc}

$$\Psi_{Exc}^{\pm} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\psi_i(1)\psi_f(2) \pm \psi_i(2)\psi_f(1)) \quad (30)$$

für den angeregten Zustand, mit den Energien

$$E_{Exc}^{\pm} = E_i + E_f + W' \pm \beta, \quad (31)$$

wobei W' die Coulomb-Energie der Wechselwirkung der Ladungsverteilung des angeregten Zustandes des Moleküls 1 mit dem Grundzustand des Moleküls 2 (oder umgekehrt) ist

$$W' = \langle \psi_f(1)\psi_i(2) | \hat{V}_{12} | \psi_f(1)\psi_i(2) \rangle \quad (32)$$

und β ein Resonanzintegral, das zur Delokalisierung der Anregungsenergie auf beide Moleküle und zur Aufspaltung (*Excitonen-Aufspaltung*) der zuvor entarteten Anregungszustände führt (siehe Abbildung 2-3)

$$\beta = \langle \psi_f(1)\psi_i(2) | \hat{V}_{12} | \psi_i(1)\psi_f(2) \rangle. \quad (33)$$

\hat{V}_{12} ist dabei der Wechselwirkungsoperator. Befinden sich beide Moleküle im Grundzustand, so ergibt sich die Gesamtenergie

$$E_{ges}^0 = 2E_i + W, \quad \text{mit} \quad W = \langle \psi_i(1)\psi_i(2) | \hat{V}_{12} | \psi_i(1)\psi_i(2) \rangle. \quad (34)$$

Die elektronische Anregungsenergie beträgt jetzt also

$$\Delta E^\pm = E_f - E_i + W' - W \pm \beta. \quad (35)$$

Die spektrale Verschiebung der monomeren Absorptionsbande bei der Dimerenbildung hängt von dem relativen Größenverhältnis von W und W' und der Orientierung der monomeren Übergangsdipolmomente ($\vec{M}(1)$ und $\vec{M}(2)$) ab. Dipolerlaubte Übergänge erhält man aus dem resultierenden Übergangsdipolmoment, welches für die \pm Zustände der Dimere als

$$\vec{M}_{ges}^\pm = \frac{1}{\sqrt{2}} (\vec{M}(1) \pm \vec{M}(2)) \quad (36)$$

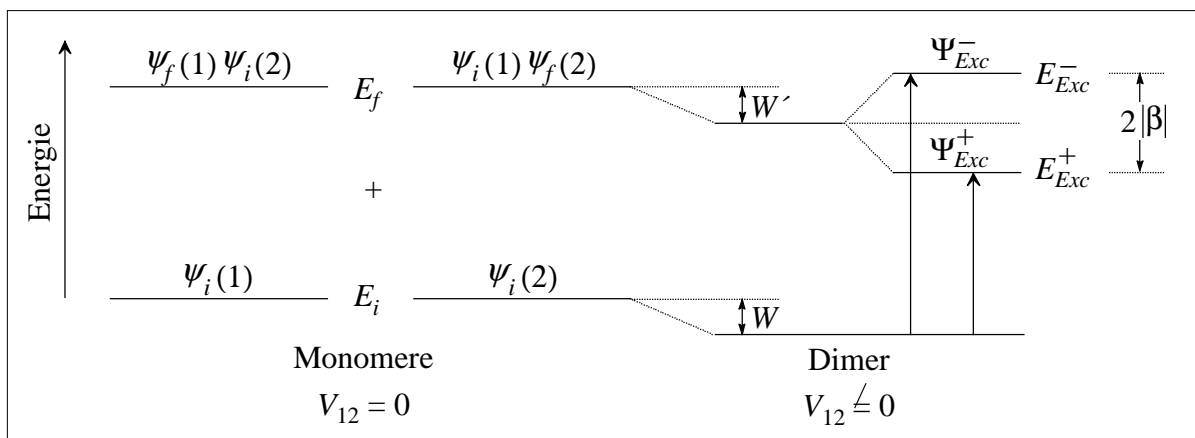


Abbildung 2-3: Aufspaltung der angeregten Energieniveaus E_f zweier nichtaggregierter Moleküle in die excitonischen Energieniveaus E_{Exc}^+ und E_{Exc}^- im dimeren Aggregat.

formuliert werden kann. Für translatorisch äquivalente Moleküle sind die Übergangsdipolmomente der Monomere entweder parallel oder antiparallel, so daß nur der Übergang zu einem der beiden angeregten Zustände optisch erlaubt ist (siehe Abbildung 2-4). Bei der Seite-an-Seite-Anordnung (H-Aggregate) der Übergangsdipolmomente gilt für den energieärmeren Zustand $\vec{M}_{\text{ges}} = 0$, für die Kopf-Schwanz-Anordnung (J-Aggregate) ist der Zustand mit $\vec{M}_{\text{ges}} = 0$ der energiereichere. Für nicht parallele Orientierung der Übergangsdipolmomente (H + J-Aggregate) sind beide Übergänge erlaubt.

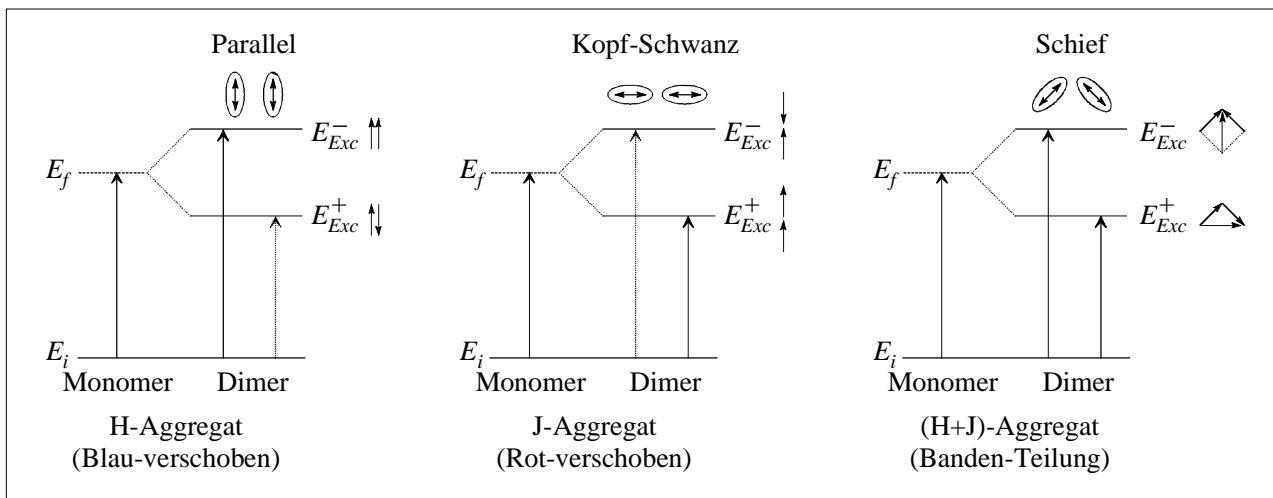


Abbildung 2-4: Excitonen-Aufspaltung in dimeren Aggregaten unterschiedlicher Geometrie. Die Coulomb-Wechselwirkungen W und W' wurden hier weggelassen. Die Orientierungen der monomeren Übergangsdipolmomente sind durch kurze Pfeile dargestellt. Dipolverbotene Übergänge sind gestrichelt gezeichnet.

2.1.5 Resonanter-Energie-Transfer (RET)

Der Resonante-Energie-Transfer (RET) ist ein Desaktivierungsprozeß für Moleküle im angeregten Zustand (Ratenkonstante k_{RET}) und konkurriert mit der Desaktivierung durch

- Fluoreszenz (Ratenkonstante k_F),
- *dynamische Prozesse* wie Kollision (Ratenkonstante k_{Kol}) und
- *statische Prozesse* wie Komplexbildung oder Elektronen-Transfer (Ratenkonstanten k_{Kom} bzw. k_{ET}).

RET ist ein Prozeß, der dann stattfindet, wenn ein Chromophor, dessen Absorptionsspektrum sich mit dem Emissionsspektrum des angeregten Fluorophors überlappt (Resonanzbedingung),

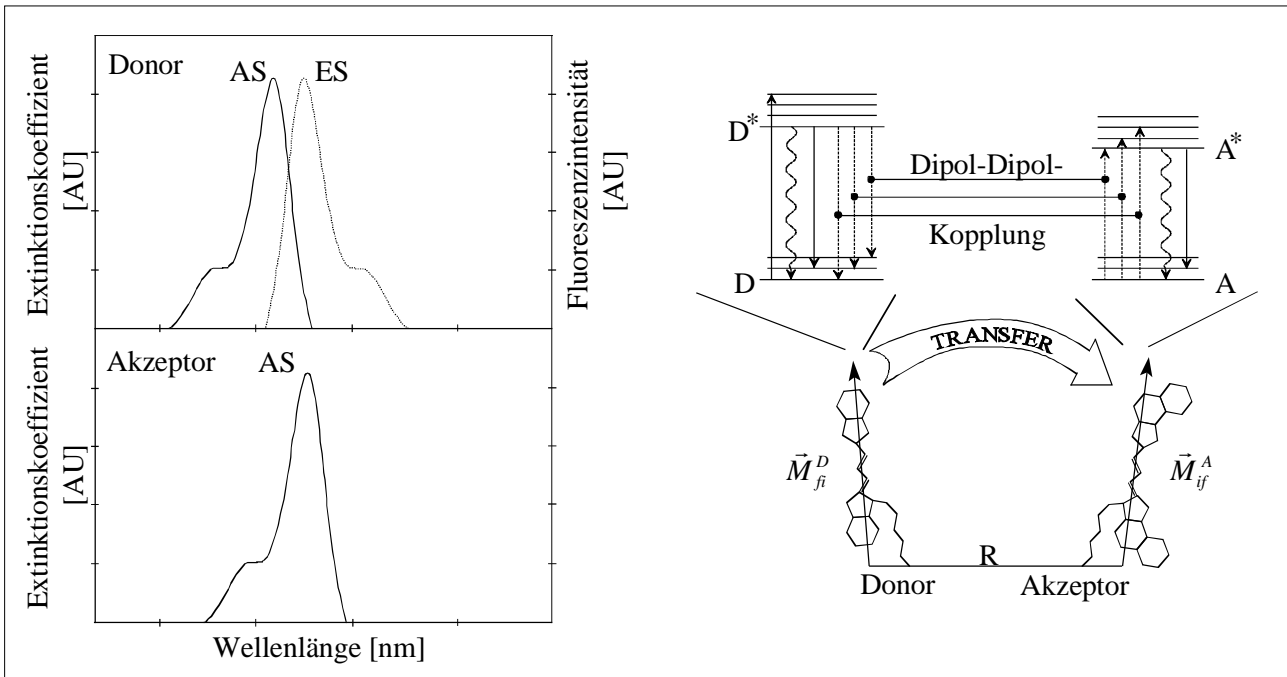


Abbildung 2-5: Prinzip des RET. Links: Überlappung des ES des Donors mit dem AS des Akzeptors. Rechts: Schematische Darstellung des RET von einem angeregten Donor (mit dem Übergangsdipolmoment der Emission \vec{M}_{fi}^D) zu einem sich im Abstand R befindlichen Akzeptor (mit dem Übergangsdipolmoment der Absorption \vec{M}_{if}^A), anhand eines vereinfachten Termschemas.

in unmittelbare Nähe (1 - 10 nm, Van Der Meer et al., 1994) zum Donor gebracht wird. In diesem Fall kann die Anregungsenergie des Fluorophors (im Folgenden als *Donor* bezeichnet) strahlungslos auf den Chromophor (im Folgenden als *Akzeptor* bezeichnet) übertragen werden (siehe Abbildung 2-5). Dieser Prozeß, der auf einer *Dipol-Dipol-Wechselwirkung* der beiden Oszillatoren basiert (Förster, 1946), führt zu einer *Abnahme der Donorfluoreszenz*. Ist der Akzeptor seinerseits ein Fluorophor, so wird ein Teil der übertragenen Energie als *sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz* emittiert.

RET für ein Donor-Akzeptor-Paar

Entsprechend der Förster-Theorie (Förster, 1948 und 1960) kann die Ratenkonstante k_{RET} für den RET von einem Donor-Molekül auf ein Akzeptor-Molekül, die durch einen festen Abstand R voneinander getrennt sind, nach

$$k_{RET} = \frac{1}{\tau_F^D} (8.79 \cdot 10^{-11}) \kappa^2 n^{-4} \phi_F^D J_{DA} R^{-6} = \frac{1}{\tau_F^D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (37)$$

mit

$$R_0^6 = (8.79 \cdot 10^{-11}) \kappa^2 n^{-4} \phi_F^D J_{DA} [nm^6] \quad (38)$$

berechnet werden. Darin ist R_0 der kritische Abstand (*Förster-Abstand*), bei welchem der RET und die restlichen Desaktivierungsprozesse gleich wahrscheinlich sind, ϕ_F^D und τ_F^D die Fluoreszenzquantenausbeute bzw. Lebensdauer des Donors (D) in Abwesenheit des Akzeptors (A), n der Brechungsindex, für den nach Moog et al. (1984) der Wert des verwendeten Lösungsmittels eingesetzt wird. κ^2 , der Orientierungsfaktor, ist definiert als

$$\kappa^2 = (\cos\theta_{DA} - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2, \quad (39)$$

wobei die Winkel (siehe Abbildung 2-6) die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander angeben. κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Wegen der Rotationsbewegung der Moleküle wechseln sämtliche Richtungen in den meisten Fällen so rasch, daß statt der Momentanwerte von κ^2 , dessen statistischer Mittelwert $\kappa^2 = 2/3$ über sämtliche Orientierungen eingesetzt werden kann. Die Rotationszeit der Moleküle muß allerdings kürzer sein als die Lebensdauer des angeregten Donorzustandes. Der Fehler, der durch Einsetzen von $\kappa^2 = 2/3$ in Gl. (38) entsteht, ist im allgemeinen klein und beträgt nach Stryer (Stryer, 1978) weniger als 20 %. J_{DA} , das Überlappungsintegral, ist definiert als

$$J_{DA} = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (40)$$

worin $F_D(\lambda)$ das bezüglich der Wellenlängenskala normierte Emissionsspektrum des Donors und $\varepsilon_A(\lambda)$ der molare Extinktionskoeffizient des Akzeptors ist.

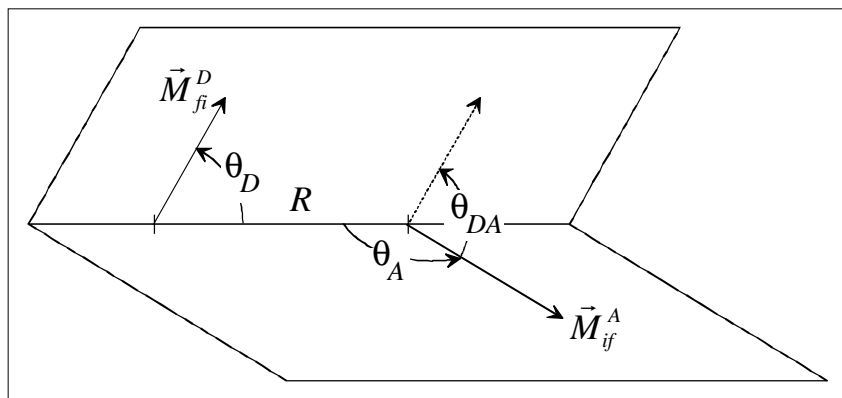


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Winkel, die in der Definition von κ^2 (Gl. (39)) verwendet wurden. \vec{M}_{fi}^D und \vec{M}_{if}^A sind die Übergangsdipolmomente der Donoremission bzw. Akzeptorabsorption und R ist der Abstand der Zentren der beiden Chromophore.

Analog der Fluoreszenzquantenausbeute (siehe Gl. (20)) wird beim RET die Transfereffizienz E_{RET} als der Anteil der absorbierten Photonen, die vom Donor zum Akzeptor übertragen werden, definiert

$$E_{RET} = \frac{k_{RET}}{k_{RET} + k_F + k_{nr}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} = 1 - \frac{\tau_F^{DA}}{\tau_F^D} = 1 - \frac{\phi_F^{DA}}{\phi_F^D}, \quad (41)$$

wobei τ_F^{DA} und ϕ_F^{DA} die Fluoreszenzlebensdauer bzw. -quantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors ist.

RET für statistisch verteilte Donoren und Akzeptoren

Für ein System mit statistisch im dreidimensionalen Raum verteilten Donoren und Akzeptoren, bei welchem der RET nur vom Donor zum Akzeptor stattfindet und die translatorische Diffusion der Moleküle im Vergleich zu der Transferrate langsam ist, kann nach Förster (1949) die mittlere Wahrscheinlichkeit $\langle \rho(t) \rangle$, ein zur Zeit $t = 0$ angeregtes Molekül zur Zeit t noch angeregt vorzufinden, nach

$$\langle \rho(t) \rangle = e^{-s - 2c/c_0 \sqrt{s}} \quad (42)$$

mit

$$c_0 = \frac{3000}{2\sqrt{\pi^3} N_A R_0^3} \quad (43)$$

berechnet werden. Darin ist $s = t/\tau_F^D$, c die Konzentration der Akzeptoren, c_0 die sogenannte „kritische Konzentration“, bei welcher die Transfereffizienz 76 % wird, und N_A die Avogadrozahl. Aus Gl. (42) und Gl. (43) geht hervor, daß, obwohl der Abklingvorgang des Einzelmoleküls streng exponentiell erfolgt, im Mittel über die Gesamtheit der Moleküle die Anregung zunächst stärker, dann schwächer abklingt, als es nach Gl. (16) der Fall wäre. Die Transfereffizienz E_{RET} läßt sich mit $x = c/c_0$ nach

$$E_{RET} = \sqrt{\pi} x e^{x^2} \{1 - \text{erf}(x)\} \quad (44)$$

berechnen. $\text{erf}(x)$ ist das Gaußsche Fehlerintegral

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-y^2} dy, \quad (45)$$

wobei $y = \sqrt{s} + x$ ist.

Anwendungen des RET

Aufgrund der starken Abhängigkeit der Transferrate k_{RET} vom Abstand R zwischen Donor und Akzeptor in Gl. (37), wird der *RET* oft zur Bestimmung von mittleren Abständen in biologischen Makromolekülen oder Aggregaten verwendet (Wu und Brand, 1994). Die besonderen Eigenschaften dieses „spektroskopischen Lineals“ sind: geringe räumliche Auflösung (Angströmbereich), hohe zeitliche Auflösung (Nanosekundenbereich), geringe Nachweisgrenzen (nanomolarer Bereich) und Anwendbarkeit in komplexen Systemen, wie Plasmamembranen oder lebenden Zellen (Stryer, 1978).

Neben diesen Anwendungen von *RET* als „spektroskopisches Lineal“ in Proteinen, Membranen, Nukleinsäuren und anderen biologischen Systemen, wird der Energie-Transfer zunehmend für die Entwicklung von Immunoassays eingesetzt (Van Der Meer et al., 1994). Bei dieser Technik wird der Antikörper mit einem Donorfluorophor und ein Antigenderivat mit dem entsprechenden Akzeptormolekül markiert. Energie-Transfer wird dann als Abnahme der Donorfluoreszenz bzw. Auftreten der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz beobachtet, wenn das markierte Antigen von dem markierten Antikörper in einer spezifischen Reaktion gebunden wird (siehe Kap. 2.2.2.3). Nur in diesem Komplex sind die Fluorophore nahe genug, um effizient den strahlungslosen Energie-Transfer zu ermöglichen. Gibt man nun unmarkiertes Antigen (Analyt) dazu, so wird der markierte Antigen-Antikörper-Komplex teilweise dissoziieren, was die Fluoreszenzlöschung des Donors bzw. die sensibilisierte Fluoreszenz des Akzeptors rückgängig macht (Ullman et al., 1976, Lim et al., 1980) (siehe Kap. 4.2).

2.2 Antigen-Erkennung

2.2.1 Rezeptor-Typen

Biochemische Makromoleküle können in bestimmten Regionen des Moleküls, den *Bindungsstellen* oder *Bindungstaschen*, makro- oder niedermolekulare Liganden binden. Dieses Prinzip der „*biomolekularen Erkennung*“ wird schon seit 1959 ausgenutzt, um selektiv und sensitiv Analyte nachweisen zu können. Verschiedene *Rezeptoren* wurden dabei als Erkennungsstrukturen eingesetzt:

- polyklonale menschliche *Antikörper* (Berson und Yalow, 1959),
- *Transportproteine* wie thyroxin-bindendes Globulin (Ekins, 1960), Transcortin (Murphy et al., 1963) und
- *Zellrezeptoren* wie z.B. der Estradiol (E_2)-Rezeptor (Korenman, 1968).

Aufgrund der Vielseitigkeit der polyklonalen Antikörper bezüglich der *Spezifität*, *Verfügbarkeit* und *Stabilität* stellen sie, zusammen mit den seit 1975 verfügbaren monoklonalen Antikörpern (Köhler und Milstein, 1975), die am häufigsten genutzten Rezeptoren dar (Gosling, 1990). Tabelle 2-1 faßt die allgemeinen Eigenschaften dieser drei Klassen von Rezeptoren zusammen. In dieser Arbeit wurde für die spezifische Erkennung der Zielanalyte die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung mit Hilfe polyklonaler und monoklonaler Antikörper eingesetzt.

Tabelle 2-1: Vergleich der Eigenschaften der am häufigsten genutzten Rezeptoren zur spezifischen Erkennung von Liganden (nach Hamilton, 1987)

Eigenschaften	Antikörper	Zellrezeptoren	Transportproteine
Allgemeiner Einsatz	breit	limitiert	limitiert
Affinität (l/mol)	die höchste ($10^4 - 10^{14}$)	sehr hoch ($10^9 - 10^{11}$)	hoch (10^8)
Spezifität	variabel	sehr hoch	hoch
Herstellungsdauer	Monate	Stunden	Minuten
Methode	Tiere (polyklonal) Zellen (monoklonal)	Zellfraktionierung	Serumverdünnung
Reproduzierbarkeit	variabel (polyklonal) konstant (monoklonal)	konstant	konstant
Langzeitstabilität	sehr stabil	instabil	sehr stabil

2.2.2 Antikörper

2.2.2.1 Struktur

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein reaktives System aus Organen, Zellen und löslichen (humoralen) Faktoren, das die Unversehrtheit des Organismus gegenüber makromolekularen Fremdstoffen (Antigene) gewährleistet. Eine Schlüsselrolle bei der Bekämpfung der Antigene spielt dabei die *humorale Immunität*, die durch *Antikörper* (Immunglobuline) vermittelt wird. Antigene lösen in peripheren Lymphgeweben die Proliferation und Differenzierung von spezifischen B-Lymphozyten aus, wonach diese Zellen aktiv Antikörper sezernieren. Diese exocytierten Antikörper binden das Antigen und initialisieren einige der Effektorfunktionen des Immunsystems (Komplementsystem, Phagozytose und zytotoxische Reaktionen). Die Region des Antikörpers, an welcher das Antigen gebunden wird, heißt *Paratop*. Die komplementäre Region des Antigens, die spezifisch durch das Paratop erkannt wird, heißt *antigene Determinante* oder *Epitop*. Niedermolekulare Substanzen mit einer relativen Molmasse kleiner 2000 (sogenannte *Haptene*) wirken im Körper nicht immunogen. Erst durch Kupplung an makromolekulare Träger (z.B. Rinderserum-Albumin (BSA) oder Ovalbumin (OVA)) wird eine Immunantwort gegen die haptene Determinante ausgelöst. Das Hapten wird vom gebildeten Antikörper auch ohne den makromolekularen Träger erkannt.

Man unterscheidet fünf Immunglobulin-Klassen: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. Der wichtigste Vertreter, der 80 % der im Serum vorliegenden Immunglobuline ausmacht, ist das *IgG*. Es kommt in vier Subklassen (γ_1 - γ_4) vor. Die Struktur eines IgG-Moleküls (Subklasse IgG1) ist in Abbildung 2-7 gezeigt. Es besteht aus vier Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind: zwei identische *schwere Ketten* (Heavy, H), die ca. 450 Aminosäuren enthalten (ca. 55 kD) und zwei *leichte Ketten* (Light, L) aus ca. 220 Aminosäuren (ca. 24 kD). Jede Kette besteht aus homologen Segmenten von ca. 110 Aminosäuren, die unabhängig gefaltete Domänen bilden. H- und L-Ketten enthalten am N-Terminus je eine variable (V) Domäne, die bei Antikörpern verschiedener Spezifität variiert und drei (H) bzw. eine (L) konstante (C) Domäne. Die drei hochkonservierten Domänen der H-Kette werden C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} genannt. Zwischen der C_{H1} - und C_{H2} -Domäne befindet sich ein zusätzliches Segment, welches als *Hinge Region* bezeichnet wird und die inter-H-Ketten-Disulfidbrücken enthält. Dadurch erhält das Molekül eine Y-förmige, symmetrische Struktur, mit einer gewissen *Flexibilität*. Innerhalb der C_{H2} -Domäne befinden sich eine Oligosaccharidseitenkette und eine

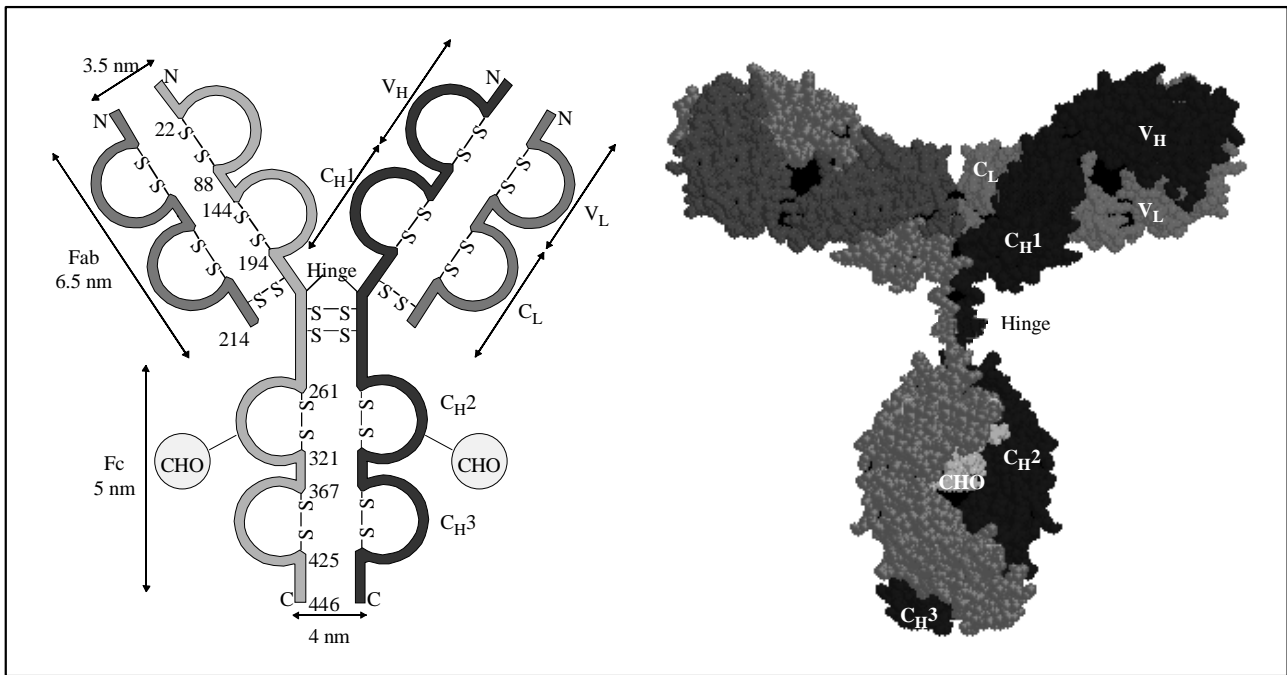


Abbildung 2-7: Links: Schematische Darstellung der Struktur eines Antikörpers (Subklasse IgG1). Rechts: mögliche dreidimensionale Struktur eines menschlichen IgG1 (Bild aus Padlan, 1994). Die leichten und schweren Ketten sind entsprechend der schematischen Darstellung (links) in verschiedenen Graustufen codiert.

Komplementbindungsstelle. Die konstante Domäne der L-Kette wird C_L genannt (Padlan, 1994, Mian et al., 1991).

Innerhalb jeder V-Domäne (V_H und V_L) zeigen drei Segmente *Hypervariabilität* und bilden die *komplementaritätsbestimmenden Regionen* (complementary-determining regions, CDR) des Immunglobulins. Diese sechs CDRs, die aus ca. 50 Aminosäuren bestehen, bilden das Paratop der Immunglobuline. Die *Diversität* dieser hypervariablen Regionen, die sich aus der Sequenz- und Längenvariabilität der CDRs ergibt (v.a. CDR3 (Price, 1998)), führt zu einer Bibliothek von 10⁶ - 10⁸ Antikörper verschiedener Spezifität und wird auf der DNA-Ebene durch die somatische Rekombination von Gensegmenten und somatische Mutation der V-Gene erklärt (Leder, 1982).

2.2.2.2 Herstellung von Antikörpern

Die Produktion von Antikörpern gegen Haptene, wie z.B. Pestizide, beruht auf der Immunisierung eines geeigneten Vertebraten (Hase, Maus, Ratte, Ziege, Schaf) mit einem Konjugat aus einem immunogenen Molekül (typischerweise Rinderserum Albumin, BSA) und dem Hapten (Harlow und Lane, 1988). Das Design und die Synthese des Haptens und des Hapten-Protein-Konjugats bestimmen dabei maßgeblich die Eigenschaften des erhaltenen Antiserums

(Goodrow und Hammock, 1998, Ballesteros et al., 1998). Die haptenspezifischen Antikörper werden aus der Gesamtfraction der Serumantikörper durch Affinitätschromatographie isoliert. Man erhält eine *polyklonale* Antikörperfraction, die von einer Vielzahl verschiedener B-Zellen produziert wurde und dementsprechend heterogen bezüglich ihrer Affinität (siehe Kap. 2.2.2.5) und Selektivität ist.

Die *Hybridomtechnologie* (Köhler und Milstein, 1975) kann zur Gewinnung *monoklonaler* Antikörperpopulationen genutzt werden. Durch Fusion von B-Zellen mit Tumorzellen und anschließender Selektion der Zellklone, die Antikörper mit der gewünschten Spezifität liefern, lassen sich in Zellkulturen einheitliche Antikörper, in praktisch unbegrenzter Anzahl, produzieren. *Antikörperfragmente* wie *Fab* und *F(ab)₂* lassen sich durch enzymatische Spaltung mit den Proteasen Papain und Pepsin herstellen (Killard et al., 1995). *Fv-Fragmente* (beinhalten nur die variablen Regionen der H- und L-Ketten) sind über *rekombinante* DNA-Technologien zugänglich. Sie erlauben die Modifizierung der Bindungseigenschaften der Antikörper auf der DNA-Ebene in geeigneten Organismen, wie *Escherichia Coli* oder Hefe (Plückthun, 1990, Hock et al., 1995).

2.2.2.3 Antigen-Antikörper-Bindung

Die Bindung eines Antigens an einen Antikörper geschieht über die Ausbildung von vielen *nichtkovalenten Bindungen* zwischen dem Epitop und den Aminosäuren des Paratops. Um repulsive Kräfte zu verringern und gleichzeitig eine vollständige Annäherung der beiden Moleküle zu ermöglichen, welche notwendig ist, um die schwachen attraktiven Kräfte zu optimieren, sind *komplementäre Raumstrukturen* der Wechselwirkungsflächen erforderlich.

Bei der Annäherung eines Antigens an einen Antikörper treten in einem Abstand von ca. 2 - 3 nm makroskopische, unspezifische *repulsive Wechselwirkungen* aufgrund der hydrophilen Natur der beiden solvatisierten Moleküle auf. Sie werden durch van-der-Waals-, Lewis-Säure-Base und elektrostatische Kräfte verursacht. Diese Repulsionskräfte müssen zunächst überwunden werden, bevor eine mikroskopische, spezifische *attraktive Wechselwirkung* zwischen den komplementären Strukturen des Epitops und des Paratops auftreten kann (van Oss, 1995).

Die wichtigsten Kräfte in der primären Attraktion zwischen Epitop und Paratop, die lokal in der Lage sein müssen, die makroskopischen repulsiven Kräfte zu überwinden, sind die weit-

reichenden (3 - 10 nm) hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen. *Hydrophobe Wechselwirkungen* beschreiben die Tendenz von unpolaren oder partiell unpolaren Gruppen oder Molekülen zu aggregieren (van Oss, 1995). Die treibende Kraft für die hydrophobe Anziehung solvatisierter Verbindungen liegt in der freien Enthalpie der Kohäsion von Wasser, welche durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen des ausgeschlossenen Wassers hervorgerufen wird. Der Prozeß kann anschaulich als ein Zusammendrängen der unpolaren Gruppen oder Moleküle durch die umgebenden, partiell durch Wasserstoffbrückenbindungen verbundenen Wassermoleküle beschrieben werden³. Abhängig von der Natur der betrachteten organischen Verbindungen kann die resultierende freie Enthalpie der hydrophoben Wechselwirkung hauptsächlich entropisch, hauptsächlich enthalpisch oder eine Mischung der beiden in jedem beliebigen Verhältnis sein (Mirejovski und Arnett, 1983).

Elektrostatische Coulombwechselwirkungen treten zwischen geladenen Atomen oder Atomgruppen des Epitops und Ionen entgegengesetzter Ladung des Paratops auf. Diese Kräfte sind umgekehrt proportional zu r^2 und der Dielektrizitätskonstanten, welche drastisch abnimmt, wenn Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt werden. Optimale komplementäre Strukturen bestimmen über das Ausmaß der Wasserelimination direkt die Stärke der Wechselwirkung. Zusätzlich werden elektrostatische Kräfte vom pH-Wert und der Ionenstärke des umgebenden Mediums beeinflusst. Diese Eigenschaften lassen sich für eine beschleunigte Dissoziation der Antigen-Antikörper-Komplexe verwenden. Die freie Enthalpie ΔG^0 der Attraktion zwischen einer COO^- und einer NH_3^+ Gruppe beträgt, bei einem Abstand von 0.3 nm und einer Ionenstärke des Mediums von $I = 0.15$, ungefähr -29 kJ/mol (van Oss, 1995).

Erst nach der erfolgten primären Attraktion durch die weitreichenden Wechselwirkungen werden sich die Abstände zwischen Epitop und Paratop soweit verringert haben, daß Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Wechselwirkungen auftreten können. Bei der *Wasserstoffbrückenbindung* teilen sich zwei elektronegative Atome ein Wasserstoffatom. Effektive Wechselwirkung findet dabei nur über eine Distanz von 0.2 - 0.3 nm statt, wobei die Bindung bei linearer Anordnung der drei Atome am stärksten ist. Die präzise Ausbildung des

³ Der Name „hydrophobe Wechselwirkung“ ist etwas irreführend, da hier der Eindruck vermittelt wird, daß eine Abstoßung zwischen hydrophoben Gruppen oder Molekülen und Wassermolekülen besteht. Vielmehr ist hier eine attraktive Wechselwirkung vorhanden, die überwiegend auf van-der-Waals-Kräften beruht ($\Delta G^0 = -4$ kJ/mol). Hydrophobe Verbindungen aggregieren nur deshalb, weil die jeweiligen Wechselwirkungen der Wassermoleküle ($\Delta G^0 = -9$ kJ/mol) und der hydrophoben Gruppen ($\Delta G^0 = -0.2$ kJ/mol) untereinander energetisch begünstigt sind.

erforderlichen Bindungswinkels ist in den meisten Epitop-Paratop-Wechselwirkungen nicht möglich, so daß Wasserstoffbrückenbindungen in der sekundären Bindung eine untergeordnete Rolle spielen. Über 90 % der Wasserstoffbrückenbindungen werden im Paratop von Seitenkettenatomen ausgebildet. Die freie Enthalpie ΔG^0 einer einzelnen Wasserstoffbrückenbindung variiert zwischen -2 kJ/mol und -10 kJ/mol.

Van-der-Waals-Wechselwirkungen existieren zwischen allen Atomen. Sie sind eine quantenmechanische Erscheinung und lassen sich anschaulich als induzierte Dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkung erklären, die durch die Korrelation der Ladungsdichtefluktuationen in den benachbarten Atomen zustande kommt. Mit zunehmender Annäherung der Atome und damit Ausschluß von Wassermolekülen aus der Bindungstasche (siehe hydrophobe Wechselwirkung) wächst die anziehende Wechselwirkung ($\sim r^{-6}$), bis der sogenannte van der Waals Abstand (ca. 0.3 nm) erreicht ist. Danach treten aufgrund der gegenseitigen Durchdringung der Elektronenhüllen (Pauli-Prinzip) abstoßende Kräfte auf ($\sim r^{-12}$). Physikalisch wird diese Wechselwirkung mit dem Lennard-Jones-Potential beschrieben. Betrachtet man eine Wechselwirkungsfläche zwischen Epitop und Paratop von $\approx 0.4 \text{ nm}^2$ bis $\approx 8 \text{ nm}^2$ (Davies et al., 1988), so erreicht die freie Enthalpie der van der Waals Wechselwirkungen, bei vollständigem lokalem Ausschluß von Wasser, Werte von -20 kJ/mol bis -390 kJ/mol (entspricht dem ΔG^0 einer C-C Einfachbindung). Eine exakte Paßform über die gesamte Epitop-Paratop-Wechselwirkungsfläche von $\approx 8 \text{ nm}^2$ wird allerdings in der Realität nie erreicht. Der Wert der freien Enthalpie von $\Delta G^0 \approx -390 \text{ kJ/mol}$ würde eine immens hohe Gleichgewichtskonstante (siehe Kap. 2.2.2.5) für die Epitop-Paratop-Wechselwirkung von $K \approx 5.5 \cdot 10^{67} \text{ l/mol}$ ergeben. Schon eine Monolage Wasser zwischen den Oberflächen reduziert ΔG^0 um 90 % und führt zu einer moderaten Gleichgewichtskonstanten von $K \approx 1.6 \cdot 10^5 \text{ l/mol}$.

An dieser Stelle sollte noch angemerkt werden, daß die Antigen-Antikörper-Bindung nicht streng nach dem klassischen *Schlüssel-Schloß-Prinzip* erfolgt. Danach interagieren zwei rigide Strukturen miteinander, wobei die Erkennung auf einer exakten sterischen und chemischen Komplementarität basiert, ohne daß sich Epitop und Paratop in irgendeiner Weise deformieren. Vielmehr entspricht der Erkennungsprozeß zwischen Antigen und Antikörper dem sogenannten „*induced-fit*“ Modell, wonach konformative Strukturänderungen in einem oder sogar beiden Reaktanden auftreten (Wilson und Stanfield, 1994, Churchill et al., 1994). Dadurch wird die Komplementarität der beiden Strukturen erhöht und die Bildung stabilerer Komplexe ermöglicht.

2.2.2.4 Kreuzreaktivität

Obwohl die Bindungstasche eines Antikörpers aus dem kompletten Satz von 6 CDRs mit insgesamt ca. 50 Aminosäuren besteht, trägt nur etwa ein Drittel der Aminosäuren zu der Wechselwirkung mit dem komplementären Epitop bei. Da über zwei Drittel der Aminosäuren nicht an der Epitop-Paratop-Wechselwirkung beteiligt sind, wird die strukturelle Beziehung zwischen einem Antikörper und einem Antigen nie von einer exklusiven Natur sein. Vielmehr ist zu erwarten, daß Antikörper multispezifisch und sogar polyfunktionell sind. *Multispezifisch* sind Antikörper, die in der Lage sind, eine Reihe von Epitopen zu erkennen, die einige strukturelle Gemeinsamkeiten mit dem Antigen besitzen, welches für die Immunisierung verwendet wurde (Roberts et al., 1993). Das homologe Antigen wird in der Regel vom Antikörper stärker gebunden als die heterologen Antigene (Harper et al., 1987, Piehler et al., 1997). Der Ausdruck *polyfunktionell* wird für Antikörper verwendet, die strukturell nicht verwandte Epitope binden (Richards et al., 1975). Dabei können sich die Paratope in der Bindungstasche des Antikörpers überlappen oder vollständig unabhängig voneinander sein. Im häufigeren ersten Fall wird durch die Bindung des einen Epitops das gleichzeitige Binden des zweiten verhindert, während im zweiten Fall beide Epitope simultan durch das Paratop gebunden werden können (Bhattacharjee und Glaudemans, 1978).

Die *Heterospezifität* multispezifischer Antikörper kann in der Analytik von beachtlichem praktischen Nutzen sein. In der Pestizidanalytik werden häufig hoch-kreuzreaktive Antikörper eingesetzt, um den Summenparameter (Grenzwert: 0.5 µg/l) einer Pestizidklasse (z.B. Triazine, Phenylharnstoffe) zu erfassen (Hock, 1995, Winklmaier et al., 1997).

2.2.2.5 Antikörperaffinität

Die Wechselwirkung zwischen Antigen (Ag) und Antikörper (Ak) kann mit Hilfe folgender Reaktionsgleichung beschrieben werden:



wobei $Ag-Ak$ den Antigen-Antikörper-Komplex darstellt; k_{Ass} und k_{Dis} sind die Assoziations- bzw. Dissoziationsratenkonstanten. Die Gleichgewichtskonstante K (häufig auch als Affinitätskonstante oder Bindungskonstante bezeichnet), ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz

$$K = \frac{k_{Ass}}{k_{Diss}} = \frac{c_{Ag-Ak}}{c_{Ag} \cdot c_{Ak}} \quad (47)$$

oder aus der freien Bindungsenthalpie ΔG^0

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (48)$$

wobei c_{Ag} , c_{Ak} und c_{Ag-Ak} die Gleichgewichtskonzentrationen des Antigens, Antikörpers bzw. des Antigen-Antikörper-Komplexes sind. Die Antikörperaffinität spiegelt also die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Epitop und Paratop wider und repräsentiert die kumulativen attraktiven und repulsiven Kräfte dieser Interaktion. Die freie Bindungsenthalpie ΔG^0 biologisch relevanter Affinitätsreaktionen liegt zwischen -20 kJ/mol und -90 kJ/mol und damit deutlich unter der theoretisch möglichen freien Bindungsenthalpie von $\Delta G^0 \approx -390$ kJ/mol, bei optimaler Paßform zwischen Epitop und Paratop (siehe Kap. 2.2.2.3). Die Affinitätskonstanten K liegen damit in einem Bereich zwischen 10^4 l/mol bis 10^{14} l/mol (Steward und Steensgaard, 1983). Die große Schwankungsbreite für K ergibt sich primär aus der breiten Verteilung der Werte der Dissoziationsratenkonstanten k_{Diss} . Diese Werte liegen zwischen 10^4 s⁻¹ für niedrig-affine und 10^{-6} s⁻¹ für sehr hochaffine Systeme (Avidin-Biotin-System). Typische Assoziationsratenkonstanten k_{Ass} befinden sich in einem Bereich zwischen 10^5 l·mol⁻¹·s⁻¹ und 10^8 l·mol⁻¹·s⁻¹ (Karlsson und Roos, 1997). Für Analyte mit Molmassen unter 400 g/mol, wie sie für Pestizide typisch sind ($M \approx 190$ g/mol bis 220 g/mol), werden die hohen Affinitäten von 10^{14} l/mol nicht mehr erreicht. Bedingt durch die kleineren Wechselwirkungsflächen sind mit den CDRs der Paratope wesentlich weniger Kontakte möglich (Chappey et al., 1994). Maximale Affinitätskonstanten für Triazine von bis zu 4.5×10^{10} l/mol wurden von Winklrmair et al. (1997) beschrieben.

Die Kenntnis der Affinitätskonstanten der verwendeten Antikörper ist für die Etablierung immunanalytischer Testverfahren von zentraler Bedeutung. Sie bestimmen die analytische Leistungsfähigkeit des Assays und helfen vor allem bei kompetitiven Testformaten, über die Information der Kreuzreaktivität optimierte Testverfahren aufzubauen (Gerdes, 1997, Ballesteros et al., 1998). Typischerweise werden die Affinitätskonstanten über die Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktanden bestimmt. Hierfür stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, wie z.B. Dialyse, Fluoreszenzlöschung oder -verstärkung, Fluoreszenzpolarisation, Immunopräzipitation oder Ultrazentrifugation und Filtration. Eine ausführliche Beschreibung dieser Techniken findet sich in Steward und Steensgaard (1983).

Monoklonale Antikörper

Eine weitere relativ universell anwendbare Methode, um monoklonale Affinitätskonstanten zu bestimmen, ist die Bestimmung der freien Antikörperkonzentration im Gleichgewicht der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei wird die Bindung des Antikörpers an ein Antigen detektiert, welches auf der Oberfläche eines Transducers immobilisiert ist (siehe Kap. 2.3.1). In Abbildung 2-8 sind die einzelnen Vorgänge des sogenannten Bindungshemmtests schematisch dargestellt. In homogener Lösung wird der Antikörper (Ausgangskonzentration $c_{0,Ak}$) mit dem Antigen (Ausgangskonzentration $c_{0,Ag}$) inkubiert. Nach Erreichen des Gleichgewichts sind die Bindungsstellen der Antikörper teilweise durch das Antigen blockiert und für die nachfolgende Detektion an der festen Phase (Transducer) gehemmt. Nur Antikörper mit freien Bindungsstellen ($c_{Ak,frei}$) können mit den Bindungspartnern an der Transduceroberfläche reagieren. Es kommt zu einer Verarmung der Lösung an der Grenzfläche im Vergleich zum Volumen. In der Diffusionsschicht entsteht ein Konzentrationsgradient, der durch Diffusion von Antikörpern aus der Lösung ausgeglichen wird. Sind an der Oberfläche sehr viele Bindungspartner mit einer hohen Affinität zum Antikörper vorhanden und ist die Assoziationsratenkonstante (k_{Ass}) ausreichend hoch, so ist die Nachlieferung von Antikörpern mit

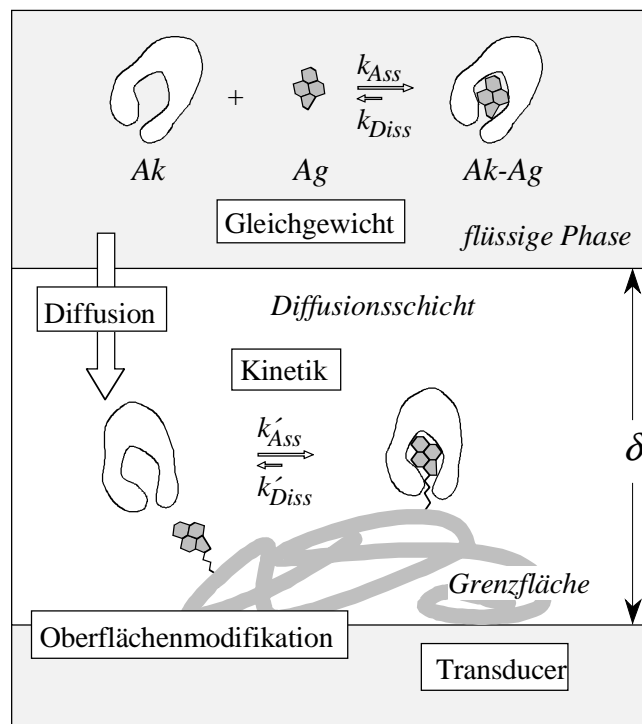


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung der Wechselwirkungsprozesse bei der Detektion der freien Antikörperkonzentration in homogener Lösung (aus Piehler, 1997).

freien Bindungsstellen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion. Man spricht dann von einer massentransport kontrollierten Bindung, bei der die Bindungsrate proportional zur Konzentration der freien Antikörper im homogenen Gleichgewicht ist (Piehler et al., 1997a).

Die im Gleichgewicht vorliegende Anzahl an freien Antikörperbindungsstellen (siehe Gl. (46)) läßt sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableiten. Aus Gl. (47) folgt für monovalente Antikörper

$$K = \frac{c_{Ag-Ak}}{(c_{0,Ag} - c_{Ag-Ak}) \cdot (c_{0,Ak} - c_{Ag-Ak})}. \quad (49)$$

Diese quadratische Gleichung in c_{Ag-Ak} liefert als einzig physikalisch sinnvolle Lösung

$$c_{Ag-Ak} = \frac{c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0,Ak} \cdot c_{0,Ag}}. \quad (50)$$

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung

$$c_{Ak, frei} = c_{0,Ak} - c_{Ag-Ak} \quad (51)$$

ergibt sich für die Konzentration an freien Antikörperbindungsstellen

$$c_{Ak, frei} = \frac{c_{0,Ak} - c_{0,Ag} - \frac{1}{K}}{2} + \sqrt{\frac{(c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0,Ak} \cdot c_{0,Ag}}. \quad (52)$$

Berücksichtigt man die Bivalenz der Antikörper, so wird die Rechnung komplizierter, da im Gleichgewicht neben vollständig belegten, auch einfach besetzte und unbesetzte Antikörpermoleküle vorliegen⁴ (Piehler, 1997b). Nur vollständig belegte Antikörpermoleküle sind blockiert und demnach nicht mehr bindungsfähig. Nach Stevens (1987) kann mit Hilfe einer Binomialverteilung und unter der Annahme, daß die beiden Bindungsstellen unabhängig voneinander besetzt werden, die Konzentration der vollständig belegten Antikörpermoleküle ($c_{Ak, vollst.}$) berechnet werden

$$c_{Ak, vollst.} = c_{Ag-Ak}^2 / 2 \cdot c_{0,Ak} \quad (53)$$

⁴ Im folgenden beziehen sich die Antikörperkonzentrationsangaben auf die Konzentration der Rezeptorstellen d.h. $c_{0,Ak-Moleküle} = c_{0,Ak} / 2$.

Für die bindungsfähigen Antikörpermoleküle (unbesetzt und einfach besetzte) ergibt sich dann

$$c_{Ak, frei} = \frac{c_{0, Ak}}{2} - \frac{c_{Ag-Ak}^2}{2 \cdot c_{0, Ak}} \quad (54)$$

$$c_{Ak, frei} = \frac{c_{0, Ak}}{2} - \frac{\left[\frac{c_{0, Ak} + c_{0, Ag} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{0, Ak} + c_{0, Ag} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0, Ak} \cdot c_{0, Ag}} \right]^2}{2 \cdot c_{0, Ak}} \quad (55)$$

Die graphische Darstellung der freien Antikörperkonzentration $c_{Ak, frei}$ in Abhängigkeit von der eingesetzten Antigenkonzentration $c_{0, Ag}$ ist in Abbildung 2-9 für eine typische Affinitätskonstante von $K = 10^9$ l/mol gezeigt. Zum Vergleich sind auch die jeweiligen Kurven für unendlich hohe Affinitätskonstanten angegeben. Ist die Antikörperkonzentration gegenüber der reziproken Affinitätskonstanten groß, so kann in Gl. (55) der Term $1/K$ vernachlässigt werden, so daß die Lage und Form der erhaltenen Kurve nur noch von $c_{0, Ak}$ abhängig ist. Wenn die Antikörperkonzentration gegenüber der reziproken Affinitätskonstanten klein ist, so wird die Lage und Form der Titrationskurve nur noch von der Affinitätskonstanten bestimmt. Solche Titrationskurven eignen sich daher, um Affinitätskonstanten zu bestimmen.

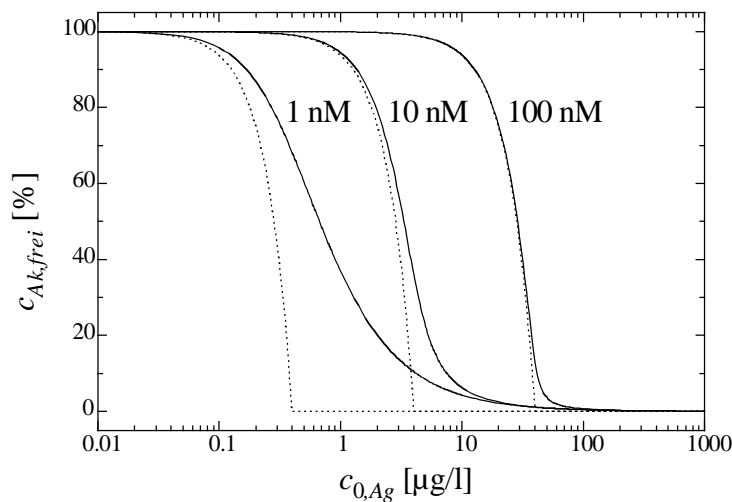


Abbildung 2-9: Berechnete Titrationskurven für bivalente Antikörper (siehe Gl. (55)) mit $c_{0, Ak} = 1$ nM bis 100 nM und $K = 10^9$ l/mol (—) bzw. $K = \infty$ (.....) in Abhängigkeit von der eingesetzten Antigenkonzentration $c_{0, Ag}$ ($M_{Ag} = 200$ g/mol) (aus Piehler, 1997).

Polyklonale Antikörper

Die Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern ist aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Affinitätskonstanten nicht ohne weiteres möglich. Erschwerend kommt hinzu, daß die Heterogenität nicht einfach über eine Gauß-Verteilung beschrieben werden kann, sondern häufig eine schiefe oder bimodale Affinitätsverteilung gefunden wird (Steward und Steensgaard, 1983). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist für dieses Problem in der Literatur noch keine adäquate Lösung verfügbar.

In dieser Arbeit werden daher für die polyklonalen Antikörper „mittlere“ Affinitätskonstanten angegeben. Diese entsprechen den Gleichgewichtskonstanten monoklonaler Antikörper, deren Titrationskurven bei gleicher Antikörperkonzentration $c_{0,Ak}$ den gleichen Testmittelpunkt (Antigenkonzentration bei der 50 % der freien Bindungsstellen belegt sind) aufweisen. Für *monovalente Antikörper* ergibt sich für die Bedingung am Testmittelpunkt (TMP)

$$c_{Ak}(TMP) = c_{Ag-Ak}(TMP) = \frac{1}{2}c_{0,Ak} \quad (56)$$

Mit Gl. (47) erhält man für die Affinitätskonstante (Hock, 1997)

$$K = \frac{1}{c_{0,Ag}(TMP) - \frac{1}{2}c_{0,Ak}} \quad (57)$$

Für *bivalente Antikörper* formuliert man analog zu Gl. (56) die Bedingung

$$c_{Ak,vollst.}(TMP) = \frac{1}{2}c_{Ak,Moleküle} = \frac{1}{4}c_{0,Ak} \quad (58)$$

und erhält mit Gl. (53) und Gl. (50) für die Affinitätskonstante den Ausdruck

$$K = \frac{2 + \sqrt{2}}{\sqrt{2} \cdot c_{0,Ag}(TMP) - c_{0,Ak}} \quad (59)$$

Abbildung 2-10 zeigt eine typische Titrationskurve eines bivalenten polyklonalen Antikörpers mit $c_{0,Ak} = 1$ nM und die nach Gl. (55) berechnete Titrationskurve eines bivalenten monoklonalen Antikörpers mit der aus Gl. (59) erhaltenen Affinitätskonstanten.

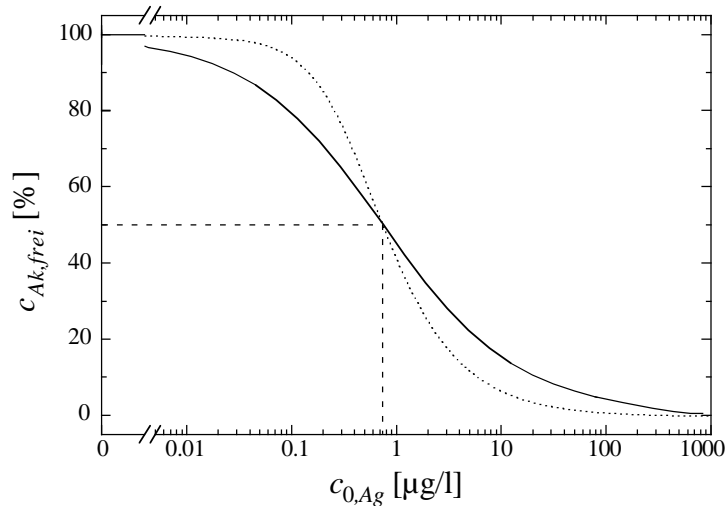


Abbildung 2-10: Typische Titrationskurve eines bivalenten polyklonalen Antikörpers (—) mit einer Konzentration von 1 nM. Die „mittlere“ Affinität entspricht der Gleichgewichtskonstanten eines monoklonalen Antikörpers, dessen Kurve (·····) bei gleichem $c_{0,Ak}$ die polyklonale Titrationskurve am Testmittelpunkt schneidet ($M_{Ag} = 200 \text{ g/mol}$).

Kreuzreaktivitäten

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten (siehe Kap. 2.2.2.4) eines Antikörpers werden für alle zu untersuchenden Analyte Titrationskurven aufgenommen und nach Gl. (55) (monoklonal) bzw. nach Gl. (59) (polyklonal) die Affinitätskonstanten bestimmt. Die Kreuzreaktivität (KR) berechnet sich nach (Hock, 1995)

$$KR[\%] = \frac{K_x}{K_{Ag}} \cdot 100, \quad (60)$$

worin K_{Ag} die Affinitätskonstante des spezifischen Analyten und K_x die Affinitätskonstante des kreuzreagierenden Analyten ist.

2.3 Immunanalytische Testverfahren

Ein immunanalytisches Testverfahren (Immunoassay, IA) ist eine quantitative Technik, die auf der spezifischen Reaktion zwischen einem Antigen (Analyt) und einem Antikörper beruht. Eine allgemeine Darstellung von Immunoassays findet man bei Price und Newman (1997), Chan und Perlstein (1987) und Tijssen (1985).

Immunanalytische Testverfahren können in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die sich in der Art der Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion unterscheiden: (a) Systeme, die

Markierungsmoleküle einsetzen und (b) markierungsfreie (direkte) Systeme (Immunsensoren). Immunsensoren erlauben die unmittelbare Beobachtung von biomolekularen Interaktionen an einer Sensoroberfläche. Ein Wechselwirkungspartner wird an der Oberfläche immobilisiert und die Probe, die den zweiten Partner enthält, mit dieser in Kontakt gebracht. Eine Beeinflussung der Bindungspartner durch die Markierung findet hier nicht statt. Diese Verfahren werden deshalb häufig für kinetische oder thermodynamische Charakterisierungen der Wechselwirkung eingesetzt. In Kap. 2.3.1 findet sich eine Übersicht über die gängigsten Immunsensoren. Anschließend folgt eine kurze Beschreibung der Grundlagen des in dieser Arbeit verwendeten optischen Immunsensors, welcher auf dem Prinzip der Reflektometrischen-Interferenz-Spektroskopie (*RIFS*) basiert.

Markierte Verfahren haben den Vorteil der erzielbaren geringeren Nachweisgrenze. Sie werden daher häufig in der quantitativen Analyse eingesetzt, wenn niedrige Grenzwerte überwacht werden müssen. Entsprechend ihrer Durchführung werden sie in homogene und heterogene Verfahren eingeteilt. Bei heterogenen Assays erfolgt die Unterscheidung zwischen gebundenem und ungebundenem Marker durch eine physikalische Abtrennung der ungebundenen Komponente. Bei homogenen Assays tritt eine Signalmodulation des Markers auf, wenn das markierte Antigen an den Antikörper gebunden hat, verglichen mit dem ungebundenen markierten Antigen. Beide Verfahren haben ihre Stärken und Schwächen (Price und Newman, 1997), so daß das geeignete Verfahren anhand der analytischen Fragestellung ausgewählt werden muß.

2.3.1 Direkte Verfahren

Für die markierungsfreie Detektion biomolekularer Interaktionen sind in den letzten 10 Jahren verschiedenen Techniken beschrieben worden. Favorisiert werden vor allem Verfahren, die auf einer optischen Signaltransduktion beruhen. Kommerziell erhältlich sind Systeme wie BIAcore von „Pharmacia Biosensor“, basierend auf der Detektion der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) (Jönsson und Malmqvist, 1992), IAsys von „Fisons Applied Sensor Technology“, welches die Prismenkoppler-Technik nutzt (Cush et al., 1993, Fortune, 1993) und BIOS-1 von „Artificial Sensing Instruments“ mit einem Gitterkoppler als optischen Transducer (Tiefenthaler, 1993). Diese kommerziellen Methoden detektieren die Änderungen der Brechungsindices auf der Sensoroberfläche mit Hilfe des evaneszenten Feldes. Daneben wurden auch reflektometrische Techniken wie Ellipsometrie (Striebel et al., 1994) und die

Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie (*RIfS*) (Gauglitz et al., 1993) beschrieben. Einen vergleichenden Überblick über diese Techniken findet man bei Brecht und Gauglitz (1995 und 1997) und Gauglitz (1996).

Die Charakterisierung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen (siehe Kap. 2.2.2.5) wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von *RIfS* durchgeführt. Im folgenden werden die Grundlagen von *RIfS* kurz beschrieben. Detailliertere Ausführungen findet man bei Gauglitz et al. (1993).

2.3.1.1 Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie (*RIfS*)

Bei *RIfS* wird die Interferenz von weißem Licht an dünnen Schichten ausgenutzt, um die optische Schichtdicke von dünnen transparenten Filmen zu bestimmen. Trifft weißes Licht auf die Grenzfläche zweier Medien mit verschiedenen Brechungsindices, dann wird dieses teilweise reflektiert (siehe Abbildung 2-11). Bei Filmen entstehen Mehrfachreflexionen an jeder Grenzschicht, wobei im Falle von kleinen Reflektivitäten (< 0.05) nur die erste Reflexion eine nennenswerte Rolle spielt. Zwischen den reflektierten Teilstrahlen entsteht eine Phasendifferenz $\Delta\varphi$

$$\Delta\varphi = \frac{2nd}{\lambda} + \varphi_{refl}, \quad (61)$$

wobei n den Brechungsindex und d die physikalische Schichtdicke des Films, λ die Wellenlänge des einfallenden Lichts und φ_{refl} die Phasenänderung bei Reflexion an der Phasengrenze darstellt. Die reflektierten Teilstrahlen überlagern sich und interferieren, sofern die Kohärenzbedingungen erfüllt sind. Durch konstruktive und destruktive Interferenz erhält man eine wellenlängenabhängige Modulation des reflektierten Lichts (siehe Abbildung 2-11 b). Für senkrechten Lichteinfall, nichtabsorbierende Schichten, geringe Reflektivitäten und falls keine Phasensprünge bei der Reflexion auftreten, gilt für die Intensität I des reflektierten Lichts:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(4\pi nd / \lambda), \quad (62)$$

wobei I_1 und I_2 für die Intensitäten der reflektierten Teilstrahlen der beiden Grenzflächen stehen. Aus dem Reflexionsspektrum kann die Schichtdickenänderung mit einer Auflösung von ca. 1 pm (entspricht 0.1 % einer Protein-Monolage) bestimmt werden. Dies entspricht einer Nachweisgrenze von ca. 20 pmol/l Antikörper (Piehler et al., 1997a). Die zehnfache Konzentration der Nachweisgrenze, entsprechend einer Antikörperkonzentration von 0.2 nM,

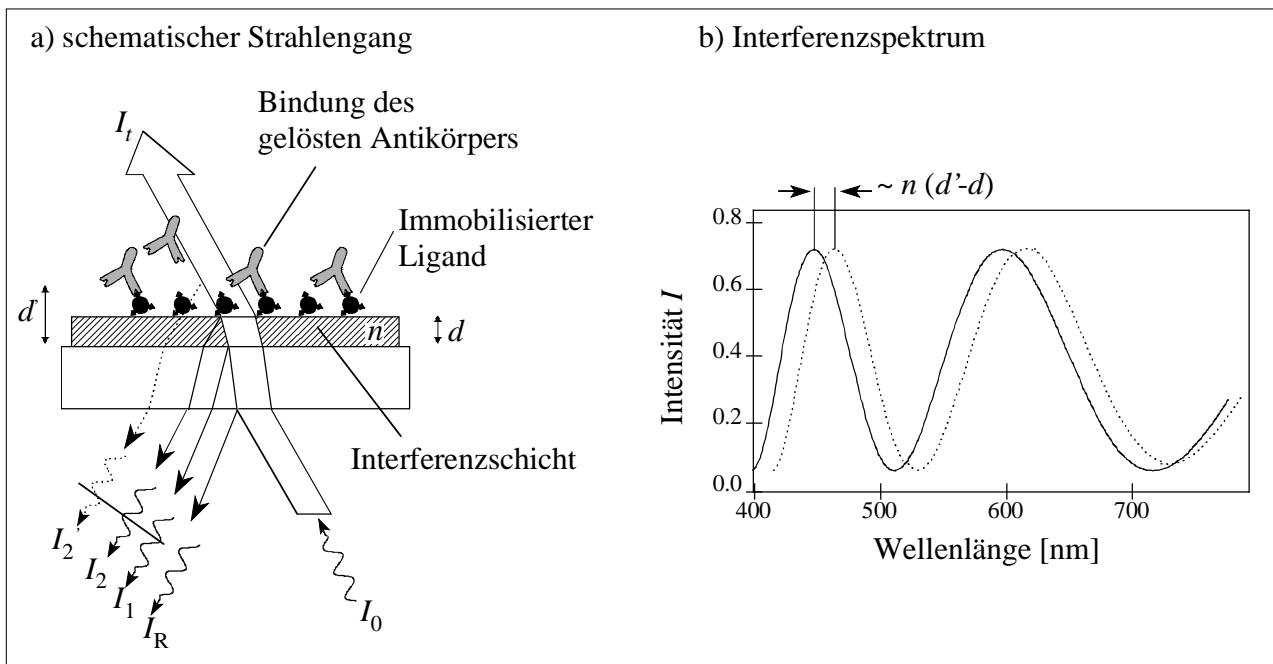


Abbildung 2-11: Prinzip der Reflektometrischen-Interferenz-Spektroskopie (RIfS): Die Überlagerung von zwei an jedem Phasenübergang teilreflektierten Strahlen (I_1 und I_2 bzw. I_2') führt in Abhängigkeit von der Phasendifferenz zu einer konstruktiven oder destruktiven Interferenz (a). Die Weißlichtinterferenz moduliert mit der Wellenlänge (b), wobei eine Schichtdickenänderung, hervorgerufen durch Bindung des Rezeptors an den immobilisierten Liganden, eine Verschiebung des spektralen Interferenzmusters zur Folge hat.

wird für die Durchführung einer Titration benötigt. Dies erlaubt die Bestimmung von Antikörperaffinitäten mit Hilfe des in Kap. 2.2.2.5 beschriebenen Bindungshemmtests von bis zu $10^{10} - 10^{11} \text{ M}^{-1}$.

2.3.2 Markierte Verfahren

Eine weitere Klassifizierung der markierten Verfahren ist aufgrund der Testformate möglich. Prinzipiell unterscheidet man zwischen *kompetitiven* und *nicht-kompetitiven* Testformaten (Gosling, 1990). Diese Bezeichnungen stellen kein bestimmtes analytisches Konzept dar, sondern spiegeln lediglich die Tatsache wider, daß abhängig vom Immunoassay-Design die minimale Nachweisgrenze, bei einer möglichst kleinen Antikörperkonzentration (kompetitiv) bzw. bei einer möglichst hohen Antikörperkonzentration (nicht-kompetitiv), erreicht wird (Jackson und Ekins, 1986). Beim *nicht-kompetitiven* Testformat (immunometrische Assays) werden die Analytmoleküle durch einen *hohen Antikörperüberschuß* extrahiert. Dies können entweder auf einem festen Träger (z.B. Mikrotiterplatte) immobilisierte, unmarkierte Antikörper (Abbildung 2-12 Aa) oder in Lösung befindliche markierte Antikörper (Abbildung 2-12

Ab) sein. Nach der Extraktion wird im Fall (Aa) ein zweiter analytspezifischer markierter Antikörper zugegeben, so daß hier ein sogenanntes „Sandwich“ entsteht. In beiden Fällen muß der ungebundene markierte Antikörper durch einen *physikalischen Trennschritt* entfernt werden (*heterogene Verfahren*). Im Fall (Aa) kann dies durch einen einfachen Waschschrift erfolgen, bei (Ab) wird die Trennung mit Hilfe von Immunoabsorbentien (Affinitätsäulen) bewerkstelligt (Freitag et al., 1984). Die Anwendbarkeit des „Sandwich“-Assays (Aa) ist auf Polypeptidanalyte (z.B. Hormone und Tumormarker) mit mindestens zwei antigenen Determinanten beschränkt (Ishikawa, 1987). Die theoretische Nachweisgrenze (NWG_{min}) immunometrischer Assays läßt sich mit Hilfe folgender Gleichung berechnen (Jackson und Ekins, 1986)

$$NWG_{min} = \frac{K_{nb} \cdot 3CV_0}{K_1}, \quad (63)$$

wobei K_1 die Antikörperaffinität, CV_0 den relativen Fehler der experimentellen Bestimmung des Nullwerts⁵ und K_{nb} die Fraktion des unspezifisch gebundenen markierten Antikörpers darstellt. In Abbildung 2-13 sind die NWG_{min} -Werte in Abhängigkeit von der Antikörperaffinität dargestellt, wobei für CV_0 ein Wert von 0.02 und für K_{nb} ein Wert von 0.01 angenommen wurde.

Beim *kompetitiven Testformat* konkurriert eine vorgegebene Konzentration eines markierten Analyten mit dem unmarkierten Analyten (aus der Probe) um eine *begrenzte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen*. Beobachtet werden die durch den Marker besetzten Bindungsstellen (Abbildung 2-12 B). Im Gegensatz zu den immunometrischen Assays, die ausschließlich heterogene Verfahren darstellen, sind kompetitive Assays sowohl als *heterogene* als auch als *homogene* Verfahren durchführbar. Das heterogene Testformat des klassischen Radioimmunoassays (RIA) (Yalow und Berson, 1960) ist in (Ba) dargestellt. Markierter und unmarkierter Analyt konkurrieren hier um die Bindungsstellen eines immobilisierten Antikörpers. (Bb) stellt ein rein homogenes Testformat dar, bei dem die *Signalmodulation* des markierten Analyten detektiert wird. Sowohl homogen als auch heterogen kann das Testformat aus (Bc) durchgeführt werden. Im zweiten Fall wird das Analytderivat nicht markiert, sondern kovalent

⁵ Der experimentelle Fehler beinhaltet die Summe aller zufälligen Fehler, die im Testablauf auftreten. Nicht inbegriffen sind Fehler, die bei der Signalbestimmung auftreten (dies setzt eine unendlich spezifische Aktivität des Markers voraus).

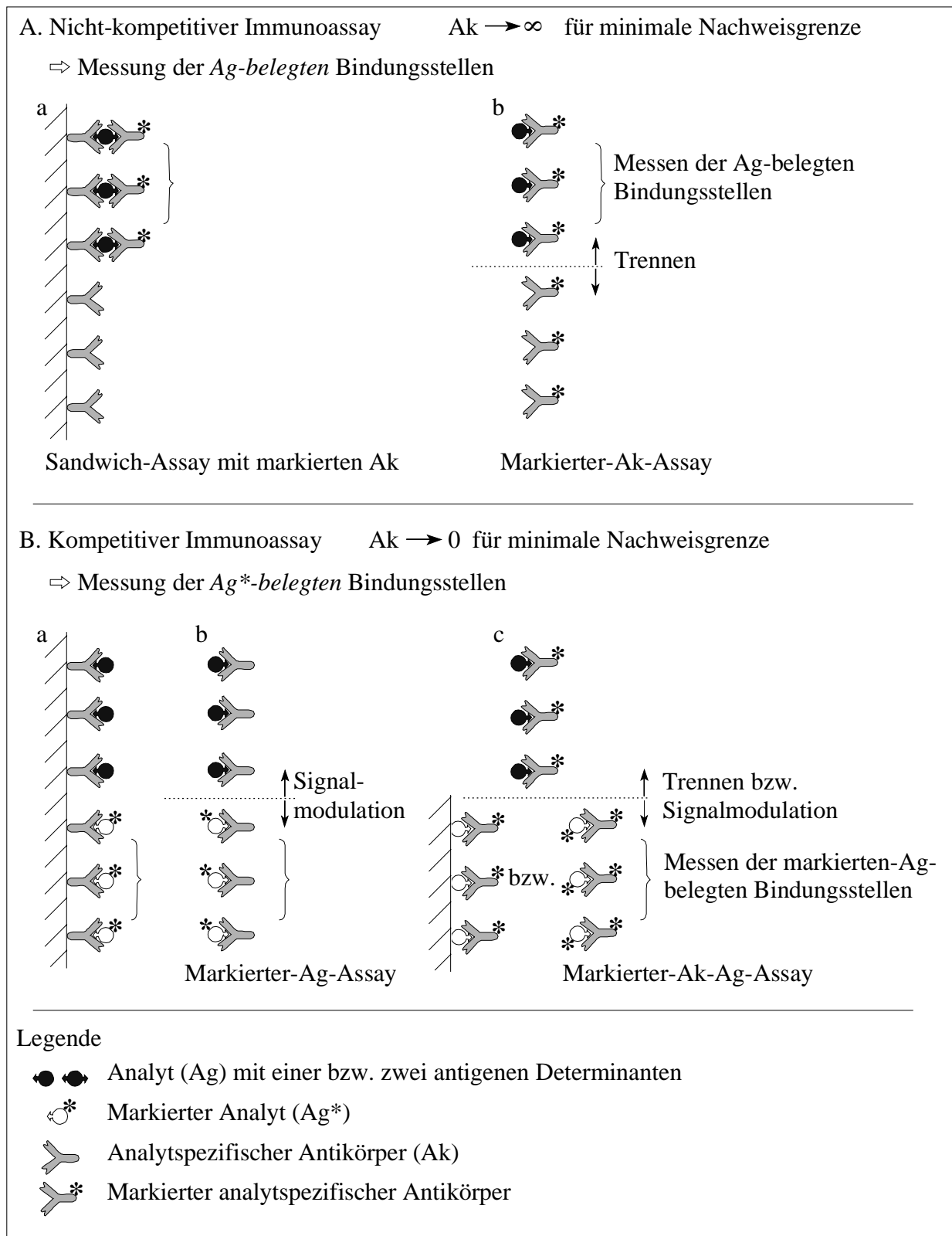


Abbildung 2-12: Grundlegende Immunoassay-Designs. Bei nicht-kompetitiven (heterogenen) Assays (A) werden nach erfolgter Reaktion die durch den Analyten belegten Ak-Bindungsstellen gemessen, während bei kompetitiven (heterogenen und homogenen) Assays (B) die mit dem markierten Analyten belegten Bindungsstellen detektiert werden (nach Ekins, 1989).

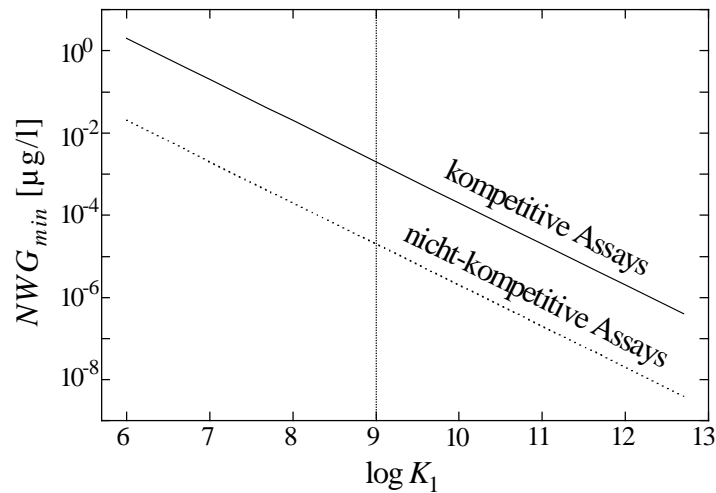


Abbildung 2-13: Theoretische Nachweisgrenzen ($M_{Ag} = 200 \text{ g/mol}$) nicht-kompetitiver (····) und kompetitiver (—) Assays in Abhängigkeit von der Antikörperaffinität (K_1). Beim kompetitiven Assay wurde ein CV_0 -Wert von 0.02 (2 %) angenommen, beim nicht-kompetitiven Assay der gleiche CV_0 -Wert und ein K_{nb} -Wert von 0.01 (1 %). Die typische Antikörperaffinität von $K_1 = 10^9 \text{ l/mol}$ ist durch die senkrechte Linie markiert.

oder adsorptiv an die Oberfläche eines Trägers gekoppelt. Die theoretische Nachweisgrenze (NWG_{min}) kompetitiver Assays läßt sich analog zu Gl. (63) nach

$$NWG_{min} = \frac{3CV_0}{K_1} \quad (64)$$

berechnen (Jackson und Ekins, 1986). K_1 stellt dabei die Antikörperaffinität und CV_0 den relativen Fehler der experimentellen Bestimmung des Nullwerts⁵ dar. In Abbildung 2-13 sind die NWG_{min} -Werte in Abhängigkeit von der Antikörperaffinität dargestellt, wobei für CV_0 ein Wert von 0.02 (2 %) angenommen wurde. Ein Vergleich der Gleichungen Gl. (63) und Gl. (64) macht deutlich, daß bei vergleichbaren CV_0 -Werten die Nachweisgrenze kompetitiver Assays nur durch höhere Affinitätskonstanten gesenkt werden kann, während die Nachweisgrenze immunometrischer Assays zusätzlich durch Reduktion der unspezifischen Bindung des markierten Antikörpers (K_{nb}) verringert wird.

Als Marker werden bei den Immunoassays (IA) neben chemilumineszenten Verbindungen und elektrochemisch aktiven Substanzen hauptsächlich Fluorophore, Enzyme und radioaktive Liganden eingesetzt (Price und Newman, 1997).

2.3.2.1 Heterogene Testverfahren

Heterogene IA stellen die am weitest verbreiteten immunanalytischen Testverfahren dar. Von 1980 bis 1989 nahm der Einsatz und die Entwicklung von heterogenen IA von ca. 40 % auf über 70 % zu, wobei die Mehrzahl dieser Assays (fast 70 %) in der Standardmikrotiterplatte als Testplattform durchgeführt werden (Gosling, 1990). Die erforderlichen *physikalischen Trennschritte* im Testablauf ermöglichen die Einführung von Waschschritten, wodurch störende Matrix-Komponenten vor der Detektion entfernt und somit die Nachweisgrenzen der Assays verbessert werden. Die *höchsten Spezifitäten* weisen die „Sandwich“-Assays auf, da hier die kombinierte Spezifität von zwei Antikörpern, die zwei verschiedene antigene Determinanten eines Analytmoleküls erkennen müssen, für die Signalerzeugung verantwortlich sind. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz haben unter den heterogenen IA die *immunometrischen* Verfahren IRMA, IEMA und IFMA (Testantikörper im Überschuß) die *geringsten Nachweisgrenzen* (10^{-13} - 10^{-14} M, siehe Abbildung 2-13 und Tabelle 2-2), sind aber wegen des hohen Reagenzienverbrauchs gleichzeitig die teuersten IA. Allgemein sind die heterogenen IA aufgrund des *hohen apparativen Aufwands* und der *großen Reagenzienmengen*, die zur Durchführung der IA notwendig sind, wesentlich *teurer* als die vergleichbaren homogenen Verfahren.

Einige wichtige heterogene Testverfahren (welche zum Teil auch kommerziell verfügbar sind) und deren Einordnung in die verschiedenen Testformate (siehe Abbildung 2-12) sind in Tabelle 2-2 vorgestellt. Die Testverfahren, die in der Pestizidanalytik eingesetzt werden, sind mit einem „ja“ gekennzeichnet. Am weitesten verbreitet sind hier Verfahren, die Enzym- bzw. Fluoreszenzmarker einsetzen (Hock, 1995). Angegeben sind auch die jeweiligen erzielten Nachweisgrenzen für Herbizide und im Vergleich dazu die niedrigsten Nachweisgrenzen, die für das entsprechende Testverfahren beschrieben wurden (Werte in Klammern). Eine ausführliche Darstellung der verschiedenen Testformate findet sich in Gosling, (1990).

2.3.2.2 Homogene Testverfahren

Homogene IA haben durch die Abwesenheit von physikalischen Trennschritten den großen Vorteil des *einfachen, schnellen* und auch *automatisierbaren Testablaufs*. Die erforderlichen Geräte, die zur Durchführung dieser IA notwendig sind, beschränken sich auf eine Dispensiereinheit, zur präzisen Dosierung von 2 - 4 Reagenzien, und eine Detektionseinheit. Dies führt, zusammen mit dem *geringen Reagenzienverbrauch* und der Möglichkeit der

Tabelle 2-2: Ausgewählte heterogene Testverfahren und deren Nachweisgrenzen. Angegeben sind die Nachweisgrenzen (NWG), die für Herbizide beschrieben wurden, und in Klammern die minimal erreichten NWG.

Marker	Testformat ¹	Immunoassay (IA) (Akronym)	Pestizide	NWG	Lit.
Radioaktiv	Aa	Immunoradiometrischer-Assay (IRMA)	nein	(10 ⁻¹⁴ M)	(1)
	Ba	Radioimmunoassay (RIA)	ja	4·10 ⁻¹⁰ M (6·10 ⁻¹² M)	(2)
Enzym	Aa	Immunoenzymmetrischer-Sandwich-Assay (IEM“S“A bzw. ELISA)	nein	(10 ⁻¹³ M)	(3)
	Ab	Affinitätssäule-vermittelter Immunoenzymmetrischer-Assay (ACMIA)	nein	(10 ⁻¹⁰ M)	(4)
	Ba	Enzymimmunoassay (EIA)	ja	10 ⁻⁹ - 10 ⁻¹¹ M (10 ⁻¹¹ M)	(5)
	Bc-heterogen	Enzymimmunoassay (EIA)	ja	10 ⁻⁹ - 10 ⁻¹⁰ M (10 ⁻¹¹ M)	(6)
Fluorophor	Aa	Immunofluorimetrischer-Assay (IFMA) z.B. DELFIA ² - Wallac Ltd	nein	(10 ⁻¹³ M)	(7)
	Ba	Fluoroimmunoassay (FIA)	ja	2·10 ⁻¹⁰ M	(8)
	Bc-heterogen	Fluoroimmunoassay (FIA) z.B. FIAgen ³ - CyberFluor Inc	ja	10 ⁻⁹ -10 ⁻¹⁰ M (10 ⁻¹⁰ M)	(9)

¹ Angaben beziehen sich auf Abbildung 2-12; ² Dissoziationsverstärkter-Lanthanoid-Fluoreszenz-Immunoassay; ³ Zeitaufgelöster-Fluoreszenz-Immunoassay.

Literatur: (1) Hourd und Edwards, 1989; (2) Yalow und Berson, 1960; Fatori und Hunter, 1980; (3) Ishikawa, 1987; Buscarlet et al., 1999; (4) Freytag et al., 1984; (5) Van Weemen und Schuurs, 1971; Matuszczyk et al., 1996; Winkelmaier et al., 1997; Van Emon und Lopez-Avila, 1992; (6) Henderson, 1995; Goodrow et. al., 1990; (7) Soini und Kojola, 1983; (8) Hemmilä, 1985; Reimer et al., 1998; (9) Reichstein et al., 1988; Papanastasiou-Diamandi et al, 1988; Wortberg und Cammann, 1993.

Miniaturisierung bis in den Bereich unter 1 µl, zu einer drastischen *Reduktion der Kosten*, verglichen mit denen der heterogenen IA. Die größte Limitierung der homogenen IA ist die *höhere Nachweisgrenze* im Vergleich zu den äquivalenten heterogenen IA. Hauptursache

hierfür sind die häufig *geringe Signaldynamik*, verursacht durch Interferenzen, und hohe Hintergrundsignale der zum Teil komplexen Probenmatrices, v.a. im Bereich der klinischen Diagnostik (Soini und Hemmilä, 1979). Bei umweltrelevanten Proben, wie z.B. Trinkwässern, spielen störende Matrixkomponenten eine nur untergeordnete Rolle (Matveeva et al, 1997) und die Hintergrundsignale können durch geeignete Marker und Detektionsmethoden minimiert werden (siehe Kap. 2.4). Kombiniert mit der *hohen Präzision*, welche bei homogenen „mix & measure“ IA erreichbar ist (v.a. wenn automatisiert), sind Nachweisgrenzen von bis zu 10^{-11} M realisierbar.

In Tabelle 2-3 sind die wichtigsten Vertreter der homogenen IA aufgeführt.

Tabelle 2-3: Ausgewählte homogene Testverfahren und deren Nachweisgrenzen. Angegeben sind die Nachweisgrenzen (NWG), die für Herbizide beschrieben wurden, und in Klammern die minimal erreichten NWG.

Marker	Testformat ¹	Immunoassay (IA) (Akronym)	Herbizide	NWG	Lit
Radioaktiv	Bc homogen	Scintillation-Proximity-Assay (SPA)	nein	$(10^{-11}$ M)	(1)
Enzym	Bb	Enzymvermittelte-IA (EVIA)		$(10^{-9}$ M)	
		Enzyme-Multiplied-IA (EMIT [®])	ja	$5 \cdot 10^{-9}$ M	(2)
		Cloned-Enzyme-Donor-IA (CEDIA [®])	ja ²	$2 \cdot 10^{-8}$ M	(3)
Fluorophor	Bb	Fluoreszenz-Polarisations-IA (FPIA)	ja	$4 \cdot 10^{-10}$ M	(4)
		Fluoreszenz-Modulations-IA (FMIA)		$(3 \cdot 10^{-11}$ M)	
		Verstärkung (FEIA)	ja	10^{-9} - $3 \cdot 10^{-11}$ M	(5)
		Quenching (FQIA)	ja	10^{-7} M	(6)
	Bb	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-IA (FCS-IA)	nein	$(10^{-12}$ M)	(7)
Bc homogen	Resonanter-Energie-Transfer-IA (RETIA)	nein	$(10^{-10}$ M)	(8)	
	Zeitaufgelöst (HTRF [®] und LANCE [™])		$(10^{-11}$ M)	(9)	

¹ Angaben beziehen sich auf Abbildung 2-12. ² Analyt: Trinitrotoluol (TNT).

Literatur: (1) Bosworth und Towers, 1989; Udenfriend et al., 1987; (2) Rubenstein et al., 1972; Beresini et al, 1993; Zherdev et al., 1997; (3) Engel und Khanna, 1992; Dosch et al., 1998; (4) Dandliker und de Saussure, 1970; Önerford et al, 1998; (5) Smith, 1977; Aguilar-Caballo et al., 1999; (6) Kobayashi et al., 1980; Chang et al., 1995; Matveeva et al., 1996; (7) Rigler, 1995; (8) Ullman et al., 1976; (9) Mathis, 1993; Kolb et al., 1996; Stenroos et al., 1998.

Alle Testverfahren sind *kompetitiv* und werden hauptsächlich zur Detektion von *niedermolekularen Analyten* (Haptene) eingesetzt. In der klinischen Diagnostik haben sich die enzymvermittelten IA EMIT[®] von „Syva/Behring“ und CEDIA[®] von „Microgenics“ wegen der geringen Kosten und der leichten Integration in bereits vorhandene Detektionssysteme behaupten können (Gorman et al., 1997). Die EVIA-Verfahren werden auch in der Umweltanalytik mit Nachweisgrenzen im nanomolaren Bereich erfolgreich eingesetzt.

Einen großen Boom erfahren homogene Testverfahren derzeit in der *pharmazeutischen Industrie* im Bereich der Leitstruktur- und Wirkstoffsuche. Hier wird gegenwärtig die herkömmliche Methode des rationalen Wirkstoffdesigns durch einen neuen hocheffizienten Ansatz, dem Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening, HTS) kombinatorischer Bibliotheken, verdrängt (Wikel und Higgs, 1997, Gallop et al., 1994). Vor allem Assays, die auf der Detektion von radioaktiven oder Fluoreszenz-Markern beruhen, wie der SPA von „Amersham“, der HTRF[®] von „Packard“, der LANCE[™] von „EG&G[®] Wallac“ und „Advant“ und die FCS von „Evotec“, haben hier breite Anwendung gefunden. Diese Assays zeichnen sich durch geringe Hintergrundsignale aus und erreichen Nachweisgrenzen von ca. 10^{-11} M. In der Umweltanalytik sind sie jedoch noch nicht eingesetzt worden.

Einen großen Einsatzbereich hat der FPIA in der klinischen- und in der Umwelt-Analytik gefunden. Er eignet sich hervorragend für die Detektion niedermolekularer Analyte und zeigt eine ausgezeichnete Präzision und Reproduzierbarkeit.

2.3.2.3 Vergleich der homogenen und heterogenen IA

In Tabelle 2-4 sind die homogenen und heterogenen IA zusammenfassend gegenübergestellt. Zum Vergleich sind hier auch die Eigenschaften der chromatographischen Verfahren aufgeführt. Hinsichtlich der Nachweisgrenze, der Analysendauer, der Fachkenntnis des Personals und der Gerätekosten sind hier wesentliche Nachteile der konventionellen Analytik festzustellen, während die Möglichkeit, mehrere Analyte gleichzeitig zu untersuchen, einen großen Vorteil darstellt.

Tabelle 2-4: Vergleich von homogenen IA mit heterogenen IA und chromatographischen Verfahren¹.

	Homogene Immunoassays	Heterogene Immunoassays	Chromatographische Verfahren
Spezifität	0	+ ²	+
Nachweisgrenze	+	+ + ²	-
Präzision	++	+	+
Mehrere Analyte	-	-	++
Automatisierbar	+	0	0
Miniaturisierbar	++	-	-
Analysendauer	++	-	--
Fachkenntnis	+	0	--
Kosten: Reagenzien	+	-	++
Kosten: Gerät	+	0	--

¹ +, Vorteil; -, Nachteil; 0, Ausgeglichen. ² gilt v.a. für Sandwich-Assays.

2.3.3 Miniaturisierung immunanalytischer Systeme

Die Miniaturisierung analytischer Prozesse war in den letzten 10 Jahren, vor allem im klinischen und pharmazeutischen Bereich, Gegenstand intensiver Forschung und Entwicklung. Die Triebkraft dieses allgemeinen Trends der Reduktion der Probenvolumina stammt aus der Erkenntnis der *schnelleren, einfacheren* und *kostengünstigeren* Verfügbarkeit der Meßergebnisse und aus dem Bedarf der pharmazeutischen Industrie nach *miniaturisierten, hoch parallelisierten Assays* für die Wirkstoffsuche. Drei Haupttypen miniaturisierter analytischer Techniken haben sich herauskristallisiert (Kricka, 1998):

- Testplattformen mit hoher Kavitätendichte,
- Oberflächenmikroarrays und
- Mikrochips.

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der Miniaturisierung immunanalytischer Systeme mit Hilfe von Testplattformen mit hoher Kavitätendichte untersucht. Im folgenden Abschnitt sind daher die wichtigsten Aspekte dieser Technik aufgeführt. Eine kurze Darstellung des Prinzips der Oberflächenmikroarrays und Mikrochips bei der immunanalytischen Applikation und weiterführende Literatur findet sich in Tabelle 2-5.

Tabelle 2-5: Immunanalytische Anwendung der Oberflächenmikroarrays und Mikrochips.

Miniaturisierte analytische Technik	Prinzip (immunanalytische Anwendung)	Literatur
Oberflächenmikroarray (Spotdurchmesser: 10 µm - 100 µm)	Ortsaufgelöste Immobilisierung von Antikörpern: Assay Typ ¹ : Aa und Ba	Ekins und Chu, 1991, Ekins, 1998, Silzel et al., 1998
Mikrochip (Typische Chipgröße: 1.5 cm × 6 cm)	Integration miniaturisierter analytischer Komponenten: Mikro-Kapillarelektrophorese	Chiem und Harrison, 1997, Koutny et al., 1996

¹ Die angegebenen Assay-Typen beziehen sich auf Abbildung 2-12.

Testplattformen mit hoher Kavitätendichte

Das herkömmliche Mikrotiterplattenformat mit 96 Kavitäten wird gegenwärtig durch Probenträger mit *höherer Kavitätendichte* und *geringeren Volumina* ersetzt (Schullek et al., 1997, Houston und Banks, 1997). Die Entwicklung geht über Platten mit 384, 1536, 9600 bis zu 20000 Kavitäten mit Volumina von 50 µl bis 50 nl (Kricka, 1998, Schober et al., 1997) (siehe Abbildung 1-1). Im HTS werden die Platten mit 384 und 1536 Kavitäten bereits als neue Standardformate akzeptiert, wobei es derzeit keinen Konsens über die optimale Kavitätendichte oder Volumina gibt. Pantano und Walt (1996) und Michael et al. (1998) haben bereits die Möglichkeit beschrieben, Nanowell-Arrays mit einem Kavitätenradius von 125 nm, einer Dichte von $3.6 \cdot 10^8$ Kavitäten/cm² (entspricht $3.5 \cdot 10^{10}$ Kavitäten auf der Grundfläche einer Mikrotiterplatte) und einem Volumen von $3 \cdot 10^{-18}$ l pro Kavität herzustellen.

Eine entscheidende Voraussetzung für den Einsatz mikrominiaturisierter Testplattformen ist die Fähigkeit, *kleinste Flüssigkeitsmengen* im Bereich von wenigen Nanolitern *reproduzierbar zu dosieren* und zielgenau in die Plattenkavitäten abzusetzen. Hierfür wurden eine Reihe von neuen *Mikrodosiersystemen* entwickelt, die nach dem Prinzip des Tintenstrahldruckes arbeiten. Drei verschiedene Aktoren werden dabei als Antriebmodule eingesetzt: *thermische* (Lee et al., 1998), *magnetische* (Lemmo et al., 1997) und *piezoelektrische Aktoren* (Nilsson et al., 1993, Schober et al., 1993, Fischer-Frühholz, 1997).

Verschiedene immunanalytische Testverfahren wurden in die miniaturisierten Kavitäten transferiert. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um die in Tabelle 2-3 beschriebenen waschfreien, *homogenen Testverfahren*. Die Implementierung dieser Assays in die 1536-Platte mit Volumina von 1 µl ist Gegenstand aktueller Forschung und wird in den Tagungsbänden der

jährlich stattfindenden Konferenzen über „Miniaturization Technologies“ von IBC (1998 - 1999) und „Biomolecular Screening“ von der SBS (1995 - 1999) dokumentiert. Bis heute wurden nur sehr wenige *heterogene Assays* in Mikrokavitäten durchgeführt. Hier wurde eine Reduktion der Testvolumina auf 5 μl von Härmä et al. (1999) für einen Mikropartikel basierten IFMA (DELFI, Testformat: Aa, siehe Abbildung 2-12) beschrieben. Eine weitere Verringerung der Volumina auf 2 μl wurde von Dzgoev et al. (1996) und (1997) für einen EIA (Testformat: Bc-heterogen, siehe Abbildung 2-12) für den Analyten 2,4-D erreicht. Limitierend waren bei diesem Ansatz Verdunstungsprobleme und vor allem Kontaminationen benachbarter Kavitäten. Die Durchführung von Immunoassays auf mikrostrukturierten Probenträgern mit Volumina unter 1 μl ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden. In diesem Bereich wurde lediglich eine Säure-Base Titration von 9 nl H_2SO_4 mit 18 nl NaOH auf einem formatfreien Träger durchgeführt (Litborn et al., 1998).

2.3.4 Fluorophore für homogene Fluoroimmunoassays

Die Signaldynamik und damit die Nachweigrenze homogener Fluoroimmunoassays hängt entscheidend von dem *Hintergrundsignal* der Probe ab. Störungen des Meßsignals durch Streuung, Hintergrundfluoreszenzen und Löschung, kann die theoretische Nachweisgrenze von Fluorezenzmessungen um einen Faktor von 100 bis 1000 verringern (Soini und Hemmilä, 1979). Die *Streuung* des Anregungslichts kann bei IA sowohl durch Proteine (Rayleigh), als auch durch die feste Phase wie z.B. Probenträger oder Küvetten (Tyndall) verursacht werden. Die Rayleighstreuung ist dabei wellenlängenabhängig und skaliert mit $1/\lambda^4$. Rayleigh- und Tyndallstreuung haben die gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht (keinen Stokes-Shift) und besitzen keine Fluoreszenzlebensdauer. *Hintergrundfluoreszenzen* biologischer Komponenten sind in einem Wellenlängenbereich von 350 - 600 nm zu erwarten und haben Lebensdauern im Nanosekundenbereich. Störende Fluoreszenzen können durch eine geeignete Vorbehandlung der Probe mit proteolytischen Enzymen und oxidierenden oder denaturierenden Reagenzien verringert werden (Ullman und Khana, 1981). Ursachen für die *Löschung* der Fluorophore können Änderungen im pH, der Polarität (Lösungsmittelleffekte), des Oxidationsgrades (gelöster O_2) und die Nachbarschaft einer löschenden Gruppe (z.B. Γ^-) oder absorbierenden Gruppe (innerer Filtereffekt oder Energie-Transfer) sein.

Zwei verschiedene Möglichkeiten sind in der Literatur beschrieben worden um die Hintergrundsignale zu minimieren: (I) der Einsatz von *Lanthanoid-Chelaten* (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} ,

Dy³⁺) mit sehr langen Fluoreszenzlebensdauern und (II) Fluorophore die weit im *roten Wellenlängenbereich* absorbieren. Der erste Ansatz nutzt den extrem *großen Stokes-Shift* (>250 nm) und die *langen Lebensdauern* (100 - 1000 µs), um Streuung und Hintergrundfluoreszenzen zu vermeiden (Siitari et al., 1983). Beispiele homogener IA, die Lanthanoid-Chelate als Marker einsetzen, sind der HTRF[®] und LANCE[™] (siehe Tabelle 2-3). Der zweite Ansatz macht sich die *geringe Streuung* und *Hintergrundfluoreszenz* im Wellenlängenbereich > 600 nm zu nutze (Cullander, 1994). Vor allem Cyanin-Farbstoffe mit Absorptionsmaxima von 635 nm bis 1100 nm wurden hierfür synthetisiert. Beispiele sind Heptamethin-Cyanin (Narayanan et al., 1995), Squarin-Cyanin- (Terpetschnig et al., 1994) und Sulfoindo-Cyanin-Farbstoffe (Southwick et al., 1989, Mujumdar et al., 1993, Mujumdar et al., 1996). Diese Fluorophore wurden bereits erfolgreich in Fluoreszenz-IA eingesetzt (Williams et al., 1997, Wadkins et al., 1998, Klotz et al., 1998). In dieser Arbeit wurden langwellige Sulfoindo-Cyanin-Farbstoffe als Marker verwendet.

2.4 Markierung von Proteinen

Beim RETIA ist die Fluoreszenzmarkierung des verwendeten Antikörpers und eines Analytderivates erforderlich. Analytderivate können dabei *direkt kovalent* oder *indirekt* über ein Trägerprotein (z.B. Rinderserum Albumin, BSA) mit den Fluorophoren verknüpft werden. Die indirekte Markierung hat den Vorteil der einfacheren Synthese und Reinigung der Konjugate. Die Kupplungschemie ist dabei für Analytderivate und Fluorophore identisch.

Reaktive Aminosäuren

Wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit von Protein-Farbstoff-Konjugaten in immunanalytischen Testverfahren ist eine *stabile, kovalente* Protein-Fluorophor-Bindung und eine *unverminderte Bindungsfähigkeit* der markierten Antikörper. Die chemische Modifikation der Proteine muß also unter milden Reaktionsbedingungen stattfinden, um Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur, welche durch pH- oder Temperaturfluktuationen oder durch Detergentien hervorgerufen werden können, zu vermeiden. Weiterhin dürfen diejenigen funktionellen Gruppen der Proteine nicht markiert werden, welche für die strukturelle Stabilität der Proteine verantwortlich sind (z.B. Disulfidbrücken im Cystin). In Tabelle 2-6 sind sieben Aminosäuren angegeben, die an ihren Seitenketten derivatisiert werden können (Brinkley, 1992). Diese Reste enthalten *sechs funktionelle Gruppen*, die prinzipiell eine ausreichende

Reaktivität besitzen, um bei milden Bedingungen modifiziert zu werden. Zusammen mit den N-terminalen α -Amino- und C-terminalen α -Carboxylgruppen stellen sie das komplette Repertoire der Polypeptidreaktivität dar (Hermanson, 1996). Die am häufigsten genutzten funktionellen Gruppen zur Darstellung von Konjugaten sind die *aliphatischen Amino-* und die *Thiolgruppen*. Ihre Reaktivität bei nukleophilen Substitutionen oder Additionen hängt entsprechend der Henderson-Hasselbalch Gleichung (Gl. (65)) entscheidend vom *pH*-Wert der Lösung ab

$$pH = pK_a + \log \frac{[Base]}{[Säure]} \quad (65)$$

Bei $pH = pK_a$ sind genau 50 % der nukleophilen Gruppen deprotoniert (Base). Die deprotonierte Form ist das stärkere Nukleophil und kann somit effizienter die Additions- bzw. Substitutionsreaktion durch den Angriff an eine elektrophile Gruppe einleiten. In Tabelle 2-6 sind die pK_a -Werte der relevanten Aminosäuren angegeben.

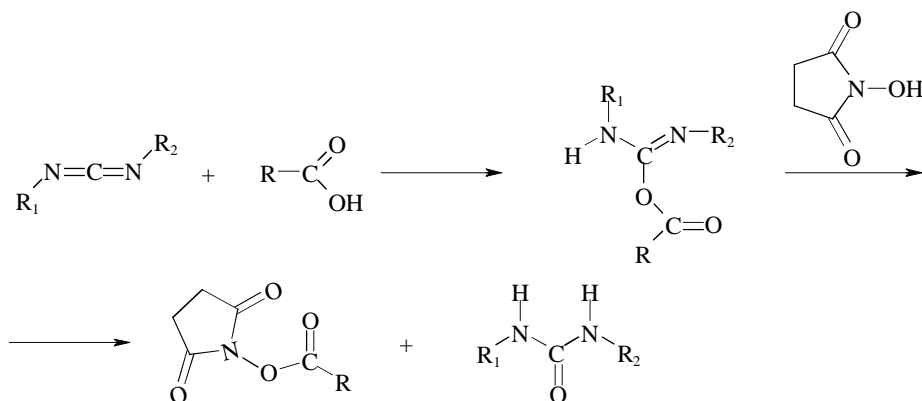
Tabelle 2-6: Reaktive Gruppen von Aminosäuren, die zur Markierung von Proteinen verwendet werden können. Angegeben sind auch die pK_a -Werte der jeweiligen Aminosäuren und die Reaktionstypen der reaktiven Gruppen.

Reaktive Gruppe	Aminosäure (AS)	pK_a -Wert ¹	Reaktionen
Amin (aliphatisch)	Lysin (ϵ -Aminogruppe)	9.3-9.5	Nukleophile Substitution
	N-terminale AS (α -Aminogruppen)	7.6-8	Nukleophile Addition
Thiol (Disulfid)	Cystein (Cystin)	8.8-9.1	Nukleophile Substitution Nukleophile Addition Redox-Reaktionen
Phenol	Tyrosin	9.7-10.1	Nukleophile Substitution Elektrophile Substitution Mannich Kondensation
Carbonsäure	Asparaginsäure	3.7-4	Veresterung
	Glutaminsäure	4.2-4.5	Amidbildung
	C-terminale AS (α -Carboxylgruppen)	2.1-2.4	
Guanidin	Arginin	>12	Nucleophile Addition
Imidazol	Histidin	6.7-7.1	Elektrophile Substitution

¹ pK_a -Werte der freien Aminosäuren. Durch Änderungen in der Mikroumgebung können die Werte erheblich von den angegebenen Werten abweichen.

Reaktive Fluorophore und Analytderivate

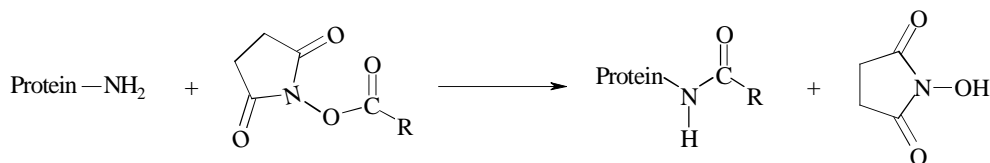
Der Großteil der erhältlichen Fluorophore und Analytderivate besitzen für die Kupplung an die funktionellen Gruppen der Proteine (siehe Tabelle 2-6) *Carboxylgruppen*. Die Methode der Wahl zur Aktivierung von Carboxylgruppen ist die Reaktion mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) in Gegenwart von Carbodiimiden unter Bildung von NHS-Aktivestern:



Je nach Löslichkeit der betreffenden Moleküle lassen sich Carbodiimide mit verschiedenen Resten R₁ und R₂ verwenden, so daß die Reaktion stets in homogener Phase durchgeführt werden kann. In unpolaren Solventien werden hauptsächlich Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Diisopropylcarbodiimid (DIC) verwendet.

Proteinmodifikation mit NHS-Aktivestern

Die NHS-Aktivester reagieren hauptsächlich mit den *aliphatischen* α - und ϵ -Aminogruppen unter Bildung von stabilen *Amidbindungen*. Thiol- und Hydroxylgruppen reagieren auch mit den Aktivestern, jedoch sind die gebildeten Thioester- bzw. Esterbindungen instabil und hydrolysieren in wässriger Lösung. Der optimale *pH*-Bereich für diese Umsetzung wird durch zwei gegenläufige Effekte bestimmt: die Zunahme der Nukleophilie der Aminofunktionen mit steigendem *pH* und die gleichzeitig zunehmende Hydrolyse der Aktivester. Üblicherweise wird diese Reaktion bei $pH = pK_a$ durchgeführt:



2.5 Signalerzeugung und statistische Datenauswertung im Immunoassay

Im kompetitiven Testformat des bereits in Kap. 2.1.5 beschriebenen RETIA (Testformat: Bc-homogen in Abbildung 2-12) konkurrieren eine definierte Konzentration eines *markierten Analyten* mit dem *Analyten aus der Probe* um eine begrenzte Anzahl an *markierten Antikörper-Bindungsstellen* (siehe Abbildung 2-14). Bei niedrigen Analytkonzentrationen wird bevorzugt das mit dem Akzeptor (A) markierte Analytderivat vom Donor (D) markierten Antikörper gebunden (I.), während bei hohen Analytkonzentrationen die Bindungsstellen des Antikörpers vom Analyt belegt werden (II.). Nur im Fall I. sind die Fluorophore nahe genug, um effizient den *strahlungslosen Energie-Transfer* zu ermöglichen. Dadurch wird die Fluoreszenz des Donors *gelöscht* und die Fluoreszenz des Akzeptors *sensibilisiert*.

Variiert man die Konzentration des Analyten, so erhält man bei *halblogarithmischer* Auftragung der in dieser Arbeit beobachteten Fluoreszenzmodulation des Donors gegen die eingesetzte Analytkonzentration eine *sigmoide Kalibrierkurve*. Bei Immunoassays ist es üblich, die gemessenen Kalibrierpunkte durch eine 4-Parameter-logistische Funktion anzupassen. Die allgemeine Form dieser Gleichung lautet (Dudley et al., 1985)

$$y = \frac{a-d}{1+(x/c)^b} + d, \quad (66)$$

wobei y die Fluoreszenzintensität, x die Analytkonzentration, a und d die obere bzw. untere Asymptote, c die Konzentration bei 50 % der maximalen Fluoreszenzintensität (*Testmittelpunkt, TMP*) und b die Steigung am Wendepunkt der sigmoiden Kurve sind.

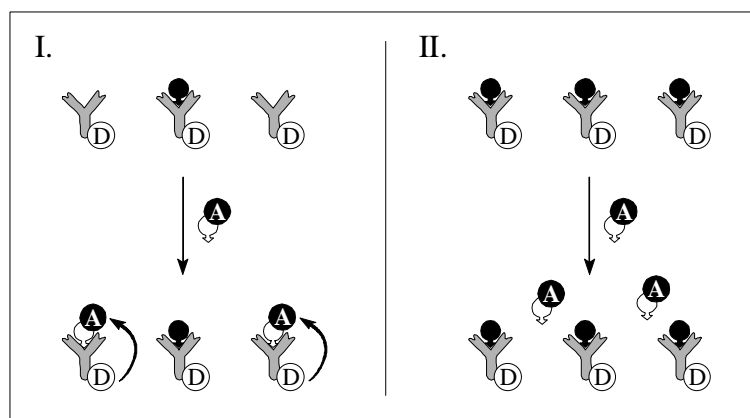


Abbildung 2-14: Testformat des kompetitiven RETIA. I. Niedrige Analytkonzentrationen. II. Hohe Analytkonzentrationen. Der RET vom Donor (D) zum Akzeptor (A) ist durch einen Pfeil symbolisiert.

In Abbildung 2-15 sind schematisch eine Kalibrierkurve mit einer angepaßten Kalibrierfunktion und deren Parameter a , c und d dargestellt. Auf der y-Achse werden entweder die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (I_F), oder normierte, dimensionslose Einheiten von B/B_0 aufgetragen, wobei

$$B/B_0[\%] = \frac{I_F - d}{a - d} \cdot 100 \quad (67)$$

ist (Hock, 1995). Als *Arbeitsbereich* werden häufig die Analytkonzentrationen definiert, die im Bereich zwischen 10 % und 90 % des Signals liegen. Ebenfalls eingezeichnet sind in Abbildung 2-15 die *Konfidenzbänder*, die sich über die *Konfidenzintervalle* (cnf) der zugrundeliegenden Mittelwerte (\bar{y}) der Kalibrierpunkte nach

$$cnf(\bar{y}) = \bar{y} \pm \frac{t(1 - \alpha/2; f) \cdot sd_y}{\sqrt{n}} \quad (68)$$

berechnen lassen und angeben, in welchem Bereich ein Meßwert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α erwartet werden kann (Otto, 1997). t ist dabei der statistische Faktor der STUDENT-Verteilung, sd_y die Standardabweichung, n die Anzahl der Meßwerte und $f = n - 1$ die Anzahl der Freiheitsgrade.

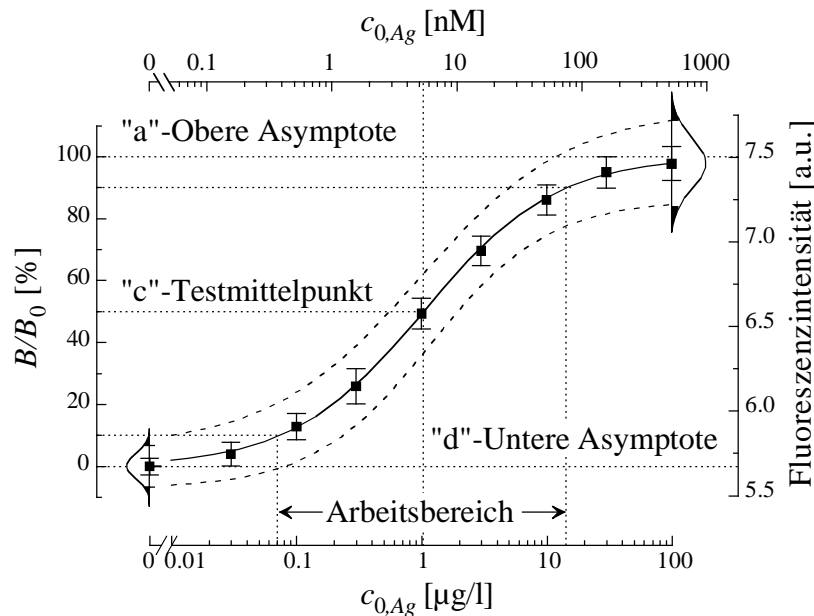


Abbildung 2-15: Schematische Darstellung einer Kalibrierkurve mit angepaßter Kalibrierfunktion (—) und der zugehörigen Konfidenzbänder (---) für $\alpha = 0.05$ und $n=3$. Der Testmittelpunkt ist als 50 % B/B_0 und der Arbeitsbereich als 10 - 90 % B/B_0 definiert.

Weitere analytische Qualitätsparameter

Nachweisgrenze, NWG (limit of detection, LOD): Als NWG wird diejenige Analytkonzentration definiert, die sich aus der Kalibrierkurve aus dem kleinsten detektierbaren Signal y_{dec} (*Erkennungsgrenze, limit of decision*) ergibt. Die Erkennungsgrenze wird, der Definition der IUPAC zufolge (Long und Winefordner, 1983), wie folgt berechnet:

$$y_{dec} = y_B + 3 \cdot sd_B. \quad (69)$$

Dabei ist y_B der Mittelwert der Signalblindwerte und sd_B deren Standardabweichung.

Bestimmungsgrenze, BG (limit of determination): Als BG wird die kleinste Analytkonzentration x_{dtm} bezeichnet, die mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit quantitativ bestimmt und vom Signalblindwert signifikant unterschieden werden kann. In der Signaldomäne wird die BG, y_{dtm} , wie folgt berechnet (Danzer et al, 1987):

$$y_{dtm} = y_B + 6 \cdot sd_B. \quad (70)$$

Präzision (precision): Die Präzision des Verfahrens (zufälliger Fehler) kann in Form der Verfahrensstandardabweichung (oder Variationskoeffizienten, CV) charakterisiert werden. Als weitere Leistungskenndaten ermittelt man die NWG sowie den Arbeitsbereich.

Richtigkeit (trueness): Die Richtigkeit, d.h. die Charakterisierung von systematischen Fehlern einer Analyse, wird mit Hilfe der Wiederfindungsrate (WFR) als Verhältnis des experimentell bestimmten Mittelwertes zum wahren Wert (x_w) angegeben. In Prozent ausgedrückt gilt:

$$WFR(\%) = \frac{\bar{x}}{x_w} \cdot 100. \quad (71)$$

Bestimmung der Konzentration einer unbekannt Probe

Die Konzentration (\bar{x}), das Konfidenzintervall ($cnf(\bar{x})$) und die Standardabweichung (sd_x) einer *unbekannten Probe* können, mit Hilfe der Kalibrierkurve, aus den gemessenen Werten der Signaldomäne (\bar{y} , und sd_y), bestimmt werden. Die Standardabweichung (sd_x) läßt sich nach

$$sd_x = \frac{sd_y}{|y'|} \quad (72)$$

berechnen, wobei y' die Steigung der Tangenten an die Kalibrierfunktion im Punkt \bar{y} ist (Dudley, 1985).

Abbildung 2-16 veranschaulicht graphisch das Prinzip der Bestimmung von sd_x . Das Konfidenzintervall $cnf(\bar{x})$ kann aus sd_x mit Hilfe der Gleichung Gl. (68) berechnet werden. Man erhält aufgrund der Tangentennäherung ein symmetrisches Intervall. Die graphische Ermittlung von $cnf(\bar{x})$ analog der Darstellung in Abbildung 2-16 liefert aufgrund der sigmioden Kalibrierfunktion, mit Ausnahme von Punkten am TMP, unsymmetrische Intervalle.

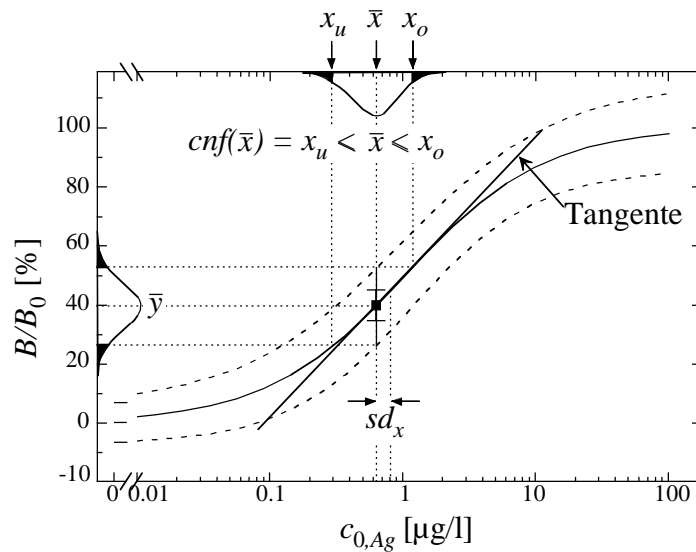


Abbildung 2-16: Darstellung des Prinzips zur Ermittlung der Standardabweichung sd_x und des Konfidenzintervalls $cnf(\bar{x})$ einer unbekannt Probe.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Arbeitsbereichs ergibt sich aus der Auftragung der relativen Standardfehler $se_x/c_{0,Ag}$, mit $se_x = sd_x/\sqrt{n}$ gegen die entsprechende Analytkonzentration. Man erhält dadurch das sogenannte *Präzisionsprofil*, welches die Präzision der Meßmethode bei jeder Konzentration angibt, jedoch nichts über dessen *Richtigkeit* aussagt (Ekins, 1997). Der Arbeitsbereich wird nun als die Analytkonzentrationen definiert, welche einen bestimmten $se_x/c_{0,Ag}$ -Wert unterschreiten. Nach Horwitz et al. (1980) dürfen die CV in der Konzentrationsdomäne bei $c_{0,Ag} = 0.1 \mu\text{g/l}$ nicht über dem Wert von 43 % ($se_x/c_{0,Ag} = 25 \%$, bei $n = 3$) und bei $c_{0,Ag} = 1 \mu\text{g/l}$ nicht über 30 % ($se_x/c_{0,Ag} = 17 \%$, bei $n = 3$) liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde unabhängig von der Konzentration ein oberer Grenzwert von $se_x/c_{0,Ag} = 20 \%$ festgelegt (siehe Abbildung 2-17).

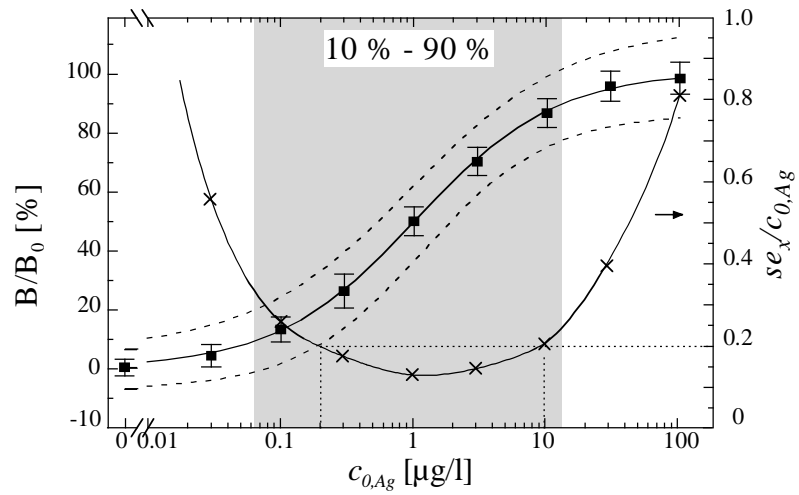


Abbildung 2-17: Alternative Methode zur Ermittlung des Arbeitsbereichs einer Kalibrierkurve mit Hilfe des Präzisionsprofils (\times) ($se_x/c_{0,Ag} = 20\%$). Zum Vergleich ist auch die 10 - 90 % B/B_0 -Definition angegeben (grau unterlegter Bereich).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

- Standardchemikalien und -biochemikalien wurden, soweit nicht andere Quellen angegeben sind, von FLUKA, Neu-Ulm, SIGMA, Deisenhofen und Riedel de Haën, Seelze bezogen.
- NHS-Aktivester von Cy5⁶ (monofunktionell) und Cy5.5⁷ (bifunktionell) von Amersham Life Science, Braunschweig (Strukturformeln in Abbildung 3-1).
- Polyklonale Simazin-, Atrazin- und Isoproturon-Antikörper von Dr. Ram Abuknesha, King's College, London.
- Monoklonale Atrazin-Antikörper von Prof. Dr. B. Hock, Lehrstuhl für Botanik, TU München.
- Monoklonale 2,4-D-Antikörper von Dr. Milan Franek, Veterinary Research Institute, Brno, Tschechien.
- Kupplungsfähige Analytderivate von Dr. Ram Abuknesha, King's College, London.

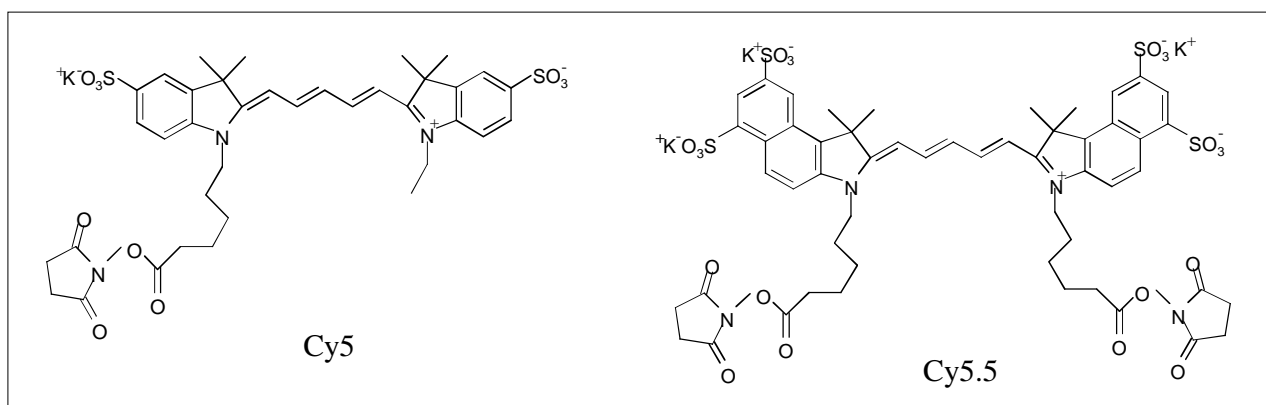


Abbildung 3-1: Strukturformeln der Cyaninfarbstoffe Cy5 und Cy5.5.

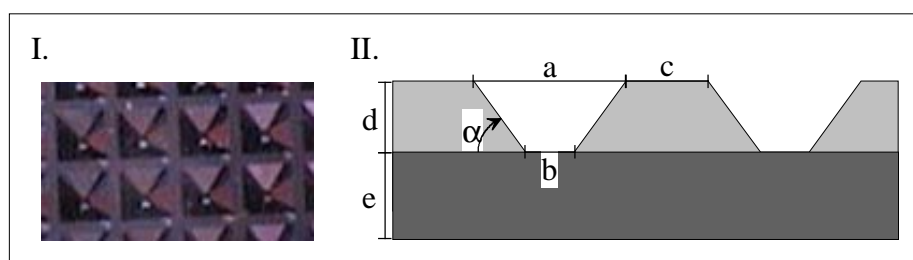
⁶ 1-(ε-carboxypentyl)-1'-(ethyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin-5,5'-disulfonat-kaliumsalz-N-hydroxysuccinimidester.

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

- Cy5.5 markierte Atrazin- und 2,4-D-Derivate von Dr. Sergei Eremin, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moskau, Rußland.
- Trinkwasserproben vom Institut Dr. Jäger, Tübingen.

3.1.2 Verbrauchsmaterial

- Mikrokonzentratoren „Microcon 30“ mit einer Porengröße von 30000 Da von Sevatec GmbH, Witten
- Sephadex G-25 Säulen für die Gelchromatographie von Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- Fluoreszenzmikrotiterplatten von Perkin Elmer, Überlingen
- Nanotiterplatten (NTP) mit 25×25 pyramidenstumpfförmigen Kavitäten mit den in Abbildung 3-2 gezeigten Abmessungen und den Außenabmessungen von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ aus
 - Silizium (siehe Abbildung 1-1) mit einem Volumen von 50 nl pro Kavität von GeSiM, Großerkmannsdorf.
 - Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) mit einem Volumen von 70 nl pro Kavität von BIAS, Bremen.
- Transparentes Klebeband zum versiegeln der NTP von Adhesives Research, Inc., Glen Rock, USA.



NTP	a [μm]	b [μm]	c [μm]	d [μm]	e [μm]	α [$^\circ$]
Si	600 ± 40	70 ± 30	130	400 ± 15	500 ± 10	54.7
ABS	600	230	150	400	1600	65

Abbildung 3-2: I. Bild der pyramidenstumpfförmigen Kavitäten einer NTP aus Si. II. Schematische Seitenansicht der NTPs aus Si und ABS. Die Abmessungen der NTPs sind in der Tabelle angegeben.

3.1.3 Lösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

150 mM NaCl

50 mM KH₂PO₄

mit 2 M KOH auf pH 7.4 einstellen.

[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-

ethansulfonsäure-Puffer (HEPES-Puffer)

20 mM HEPES

150 mM NaCl

mit 2 M KOH auf pH 7.4 einstellen.

5-fach HEPES-Puffer

100 mM HEPES

750 mM NaCl

mit 2 M KOH auf pH 7.4 einstellen.

Carbonatpuffer

100 mM Na₂CO₃

mit 100 mM NaHCO₃ auf pH 9.5 einstellen.

Piranha-Lösung

40 Vol.-% H₂O₂ (30 %)

60 Vol.-% H₂SO₄ (96 %)

in der angegebenen Reihenfolge mischen und frisch verwenden.

Pepsin Regenerationslösung

20 mg/ml Pepsin in bidestilliertem Wasser lösen. PBS mit 2 N HCl auf pH 1.8 einstellen und beide Lösungen im Verhältnis 1:9 mischen.

Acetonitril Regenerationslösung

bidestilliertes Wasser 50 %

Acetonitril 50 %

Propionsäure 1 %

3.1.4 Geräte

- Verschiedene Kolbenhubpipetten von Eppendorf, Hamburg.
- Winkelrotorzentrifuge Biofuge 15 von Heraeus Sepatech, Osterode.
- Mikrotiterplattenschüttler Typ MTS 2 von IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
- Registrierendes Spektralphotometer Lambda 2 von Perkin Elmer, Überlingen.

-
- Registrierendes Spektralphotometer Specord M500 von Zeiss, Jena.
 - Fluoreszenzmikrotiterplattenleser LSR 200 von Perkin Elmer, Überlingen.
 - Lumineszenz Spektrometer LS-50 B mit rotempfindlichem Photomultiplier R928 von Perkin Elmer, Überlingen.
 - Spektralfluorimeter Spex Fluorolog 222 mit zwei Gitter-Doppelmonochromatoren 1680 B und dem Datenerfassungsgerät Datamate DM1B von Spex Industries GmbH, Grasbrunn mit
 - einer 150 W Xenon-Hochdruck-Lampe Modell A 1010 von PTI und
 - einem Peltier-gekühlten Photomultiplier R928 von Hamamatsu, Herrsching.
 - Spex Fluorolog 112 von Spex Industries GmbH, Grasbrunn mit
 - Laser-Diode mit $\lambda = 653 \text{ nm}$ von Hamamatsu, Herrsching und
 - Zeit-Amplitudenwandler, Verstärker, Diskriminatoren und Vielkanalanaysator zur Verarbeitung der elektronischen Signale von EG&G Ortec, Bad Wildbad.
 - *RfS*-Standardlaboraufbau mit
 - FIA- Anlage ASIA und Autosampler von Ismatec, Wertheim-Mondfeld,
 - Polymerlichtleiter (PMMA), 1 mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von MicroParts, Dortmund,
 - Diodenzeilenspektrometer MCS 410 von Carl Zeiss, Jena.
 - BioScan Nanotiterplattenleser im epi-fluoreszenten Aufbau (siehe Abbildung 3-3) mit He-Ne-Laser, 2-D-Abtaster, f-theta-Linse, dichroitischen Strahlteiler (HQD 650), telezentrischer Linse, Kantenfilter (EFLP 665), Abbildungsoptik (numerische Apertur 0.24), Bandpassfilter (HQ 670) und Photomultiplier von Perkin Elmer Applied Biosystems, Überlingen.
 - Mikrodosiereinheit von BIAS, Bremen mit
 - Mikropipetten vom Typ SPIP (siehe Abbildung 4-33 links) und TMP mit Tropfen volumina von 0.5 - 2 nl, einem relativen Dosierfehler $< 2 \%$ und einer Tropfenrate bis 1 kHz von GeSiM, Großberkmannsdorf,
 - Steuergerät multi-dos mit Stroboskopmodul von GeSiM, Großberkmannsdorf,
 - x, y, z -Lineartische mit einer Positioniergenauigkeit von x, y: $1 \mu\text{m}$ und z: $0.5 \mu\text{m}$ von Physik Instrumente GmbH, Berlin,
 - Video-Kamera mit CCD Kamera-Modul von Conrad Electronic GmbH, Hirschau, und Achromat Linsen $20 \times 35 \text{ Efl}$ und $3 \times 6 \text{ Efl}$ von Pörschke GmbH, Höchst.

3.2 Methoden

3.2.1 Meßmethoden

3.2.1.1 Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren wurden am Spektralphotometer Lambda 2 bzw. am Specord M500 mit einer Spaltbreite von 2 nm und einer Registriergeschwindigkeit von 60 nm/min aufgenommen. Als Referenzen dienten die reinen Lösungsmittel, wobei Quarz-Halbmikroküvetten verwendet wurden.

Für die Aufnahme der Spektren der freien Farbstoffe wurden für die Konzentrationen 10^{-3} mol/l bzw. 10^{-2} mol/l Küvetten mit Schichtdicken von 100 μm bzw. 10 μm verwendet. Um die Adsorptionen der negativ geladenen Farbstoffe an die Gefäßwände der Küvetten zu minimieren, wurden die Spektren in alkalischer Lösung (Carbonatpuffer, pH 9.9) gemessen.

3.2.1.2 Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzemissions- bzw. Fluoreszenzanregungsspektren wurden mit dem Lumineszenz Spektrometer LS-50 B bzw. mit dem Spex Fluorolog 222 in der 90°-Anordnung aufgenommen. Die Standardeinstellungen am LS-50 B waren im Vorschub-Modus: fünf akkumulierte Spektren bei einer Spaltbreite von 5 nm, einer Registriergeschwindigkeit von 120 nm/min und einer Schrittweite von 1 nm. Am Spex Fluorolog 222 wurde mit einer Schrittweite von 1 nm und einer Registriergeschwindigkeit von 60 nm/min gemessen. Die Probenkonzentration wurde, wenn möglich, so eingestellt, daß der Photomultiplier beim Anregungsmaximum ca. $5 \cdot 10^4$ - 10^5 Photonen pro Sekunde detektieren konnte. Dies entspricht einer Extinktion im UV/VIS-Spektrum von ungefähr 0.2. Bei Lösungen mit geringerer Farbstoffkonzentration wurden größere Spalteinstellungen gewählt und entsprechend mehrere Spektren akkumuliert, um die angegebene Photonenzahl zu erreichen. Bei beiden Geräten wurden Quarz-Halbmikroküvetten mit einem Volumen von 500 μl verwendet.

Die Photomultipliekorrektur der Emissionsspektren erfolgte mit Hilfe einer Korrekturdatei der Firma Perkin Elmer. Fluoreszenzanregungsspektren wurden automatisch mit Hilfe eines im Spektrometer befindlichen Quantenzählers korrigiert.

Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Kalibrierkurven der projektrelevanten Zielanalyte wurden am LS-50 B im Zeit-Modus aufgenommen. Die Standardeinstellungen waren:

Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 647$ nm, Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 667$ nm, Spaltbreite 5 nm, Zeitintervall 130 s und Datenintervall 2 s. Aus den 65 Intensitätswerten je Probe wurde der Mittelwert zur weiteren Auswertung verwendet.

3.2.1.3 Fluoreszenzquantenausbeuten

Fluoreszenzquantenausbeuten der fluoreszierenden monomeren Fluorophore wurden nach der relativen Methode bestimmt. Als Standard (*Std*) dienten die freien Farbstoffe in Lösung mit bekannten ϕ_F und τ_F :

$$\phi_F(Probe) = \phi_F(Std) \frac{\tau_F(Probe)}{\tau_F(Std)}, \quad (73)$$

oder

$$\phi_F(Probe) = \phi_F(Std) \frac{A_F(Probe) \cdot (1 - 10^{-E(Std)}) \cdot n_{Probe}^2}{A_F(Std) \cdot (1 - 10^{-E(Probe)}) \cdot n_{Std}^2}. \quad (74)$$

Darin bedeuten A_F die Fläche unter der Fluoreszenzbande und n der Brechungsindex der jeweiligen Lösung. E ist die Extinktion der Lösungen, die um den Betrag der nicht-fluoreszierenden Dimeren Spezies korrigiert wurde.

3.2.1.4 Fluoreszenzanisotropie

Für die Messung polarisierter Fluoreszenz war einer der beiden Strahlengänge im Spex Fluorolog 222 mit im rechten Winkel zueinander angeordneten Calcit-Glan-Taylor-Prismen ausgerüstet. Die Fluoreszenzanisotropie bzw. die Rotationskorrelationszeit wurde gemäß der Gleichungen Gl. (26) und Gl. (27) bzw. Gl. (29) berechnet.

3.2.1.5 Fluoreszenzabklingkurven

Die Fluoreszenzabklingkurven wurden mit dem Spex Fluorolog 112 nach der Methode der Einzelphotonenzählung aufgenommen (Eaton, 1990). Zur optischen Anregung bei $\lambda_{exc} = 653$ nm wurde eine Laser-Diode mit einer Halbwertsbreite von $\Delta t = 0.6$ ns und einer Pulsfrequenz von $\nu = 1$ MHz verwendet. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_{em} = 680$ nm für Cy5 und $\lambda_{em} = 705$ nm für Cy5.5 beobachtet. Zwischen Probe und Emissionsmonochromator wurde zusätzlich ein 670 nm Kantenfilter gesetzt.

In Fällen, bei denen die Fluoreszenzabklingzeit nicht deutlich größer ist als die Halbwertsbreite des Lampenpulses, kann die Abklingzeit nicht direkt aus der Messkurve erhalten

werden. Die messbare zeitabhängige Fluoreszenzintensität $G(t)$ ist mit der zeitlichen Intensitätsverteilung des Lampenblitzes gefaltet (Eaton, 1990):

$$G(t) = \int_0^t L(t') \cdot F(t-t') dt'. \quad (75)$$

Darin ist $F(t)$ die Abklingfunktion und $L(t)$ die Anregungsfunktion des Lampenpulses. Um die Abklingfunktion $F(t)$ aus $G(t)$ zu erhalten, wurden die Abklingkurven durch eine *Dekonvolutionsanalyse* angepaßt. Dabei wurden die Parameter α_i und $\tau_{F,i}$ der Gl. (17) so lang verändert, bis die gewichtete und normierte Summe der Fehlerquadrate χ^2 einen festgelegten Wert unterschritt

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n w_i^2 \cdot (G(t_i) - Y_F(t_i))^2. \quad (76)$$

Darin ist w_i der Gewichtungsfaktor im Kanal i mit $w_i = 1/\sqrt{G(t_i)}$, $G(t_i)$ die gemessene Intensität im Kanal i und $Y_F(t_i)$ die berechnete Intensität im Kanal i von insgesamt n angepaßten Kanälen. Bei einer optimalen Anpassung liegt χ^2 im Bereich von 1.0 ± 0.2 . Da trotz guter χ^2 -Werte systematische Abweichungen zwischen Mess- und Fitkurve auftreten können, wurden als weitere Kriterien für die Qualität der Anpassung, die gewichteten Residuen, die Autokorrelation und der Durbin-Watson-Parameter herangezogen. Die Residuen berechnen sich als Differenz zwischen der gemessenen und der berechneten Intensität $R_i = G(t_i) - Y_F(t_i)$. Die *gewichteten Residuen* $r(t_i)$ berechnen sich nach

$$r(t_i) = \frac{G(t_i) - Y_F(t_i)}{w_i}, \quad (77)$$

wobei der Gewichtungsfaktor w_i die jeweilige Standardabweichung von R_i ist. Mit der *Autokorrelationsfunktion* c_j werden Produkte von Residuen im Kanal j und Kanal $i+j$ über eine ausgewählte Anzahl von Kanälen $m = n - j$ aufsummiert, wobei n die Gesamtzahl der Kanäle ist:

$$c_j = \frac{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m R_i R_{i+j}}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n R_i^2}. \quad (78)$$

Sowohl die Autokorrelationswerte als auch die Residuen schwanken bei guten Anpassungen statistisch um den Nullwert. Der Vorteil der Autokorrelation liegt darin, daß sie im Gegensatz zu den Residuen systematische Abweichungen - beispielsweise gegeben durch eine Überlagerung der Abklingkurve mit einer elektromagnetischen Strahlung - sichtbar macht. Der *Durbin-Watson-Parameter* DW berechnet sich nach

$$DW = \frac{\sum_{i=n_1+1}^{n_2} (r(t_i) - r(t_{i-1}))^2}{\sum_{i=n_1}^{n_2} r(t_i)^2} \quad (79)$$

mit n_1 und n_2 als erster bzw. letzter Punkt des angepaßten Kurvenbereichs. Akzeptable Anpassungen liegen vor, wenn $DW > 1.65$ bei exponentieller Anpassung und $DW > 1.80$ bei bi- oder triexponentieller Anpassung. Abklingkurven der Donor-Fluoreszenzintensität $I_F^D(t)$, wenn RET zum Akzeptor auftritt, wurden entsprechend der häufig gemachten Annahme eines festen Donor-Akzeptor-Abstandes bei markierten Proteinen (Lakowicz, 1983), gemäß der oben genannten Vorgehensweise, angepaßt. Die Auswertung der Abklingkurven für statistisch verteilte Donoren und Akzeptoren wurden nach Gl. (42) durchgeführt⁸.

3.2.1.6 Fluoreszenzmessung in der Mikrotiterplatte

MTP mit einem Gesamtvolumen von 250 µl pro Kavität wurden im Vorschub-Modus bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 640$ nm und Emissionswellenlängen von $\lambda_{em} > 662$ nm bei einer Spalteinstellung von 5 nm, einer Registriergeschwindigkeit von 120 nm/min und einer Schrittweite von 1 nm gemessen. Im Zeit-Modus wurde bei der festen Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 667$ nm und einer Integrationszeit von 30 Sekunden detektiert. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten der Kavitäten wurden mit einer Referenzfunktion, welche die Inhomogenität der Fluoreszenz über die MTP ausglich, korrigiert.

3.2.1.7 Fluoreszenzmessung in der Nanotiterplatte

Die Fluoreszenz der befüllten und anschließend mit Hilfe eines nicht fluoreszierenden, transparenten Klebandes versiegelten NTP wurden mit dem vom Projektpartner Perkin Elmer realisierten Nanotiterplattenleser „BioScan“ detektiert. Der schematische Aufbau des

⁸ Diese Auswertung wurde freundlicherweise von Dr. Stefan Uhl durchgeführt.

„BioScan“ ist in Abbildung 3-3 gezeigt. Es handelt sich um ein abtastendes Gerät, welches einen fokussierten Laserstrahl über die NTP führt und das Fluoreszenzlicht in Reflexion mittels einer hochgeöffneten Linsenoptik (numerische Apertur von 0.24 und einer Effizienz der Lichteinsammlung von fast 1 %) mit einer Ortsauflösung von etwa $10\ \mu\text{m}$ mißt. Zum Blocken des anregenden Laserlichts wurde im Detektionsstrahlengang ein dichroitischer Strahlteiler, ein Kantenfilter und ein Bandpassfilter (siehe oben) eingebaut. Der beobachtete Wellenlängenbereich betrug 665 - 680 nm. Die verwendeten Systemparameter waren, soweit im Text nicht andere Parameter angegeben sind:

- PMT-Hochspannung: $U = 1000\ \text{V}$
 - Vorschubgeschwindigkeit: $v = 150\ \text{m/s}$
 - Datenintervall: $s = 20\ \mu\text{m}$
 - Integrationszeit: $t = 100\ \mu\text{s}$
- ⇒ Gesamtmesszeit für eine NTP: $t = 2.8\ \text{min}$

Die Fluoreszenzbilder der NTPs wurden mit einer Referenzfunktion, die die Inhomogenität der Fluoreszenz über die NTP ausglich, korrigiert. Durch eine anschließende visuelle Kontrolle der Bilder wurden unvollständig befüllte Kavitäten lokalisiert und in der nachfolgenden Auswertung, die mit Hilfe einer vom Projektpartner LLG geschriebenen Software durchgeführt wurde, nicht berücksichtigt.

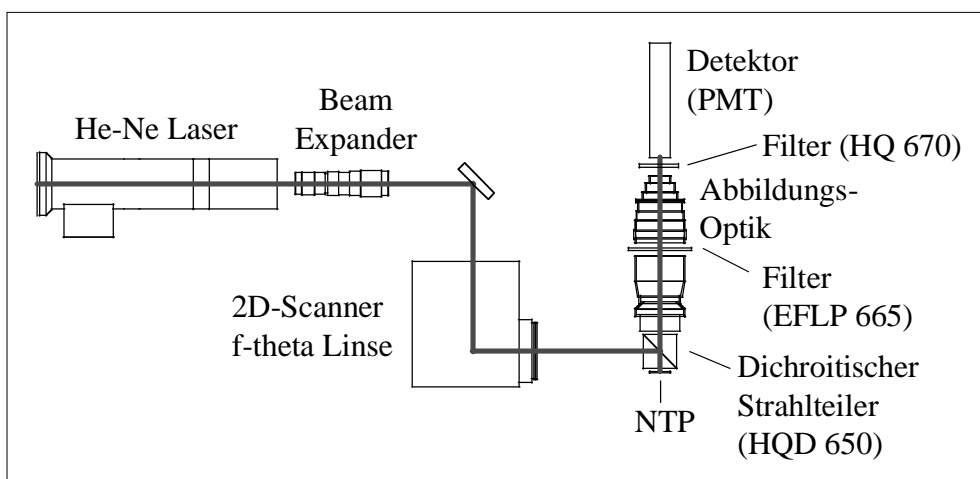


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des „BioScan“ Nanotiterplattenlesers.

3.2.1.8 Interferenzreflexionsspektren

RIfS wurde als Standardmethode zur Charakterisierung von Affinitätsreaktionen mit Hilfe des in Kap. 2.2.2.5 beschriebenen Bindungshemmtests und zur Bestimmung von Markierungsgraden der synthetisierten Analytderivat-Fluorophor-Konjugaten verwendet⁹. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode findet sich in Brecht et al. (1993) und Piehler (1997).

Abbildung 3-4 zeigt den zur Messung von Interferenzreflexionsspektren verwendeten Aufbau. Es wurde mit einem Diodenzeilenspektrometer der Firma Zeiss gearbeitet, das über einen Y-Lichtleiter mit einer Lampe und einer Meßzelle verbunden wurde. Die Lampe wurde mit einem Hohlspiegel, einem Kondensator und einer Sammellinse auf das Ende des Lichtleiters fokussiert. Zwischen Lichtquelle und Faser wurde eine mit Wasser gefüllte Küvette gebracht, die die Wellenlängen unter 300 nm und die Infrarotstrahlung durch Absorption herausfilterte. An der Meßzelle wurde das Ende des Lichtleiters auf einer optischen Bank senkrecht zur Rückseite des Transducers justiert. Der Zwischenraum wurde mit einem Tropfen Glycerin (80 %ig, $n_D=1.45$) gefüllt, um die Reflexion an diesen Phasengrenzen zu minimieren. Die reflektierte Strahlung wurde in den gleichen Lichtleiter eingekoppelt und zum Spektrometer geführt. Das Spektrometer wurde über einen Computer mit dem Programm „Measure“ von G. Kraus gesteuert.

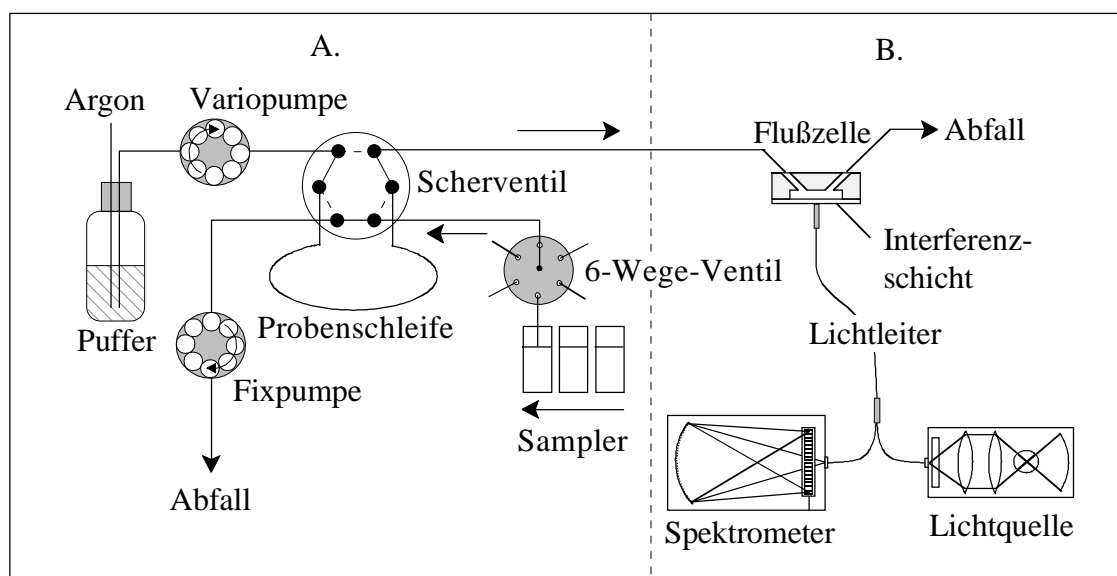


Abbildung 3-4: Schematischer Aufbau zur Messung von Interferenzspektren mit *RIfS*. A. Probenhandhabung mit FIA und Autosampler. B. Detektion der Affinitätsreaktionen.

⁹ Diese Arbeiten wurden von J. Mehne durchgeführt.

Als Transducer wurden Interferenzschichten aus SiO₂ auf einem Glassubstrat mit einer dünnen reflektionsverstärkenden Zwischenschicht aus Ta₂O₅ verwendet. An die Oberfläche war Dextran gekoppelt und daran wurde das entsprechende Analytderivat kovalent gebunden.

Alle Messungen wurden mit betriebswarmem Spektrometer und Lampe, d.h. frühestens vier Stunden nach Inbetriebnahme des Spektrometers und eine Stunde nach Einschalten der Lampe, durchgeführt. Vor der Messung der Interferenzreflexionsspektren wurde das auf dem Dunkelstrom des Spektrometers beruhende Signal I_0 bestimmt und als Referenzsignal das Spektrum I_{Ref} eines Glasplättchens ohne Oberflächenmodifizierung gemessen. Damit wurde die gemessene Intensität nach:

$$I_{Ifz} = \frac{I(\lambda) - I_0(\lambda)}{I_{Ref}(\lambda) - I_0(\lambda)} \quad (80)$$

korrigiert. Das korrigierte Spektrum I_{Ifz} wurde mit dem Programm „Ifz“ von A. Brecht ausgewertet. Dabei wird in ein ausgewähltes Extremum eine Parabel angepaßt und damit die optische Schichtdicke bestimmt.

Zur Probenhandhabung wurde ein kommerziell erhältliches Fließinjektionsanalyse-System (FIA) mit zwei Pumpen, einem Scherventil und einem Auswahlventil eingesetzt (siehe Abbildung 3-4 A.). Wesentliches Merkmal dieser Technik ist der ununterbrochene Flüssigkeitsstrom, der einen schnellen und reproduzierbaren Meßablauf bei geringem technischen Aufwand erlaubt.

3.2.2 Synthesemethoden

3.2.2.1 Markierung von Antikörpern und Rinderserum–Albumin mit Cy5 bzw. Cy5.5

Die Markierung der Proteine wurde entsprechend den Herstellerangaben der Reaktivfarbstoffe (Mujumdar et al., 1993, und 1996) durchgeführt: 20 µl einer Lösung des reaktiven Farbstoffs (molare Verhältnisse sind im Text angegeben) in absolutem N,N-Dimethylformamid (DMF) wurde zu einer Lösung von 500 µg Protein (3.3 nmol IgG bzw. 7.2 nmol BSA) in 250 µl Carbonatpuffer, pH 9.5, gegeben und vorsichtig verrührt. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abtrennen des ungebundenen Farbstoffs vom Farbstoff-Protein-Konjugat wurde die Lösung zunächst durch ein Microcon-30 zentrifugiert (5 Minuten bei 12000 × g) und anschließend über eine Sephadex G-25 Gelsäule mit PBS als

Elutionspuffer chromatographiert. Die markierten Antikörper wurden zu $3 \mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$ aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt. Die BSA-Cy5.5-Konjugate wurden zur weiteren Markierung mit den aktivierten Analytderivaten verwendet.

3.2.2.2 Analytderivat-N-Hydroxysuccinimid Aktivester

N,N-Dicyclohexylcarbodiimid ($1.5 \times n(\text{Analytderivat})$) wurde zu einer gerührten, eisgekühlten Lösung des Analytderivats (5 mg) und N-Hydroxysuccinimid ($1.1 \times n(\text{Analytderivat})$) in $200 \mu\text{l}$ absolutem DMF zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Dicyclohexylharnstoff abzentrifugiert und der entstandene Analytderivat-NHS-Aktivester ohne weitere Reinigungsschritte in der nachfolgenden Reaktion verwendet.

3.2.2.3 Markierung von BSA-Cy5.5 mit Analytderivat-NHS-Aktivester

Eine Lösung der Analytderivat-NHS-Aktivester (molare Verhältnisse sind im Text angegeben) in absolutem DMF wurde zu einer Lösung von $400 \mu\text{g}$ (5.8 nmol) BSA-Cy5.5-Konjugat in $250 \mu\text{l}$ Carbonatpuffer, pH 9.5, gegeben und vorsichtig verrührt. Die Reaktionsbedingungen und die Reinigung der Konjugate entsprechen den Angaben, welche bei der Markierung der Proteine mit den Farbstoffen gemacht wurden. Die markierten Analytderivate wurden zu $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} / 50 \mu\text{l}$ aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt.

3.2.2.4 Charakterisierung der hergestellten Konjugate

Farbstoff/Protein-Verhältnis

Das Farbstoff/Protein-Verhältnis der Konjugate wurde photometrisch in einer PBS:DMF (1:1, v/v) Lösung bestimmt (Terpetschnig et al., 1994). Die Zugabe von DMF zur gepufferten Lösung der Konjugate führt zu einer nahezu vollständigen Umwandlung des aggregierten Anteils der gebundenen Farbstoffe zu Monomeren, wodurch der Markierungsgrad exakt bestimmt werden kann. Die Molmassen, die Absorptionsmaxima und die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine (P) und Farbstoffe (F) sind in Tabelle 3-1 angegeben. Während die Proteine nur im UV-Bereich absorbieren, zeigen die Farbstoffe neben ihrem Maximum im roten Wellenlängenbereich auch eine gewisse Absorption im UV-Bereich.

Tabelle 3-1: Charakteristische Daten der Proteine und Farbstoffe zur Bestimmung des Markierungsgrades der Konjugate in PBS:DMF (1:1, v/v). Y gibt den Anteil der Absorption der Fluorophore bei $\lambda = 278 \text{ nm}$ bezüglich der Absorption am Maximum an.

	IgG	BSA	Cy5	Cy5.5
M [g/mol]	150000	69000	792	1311.6
λ_{max} [nm]	278	278	653	681
$\epsilon_{\lambda, \text{max}}$ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	201700	45540	250000	190000
Y	-	-	0.05	0.13
Literatur	Wells et al., 1966	Cohn et al., 1947	Mujumdar et al., 1993	Mujumdar et al., 1996

In der Tabelle 3-1 ist das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten $Y = \epsilon_{278}/\epsilon_{\lambda, \text{max}}$ angegeben. Der Markierungsgrad wurde mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet

$$\frac{c_F}{c_P} = \frac{\epsilon_{P, \lambda_{\text{max}}} E_{F, \lambda_{\text{max}}}}{\epsilon_{F, \lambda_{\text{max}}} (E_{278} - Y E_{F, \lambda_{\text{max}}})}. \quad (81)$$

Die eingesetzten Stoffmengen-Verhältnisse, die erzielten Markierungsgrade und die Markierungseffizienzen der in dieser Arbeit verwendeten BSA- und IgG-Konjugate sind in Tabelle 3-3 bzw. Tabelle 3-2 angegeben.

Tabelle 3-2: Markierungsgrade der hergestellten BSA-Konjugate.

Protein	$n_{\text{Cy5.5}}:n_{\text{BSA}}$ eingesetzt	$n_{\text{Cy5.5}}:n_{\text{BSA}}$ erhalten	Effizienz [%]
BSA	10	1.6	16
BSA	18	2.1	12

Tabelle 3-3: Markierungsgrade der hergestellten Antikörper-Konjugate.

Antikörper (IgG)	Akronym	$n_{Cy5}:n_{IgG}$ eingesetzt	$n_{Cy5}:n_{IgG}$ erhalten	Effizienz [%]
anti-Simazin-IgG, polyklonal	SimIgG	5	0.8	16
anti-Simazin-IgG, polyklonal	SimIgG	20	3.7	18.5
anti-Simazin-IgG, polyklonal	SimIgG	25	4.5	18
anti-Simazin-IgG, polyklonal	SimIgG	35	8.7	25
anti-Atrazin-IgG, polyklonal	AtraIgG	20	3.7	18.5
anti-Isoproturon- IgG, polyklonal	IpIgG	20	4.0	20
anti-Atrazin-IgG, monoklonal	K4E7	30	4.5	15
anti-2,4-D-IgG, monoklonal	E2G2	20	4.8	24.4

Analytderivat/BSA-Verhältnis

Zur Bestimmung des Analytderivat/BSA-Verhältnisses wurden zwei verschiedene Methoden verwendet

- Photometrische Bestimmung der Stoffmengen des Proteins und des Analytderivats (Wittmann und Hock, 1989),
- Photometrische Bestimmung der Stoffmenge des Proteins und Bestimmung der Stoffmenge des Analytderivats mit *RfS*.

Bei der photometrischen Charakterisierung der Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugate wurde nach der Kupplungsreaktion mit dem Analytderivat ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen und davon das zuvor registrierte BSA-Cy5.5-Spektrum abgezogen. In Abbildung 3-5 ist dies am

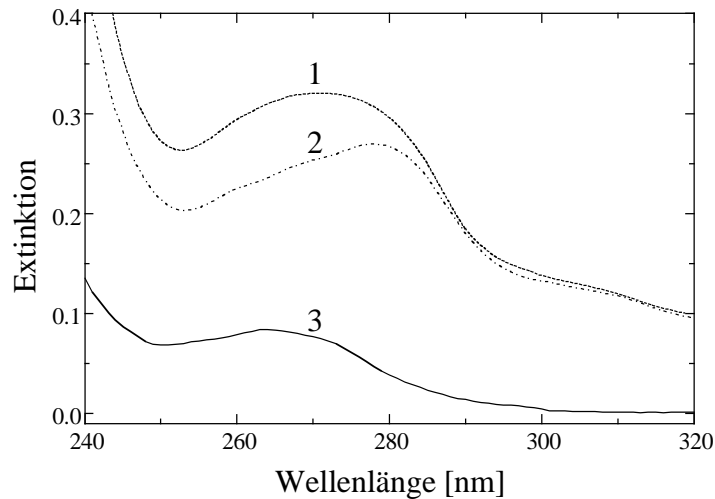


Abbildung 3-5: Photometrische Bestimmung der Analytderivatkonzentration (hier am Beispiel der Atrazincapronsäure) in einem Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugat (1). Das Analytderivat-Spektrum (3) wird durch Subtraktion der BSA-Cy5.5-Absorption (2) von (1) erhalten.

Beispiel eines Atrazincapronsäure-BSA-Cy5.5-Konjugats demonstriert. Aus dem resultierenden Analytderivat-Spektrum kann der Markierungsgrad bestimmt werden. Die Extinktionskoeffizienten der Analytderivate sind in Tabelle 3-4 angegeben.

Zur Bestimmung der Stoffmenge des Analytderivats mit *RIfS* wurde das Konjugat mit einem anti-Analytderivat-Antikörper bekannter Konzentration ($c_{0,IgG} = 250 \text{ ng/ml}$) inkubiert und anschließend die Konzentration an ungebundenem Antikörper bestimmt (siehe Bindungshemmtest Kap. 2.2.2.5 und Kap. 3.2.3.1). Daraus konnte die Konzentration des Analytderivats berechnet werden. Im Gegensatz zu der photometrischen Bestimmung der Analytderivat-Konzentration die den Summenparameter der Analytderivat-Moleküle am Protein erfaßt, wird bei der Bestimmung mit *RIfS* nur der für den Antikörper zugängliche Anteil quantifiziert. Aus diesem Grund weichen die mit *RIfS* bestimmten Markierungsgrade von den photometrisch bestimmten immer nach unten ab.

Die eingesetzten Stoffmengen-Verhältnisse, die mit UV/VIS bzw. *RIfS* bestimmten Markierungsgrade und die Markierungseffizienzen der in dieser Arbeit dargestellten Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugate sind in Tabelle 3-4 angegeben.

Tabelle 3-4: Markierungsgrade der verwendeten Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugate. (Ad, Analytderivat; n.b. nicht bestimmt).

Analytderivat	$\epsilon(\lambda_{max})$ [l/mol·cm]	$n_{Ad}:n_{BSA}$ eingesetzt	$n_{Ad}:n_{BSA}:n_{Cy5.5}$ erhalten UV/VIS bzw. RfS	Effizienz RfS [%]
<i>s-Triazinderivate:</i>				
Atrazincapronsäure (ACA)	3100 ± 100 (264 nm)	40	18 bzw. 3.6:1:1.6	9
Atrazin-4-amino- benzoesäure (ZABA)	19000 ± 310 (288 nm)	35	19 bzw. 3.8:1:2.1	10.9
Desethylatrazin- mercaptopropionsäure (THIO)	10400 ± 400 (248 nm)	20	9 bzw. 2.5:1:2.1	12.5
Desisopropylatrazin- capronsäure (DesACA)	13000 ± 360 (227 nm)	20	10 bzw. 2.2:1:2.1	11
<i>Isoproturonderivate:</i>				
3-(4-Isopropylphenyl)- 1-methyl-1-carboxy- propylharnstoff (IP30)	2040 ± 100 (270 nm)	30	n.b. bzw. 14:1:1.6	46
4-Isopropylanilin- carboxyphthalat (IPA)	37300 ± 900 (229 nm)	30	n.b. bzw. 10:1:1.6	33
4-Isopropylphenoxy- essigsäure (IP5)	1500 ± 100 (274 nm)	35	n.b. bzw. 11:1:2.1	31
<i>2,4-D-Derivate:</i>				
2-Methyl-4-chlor- phenoxyessigsäure (MCPA)	1540 ± 10 (279 nm)	30	n.b. bzw. 12:1:2.1	40
2,4-Dichloroanilin- glutarsäure (DN-1)	11500 ± 450 (251 nm)	30	n.b. bzw. 9.7:1:1.6	32

3.2.3 Bestimmungsmethoden

3.2.3.1 Durchführung der *RfS*-Messungen

Affinitätstitrationsen

Zur Bestimmung von Affinitätskonstanten wurde der Antikörper mit einem Analyten in verschiedenen Konzentrationen titriert. Die Konzentration des freien Antikörpers wurde mit *RfS* durch Bindung an einen immobilisierten Liganden im Durchfluß bestimmt. Um diffusionskontrollierte Bindung an die Oberfläche zu erreichen, wurde ein Analytderivat mit hoher Affinität in maximaler Konzentration immobilisiert. Die Konzentration des Antikörpers wurde in der Regel auf 250 - 500 ng/ml eingestellt. Die Konzentration des Analyten wurde jeweils so gewählt, daß die gesamte Modulation des Bindungssignals abgedeckt wurde. Die Lösungen des Analyten wurden in PBS angesetzt.

Messung und Auswertung

Zur Herstellung der Proben wurden 900 µl der entsprechenden Lösung des Analyten zu 100 µl der zehnfach konzentrierten Lösung des Antikörpers gegeben und nach intensivem Vermischen mindestens 10 Minuten lang vorinkubiert. Nach einer Messung der Basislinie mit einer Pumprate von etwa 30 µl/min innerhalb eines Zeitraums von 2 Minuten wurde die Probe mit erhöhter Pumprate (100 µl/min) injiziert und über einen Zeitraum von 200 s inkubiert. Danach wurde gespült und in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper mit Pepsin/Acetonitril bzw. HCl (pH 1.5)/Acetonitril regeneriert. Die Steigung der massentransport kontrollierten Bindungskurve wurde durch lineare Regression über den Bereich der Bindungskurve bestimmt, in dem sie lineares Verhalten zeigte. Die ermittelte Steigung wurde auf die maximale Steigung ohne Analyt normiert.

Bestimmung von Markierungsgraden

Die Markierungsgrade wurden analog der oben beschriebenen Vorgehensweise bei Affinitätstitrationsen bestimmt. Anstelle der Analyte wurden die markierten Analytderivate mit den Antikörpern vorinkubiert. Die Konzentration der Analytderivate wurde jeweils so gewählt, daß die Steigung der massentransport-kontrollierten Bindungskurve ca. 50 % der maximalen Steigung ohne Analytderivat betrug. Die Konzentration der markierten Analytderivate wurde anschließend über die entsprechende Titrationskurve bestimmt.

3.2.3.2 Durchführung des RET-Immunoassay

Bestimmung der optimalen Konjugatverhältnisse (Titration)

Zur Bestimmung der optimalen Verhältnisse der Antikörper-Cy5- und Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konzentrationen wurden zu Lösungen konstanter Antikörper-Cy5-Konzentrationen ($c_{0,Ak(D)}$) Lösungen bekannter Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konzentrationen ($c_{0,Ag(A)}$) zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Die $c_{0,Ag(A)}$ wurden so gewählt, daß die gesamte Signaldynamik der $Ag(A)$ - $Ak(D)$ -Reaktion bestimmt werden konnte (siehe Gl. (101)). Diejenige $c_{0,Ag(A)}$, welche die maximale Signaldynamik ergab, wurde in der nachfolgenden Kalibrierung verwendet.

Kalibrierkurven

Die Kalibrierungen der projektrelevanten Zielanalyte (siehe Kap. 1.2) erfolgten mit dem Lumineszenz Spektrometer LS-50 B in Halb-Mikroküvetten aus Quarzglas (Suprasil) mit einem Volumen von 500 μ l. Es wurden kompetitive Immunoassays, wie in Kap. 2.1.5 und 4.2 beschrieben, durchgeführt. Zu den Pestizid-Standardlösungen bekannter Konzentrationen (80 % des Gesamtvolumens) wurde eine Lösung konstanter $c_{0,Ak(D)}$ zugegeben (10 % des Gesamtvolumens) und 15 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung der konstanten und optimierten $c_{0,Ag(A)}$ zugegeben (10 % des Gesamtvolumens) und erneut 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal am Emissionsmaximum (667 nm) von Cy5 bestimmt.

Die Kalibrierungen und Messungen von Realproben wurden in Mikrotiterplatten (MTP) mit 96 Kavitäten und einem Volumen von 250 μ l und in Nanotiterplatten (NTP) durchgeführt. Zusätzlich zu dem oben angegebenen Protokoll zur Bestimmung der Kalibrierkurven mit Standardlösungen wurden für jeden Kalibrierpunkt Referenzen, die nur den markierten Antikörper bzw. das markierte Analytderivat enthielten, pipettiert. Dabei wurden zu den Standardlösungen bzw. zu den aufgestockten Realproben jeweils nur eine der beiden Konjugatlösungen zugegeben (10 % des Gesamtvolumens) und anstelle des zweiten Konjugates nur die entsprechend gepufferte Lösung zugesetzt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit dem Fluoreszenzmikrotiterplattenleser LSR 200 bzw. mit dem Nanotiterplattenleser BioScan registriert.

Ansetzen der Lösungen

Die Pestizid-Standardlösungen wurden mit entgastem PBS aus einer Stammlösung in DMF mit $c_{\text{Pestizid}} = 1 \text{ mg/ml}$ verdünnt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß der gesamte dynamische Bereich der Kalibrierkurve überstrichen wurde und in halblogarithmischer Darstellung eine äquidistante Punkteverteilung vorlag. Bei Messungen mit Realproben wurden die Kalibrierkurven mit Standardlösungen in bidestilliertem Wasser gemessen. Die entgasten Trinkwasserproben wurden ebenfalls mit der Pestizid-Stammlösung aufgestockt.

Die Antikörper-Cy5- und Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugatlösungen wurden in PBS angesetzt. Um eine unspezifische Adsorption der Proteine an die Wände der Küvetten bzw. Kavitäten zu verringern, wurde bei allen Messungen das neutrale Hintergrundprotein Ovalbumin (OVA) in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Bei Messungen mit Realproben wurden die Konjugatlösungen in 5-fach HEPES-Puffer angesetzt.

Modifizierung der Probenträger

Zur Vermeidung der unspezifischen Adsorption der im Immunoassay verwendeten Protein-Konjugate wurden zusätzlich zu der hohen Hintergrundprotein-Konzentration in der Lösung die Oberflächen der Probenträger mit einem unspezifischen Proteinen (BSA) adsorptiv belegt. Diese Oberflächenmodifikation wird mit zunehmender Miniaturisierung der Assayvolumina und der damit verbundenen zunehmenden Vergrößerung des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses immer wichtiger. Die Fluoreszenzmikrotiterplatten (MTP) und Nanotiterplatten (NTP) wurden vor der Kalibrierung nach folgenden Protokollen modifiziert:

Beschichtung der Kavitätswände der MTP:

- Pipettieren von $250 \mu\text{l}$ einer 3 mg/ml BSA Lösung in PBS bzw. HEPES in jede Kavität,
- über Nacht bei Raumtemperatur schütteln lassen,
- dreimal mit Puffer (PBS oder HEPES) waschen und trocknen.

Beschichtung der Kavitätswände der Si-NTP:

- 10 Minuten mit Piranha-Lösung im Ultraschallbad reinigen,
- mit bidestilliertem Wasser und Isopropanol gründlich abspülen und trocknen,
- NTP über Nacht in eine 3 mg/ml BSA Lösung in PBS bzw. HEPES legen und

- gründlich mit bidestilliertem Wasser abspülen und trocknen.

Beschichtung der Kavitätswände der ABS-NTP:

- 10 Minuten im Ultraschallbad mit bidestilliertem Wasser reinigen,
- NTP über Nacht in eine 3 %ige wässrige Lösung von Polyethylenimin legen,
- gründlich mit bidestilliertem Wasser abspülen,
- über Nacht in eine 3 mg/ml BSA Lösung in PBS bzw. HEPES legen und
- gründlich mit bidestilliertem Wasser abspülen und trocknen.

3.2.3.3 GC/MS-Messungen

Anreicherung

Die Quantifizierung von aufgestockten Realproben mit Simazin und Isoproturon wurden am Institut Dr. Jäger nach DIN 38 407, Teil 6 („Bestimmung ausgewählter organischer Stickstoff- und Phosphorverbindungen mittels Gaschromatographie nach Anreicherung durch Fest-Flüssig-Extraktion (F 6)“) durchgeführt. 1 Liter der zu untersuchenden Wasserprobe wurde mit 10 µl eines internen Standards versetzt und zur anschließenden Festphasenextraktion über eine mit 200 mg eines Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymerisat (Chromabond HR-P von Macherey-Nagel) gepackten Chromatographie-Säule mittels reguliertem Vakuum gesaugt. Nach gründlichem Trocknen der Extraktionssäule in einem Inertgasstrom wurden die adsorbierten Herbizide mit Aceton herausgelöst. Das Eluat wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand mit 0.4 ml Cyclohexan wieder aufgenommen. Dies ergab eine Anreicherung um den Faktor 2500.

GC/MS

Die mit internem Standard versetzten Extrakte wurden mittels GC/MS im SIM-Modus gemessen. Zur Auswertung wurden zwei oder mehr substanzspezifische Massenfragmente, welche in Vorversuchen ermittelt und aufeinander abgestimmt wurden, herangezogen. Die Rohwerte wurden manuell über die Peakhöhe mit Hilfe der graphisch ermittelten Kalibrierkurven bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden - in vier Abschnitten gegliedert - die Ergebnisse der Arbeit präsentiert und diskutiert. Im ersten Abschnitt werden zunächst die Auswahlkriterien und die photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore beschrieben. Anschließend wird der Resonante-Energie-Transfer-Immunoassay (RETIA) charakterisiert und die auftretenden Löschprozesse quantitativ untersucht. Im zweiten Abschnitt werden die Optimierungsmöglichkeiten des kompetitiven Assays anhand von Modellrechnungen aufgezeigt und im dritten Abschnitt mit den vier Modellanalyten im Mikroliterbereich umgesetzt. Der letzte Abschnitt beschäftigt sich mit dem Transfer des RETIA in den Nanoliterbereich. Hier wird zunächst auf die speziellen Herausforderungen, die sich aus den veränderten Dimensionen ergeben, eingegangen. Anschließend wird die Durchführbarkeit des RETIA in den Nanotiterplatten (NTP) anhand eines Modellanalyten demonstriert.

4.1 Charakterisierung des Resonanten-Energie-Transfer-Immunoassays

4.1.1 Auswahl und Charakterisierung der Fluorophore

Haupteinschränkung homogener Testverfahren ist die bereits in Kap. 2.3.2.2 beschriebene häufig auftretende geringe *Signaldynamik* und damit hohe *Nachweisgrenze* der Assays. Im Falle des RETIA hängt die Signaldynamik bei Beobachtung der Modulation der Donor-Fluoreszenz entscheidend von der maximalen *Fluoreszenzintensität des Donors* in Abwesenheit von Löschprozessen (I_F^D) und von der *Energieübertragungsrate* (k_{RET}) ab. Die Energieübertragungsrate gibt das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung bei Anwesenheit des Akzeptors an. Diese maximal erreichbare Signaldynamik wird hauptsächlich durch die *Eigenfluoreszenz des Akzeptors* und durch die *Hintergrundfluoreszenz* der Assaymatrix begrenzt. Die Eigenfluoreszenz des Akzeptors entsteht dabei sowohl durch direkt angeregte, als auch durch den RET sensibilisierte Fluoreszenz. I_F^D , k_{RET} , die Eigenfluoreszenz des Akzeptors und das Ausmaß der Hintergrundfluoreszenz werden maßgeblich von folgenden photophysikalischen Parametern der Fluorophore bestimmt:

- I_F^D hängt nach Gl. (24) vom Extinktionskoeffizienten $\epsilon_D(\lambda)$ und von der Quantenausbeute ϕ_F^D des Donor-Fluorophors ab.

- k_{RET} wird nach den Gl. (37) - (40) von der Quantenausbeute des Donors ϕ_F^D und vom Überlappungsintegral J_{DA} bestimmt. J_{DA} ist dabei eine Funktion des spektralen Überlapps der Emission des Donors und der Absorption des Akzeptors, der Wellenlänge ($\sim\lambda^4$) und des Extinktionskoeffizienten des Akzeptors (Fairclough und Cantor, 1978).
- Die Eigenfluoreszenz des Akzeptors wird durch dessen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_A(\lambda)$ und der Quantenausbeute ϕ_F^A bestimmt.
- Hintergrundfluoreszenzen werden durch die Eigenfluoreszenz der Matrix besonders im Bereich zwischen 350 - 600 nm, und durch Streuung des Anregungslichts hervorgerufen (siehe Kap. 2.3.4) (Soini und Hemmilä, 1979).

Die wesentlichen Kriterien, nach denen die Fluorophore ausgewählt wurden, waren deshalb:

- hohe Extinktionskoeffizienten des Donors und Akzeptors,
- hohe Quantenausbeute des Donors ($\phi_F^D > 0.2$) und niedrige Quantenausbeute des Akzeptors (im Idealfall: $\phi_F^A = 0$),
- großer spektraler Überlapp J_{DA} und
- Absorption und Emission des Donor-Fluorophors im roten Wellenlängenbereich ($\lambda > 600$ nm).

Eine Farbstoff-Klasse, die diesen Anforderungen gerecht wird, stellen die bereits in Kap. 2.3.4 beschriebenen, *langwellig* absorbierenden ($\lambda_{abs,max} > 635$ nm) Cyanin-Farbstoffe dar. Neben den geforderten hohen Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten besitzen sie eine gute *Photostabilität* (Southwick et al. 1990) und eignen sich hervorragend für die *Anregung* mit dem Helium-Neon-Laser (632.8 nm) oder den kommerziell verfügbaren kompakten und leistungsstarken Laserdiodenmodulen mit Anregungswellenlängen bei 635 nm, 670 nm und 780 nm (Mank et al., 1996, Lee et al., 1995). Aus dieser Substanz-Klasse wurden die beiden Arylsulfonat-Cyanin-Farbstoffe Cy5 (Mujumdar et al., 1993) und Cy5.5 (Mujumdar et al., 1996) als Marker für die Etablierung des RETIA ausgewählt. Neben den bereits genannten Vorteilen bezüglich der photophysikalischen Eigenschaften besitzen diese Fluorophore, bedingt durch die Anwesenheit der aromatischen Sulfonatgruppen (siehe Abbildung 3-1), auch eine ausgezeichnete *Wasserlöslichkeit* und ein geringes *unspezifisches Bindungsverhalten*. Dadurch können die NHS-Aktivester in gepufferter wässriger Lösung leicht an Antikörper und Proteine kovalent angekoppelt werden.

Tabelle 4-1: Photophysikalische Eigenschaften von Cy5 und Cy5.5 gemessen in PBS.

	$\lambda_{max}(abs)$ [nm]	$\lambda_{max}(em)$ [nm]	$\epsilon_{\lambda,max}$ [l/mol·cm]	ϕ_F	τ_F [ns]	τ_0 [ns]	τ_R^1 [ns]
Cy5	647	665	250000 ²	0.27 ²	0.94	3.48	0.47
Cy5.5	676	693	190000 ³	0.23 ³	0.99	4.30	0.84

¹ Die intrinsische Anisotropie r_0 wurde in Glycerin zu 0.36 bestimmt ² Werte aus Mujumdar et al. (1993). ³ Werte aus Mujumdar et al. (1996).

Die photophysikalischen Eigenschaften wie Absorptions- ($\lambda_{max}(abs)$), Emissionsmaximum ($\lambda_{max}(em)$), Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\lambda,max}$), Quantenausbeuten (ϕ_F), Fluoreszenzlebensdauern (τ_F) und Rotationskorrelationszeiten (τ_R) des ausgewählten Donor-Akzeptor-Paars Cy5 und Cy5.5 sind in Tabelle 4-1 angegeben. Das Absorptionsmaximum des Donors liegt bei $\lambda = 647$ nm und sowohl der Donor (Cy5) als auch der Akzeptor (Cy5.5) besitzen sehr hohe Extinktionskoeffizienten. Die Quantenausbeute des Donors ist mit $\phi_F^D = 0.27$ akzeptabel, während die des Akzeptors zwar, wie gefordert, kleiner als ϕ_F^D ist, jedoch nicht dem Idealfall $\phi_F^A = 0$ entspricht.

Abbildung 4-1 zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren von Cy5 und Cy5.5. Der spektrale Überlapp der Cy5-Emission mit der Cy5.5-Absorption erstreckt sich von 625 - 725 nm und ist nahezu perfekt. Der Försterabstand R_0 berechnet sich nach Gl. (38) mit der Quantenausbeute $\phi_F^D = 0.27$, dem Brechungsindex $n = 1.33$, dem Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$

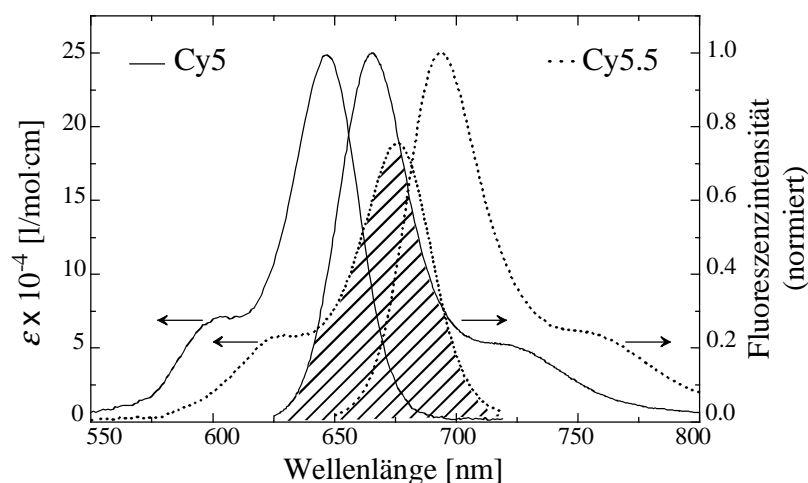


Abbildung 4-1: Absorptions- und Emissionsspektren von Cy5 (—) und Cy5.5 (····) in PBS. Der für den RET relevante Überlappungsbereich der Cy5-Emission mit der Cy5.5-Absorption ist schraffiert eingezeichnet.

und dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{676nm}^{Cy5.5} = 190000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ zu $R_0 = 6.9$ nm. Verglichen mit den in der Literatur beschriebenen typischen R_0 -Abständen, die zwischen 2 - 6 nm liegen (Van Der Meer et al., 1994), ist dies ein außerordentlich hoher Förster-Abstand. Bis heute sind lediglich vier Donor-Akzeptor-Paare mit R_0 -Abständen zwischen 6 - 7 nm beschrieben worden.

Die natürlichen Lebensdauern (τ_0) von Cy5 und Cy5.5, welche nach Gl. (19) über ϕ_F und τ_F experimentell zugänglich sind, stimmen innerhalb der Standardabweichungen mit den nach Strickler und Berg (1962) (siehe Gl. (14)) aus den spektralen Daten berechneten Werten von $\tau_0(Cy5) = 3.1 \pm 0.47$ ns und $\tau_0(Cy5.5) = 3.75 \pm 0.56$ ns überein.

4.1.2 Charakterisierung der proteingebundenen Fluorophore

Wird im RETIA die Modulation der Donorfluoreszenz durch die Anwesenheit des Akzeptorfluorophors beobachtet, so wird die Signaldynamik von folgenden Faktoren bestimmt:

- der *Intensität* der Cy5 markierten Antikörper (IgG-Cy5) und
- von der Energie-Übertragungsrate k_{RET} von IgG-Cy5 zu den mit dem Akzeptorfluorophor markierten Analytderivaten im Antigen-derivat-Antikörper-Komplex.

Die *Intensität* der IgG-Cy5-Konjugate hängt dabei entscheidend davon ab, wieviele Fluorophore kovalent an den Antikörper angebunden werden. Eine wesentliche Eigenschaft der Cyanin-Farbstoffe ist ihre Tendenz in wässrigen Lösungen zu aggregieren (Dimerbildung siehe Kap. 2.1.4) (Li und Peng, 1998, Min et al., 1998, West und Pearce, 1965, Sundström und Gillbro, 1985, Sidrowicz et al., 1997), vor allem wenn sie in hohen Konzentrationen an Proteinoberflächen immobilisiert werden. Dies führt zu einer drastischen Reduktion der Fluoreszenzintensität, da die gebildeten Dimere nicht fluoreszieren. Die Optimierung des Markierungsgrades des Antikörpers hinsichtlich einer maximalen „Antikörperfluoreszenz“ ist demnach von großer Bedeutung.

Die *Energie-Übertragungsrate* k_{RET} im $Ag(A)$ - $Ak(D)$ -Komplex hängt nach Gl. (37) vom mittleren Abstand R der Fluorophore ab ($k_{RET} \sim 1/R^6$). Aus diesem Grund wurden bei der Darstellung der Analytderivat-Cy5.5-Konjugate zwei verschiedene Ansätze parallel untersucht: (I) die direkte, kovalente Verknüpfung der Analytderivate mit Cy5.5 und (II) die indirekte Kupplung über BSA als Trägerprotein. Die direkte Verknüpfung hat dabei den Vorteil des geringeren Abstandes R der Fluorophore und damit der effizienteren Übertragung

der Cy5-Anregungsenergie auf Cy5.5. Nachteilig ist jedoch die aufwendige Synthese und Reinigung dieser Konjugate. Dem gegenüber steht die einfache Synthese und Reinigung der Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugate, wobei der Abstand R zwischen Cy5 und Cy5.5 aufgrund der Dimensionen des BSA (Länge: 15 nm, Durchmesser: 3.8 nm, Oncley et al., 1947) größer sein sollte.

4.1.2.1 Photophysikalische Eigenschaften der proteingebundenen Fluorophore

Der Einfluß des Markierungsgrades (MG) der IgG-Cy5-Konjugate auf die photophysikalischen Eigenschaften von Cy5 wurde anhand vier verschiedener MG des polyklonalen anti-Simazin-Antikörpers (SimIgG) (siehe Tabelle 3-3) untersucht. Zwei verschiedene MG wurden für die Charakterisierung der BSA-Cy5.5-Konjugate synthetisiert und sind in der Tabelle 3-2 aufgeführt. Die photophysikalischen Eigenschaften der SimIgG-Cy5- und BSA-Cy5.5-Konjugate in PBS sind in Tabelle 4-2 angegeben. Die Zunahme der *Rotationskorrelationszeit* zeigt, verglichen mit den Werten der Farbstoffe in Lösung (siehe Tabelle 4-1), daß die Fluorophore kovalent an die Proteine angebunden sind. Aufgrund der höheren *Polarisierbarkeit* der Umgebung verschieben sich die Absorptionsmaxima von Cy5 und Cy5.5 um 2 nm bzw. 5 nm zu größeren Wellenlängen. Die Fluoreszenzmaxima der Konjugate sind um 2 nm bzw. 5 nm rotverschoben. Die Fluoreszenzlebensdauern sind, im Gegensatz zu denen der Farbstoffe in Lösung, biexponentiell und können über verschiedene Aufenthaltsorte der angebundenen

Tabelle 4-2: Photophysikalische Eigenschaften der proteingebundenen Farbstoffe in PBS. Die Lebensdauern und Rotationskorrelationszeiten wurden für die Konjugate SimIgG-Cy5 (1:3.7) bzw. BSA-Cy5.5 (1:1.6) bestimmt. Die präexponentiellen Faktoren α_i sind in Klammern nach den Lebensdauern $\tau_{i,F}$ angegeben. Der experimentelle Fehler bei der Bestimmung von τ_F und τ_R beträgt $\pm 5\%$ bzw. $\pm 7\%$.

	$\lambda_{max}(\text{abs})$ [nm]	$\lambda_{max}(\text{em})$ [nm]	$\epsilon_{\lambda_{max}}$ [l/mol·cm]	$\tau_{i,F}$ [ns]	$\bar{\tau}_F$ [ns]	τ_R^1 [ns]
SimIgG-Cy5	649	667	250000	1.01 (0.12) 1.88 (0.1)	1.54	1.08
BSA-Cy5.5	681	703	190000	1.17 (0.16) 1.94 (0.09)	1.53	1.27

¹ Die intrinsische Anisotropie r_0 wurde in Glycerin zu 0.36 bestimmt.

Farbstoffe erklärt werden. Die kurze Abklingzeit, die die gleiche Größenordnung besitzt, wie die der freien Farbstoffe in Lösung, kann solchen Molekülen zugeordnet werden, die vollständig mit dem Lösungsmittel in Kontakt sind. Die lange Abklingzeit läßt eine hydrophobere Umgebung der Farbstofffraktion vermuten (Terpetschnig et al., 1994). Wie bereits in Kap. 2.1.2 erwähnt, kann das biexponentielle Abklingverhalten auch eine Verteilung von Abklingzeiten in der heterogenen Umgebung widerspiegeln, ohne daß die partiellen Abklingzeiten $\tau_{i,F}$ konkreten Molekülumgebungen zugeordnet werden können.

4.1.2.2 Dimerenbildung

Die Absorptionsspektren der SimIgG-Cy5 und BSA-Cy5.5-Konjugate sind in Abbildung 4-2 I. dargestellt. Mit zunehmendem MG nimmt der Extinktionskoeffizient des Absorptionsmaximums ab und es erscheint eine neue Bande, welche um 45 nm (Cy5) bzw. 50 nm (Cy5.5)

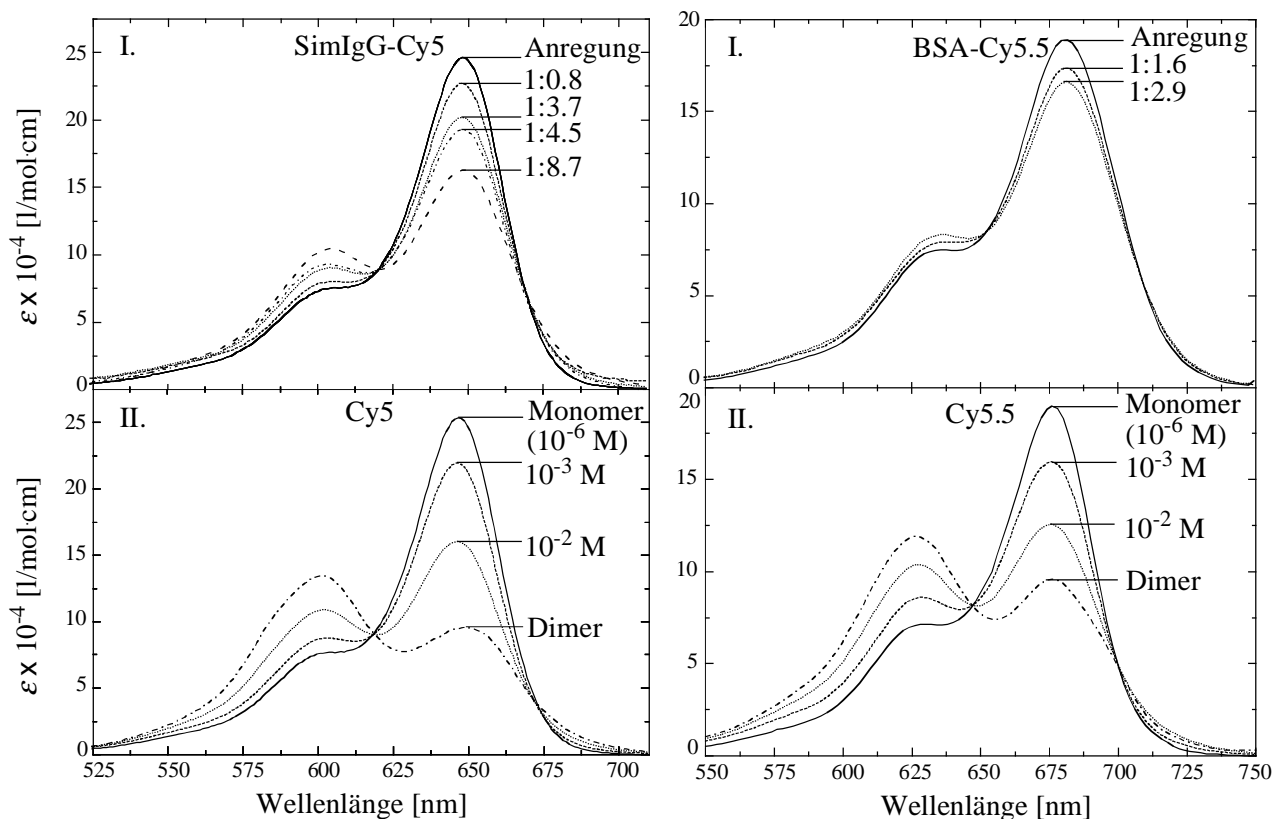


Abbildung 4-2: I. Fluoreszenzanregungsspektrum der Antikörper- (links) bzw. BSA-Konjugate (rechts) im Vergleich zu deren Absorptionsspektren in PBS. II. Absorptionsspektren von verschiedenen Konzentrationen der freien Farbstoffe in carbonatgepufferter Lösung. Die Absorptionsspektren der Monomeren Cy5 und Cy5.5 sind identisch mit ihren Fluoreszenzanregungsspektren.

bezüglich des Maximums *blauverschoben* ist. Zusätzlich erscheinen zwei *isosbestische Punkte* bei 619 nm und 673 nm (Cy5) bzw. 647 nm und 700 nm (Cy5.5), die verdeutlichen, daß hier zwei absorbierende Spezies miteinander im Gleichgewicht stehen. Dieser Effekt wird durch attraktive Wechselwirkungen zwischen benachbarten Farbstoffmolekülen hervorgerufen (*hydrophobe Wechselwirkung*, siehe Kap. 2.2.2.3), die bei höheren MG zur Bildung von Dimeren führen (West und Pearce, 1965) (siehe Kap. 2.1.4). Der aggregierte Anteil der Farbstoffe kann durch Zugabe von DMF zur PBS-Lösung im Verhältnis 1:1, v/v, nahezu vollständig in die Monomere umgewandelt werden, wodurch nach Korrektur der spektralen Verschiebung der Spektren um 6 nm (Cy5) bzw. 5 nm (Cy5.5), die isosbestischen Punkte exakt bestimmt werden konnten.

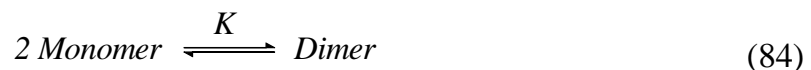
Die Fluoreszenzanregungsspektren dieser Konjugate sind identisch mit den Absorptionsspektren der monomeren Farbstoffe, was darauf hindeutet, daß die Dimere im wesentlichen *nicht-fluoreszierend* sind (siehe Kap. 2.4).

Um den Anteil der dimeren Spezies in den Protein-Konjugaten zu bestimmen, ist die Kenntnis des molaren *Extinktionskoeffizienten* der reinen Dimere bei einer bestimmten Wellenlänge erforderlich. Unter der Voraussetzung der Assoziation zu Dimeren ergeben sich für den Assoziationsgrad α folgende Beziehungen (Förster und König, 1957):

$$\alpha = \frac{2c_d}{c_0} = \frac{c_0 - c_m}{c_0} \quad (82)$$

$$\varepsilon(\lambda) = (1 - \alpha)\varepsilon_m(\lambda) + \frac{\alpha}{2}\varepsilon_d(\lambda) \quad (83)$$

Dabei sind c_d und c_m die Gleichgewichtskonzentrationen der Dimeren bzw. Monomeren und c_0 die Gesamtkonzentration des Farbstoffs mit $c_0 = 2 \cdot c_d + c_m$. $\varepsilon_m(\lambda)$ und $\varepsilon_d(\lambda)$ sind die Extinktionskoeffizienten des Monomeren und des Dimeren als Funktion der Wellenlänge. Unter der Annahme, daß für die Assoziante das *Massenwirkungsgesetz* gemäß dem Gleichgewicht



gilt, ergibt sich die weitere Beziehung

$$K = \frac{c_d}{c_m^2} = \frac{\alpha}{2(1 - \alpha)^2 c_0} \quad (85)$$

Die Gleichungen Gl. (83) und Gl. (85) müssen für sämtliche Wellenlängen und Konzentrationen erfüllt sein. Deshalb genügen zur Ermittlung von $\epsilon_d(\lambda)$, neben $\epsilon_m(\lambda)$, noch zwei weitere Spektren mit verschiedenen Assoziationsgraden α . Abbildung 4-2 II zeigt die Absorptionsspektren der reinen monomeren Farbstoffe ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ M) und die Spektren von zwei weiteren, konzentrierteren Lösungen ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ M und $1 \cdot 10^{-2}$ M). Die numerische Rechnung führt auf die in Abbildung 4-2 II. ebenfalls eingezeichneten *Absorptionsspektren* der reinen Dimeren. Diese besitzen zwei ausgeprägte Maxima bei 601 nm und 650 nm (Cy5) bzw. 626 nm und 676 nm (Cy5.5). Durch die Dimerenbildung kommt es also zur Spaltung der monomeren Absorptionsbande in zwei Banden. Dies wird auch vom *Excitonen-Modell* (Kap. 2.1.4) für schief-orientierte Übergangsdipolmomente der monomeren Einheiten vorhergesagt (Sundström und Gillbro, 1985). Die Lage des Dimerenmaximums über der Schulter des monomeren Absorptionsspektrums zeigt, daß die *Wechselwirkungsenergie* bei der Dimerenbildung wahrscheinlich in der gleichen Größenordnung liegt, wie die eines Schwingungsübergangs (West und Pearce, 1965).

Mit Hilfe der berechneten Dimerenspektren konnte das *Monomer/Dimer-Verhältnis* der verwendeten Konjugate bestimmt werden. In Tabelle 4-3 sind die erhaltenen Daten für die SimIgG-Cy5- und BSA-Cy5.5-Konjugate dargestellt. Mit zunehmendem MG von Cy5 (von 0.8 bis 8.7) und Cy5.5 (von 1.6 bis 1.9) nimmt der relative Anteil der Monomere von 0.9 auf 0.52 bzw. von 0.84 auf 0.76 ab. Die *Gleichgewichtskonstante der Assoziation* ergibt sich zu $K = 0.08 \pm 0.02$ für Cy5 und $K = 0.07 \pm 0.005$ für Cy5.5.

Ein weiterer Vorteil der Kenntnis der isosbestischen Punkte ist die Möglichkeit, MG neu dargestellter Konjugate exakt bestimmen zu können. Dies wird dadurch erreicht, indem ein monomeres Absorptionsspektrum (Anregungsspektrum) so an das gemessene Konjugat-spektrum anpaßt wird, daß sich die beiden Kurven in den isosbestischen Punkten schneiden. Die Extinktion des Monomerenspektrums wird anschließend bei der Berechnung des MG nach Gl. (81) verwendet.

4.1.2.3 Quantenausbeuten und Fluoreszenzlebensdauern

Mit der Kenntnis der Monomeren/Dimeren-Verhältnisse der Konjugate ist es möglich, die *Fluoreszenzquantenausbeuten* der proteingebundenen monomeren Farbstoffe (ϕ_F^{DA}) nach Gl. (74) zu bestimmen. In Tabelle 4-3 sind in der letzten Spalte die erhaltenen Werte für ϕ_F^{DA}

Tabelle 4-3: Prozentualer Anteil von monomeren Farbstoffmolekülen in den untersuchten Konjugaten. Ebenfalls angegeben ist die Gleichgewichtskonstante und die Quantenausbeuten der Farbstoffe, gemessen in PBS. Der experimentelle Fehler bei der Bestimmung von ϕ_F^{DA} beträgt typischerweise $\pm 5\%$.

	Monomer [%]	K	ϕ_F^{DA} (Monomer)
Cy5 (Lösung)	100	-	0.27 ¹
SimIgG-Cy5 (1:0.8)	90	0.08	0.88
SimIgG-Cy5 (1:3.7)	74	0.06	0.44
SimIgG-Cy5 (1:4.5)	69	0.07	0.40
SimIgG-Cy5 (1:8.7)	52	0.1	0.14
Cy5.5 (Lösung)	100	-	0.23 ²
BSA-Cy5.5 (1:1.6)	84	0.07	0.36
BSA-Cy5.5 (1:2.9)	76	0.07	0.21

¹ Werte aus Mujumdar et al. (1993), ² Werte aus Mujumdar et al. (1996).

angegeben. Bei dem kleinsten MG von 0.8 (Cy5) bzw. 1.6 (Cy5.5) ist eine starke Zunahme von ϕ_F^{DA} , bezüglich der Werte der freien Farbstoffe in Lösung, auf 0.88 bzw. 0.36 festzustellen. Diese Zunahme spiegelt sich auch in der Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauern von 0.94 ns (Cy5) bzw. 0.99 ns (Cy5.5) der Farbstoffe in Lösung auf 1.54 ns (IgG-Cy5, MG 1:3.7) bzw. 1.53 ns (BSA-Cy5.5, MG 1:1.6) wider (vergleiche Tabelle 4-2 und Tabelle 4-1, siehe Abbildung 4-3). Dies ist auf die eingeschränkte *Torsionsbewegung* um die zentrale Methinbrücke von Cy5 und Cy5.5 in der rigideren Umgebung der Proteine zurückzuführen. Das gleiche Ergebnis wurde von Aramendia et al. (1994), Netzels et al. (1995), Serpone und Sahyun (1994) und Carlsson et al. (1994) für andere Cyanin-Farbstoffe erhalten.

Mit zunehmendem MG wird eine drastische Verringerung von ϕ_F^{DA} festgestellt. So nimmt ϕ_F^{DA} von Cy5 von 0.88 (MG 1:0.8) auf 0.14 (MG 1:8.7) ab. Diese Abnahme kann auf *RET* von den fluoreszenten monomeren Farbstoffen (SimIgG-Cy5_m bzw. BSA-Cy5.5_m) auf eine zunehmende Anzahl von nicht-fluoreszierenden dimeren Molekülen (SimIgG-Cy5_d bzw. BSA-Cy5.5_d) an einem Proteinmolekül zurückgeführt werden. Die berechneten Förster-Abstände für den RET von SimIgG(-Cy5_m → -Cy5_d) und BSA(-Cy5.5_m → -Cy5.5_d) betragen 8.4 nm, wenn der

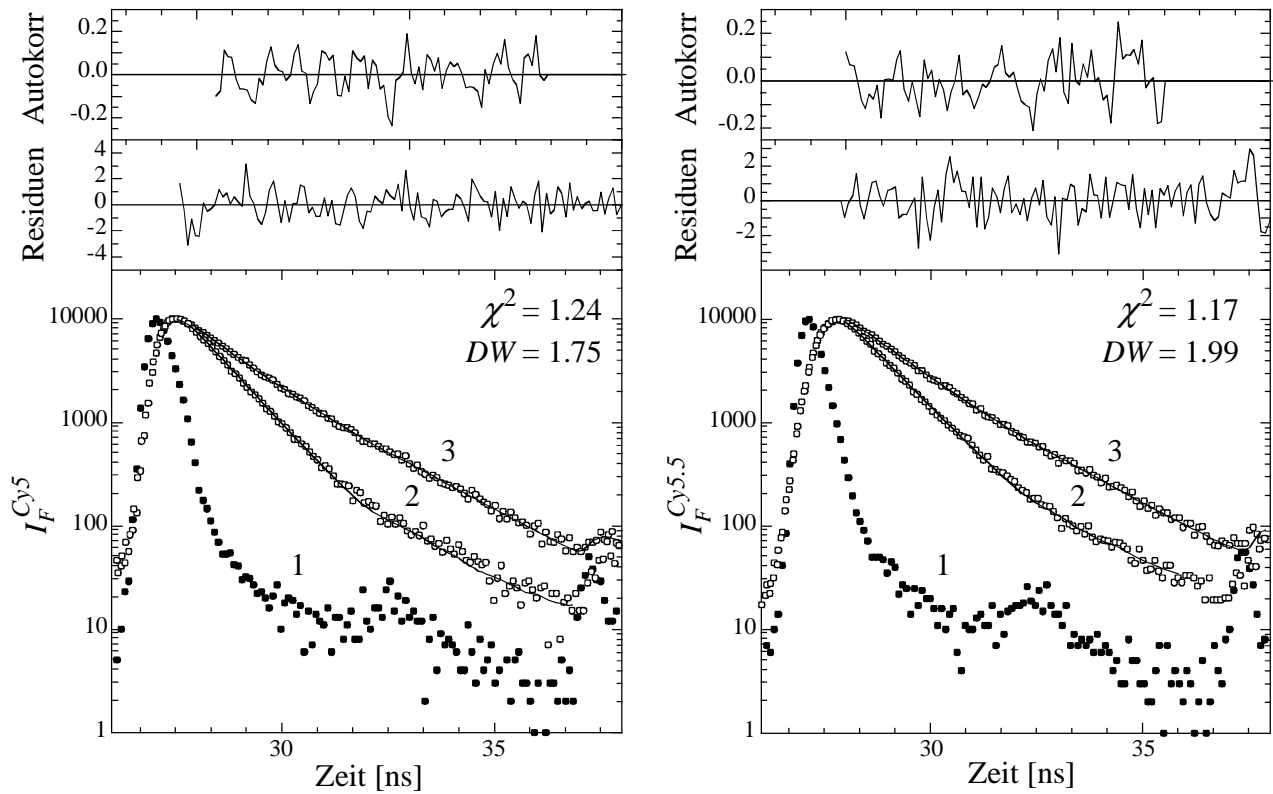


Abbildung 4-3: Links: Lampenpulsprofil (1) und Fluoreszenzabklingkurven von Cy5 (2) und SimIgG-Cy5 (MG 1:3.7) (3) in PBS. Rechts: Lampenpulsprofil (1) und Fluoreszenzabklingkurven von Cy5.5 (2) und BSA-Cy5.5 (MG 1:1.6) (3) in PBS. Die Linien stellen Anpassungen nach Gl. (17) dar. Die angegebenen Qualitätsparameter der Anpassung (χ^2 , DW, Residuen und Autokorrelation siehe Kap. 3.2.1.5) beziehen sich auf die Abklingkurven der gebundenen Farbstoffe.

Berechnung für beide Farbstoffe ein ϕ_F^D -Wert (siehe Gl. (38)) von 1 (siehe Abbildung 4-5) zugrunde gelegt wird. ϕ_F^D stellt dabei die Fluoreszenzquantenausbeute der Monomere in Abwesenheit von RET-Prozessen dar. Dies läßt einen sehr effizienten RET von den fluoreszenten Monomeren zu den nicht-fluoreszierenden Dimeren vermuten, wenn die Dimensionen eines Antikörper- (siehe Abbildung 2-7) bzw. BSA-Moleküls berücksichtigt werden.

Modellrechnung

Die Abhängigkeit der Quantenausbeute (ϕ_F^{DA}) der SimIgG-Cy5_m vom Markierungsgrad läßt sich entsprechend der Vorgehensweise von Gennis und Cantor (1972) und Ullman et al. (1976) unter vereinfachenden Voraussetzungen berechnen. Es wird ein RET zwischen Donoren und Akzeptoren angenommen, die in einem bestimmten Abstand voneinander am gleichen Proteinmolekül angekuppelt sind. Die Verteilung der Monomere und Dimere auf die Proteinmoleküle wird mit Hilfe der *Poisson-Statistik* beschrieben. Diese kann als Grenzform der Binomial-

verteilung bei kleinen Wahrscheinlichkeiten und bei einer großen Anzahl von Bindungsstellen eingesetzt werden.

Verteilung der Farbstoffmoleküle: Ist μ der mittlere Anzahl von Farbstoffmolekülen pro Protein (MG), so ist die Wahrscheinlichkeit $P(N_\mu, \mu)$ ein Proteinmolekül mit N_μ Farbstoffmolekülen zu finden durch

$$P(N_\mu, \mu) = \frac{\mu^{N_\mu}}{N_\mu!} e^{-\mu} \quad (86)$$

gegeben. Die Farbstoffmoleküle assoziieren nun gemäß dem Assoziationsgleichgewicht in Gl. (84) zu Dimeren. Dabei wird vorausgesetzt, daß das Massenwirkungsgesetz auch in der heterogenen Umgebung des betrachteten Systems gilt. Aus Gl. (85) läßt sich die mittlere Anzahl von Dimeren δ bei festem N_μ berechnen. Die einzig physikalisch sinnvolle Lösung der resultierenden quadratischen Gleichung ist

$$\delta = \frac{(4KN_\mu + 1) - \sqrt{(4KN_\mu + 1)^2 - 16K^2N_\mu^2}}{8K}. \quad (87)$$

Analog zu Gl. (86) kann die Wahrscheinlichkeit $P(D_\delta, \delta)$, D_δ Dimere bei einer mittleren Anzahl von δ Dimeren auf einem Antikörpermolekül zu finden, über eine Poisson-Verteilung angegeben werden

$$P(D_\delta, \delta) = \frac{\delta^{D_\delta}}{D_\delta!} e^{-\delta}. \quad (88)$$

Die Gesamtwahrscheinlichkeit, bei einem mittleren MG von μ ein Antikörpermolekül mit N_μ Farbstoffmolekülen und davon D_δ Dimeren zu finden, ergibt sich aus dem Produkt der Gl. (86) und Gl. (88)

$$P(N_\mu, D_\delta, \mu) = P(N_\mu, \mu) \cdot P(D_\delta, \delta) \quad (89)$$

Quantenausbeute: Die Fluoreszenzintensität (I_F) der monomeren Farbstoffe bei einem mittleren MG von μ läßt sich in Abwesenheit von RET-Prozessen unter Berücksichtigung des inneren Filtereffekts nach

$$I_F = I_{abs} \cdot \frac{\varepsilon^D \cdot c^D}{\varepsilon^D \cdot c^D + \varepsilon^A \cdot c^A} \cdot \phi_F^D \quad (90)$$

berechnen. Dabei ist I_{abs} die Intensität des absorbierten Lichts, ϕ_F^D die Fluoreszenzquantenausbeute der Monomere (Donoren) in Abwesenheit von RET, ε^D bzw. ε^A die Extinktionskoeffizienten der Monomere bzw. Dimere (Akzeptoren) bei der Anregungswellenlänge ($\lambda = 647$ nm) und c^D bzw. c^A die Konzentrationen der Monomere bzw. Dimere bei dem betrachteten mittleren MG von μ . In Anwesenheit von RET-Prozessen ergibt sich die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F^{DA} zu

$$\phi_F^{DA} = \frac{\varepsilon^D \cdot c^D}{\varepsilon^D \cdot c^D + \varepsilon^A \cdot c^A} \cdot \phi_F^D \cdot (1 - \bar{E}) \quad (91)$$

wobei \bar{E} die mittlere Transfereffizienz ist. Die Berechnung von \bar{E} erfolgt entsprechend der folgenden Vorgehensweise:

Transfereffizienz: Die Transfereffizienz $E(D_\delta)$ läßt sich unter der Annahme einer *parallelen Kinetik erster Ordnung* für den RET von einem Donor (Cy5_m) zu D_δ Dimeren (Akzeptoren) (Dale und Teale, 1970) über die Summe von Ratenkonstanten $k_{RET,i}$ beschreiben

$$E(D_\delta) = \frac{\tau_F^D \sum_{i=1}^{D_\delta} k_{RET,i}}{1 + \tau_F^D \sum_{i=1}^{D_\delta} k_{RET,i}} = \frac{\sum_{i=1}^{D_\delta} \left(\frac{R_0}{R_i} \right)^6}{1 + \sum_{i=1}^{D_\delta} \left(\frac{R_0}{R_i} \right)^6}, \quad (92)$$

wobei $k_{RET,i}$ und R_i die Ratenkonstante bzw. der Abstand von dem Donor zu dem i -ten Akzeptor ist und R_0 für alle Donor-Akzeptor-Paare als gleich angenommen wird. Diese Vereinfachung gilt nur dann, wenn die spektralen Eigenschaften der gebundenen Farbstoffe von der Heterogenität der Protein-Bindungsstellen unabhängig sind. Die Summe in Gl. (92) läßt sich durch Mittelung der Donor-Akzeptor-Abstände (\bar{R}) vereinfacht als

$$E(D_\delta) = \frac{D_\delta \left(\frac{R_0}{\bar{R}} \right)^6}{1 + D_\delta \left(\frac{R_0}{\bar{R}} \right)^6} \quad (93)$$

darstellen. Die Transfereffizienz $E(M_\mu, D_\delta)$ von $M_\mu = N_\mu - 2D_\delta$ Donoren zu D_δ Akzeptoren ergibt sich zu

$$E(M_{\mu}, D_{\delta}) = (N_{\mu} - 2D_{\delta}) \frac{D_{\delta} \left(\frac{R_0}{\bar{R}} \right)^6}{1 + D_{\delta} \left(\frac{R_0}{\bar{R}} \right)^6}. \quad (94)$$

Für die gewichtete, mittlere Transfereffizienz \bar{E} erhält man mit den Poisson-Termen aus Gl. (89) als Gewichtungsfaktoren

$$\bar{E} = \sum_{N_{\mu}=0}^n \frac{1}{N_{\mu}} \sum_{D_{\delta}=0}^m \{P(N_{\mu}, D_{\delta}, \mu) \cdot E(M_{\mu}, D_{\delta})\} \quad (95)$$

wobei für n und m Werte angenommen wurden, die groß genug waren (0 - 14), um eine signifikante Beeinträchtigung des numerischen Ergebnisses zu vermeiden. Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F^{DA} kann nun durch Einsetzen der Gl. (95) in Gl. (91) als Funktion von μ , ϕ_F^D , K , R_0 und \bar{R} berechnet werden.

Berechnung der Parameter: Für die Gleichgewichtskonstante K wurde bereits in Kap. 4.1.2.2 ein Wert von $K = 0.08 \pm 0.02$ ermittelt (siehe auch Tabelle 4-3) und für R_0 ergab sich unter der Annahme von $\phi_F^D = 1$ ein Wert von $R_0 = 8.4$ nm (siehe oben). Der mittlere Abstand \bar{R} zwischen statistisch auf einem Antikörpermolekül verteilten Donoren und Akzeptoren berechnet sich zu $\bar{R} = 5.9$ nm. Der Berechnung liegt dabei das in Abbildung 4-4 gezeigte Antikörpermodell zugrunde. Es besteht aus drei äquivalenten zylinderförmigen Fragmenten mit den in der Abbildung angegebenen Dimensionen.

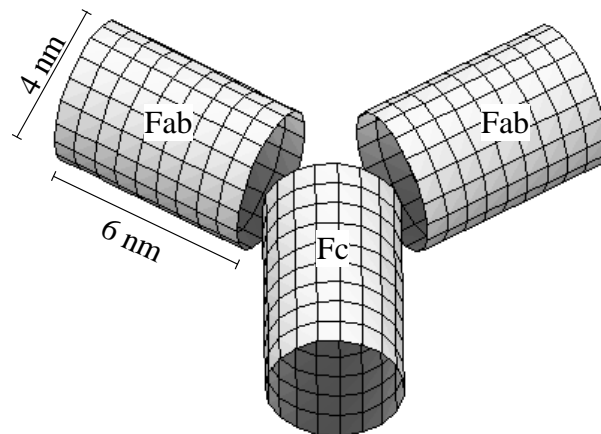


Abbildung 4-4: Antikörpermodell, welches zur Berechnung von \bar{R} verwendet wurde.

Vergleich der experimentellen und berechneten Werten: In Abbildung 4-5 sind die berechneten Quantenausbeuten von Cy5 für $\phi_F^D = 1$, $R_0 = 8.4$ nm, $K = 0.1$ und $\bar{R} = 5.9$ nm den experimentellen Werten aus Tabelle 4-3 gegenübergestellt. Unter Berücksichtigung der Einfachheit des Modells wird eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen und berechneten Werten erreicht. Daraus kann für die Fluoreszenzquantenausbeute der Monomere in Abwesenheit von RET-Prozessen ein Wert von $\phi_F^D = 1$ abgeleitet werden. Folglich werden durch die eingeschränkte *Torsionsbewegung* des Cy5-Moleküls und der damit verbundenen Restriktion in eine planare Konformation, die inneren Umwandlungsprozesse (internal conversion, ic) die zur strahlungslosen Desaktivierung führen, drastisch reduziert.

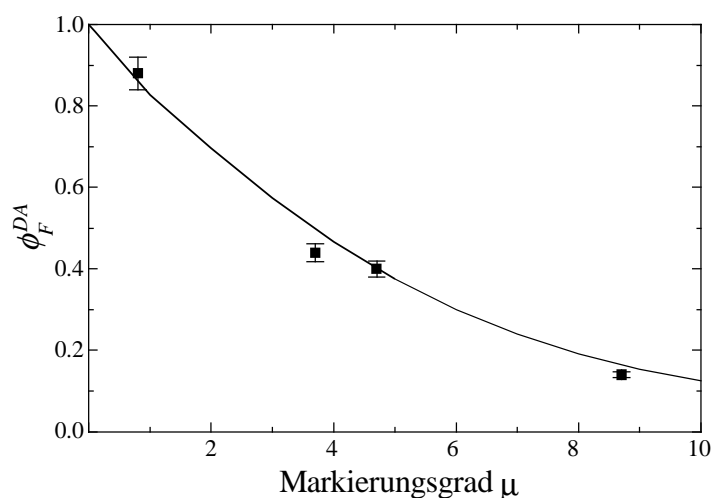


Abbildung 4-5: Auftragung der Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_F^{DA} der monomeren, Antikörper gebundenen Cy5 gegen den Markierungsgrad μ . Die durchgezogene Linie stellt die berechneten Werte dar. Die Berechnung wurde mit den Parametern $\phi_F^D = 1$, $R_0 = 8.4$ nm, $K = 0.1$ und $\bar{R} = 5.9$ nm durchgeführt.

Quantenausbeute pro Antikörpermolekül

Das Maximum der *Fluoreszenzintensität* pro markierten Antikörper kann durch Multiplikation der Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_F^{DA} der Cy5_m mit der Anzahl von Cy5_m pro Antikörpermolekül erhalten werden. Abbildung 4-6 zeigt die experimentellen und die nach dem Modell (mit den oben genannten Parametern) berechneten Werte. Mit zunehmendem MG nimmt die Fluoreszenzintensität zu und erreicht ein Maximum bei einem MG von ungefähr 4. Bei höheren MG beginnt die Fluoreszenzlöschung durch RET von $\text{SimIgG}(-\text{Cy5}_m \rightarrow -\text{Cy5}_d)$ zu

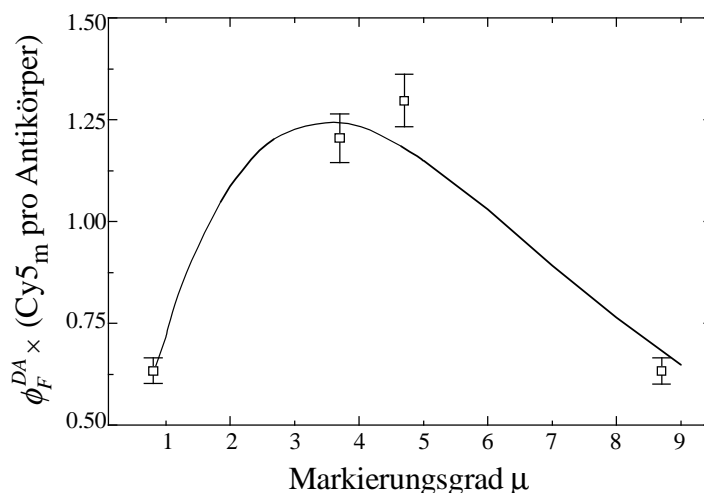


Abbildung 4-6: Quantenausbeute pro Antikörpermolekül in Abhängigkeit vom MG. Vergleich der gemessenen mit den nach dem Modell (—) berechneten Werten.

dominieren und führt zu der beobachteten Abnahme der Intensität. Dieses Ergebnis ist im guten Einklang mit dem Wert, den Southwick et al. (1990) für einen ähnlichen Carboxymethylindocyanin-Farbstoff (Cy5.12) erhalten haben.

4.1.3 RET im Antigen-Antikörper-Komplex

Wie bereits in Kap. 4.1.2 erwähnt wurden zur Optimierung des k_{RET} im Antigen-Antikörper-Komplex zwei verschiedene Ansätze untersucht: (I) die direkte kovalente Verknüpfung des Analytderivates mit Cy5.5 und (II) die indirekte Kupplung über BSA als Trägerprotein.

4.1.3.1 RET bei direkter kovalenter Markierung der Analytderivate mit Cy5.5

Aufgrund der starken Abhängigkeit von k_{RET} vom Abstand zwischen Cy5 und Cy5.5, sollte dieser für eine effiziente Übertragung der Anregungsenergie möglichst klein sein. Ein Ansatz, der dieser Forderung gerecht wird, ist die *direkte kovalente* Verknüpfung der Analytderivate mit Cy5.5. Als Modellsystem zur Untersuchung des RET im Antigen-Antikörper-Komplex wurden die in Tabelle 4-4 zusammengestellten Analytderivat-Cy5.5-Konjugate und die spezifischen Antikörper der Analyte Simazin und 2,4-D, SimIgG und E2G2, eingesetzt. Die MG der beiden Antikörper wurden mit MG = 1:3.7 (SimIgG-Cy5) und MG = 1:4.8 (E2G2-Cy5) (siehe Tabelle 3-3) so gewählt, daß das Maximum der Fluoreszenz der markierten Antikörper entsprechend der Optimierung in Kap. 4.1.2.3 erreicht wurde. Der Förster-Abstand für den RET von SimIgG-Cy5_m → Cy5.5 berechnet sich mit Hilfe der Angaben in Tabelle 4-2 und

Tabelle 4-4: Analytderivate der Analyte Simazin und 2,4-D, die mit Cy5.5 direkt markiert wurden.

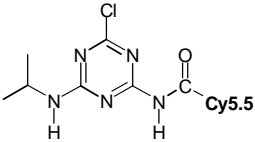
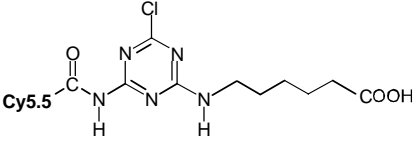
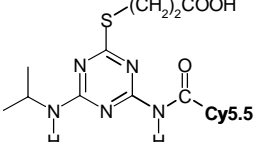
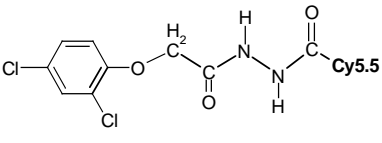
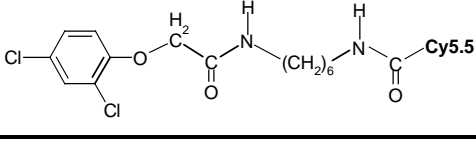
Name	Struktur	Molmasse
Desethylatrazin-Cy5.5		1286.4
Desisopropylatrazin-capronsäure-Cy5.5		1358.4
Desethylatrazinmercapto-propionsäure-Cy5.5		1356.4
2,4-D-hydrazid-Cy5.5		1333.4
2,4-D-(hexamethylen-1,6-diamin)-amid-Cy5.5		1405.4

Tabelle 4-3 zu $R_0 = 7.5$ nm. Dieser hohe R_0 -Abstand, verglichen mit dem der Farbstoffe in Lösung (Kap. 4.1.1), ist allein auf die höhere *Fluoreszenzquantenausbeute* von Cy5 zurückzuführen. Das Ergebnis der Titrations der Antikörper ($c_{0,IgG} = 150$ ng/ml) mit den Konjugaten ist beispielhaft an dem System SimIgG-Cy5, Desethylatrazin-Cy5.5 in Abbildung 4-7 gezeigt. Mit zunehmender Konzentration des zugesetzten Desethylatrazin-Cy5.5-Konjugates tritt keine Löschung der Cy5-Fluoreszenz auf. Es wird lediglich eine Zunahme der direkt angeregten Cy5.5-Fluoreszenz detektiert. Dies deutet darauf hin, daß die markierten Analytderivate vom Antikörper nicht mehr erkannt und gebunden werden. Dies ist vermutlich auf die unmittelbare Nähe des Fluorophors zu dem Hapten zurückzuführen. Auch die Variation der *Brückenkettenlänge* zwischen Analytderivat und Cy5.5, die am Beispiel der beiden 2,4-D-Derivate von einer Hydrazid-Brücke auf eine Hexamethylen-1,6-diamin-Brücke erhöht wurde, führte zu keiner Verbesserung des Bindungsverhaltens des betrachteten Antikörpers. Arbeiten von

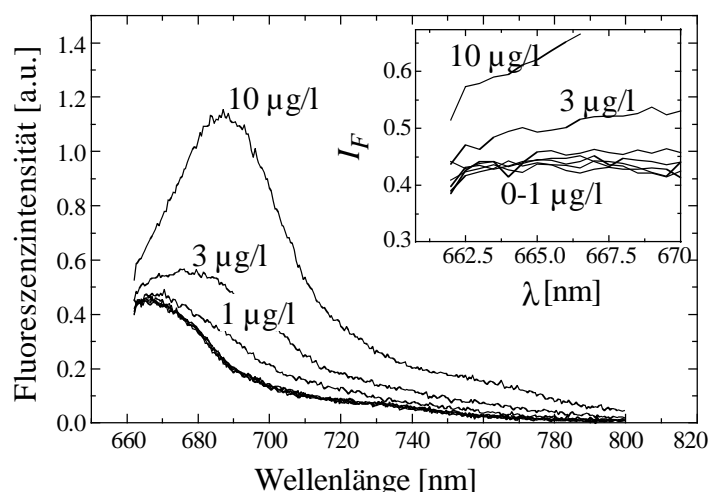


Abbildung 4-7: Titration des SimIgG-Cy5 ($c_{0, \text{SimIgG}} = 150 \text{ ng/ml}$) mit Desethylatrazin-Cy5.5. Der Ausschnitt rechts oben zeigt den vergrößerten Bereich um 667 nm.

Zhao et al. (1995), Matveeva et al. (1996) und Aguilar-Caballos et al. (1999) zeigten am Beispiel der Fluorophore Fluorescein und Cresyl Violet, daß nach der direkten Kupplung an ein Analytderivat kompetitive IA durchgeführt werden können. Eine weitere Optimierung der Brücken-Kettenlänge, die zur erfolgreichen Durchführung des RETIA mit direkt markierten Analytderivaten notwendig ist, war im Rahmen des Projektes LINDAU aus zeitlichen Gründen nicht möglich und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

4.1.3.2 RET bei indirekter Markierung der Analytderivate mit Cy5.5

Als zweiten Ansatz wurde die indirekte Markierung der Analytderivate mit Cy5.5 über BSA als Trägerprotein untersucht. Als Modellsystem wurde der polyklonale Simazin-Antikörper, SimIgG-Cy5 (MG 1:3.7), und das Triazinderivat Atrazincapronsäure (ACA) verwendet. Dieser Ansatz hat gegenüber dem direkt markierten (siehe oben) den Vorteil, daß die Erkennung des Analytderivates durch den Antikörper durch die Anwesenheit des Trägerproteins BSA nicht gestört wird¹⁰. Voraussetzung ist allerdings, daß der Antikörper eine ausreichende Affinität zum betrachteten Analytderivat aufweist.

Die Förster Abstände für den RET von SimIgG-Cy5_m zu den beiden am BSA gebundenen Cy5.5-Spezies, Cy5.5_m und Cy5.5_d, konnten mit Hilfe der in Tabelle 4-2 und Tabelle 4-3 angegebenen photophysikalischen Parametern und den in Abbildung 4-2 gezeigten Absorptions-

¹⁰ An dieser Stelle sei noch mal daran erinnert, daß die Produktion von Antikörpern gegen Haptene erst nach der Immunisierung eines Vertebraten mit einem Konjugat aus einem hochmolekularen Träger wie z.B. BSA und dem Hapten erfolgt (siehe Kap. 2.2.2.2).

spektren berechnet werden. Sehr hohe Werte von $R_0 = 7.6$ nm und $R_0 = 7.8$ nm für $\text{SimIgG-Cy5}_m \rightarrow \text{BSA-Cy5.5}_m$ und $\text{SimIgG-Cy5}_m \rightarrow \text{BSA-Cy5.5}_d$ wurden erhalten. Verglichen mit den Werten der freien Farbstoffe in Lösung aus Kap. 4.1.1 ($R_0 = 6.9$ nm) liegen die Werte der proteingebundenen Farbstoffe deutlich höher. Grund hierfür ist die *erhöhte* Fluoreszenzquantenausbeute der Cy5_m (Zunahme von $\phi_F = 0.27$ auf $\phi_F^{DA} = 0.44$) und der *vergrößerte* spektrale Überlapp.

Die Emissionsspektren von 10 $\mu\text{g/ml}$ SimIgG-Cy5 sind in Abbildung 4-8 links gezeigt. Die Zugabe von 0 - 50 $\mu\text{g/l}$ ACA-BSA-Cy5.5 (MG 3.6:1:1.6) führte zu einer stetigen Abnahme der Fluoreszenzintensität, bis bei $c_{\text{ACA}} = 50$ $\mu\text{g/l}$ die *maximale Löschung* der SimIgG-Cy5 -Fluoreszenz erreicht wurde (siehe Abbildung 4-8 rechts). Das gesamte Quenching der SimIgG-Cy5 -Fluoreszenz ($\Delta I_{F,\text{quench}}^{\text{Cy5}}$), welches sich als Differenz der SimIgG-Cy5 -Fluoreszenz in Abwesenheit (I_F^{Cy5}) und in Anwesenheit von 50 $\mu\text{g/l}$ ACA-BSA-Cy5.5 ($I_{F,\text{quench}}^{\text{Cy5}}$) berechnen läßt, beträgt

$$\Delta I_{F,\text{quench}}^{\text{Cy5}} = I_F^{\text{Cy5}} - I_{F,\text{quench}}^{\text{Cy5}} = 0.65 \cdot I_F^{\text{Cy5}}. \quad (96)$$

Diese sehr hohe Signaldynamik von 65 % zeigt einerseits, daß der Antikörper erwartungsgemäß das ACA-BSA-Cy5.5 -Konjugat bindet und andererseits, daß ein sehr effizienter Energieübertrag im Antigen-Antikörper-Komplex von Cy5 zu Cy5.5 erfolgt. Dies ist bemerkenswert, da die Abstände zwischen den beiden Fluorophoren im ungünstigsten Fall bis zu 25 nm betragen können.

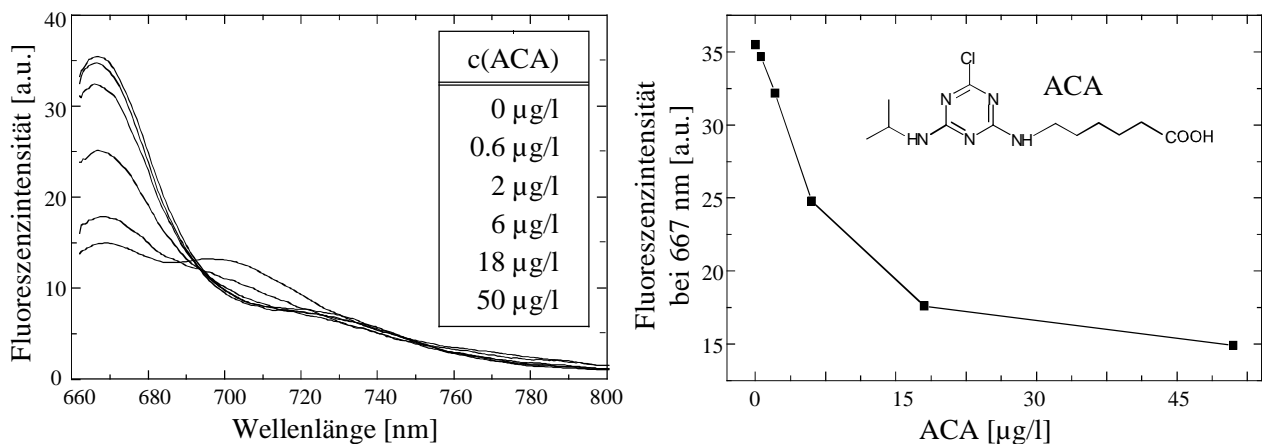


Abbildung 4-8: Titration von 10 $\mu\text{g/ml}$ SimIgG-Cy5 (MG 1:3.7) mit zunehmenden Konzentrationen von ACA-BSA-Cy5.5 (MG 3.6:1:1.6) (links). Rechts sind die Intensitäten am Maximum der Cy5 -Fluoreszenz ($\lambda = 667$ nm) gegen die ACA -Konzentration aufgetragen.

Charakterisierung des Energieübertrags

Stationäre Messungen

Die folgende detaillierte Analyse des Quenching-Prozesses wird zeigen, daß zwei Mechanismen für die beobachtete Abnahme der SimIgG-Cy5-Fluoreszenz im Antigen-Antikörper-Komplex verantwortlich sind:

- *dynamisches Quenching* aufgrund von RET von Cy5 zu Cy5.5 und
- *statisches Quenching* aufgrund der unmittelbaren Nähe von Cy5 und Cy5.5.

In Abbildung 4-9 sind links noch einmal die beiden Emissionsspektren von SimIgG-Cy5 für 0 µg/l und 50 µg/l ACA-BSA-Cy5.5 aus Abbildung 4-8 gezeigt. Bei dem Spektrum $I_{F,quench}^{Komplex}$ wurde bereits der direkt angeregte Anteil der Cy5.5-Fluoreszenz abgezogen. Dieser konnte durch *selektive* Anregung der Cy5.5-Fluoreszenz bei $\lambda_{exc} = 700$ nm (siehe Abbildung 4-2) und anschließende Umrechnung der erhaltenen Fluoreszenzintensität auf $\lambda_{exc} = 647$ nm bestimmt werden. Das Emissionsspektrum $I_{F,quench}^{Komplex}$ kann nun als Linearkombination aus dem *nicht gequenchten* Anteil der SimIgG-Cy5-Fluoreszenz ($I_{F,quench}^{Cy5}$) und der durch den RET verursachten *sensibilisierten* ACA-BSA-Cy5.5-Fluoreszenz ($\Delta I_{F,RET}^{Cy5.5}$, vertikal schraffiertes Spektrum) dargestellt werden.

Der Anteil der Fluoreszenzintensität von SimIgG-Cy5, welcher durch RET von SimIgG-Cy5_m → BSA(-Cy5.5_m und -Cy5.5_d) ($\Delta I_{F,RET}^{Cy5}$) gelöscht wird und deshalb zu der sensibilisierten Fluoreszenz von BSA-Cy5.5 führt, ergibt sich aus

$$\Delta I_{F,RET}^{Cy5} = \Delta I_{F,RET}^{Cy5.5} \cdot \frac{\phi_F^{Cy5}}{\phi_F^{Cy5.5}} \quad (97)$$

und beträgt

$$\Delta I_{F,RET}^{Cy5} = 0.53 \cdot \Delta I_{F,quench}^{Cy5} \quad (98)$$

ϕ_F^{Cy5} ist dabei die Fluoreszenzquantenausbeute der SimIgG-Cy5_m und $\phi_F^{Cy5.5}$ die *mittlere* Fluoreszenzquantenausbeute der BSA gebundenen Cy5.5. Daraus ergibt sich, daß nur etwa die Hälfte der Cy5-Fluoreszenz aufgrund von RET gelöscht wird. Mit Hilfe der in Tabelle 4-3 angegebenen Daten kann der RET-Anteil von SimIgG-Cy5_m zu den BSA gebundenen Cy5.5_m und Cy5.5_d zu $0.44 \cdot \Delta I_{F,quench}^{Cy5}$ bzw. $0.09 \cdot \Delta I_{F,quench}^{Cy5}$ berechnet werden.

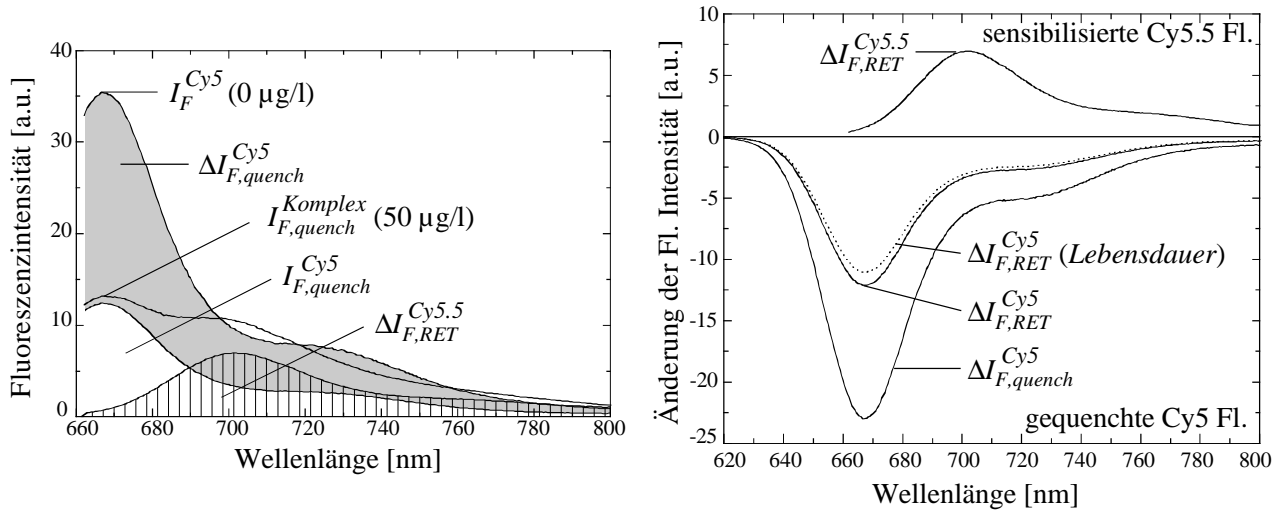


Abbildung 4-9: Links: Emissionsspektrum von 10 µg/ml SimIgG-Cy5 (I_F^{Cy5}) und Darstellung des Spektrums von SimIgG-Cy5_m mit 50 µg/l ACA-BSA-Cy5.5 ($I_{F,quench}^{Komplex}$) als Linearkombination der Komponenten. Rechts: Sensibilisierte ACA-BSA-Cy5.5-Fluoreszenz (positive y-Achse) und Quenching der SimIgG-Cy5_m-Fluoreszenz (negative y-Achse). Weitere Details finden sich im Text.

In Abbildung 4-9 wird rechts die Analyse der Quenching-Prozesse anschaulich dargestellt. Hier sind auf der negativen y-Achse die Löschprozesse und auf der positiven y-Achse die Zunahmen der Fluoreszenzintensitäten aufgetragen. Abbildung 4-10 faßt die Desaktivierungs-

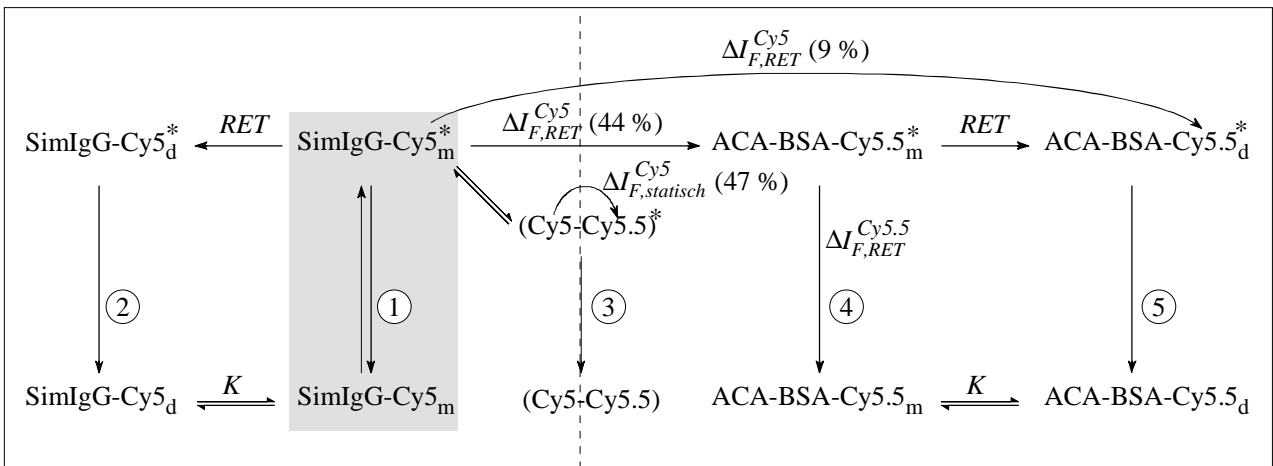


Abbildung 4-10: Desaktivierungsschema der angeregten SimIgG-Cy5_m* im Antigen-Antikörper-Komplex. Die linke Seite zeigt die Desaktivierungskanäle innerhalb des Antikörpermoleküls, die rechte Seite die Energie-Übertragungsprozesse auf die BSA gebundenen Cy5.5. 1: Fluoreszenz der Cy5_m*, 2: strahlungslose Desaktivierung von Cy5_d*, 3: statisches Quenching aufgrund von Elektronen-Transfer, 4: sensibilisierte Fluoreszenz der Cy5.5_m*, 5: strahlungslose Desaktivierung von Cy5.5_d*.

möglichkeiten der monomeren SimIgG-gebundenen Cy5-Farbstoffe anhand eines vereinfachten Termschemas (siehe auch Kap. 4.1.2.2) zusammen. Auf der linken Seite ist der in Kap. 4.1.2.3 beschriebene RET-Prozess der angeregten $Cy5_m$ zu den $Cy5_d$ innerhalb eines Antikörpermoleküls angegeben. Rechts sind die Desaktivierungsprozesse von $Cy5_m$ im Antigen-Antikörper-Komplex zu den BSA gebundenen Cy5.5 dargestellt.

Lebensdauermessungen

Da der RET als *dynamischer* Prozeß auch über Lebensdauermessungen zugänglich ist, wurden zur Bestätigung der aus den stationären Messungen erhaltenen Ergebnisse das Abklingverhalten von Cy5 im Antigen-Antikörper-Komplex gemessen.

Abbildung 4-11 zeigt die in Kap. 4.1.2.3 beschriebene Zunahme der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von Cy5 beim kovalenten Anbinden an den Antikörper von 0.94 ns auf 1.54 ns (siehe auch Abbildung 4-3 links) und die Abnahme der *mittleren* Fluoreszenzlebensdauer von Cy5 im Antigen-Antikörper-Komplex von 1.54 ns auf 1.06 ns. Daraus folgt, daß 31 % der Cy5-Anregungsenergie über RET desaktiviert wird. Die Analyse der Fluoreszenzabklingkurve von SimIgG-Cy5 in Anwesenheit von ACA-BSA-Cy5.5 (Kurve (3) aus Abbildung 4-11) nach dem von Förster (1949) abgeleiteten Abklinggesetz für *statistisch* verteilte Donoren und Akzeptoren (siehe Kap. 2.1.5, Gl. (42)) ergab für die Transfereffizienz einen Wert von $E_{RET} = 0.28$. Dieser ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem Wert von $E_{RET} = 0.31$, welcher mit der häufig gemachten Annahme eines *festen* Donor-Akzeptor-Abstandes berechnet wurde.

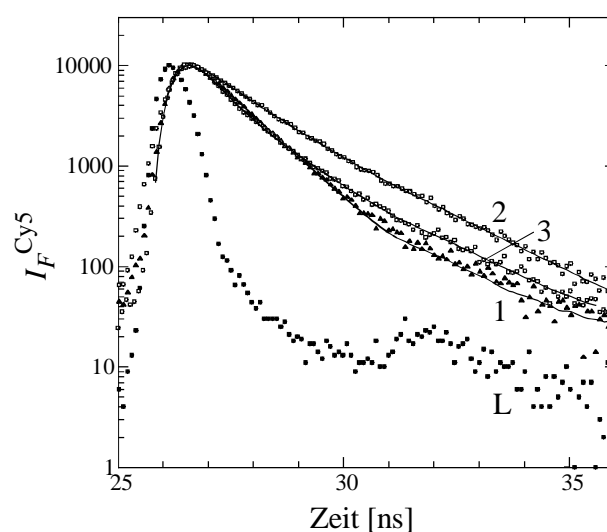


Abbildung 4-11: Lampenpulsprofil (L) und Fluoreszenzabklingkurven von Cy5 (1), 10 $\mu\text{g/ml}$ SimIgG-Cy5 in Abwesenheit (2) und Anwesenheit (3) von 50 $\mu\text{g/l}$ ACA-BSA-Cy5.5 in PBS.

Die integrale Emission, die diesem Quenching entspricht ($\Delta I_{F,RET}^{Cy5}(\text{Lebensdauer})$) und ebenfalls in Abbildung 4-9 rechts gezeigt ist (gepunktete Linie), beträgt

$$\Delta I_{F,RET}^{Cy5}(\text{Lebensdauer}) = 0.48 \cdot \Delta I_{F,quench}^{Cy5}. \quad (99)$$

Die Diskrepanz zwischen dem Anteil des Quenchings der Cy5-Fluoreszenz durch RET, welcher aus den *stationären* Messungen (0.53, siehe Gl. (98)) und den *dynamischen* Messungen (0.48) abgeleitet wurde, liegt innerhalb des experimentellen Fehlers.

Tabelle 4-5 faßt die charakteristischen Parameter, die den RET-Prozeß von IgG-Cy5_m auf BSA(-Cy5.5_m und -Cy5.5_d) beschreiben, zusammen. Aufgeführt sind die Förster-Abstände R_0 , die Transfereffizienz E_{RET} , die Ratenkonstante k_{RET} und der mittlere Abstand zwischen den Fluorophoren R .

Tabelle 4-5: Analyse des RET von SimIgG-Cy5_m zu ACA-BSA(-Cy5.5_m und Cy5.5_d).

τ_F^D [ns] ¹	τ_F^{DA} [ns] ²	R_0 (Cy5.5 _m) [nm]	R_0 (Cy5.5 _d) [nm]	E_{RET}	k_{RET} [1/s]	R [nm]
1.54	1.06	7.6	7.8	0.31	$3 \cdot 10^8$	8.7

¹ Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von Cy5 in Abwesenheit von Cy5.5. ² Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von Cy5 in Anwesenheit von Cy5.5.

Statisches Quenching

Der Anteil des SimIgG-Cy5-Quenchings, der nicht dem dynamischen Desaktivierungsprozeß RET zugeordnet werden konnte, muß einem *statischen* Mechanismus ($\Delta I_{F,static}^{Cy5}$) zugeschrieben werden. Er beträgt

$$\Delta I_{F,static}^{Cy5} = \Delta I_{F,quench}^{Cy5} - \Delta I_{F,RET}^{Cy5} = 0.47 \cdot \Delta I_{F,quench}^{Cy5}. \quad (100)$$

Dieser hohe Anteil führt zu der in Abbildung 4-8 links gezeigten, nur geringfügigen Überlagerung der gelöschten Cy5-Fluoreszenz durch die sensibilisierte Cy5.5-Fluoreszenz und damit zu der beobachteten hohen Signaldynamik von 65 %.

Als möglicher Mechanismus der statischen Löschung ist hierbei der *Elektronen-Transfer* (ET) zu diskutieren. Dieser tritt bei Cyanin-Farbstoffen häufig als Konkurrenzprozeß zum RET auf (Killesreiter, 1979, Möbius, 1978). Weiterhin sind Cyaninfarbstoffe als sehr effiziente *spek-*

trale Sensibilisatoren im photographischen Prozeß bekannt. Hierbei werden über photoinduzierte ET-Reaktionen Silberhalogenide sensibilisiert (Maskasky, 1991). Auch ET-Prozesse von Cyanin-Farbstoffen zu Elektronen-Akzeptor-Molekülen, wie Methylviologen (Mialocq und Doizi, 1983, Doizi und Mialocq, 1987, Bauer und Königstein, 1993) und Benzylviologen (Feller und Gadonas, 1996), sind berichtet worden. Der ET von Cyaninfarbstoffen zu Cyaninfarbstoffen ist bis heute nur in Form von einer sogenannten *Selbstsensibilisierung* von J-Aggregaten durch die monomeren Farbstoffe beobachtet worden (Sviridov et al., 1992). Die detaillierte spektroskopische Charakterisierung dieses Prozesses, die nur mit Hilfe der schnellen *transienten Pikosekunden-Absorptions-Spektroskopie* möglich ist (Feller und Gadonas, 1996), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Elektronen-Transfer erfolgt im Gegensatz zum RET über überlappende Elektronenwolken und erfordert demzufolge einen *physikalischen Kontakt* von Cy5 und Cy5.5. Der hohe Anteil der statischen Fluoreszenzlöschung von 47 % zeigt, daß sich die beiden Farbstoffe im Antigen-Antikörper-Komplex trotz der voluminösen Trägerproteine räumlich sehr weit annähern können. Damit ist der Ansatz der indirekten Kupplung der Analytderivate mit Cy5.5 aufgrund der einfachen Synthese der Konjugate und der erhaltenen hohen Signaldynamik im RETIA der direkten Kupplung der beiden Moleküle deutlich überlegen.

4.1.4 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

- ⇒ Die Sulfoindocyanin-Farbstoffe Cy5 und Cy5.5 wurden aufgrund der geeigneten photo-physikalischen Eigenschaften als Marker für den RETIA ausgewählt.
- ⇒ Der Förster-Abstand des Donor-Akzeptor-Paares beträgt in Lösung $R_0 = 6.9$ nm und stellt einen außerordentlich hohen Wert dar.
- ⇒ Die Fluoreszenzquantenausbeute von Cy5 wird von $\phi_F = 0.27$ in Lösung auf $\phi_F^D = 1$ am Protein erhöht. Grund ist die eingeschränkte Torsionsbewegung um die zentrale Polymethinbrücke in der rigiden Umgebung der Proteine.
- ⇒ Durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Antikörper gebundenen monomeren Cy5-Molekülen kommt es mit zunehmendem MG zur Bildung von nicht-fluoreszierenden Dimeren. Der Förster-Abstand für den RET von SimIgG(-Cy5_m → -Cy5_d) beträgt $R_0 = 8.4$ nm. Dadurch bedingt tritt ein sehr effizienter RET-Prozess von den

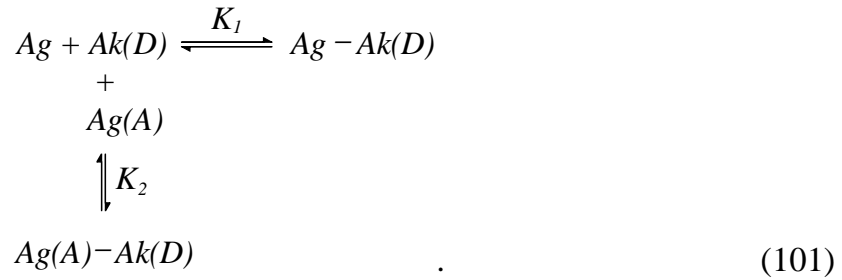
- Monomeren zu den Dimeren auf, der eine drastische Verringerung von ϕ_F^{DA} zur Folge hat.
- ⇒ Diese beiden gegenläufigen Prozesse (eingeschränkte Torsionsbewegung \leftrightarrow Löschung durch RET) führen zu einem Maximum der Fluoreszenzintensität der Cy5-markierten Antikörper bei einem MG von 4 ± 1 .
 - ⇒ Die Kenntnis der reinen Dimerenspektren von Cy5 und Cy5.5 ermöglicht eine exakte Bestimmung der Markierungsgrade von Protein-Konjugaten.
 - ⇒ Die Titration der markierten Antikörper mit den untersuchten, direkt markierten Analytderivat-Cy5.5-Konjugaten, führte zu keiner Löschung der Cy5-Fluoreszenz.
 - ⇒ Indirekt markierte Analytderivate eignen sich aufgrund der hohen Signaldynamik von 65 % (bei $c_{0,Ak} = 10 \mu\text{g/ml}$) im Antigen-Antikörper-Komplex hervorragend für die Durchführung des RETIA. Desweiteren zeichnen sie sich durch eine einfache Synthese aus.
 - ⇒ Die detaillierte Analyse der Löschung der Cy5-Fluoreszenz im $Ag(A)-Ak(D)$ -Komplex führt zu zwei konkurrierenden Desaktivierungsprozessen: dem dynamischen RET und dem statischen ET. Das Quenching erfolgt etwa im Verhältnis 1:1, wodurch nur 50 % der zu erwartenden sensibilisierten Cy5.5-Fluoreszenz auftritt.

4.2 Simulationsrechnungen zum RETIA

Dieser Abschnitt befaßt sich mit der Berechnung der Kalibrierkurven für das kompetitive Testformat des RETIA. Darauf aufbauend werden die Optimierungsmöglichkeiten im Hinblick auf eine minimale Nachweisgrenze (NWG) und maximale Signaldynamik des Assays anhand der systematischen Variation der Assayparameter, Konzentration des markierten Analytderivates ($c_{0,Ag(A)}$), Konzentration des markierten Antikörpers ($c_{0,Ak(D)}$) und Affinitätskonstante des Gleichgewichtes zwischen $Ag(A)$ und $Ak(D)$, K_2 , gezeigt.

4.2.1 Berechnung der Kalibrierkurven

Die kompetitiven Reaktionen des Analyten aus der Probe (Ag) und des Akzeptor markierten Analytderivates ($Ag(A)$) um die Bindungsstellen des Donor markierten Antikörpers ($Ak(D)$) lassen sich anhand folgender Gleichgewichte beschreiben:



$Ag-Ak(D)$ und $Ag(A)-Ak(D)$ stellen die Analyt-(markierter Antikörper) bzw. (markierter Analyt)-(markierter Antikörper)-Komplexe dar. K_1 und K_2 sind die Affinitätskonstanten der entsprechenden Reaktionen, die sich aus den Gleichgewichtskonzentrationen nach Gleichung Gl.(102) bzw. Gl.(103) berechnen lassen:

$$K_1 = \frac{c_{Ag-Ak(D)}}{c_{Ag} \cdot c_{Ak(D)}} \quad (102)$$

$$K_2 = \frac{c_{Ag(A)-Ak(D)}}{c_{Ag(A)} \cdot c_{Ak(D)}}. \quad (103)$$

Die Gesamtkonzentrationen des markierten Antikörpers ($c_{0,Ak(D)}$), des markierten Analytderivats ($c_{0,Ag(A)}$) und des Analyten ($c_{0,Ag}$) ergeben sich aus den folgenden Gleichungen

$$c_{0,Ak(D)} = c_{Ak(D)} + c_{Ag-Ak(D)} + c_{Ag(A)-Ak(D)}, \quad (104)$$

$$c_{0,Ag(A)} = c_{Ag(A)} + c_{Ag(A)-Ak(D)} \quad (105)$$

$$c_{0,Ag} = c_{Ag} + c_{Ag-Ak(D)}. \quad (106)$$

Die Darstellung der *Intensität* der beobachteten Donorfluoreszenz in Abhängigkeit der Ausgangskonzentration des Analyten ($c_{0,Ag}$) führt zu der Kalibrierkurve des RETIA. Unter folgenden Bedingungen können die Kalibrierkurven mit Hilfe der Gleichungen Gl. (102) - Gl. (106) simuliert werden:

- die verwendeten Antikörper sind *monoklonal* und *monovalent*,
- die Bindung des Analyten an den markierten Antikörper verändert die *photophysikalischen Eigenschaften* des Donors nicht,
- der Akzeptor ist kein *Fluorophor* und
- die Bindung des markierten Analyten an den markierten Antikörper führt zur vollständigen *Löschung der Donorfluoreszenz*.

Die beiden letzten Bedingungen weichen von dem in Kap. 4.1 beschriebenen und charakterisierten System ab. Die Voraussetzung der vollständigen Löschung der Donorfluoreszenz im Antigen-Antikörper-Komplex wirkt sich bei der Berechnung der Kalibrierkurven nur in der absoluten Signaldynamik der Kalibrierkurven aus. Die relative Änderungen der Signaldynamik und die Lage der Kalibrierkurven wird von dieser Bedingung nicht beeinträchtigt. Die Annahme, daß der Akzeptor nicht fluoresziert, wirkt sich ebenfalls auf die Signaldynamik aus und kann auch die Lage der Kalibrierkurve beeinflussen. In Kap. 4.2.2 wird dieser Einfluß ausführlich diskutiert.

Unter diesen Voraussetzungen kann die Konzentration der Donorfluorophore die zum Fluoreszenzsignal beitragen, als Summe der Gleichgewichtskonzentrationen von $c_{Ak(D)}$ und $c_{Ag-Ak(D)}$ beschrieben werden. Aus Gl. (104) erhält man

$$c_{Ak(D)} + c_{Ag-Ak(D)} = c_{0,Ak(D)} - c_{Ag(A)-Ak(D)} \quad (107)$$

so daß sich die Berechnung der Kalibrierkurven auf die Bestimmung von $c_{Ag(A)-Ak(D)}$ als Funktion der bekannten Größen K_1 , K_2 , $c_{0,Ak(D)}$, $c_{0,Ag(A)}$ und $c_{0,Ag}$ beschränkt. Die Lösung des Gleichungssystem mit vier Unbekannten und vier Gleichungen führt zu einer Gleichung dritten Grades, die sich für den Spezialfall $K_1 = K_2$ zu einer quadratischen Gleichung vereinfacht. Als einzig physikalisch sinnvolle Lösung erhält man

$$c_{Ag(A)-Ak(D)} = \frac{-b - \sqrt{(b)^2 - 4K^2(c_{0,Ag} + c_{0,Ag(A)}) \cdot (c_{0,Ag(A)}^2 \cdot c_{0,Ak(D)})}}{2K^2(c_{0,Ag} + c_{0,Ag(A)})}, \quad (108)$$

$$\text{mit} \quad b = K^2 c_{0,Ag(A)} \left(\frac{1}{K} + c_{0,Ag} + c_{0,Ak(A)} + c_{0,Ag(A)} \right) \quad (109)$$

Für $K_1 > K_2$ und $K_1 = 1/c_{0,Ak(D)}$ wurde auch die kubische Gleichung mit Hilfe der Cardanischen Formeln (Rast, 1983) gelöst. Man erhält drei verschiedene, reelle Lösungen, von denen nur eine physikalisch sinnvoll ist.

4.2.2 Simulation der Optimierungsmöglichkeiten

Analytderivat-Konzentration $c_{0,Ag(A)}$

Der Einfluß der Konzentration des *markierten Analytderivates* ($c_{0,Ag(A)}$) auf den TMP und die NWG der Kalibrierkurven ist in Abbildung 4-12 gezeigt. Die NWG wurden gemäß Gl. (69) berechnet, wobei ein CV_0 -Wert von 2 % angenommen wurde. Die verwendeten Simulations-

parameter sind in der Tabelle, rechts von der Abbildung, aufgeführt. Die Kalibrierkurven wurden für den typischen Fall $K_1 = K_2 = 10^9$ l/mol mit Gl. (108) und Gl. (107) berechnet. Gl. (107) wurde zusätzlich durch $c_{0,Ak(D)}$ dividiert, um ein normiertes Signal zu erhalten.

Hohe $c_{0,Ag(A)}$ -Werte führen zu Kalibrierkurven, deren TMP und NWG bei hohen $c_{0,Ag}$ Konzentrationen liegen. Eine Verringerung von $c_{0,Ag(A)}$ von 200 $\mu\text{g/l}$ auf 20 $\mu\text{g/l}$ führt zu einer proportionalen Verschiebung des TMP und der NWG zu kleineren $c_{0,Ag}$ -Werten und die Signaldynamik bleibt, aufgrund des hohen $c_{0,Ag(A)}$ -Überschusses bezüglich $c_{0,Ak(D)}$, konstant. Die Verringerung von $c_{0,Ag(A)}$ um einen weiteren Faktor 10, auf 2 $\mu\text{g/l}$, führt bereits zur Abnahme der Signaldynamik (auf 90 %) und der TMP und die NWG verschieben sich nicht mehr proportional zu kleineren $c_{0,Ag}$ -Werten. Für $c_{0,Ag(A)} < 2$ $\mu\text{g/l}$ nimmt die Signaldynamik stark ab, der TMP verschiebt sich nur noch geringfügig zu kleineren Konzentrationen und die NWG zeigt ein Minimum bei $c_{0,Ag(A)} = 0.5$ $\mu\text{g/l}$. Diese $c_{0,Ag(A)}$ -Konzentration führt bei den vorgegebenen Affinitätskonstanten in Verbindung mit der gewählten $c_{0,Ak(D)}$ -Konzentration von 10^{-9} l/mol zu der Kalibrierkurve mit der kleinsten NWG.

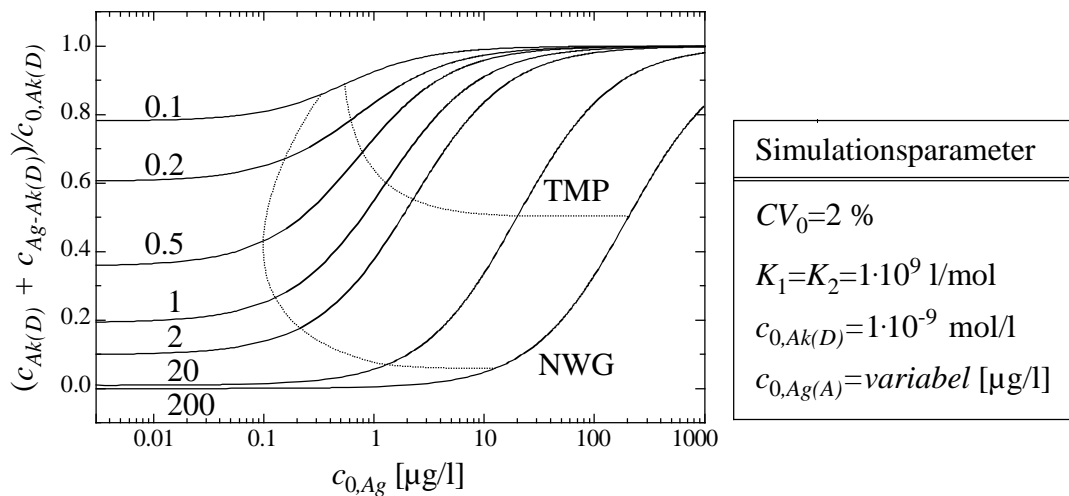


Abbildung 4-12: Berechnete Kalibrierkurven für den Fall $K_1 = K_2$. Als Parameter sind die Konzentrationen von $c_{0,Ag(A)}$ in der Abbildung angegeben. Gestrichelt eingezeichnet sind die NWG und die TMP ($M_{Ag} = M_{Ag-Derivat} = 200$ g/mol)

Die Abhängigkeit der optimalen $c_{0,Ag(A)}$ -Konzentration von der Affinitätskonstanten K_2 ist für $K_1 = 1 \cdot 10^9$ l/mol und $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$ in Abbildung 4-13 gezeigt. Es ergibt sich ein umgekehrt proportionales Verhalten (Steigung: $m = -0.89 \pm 0.02$ $\mu\text{g} \cdot \text{mol/l}^2$).

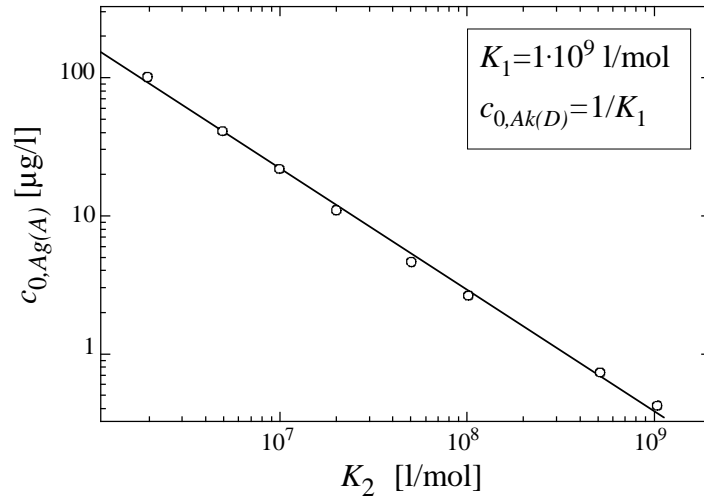


Abbildung 4-13: Auftragung von $c_{0,Ag(A)}$ als Funktion von K_2 .

Antikörperkonzentration $c_{0,Ak(D)}$

Zur Bestimmung der *optimalen Antikörperkonzentration* wurden ebenfalls für den Fall $K_1 = K_2 = 10^9$ l/mol die $c_{0,Ak(D)}$ von $3 \cdot 10^{-8}$ M bis $1 \cdot 10^{-10}$ M variiert und zu jeder simulierten Antikörperkonzentration gemäß Abbildung 4-12 die $c_{0,Ag(A)}$ bestimmt, für die die kleinste NWG erreicht wurde. In Abbildung 4-14 sind die $c_{0,Ak(D)}$ auf der linken y-Achse und die entsprechenden $c_{0,Ag(A)}$ auf der rechten y-Achse aufgetragen. Der Verlauf der NWG und der

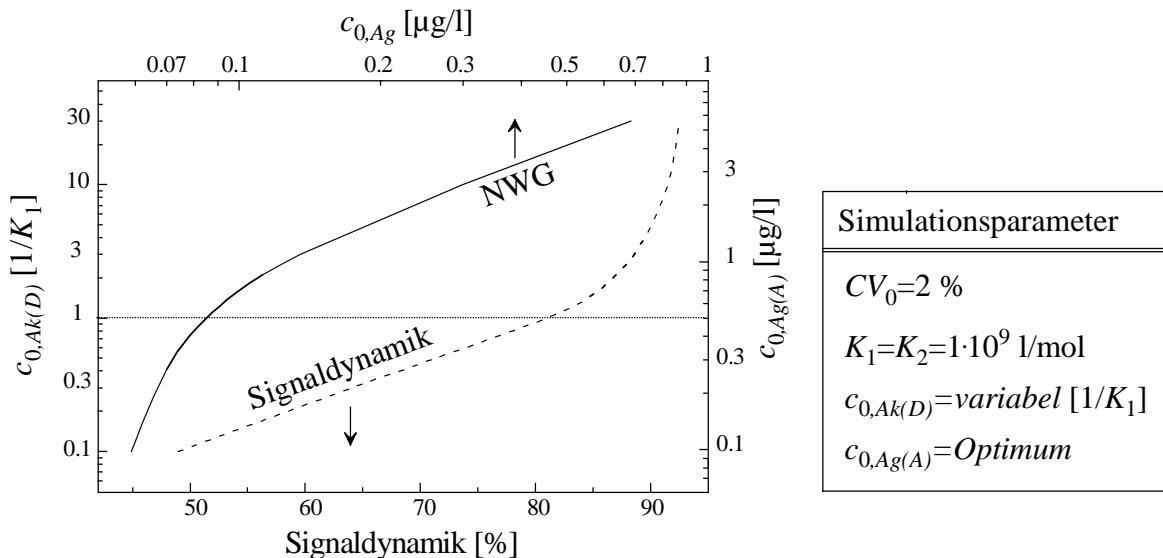


Abbildung 4-14: Verlauf der NWG (—) und der Signaldynamik (---) bei Variation der Antikörperkonzentration $c_{0,Ak(D)}$. Die $c_{0,Ag(A)}$ -Konzentration wurde für jeden $c_{0,Ak(D)}$ -Wert so optimiert, daß die NWG das Minimum erreicht (siehe Abbildung 4-12 und Abbildung 4-13). Das Wertepaar für $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$ ist gepunktet markiert.

Signaldynamik ist für jedes Antikörper-Analytderivat-Konzentrationspaar dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, daß die NWG mit abnehmender $c_{0,Ak(D)}$ zunächst proportional zu kleineren $c_{0,Ag}$ -Werten verschoben wird, um dann bei Werten von $c_{0,Ak(D)} < 1/K_1$ nur noch geringfügig abzunehmen. Der Verlauf der Signaldynamik ist dem der NWG entgegengesetzt. Die optimale Antikörperkonzentration ergibt sich damit aus der Bedingung, bei einer möglichst kleinen NWG noch eine möglichst hohe Signaldynamik zu erhalten. Dies ist bei $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$ der Fall.

Affinitätskonstanten K_1 und K_2

Der Einfluß der *Affinitätskonstanten* K_1 auf die NWG wurde bereits in Kap. 2.3.2 und Abbildung 2-13 beschrieben. In Abbildung 4-15 sind Lösungen der kubischen Gleichung für $K_2 < K_1$ und $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$ dargestellt. Die für die Simulation verwendeten Parameter sind in der Tabelle angegeben und entsprechen den nach Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14 optimierten Werten.

Aus der Abbildung 4-15 ist ersichtlich, daß bei einer Verringerung von K_2 auf Werte kleiner K_1 die NWG gesenkt werden kann (von $0.1 \mu\text{g/l}$ auf $0.07 \mu\text{g/l}$). Das Minimum wird für $K_2 = 0.05 \cdot K_1$ erreicht. Bei K_2 -Werten kleiner $0.05 \cdot K_1$ ist weder eine Änderung in der NWG noch in der Signaldynamik der Kalibrierkurven festzustellen. Voraussetzung hierfür ist allerdings die Möglichkeit, die $c_{0,Ag(A)}$ -Konzentrationen entsprechend dem in Abbildung 4-14 gezeigten Verlauf dem jeweiligen K_2 -Wert anzupassen. In der Modellrechnung ist dies ohne weiteres möglich, da der Akzeptor als nicht-fluoreszierend angenommen wurde. In der Praxis

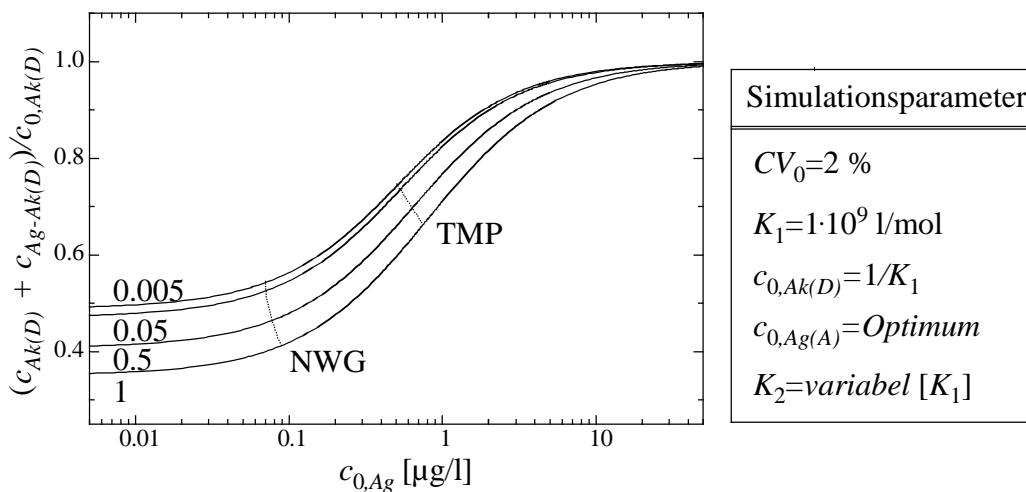


Abbildung 4-15: Einfluß von K_2 auf die NWG, den TMP und die Signaldynamik der Kalibrierkurven für $K_1 = 10^9 \text{ l/mol}$. Die verwendeten Werte für K_2 sind in der Abbildung in Einheiten von K_1 angegeben.

wird allerdings die sensibilisierte und die direkt angeregte Fluoreszenz des Akzeptors (siehe Kap. 4.1.3.2) das beliebige Erhöhen der $c_{0,Ag(A)}$ -Konzentration limitieren. Grund hierfür ist die Überlagerung der Löschung der Donorfluoreszenz durch die steigende Akzeptorfluoreszenz.

4.2.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

- ⇒ Die Kalibrierkurven können für den kompetitiven RETIA unter den einschränkenden Voraussetzungen $K_1 = K_2$ bzw. $K_1 > K_2$ und $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$ berechnet werden.
- ⇒ Die Variation der Testparameter K_2 , $c_{0,Ak(D)}$ und $c_{0,Ag(A)}$ und deren Einfluß auf die Änderungen der Parameter - Signaldynamik, NWG und TMP - kann simuliert werden und erleichtert damit die Optimierung des RETIA.
- ⇒ Diesen Erkenntnissen zufolge sollte die Etablierung eines optimierten RETIA mit einer minimalen NWG und einer maximalen Signaldynamik nach folgendem Schema erfolgen:
 - Auswahl von Antikörpern mit hoher Affinitätskonstanten K_1 ($K_1 \geq 10^9$ l/mol),
 - Antikörperkonzentration so wählen, daß $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$,
 - markiertes Analytderivat ($Ag(A)$) mit $K_2 < K_1$ auswählen und dabei die Reduktion der Signaldynamik beachten und
 - die $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$ entsprechende optimale Konzentration $c_{0,Ag(A)}$ ermitteln, wobei die NWG und die Signaldynamik die bestimmenden Kriterien sind.

4.3 Etablierung des RETIA im Mikroliterbereich

Ausgehend von den in Kap. 4.2 anhand von Berechnungen getroffenen Vorhersagen wird im folgenden die Optimierung des RETIA für die projektrelevanten Analyte Atrazin, Simazin, 2,4-D und Isoproturon durchgeführt. Am Beispiel des Analyten Atrazin wird ausführlich die Charakterisierung der Antikörper hinsichtlich ihrer Affinitätskonstanten K_1 und K_2 zu dem spezifischen Analyten bzw. zu einer Auswahl an Analytderivaten vorgestellt. Mit diesem System werden auch der Einfluß von $c_{0,Ag(A)}$ und K_2 auf die Signaldynamik, die NWG und den TMP der Kalibrierkurven demonstriert und die Grenzen der Optimierungsmöglichkeiten bei einem gegebenen K_1 anhand des Präzisionsprofils aufgezeigt. Anschließend wird der Einfluß von K_1 auf die Verfahrenskenndaten gezeigt. Die Ergebnisse der Kalibrierungen der Analyte Simazin, 2,4-D und Isoproturon werden anschließend nur kurz dargestellt und diskutiert.

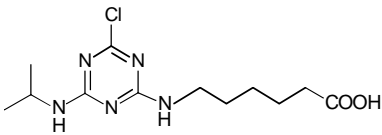
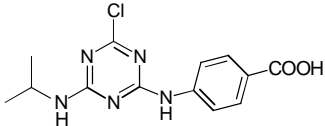
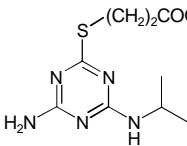
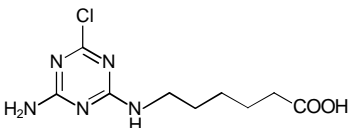
Im Kap. 4.3.3 wird der RETIA anhand von verschiedenen Kriterien validiert. Die Messung von Realproben steht hierbei im Vordergrund, wobei im einzelnen auf die Reproduzierbarkeit, Matrixeffekte, Wiederfindungsraten und die Korrelation mit konventionellen Verfahren, wie GC/MS, eingegangen wird.

4.3.1 Charakterisierung der Antikörper

Atrazin

Zur Etablierung kompetitiver IA ist die Kenntnis der *Affinität* der Antikörper (siehe Kap. 2.2.2.5) zu dem betrachteten Analyten und die *Kreuzreaktivität* zu Analytderivaten von zentraler Bedeutung. Nur mit Hilfe dieser Informationen ist es möglich, optimierte Testverfahren aufzubauen (siehe Kap. 4.2.2). Für die Etablierung des Atrazin-RETIA standen zwei Antikörper, ein polyklonaler (AtraIgG) und ein monoklonaler (K4E7), zur Verfügung. Beide Antikörper stammten aus Immunisierungen mit Konjugaten des Analytderivates Atrazin-capronsäure (ACA) (Abuknesha, 1997, Giersch, 1993). Die Auswahl an s-Triazinderivaten, die zur Charakterisierung der Heterospezifitäten der beiden Antikörper herangezogen wurden, sind in Tabelle 4-6 zusammengestellt.

Tabelle 4-6: *s*-Triazinderivate, die für die Bestimmung der Kreuzreaktivitätsmuster der beiden Antikörper herangezogen wurden.

Atrazinderivat	Struktur	Molmasse
Atrazincapronsäure (ACA)		301.8
Atrazin-4-amino-benzoesäure (ZABA)		307.4
Desethylatrazinmercapto-propionsäure (THIO)		257.1
Desisopropylatrazin-capronsäure (DesACA)		259.5

Polyklonaler anti-Atrazin-Antikörper (AtraIgG)

Die Bestimmung der Affinitätskonstanten des AtraIgG bezüglich des in Tabelle 4-6 gezeigten Spektrums an Analytderivaten wurde in homogener Phase anhand des in Kap. 2.2.2.5 beschriebenen *Bindungshemmtests* mit *RfS* durchgeführt. Abbildung 4-16 zeigt zwei typische Titrationskurven, an deren Meßpunkte die 4-Parameter-logistische Funktion nach Gl. (66) angepaßt wurde.

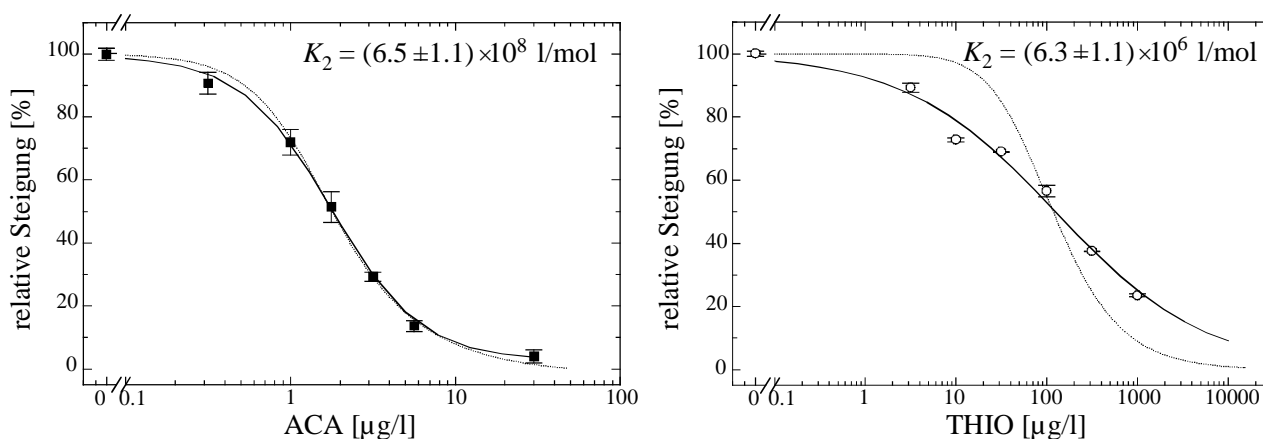


Abbildung 4-16: *RfS*-Titrationskurven für die Bindung von ACA (links) und THIO (rechts) an AtraIgG und Anpassung der 4-Parameter-logistischen Funktion (—) (siehe Gl. (66)) sowie der berechneten Titrationskurve für monoklonale Antikörper (····) (siehe Gl. (59) und (55)) mit den in den Abbildungen angegebenen mittleren Affinitäten.

Auf Basis der Gleichung für polyklonale Antikörper (siehe Gl. (59)) wurde aus der Analytderivatkonzentration am Testmittelpunkt der Titrationskurven die *mittleren Affinitätskonstanten* berechnet. Die theoretischen Titrationskurven monoklonaler Antikörper, die mit diesen Affinitätskonstanten korrespondieren, sind in Abbildung 4-16 gestrichelt eingezeichnet. Während AtrAIgG zu dem für die Immunisierung verwendeten Analytderivat ACA (Abbildung 4-16 links) eine nahezu „monoklonale“ Affinität von $K_2 = (6.5 \pm 1.1) \times 10^8$ l/mol besitzt, zeigen die anderen Analytderivate deutliche Affinitätsverteilungen. Dies ist am Beispiel von THIO in Abbildung 4-16 rechts gezeigt. Die mittlere Affinität berechnet sich zu $K_2 = (6.3 \pm 1.1) \times 10^6$ l/mol. Das komplette Kreuzreaktivitätsmuster von AtrAIgG ist in Abbildung 4-17 dargestellt. Wie zu erwarten, ist die Affinität zu ACA am höchsten.

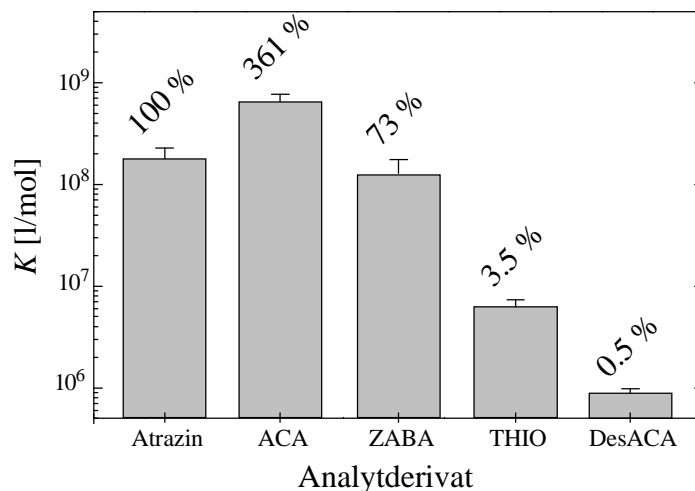


Abbildung 4-17: Affinitätsmuster von AtrAIgG. Neben den fünf ausgewählten Analytderivaten ist hier noch die Affinität zu dem Analyten Atrazin aufgeführt. Diese wurde als Bezugspunkt bei der Berechnung der Kreuzreaktivitäten (Werte über den Säulen) nach Gl. (60) verwendet.

Monoklonaler anti-Atrazin-Antikörper (K4E7)

Die Affinitätskonstanten von K4E7 zu den Analytderivaten ACA, ZABA und DesACA wurden durch Anpassen der *bivalenten, monoklonalen Modellfunktion* (Gl. (55)) an die gemessenen Titrationskurven (Abbildung 4-18 links) erhalten. Wegen der extrem hohen Affinität von K4E7 zu ACA von $K \geq 10^{10}$ l/mol ist der Fehler bei der Bestimmung der Affinitätskonstanten sehr groß. Der Grund liegt darin, daß bei Antikörperkonzentrationen über dem Kehrwert der Bindungskonstante, die Titrationskurve weniger Information über die Affinität der Wechselwirkung trägt (siehe Abbildung 2-9 und Piehler, 1997). In Abbildung 4-18 sind rechts die ermittelten Affinitätskonstanten mit der des Analyten Atrazin verglichen.

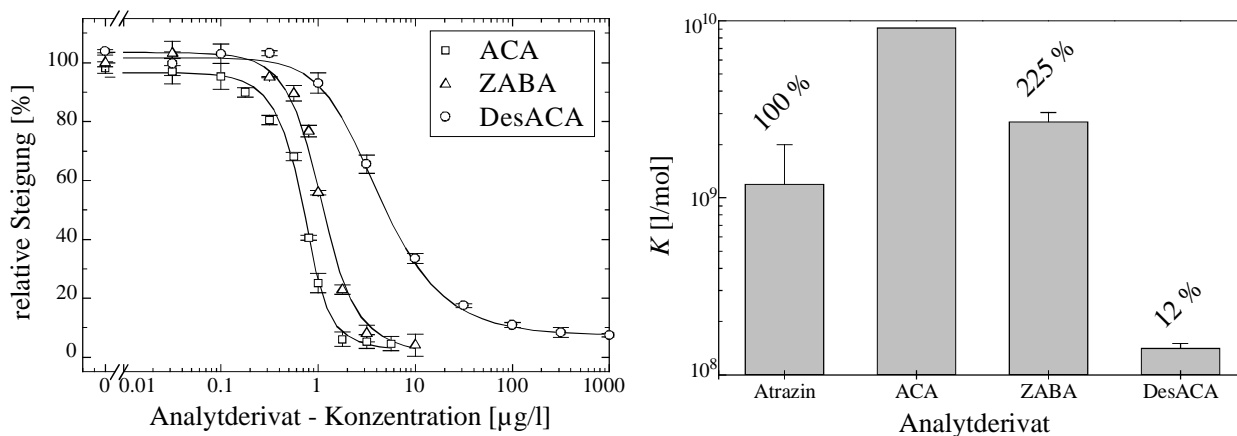


Abbildung 4-18: Bestimmung des Affinitätsmusters von K4E7. Links: Titration mit den Analytderivaten ACA, ZABA und DesACA und Anpassung des Bindungsmodells nach Gl. (55). Rechts: Ermittelte Affinitätskonstanten und Kreuzreaktivitäten. Wegen der hohen Affinität von K4E7 zu ACA läßt sich dieser Wert aus der Titrationskurve nur abschätzen. Die Werte für den Analyten Atrazin sind ebenfalls angegeben.

Simazin, 2,4-D und Isoproturon

Die Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper (siehe Tabelle 3-3) für die Analyten Simazin (SimIgG), 2,4-D (E2G2) und Isoproturon (IPIgG) wurden analog der oben beschriebenen Vorgehensweise bestimmt und sind in Abbildung 4-19 zusammenfassend dargestellt. Für jeden Antikörper sind die ermittelten Affinitäten zu je drei Analytderivaten mit der des spezifischen Analyten verglichen. Die Strukturen der untersuchten Analytderivate sind in Abbildung 4-19 rechts angegeben. Beim SimIgG entsprechen die verwendeten Analytderivate denen in Tabelle 4-6 aufgeführten s-Triazinderivaten.

Während der SimIgG eine ausgesprochen hohe mittlere Affinität zu Simazin von $(7 \pm 0.5) \cdot 10^9$ l/mol aufweist, liegt die Affinität von E2G2 und K4E7 (siehe oben) bzw. die mittlere Affinität von IPIgG zu dem jeweiligen spezifischen Analyten mit $(9 \pm 0.1) \cdot 10^8$ l/mol, $(1.2 \pm 0.8) \cdot 10^9$ l/mol bzw. $(2 \pm 0.3) \cdot 10^9$ l/mol im Bereich typischer Affinitätskonstanten für niedermolekulare Substanzen (siehe Kap. 2.2.2.5). Nur der AtrIgG (siehe oben) zeigt mit $K_1 = (1.8 \pm 0.3) \cdot 10^8$ l/mol eine mäßig hohe Bindungskonstante zu Atrazin.

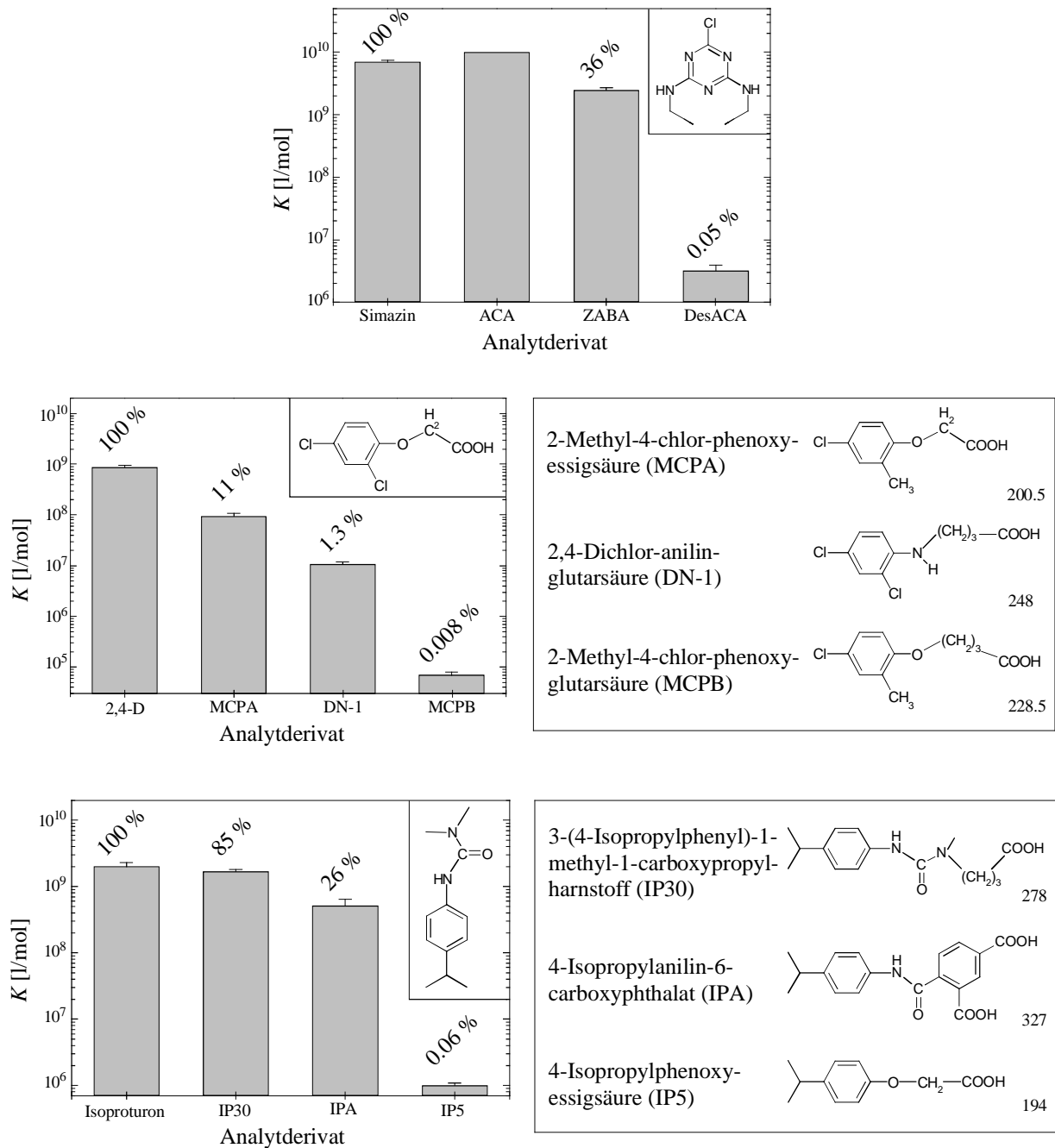


Abbildung 4-19: Affinitätsmuster von SimIgG (oben), E2G2 (mitte) und IPIgG (unten). Die Namen, Akronyme und Strukturen der Analytderivate entsprechen beim Simazin denen in Tabelle 4-6 angegebenen, bei 2,4-D und Isoproturon sind sie jeweils rechts angegeben.

4.3.2 Kalibrierung der Modellanalyte

Eingesetzte Antikörper-Konzentrationen $c_{0,Ak(D)}$

Bei der Durchführung von Kalibrierungen beträgt nach den Berechnungen in Kap. 4.2.2 die optimale Antikörperkonzentration, im Hinblick auf *maximale Signaldynamik* und *minimale*

NWG, $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1$. Für die Antikörper E2G2, K4E7 und IPIgG entspricht das einer Antikörperkonzentration von ca. 150 ng/ml ($1 \cdot 10^{-9}$ M), wobei die Rechnung für einen optimierten Assay eine NWG von ca. 0.07 $\mu\text{g/l}$ vorhersagt (siehe Abbildung 4-15). Dieser Wert liegt in dem Bereich der Zielvorgabe des Projekts (NWG = 0.05 $\mu\text{g/l}$, siehe Kap. 1.2), so daß in den nachfolgenden Kalibrierungen die berechnete Antikörperkonzentration eingesetzt wurde. Für den SimIgG und den AtraIgG betragen die berechneten Antikörperkonzentrationen $c_{0,Ak(D)} = 1/K_1 = 20$ ng/ml bzw. 830 ng/ml. Abweichend von den berechneten Werten wurden auch für diese Antikörper in den Kalibrierungen 150 ng/ml eingesetzt. Im Fall vom SimIgG wurde damit eine sehr hohe Signaldynamik und ein großer Arbeitsbereich bei gleichzeitig niedriger NWG erwartet (vergleiche Abbildung 4-14). Beim AtraIgG sagt die Simulation für einen optimierten Assay mit der berechneten hohen Antikörperkonzentration von 830 ng/ml eine NWG von nur 0.5 $\mu\text{g/l}$ voraus. Aus diesem Grund wurde die Antikörperkonzentration auf 150 ng/ml verringert, wobei die daraus resultierende geringe Signaldynamik bewußt in Kauf genommen wurde.

Optimierung des RETIA am Beispiel des Analyten Atrazin

Einfluß von $c_{0,Ag(A)}$

Die in Abbildung 4-12 dargestellte Abhängigkeit der Signaldynamik und NWG von der eingesetzten Konzentration der markierten Analytderivate wurde am Beispiel des AtraIgG untersucht. Die Änderung der Signaldynamik mit zunehmender $c_{0,Ag(A)}$ wurde bereits anhand von Titrationen aufgezeigt und ist in Abbildung 4-20 links, beispielhaft für das Analytderivat DesACA, dargestellt. Aus den Emissionsspektren kann die $c_{0,Ag(A)}$ bestimmt werden, welche zu der maximalen Löschung der Donorfluoreszenz führt. Der Einfluß von verschiedenen $c_{0,Ag(A)}$ auf die NWG der Kalibrierkurven ist in Abbildung 4-20 rechts, für zwei Konzentrationen (2 $\mu\text{g/l}$ und 6 $\mu\text{g/l}$), gezeigt. Es ist zu erkennen, daß mit kleiner werdendem $c_{0,Ag(A)}$, die NWG aufgrund der geringeren Signaldynamik abnimmt. Dieser Trend war bei allen Analytderivaten festzustellen (siehe Tabelle 4-6) und entspricht auch der Vorhersage aus Abbildung 4-12 für kleine Modulationstiefen ($c_{0,Ag(A)} \leq 0.5$ $\mu\text{g/l}$). Der RETIA ist demzufolge prinzipiell durch die erreichbare Signaldynamik limitiert. Die kleinsten NWG werden also mit derjenigen Analytderivatkonzentration erreicht, welche die *höchste Signaldynamik* in der Titration ergibt.

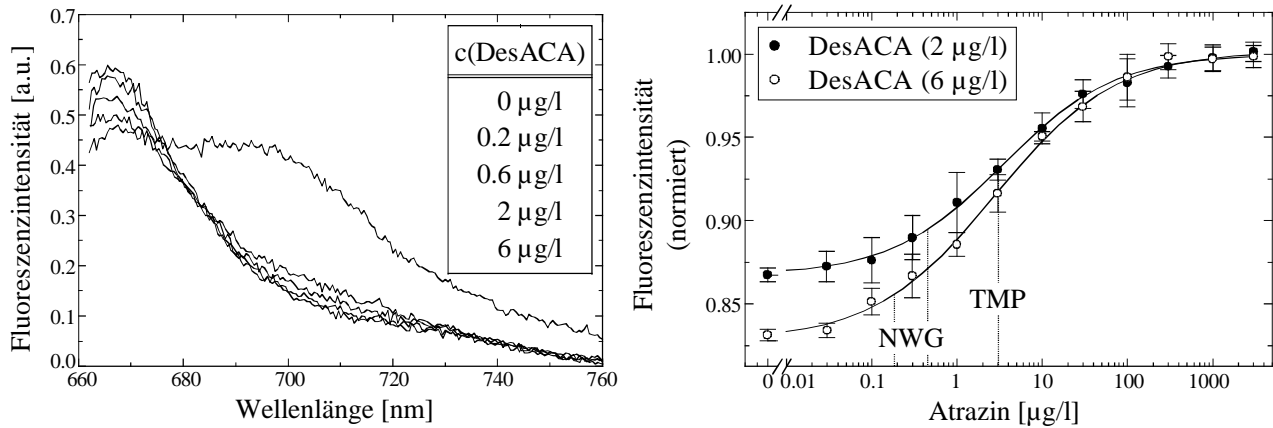


Abbildung 4-20: Untersuchung des Einflusses von verschiedenen $c_{0,Ag(A)}$ auf die Signaldynamik und NWG im RETIA. Links: Titration von AtrIgG ($c_{0,AtrIgG} = 150 \text{ ng/ml}$) mit DesACA. Rechts: Vergleich der Kalibrierkurven für $c_{0,DesACA} = 2 \text{ µg/l}$ und 6 µg/l .

Einfluß von K_2

Zur Bewertung des Einflusses von K_2 auf die Signaldynamik und NWG des RETIA wurde der Modellanalyt Atrazin mit dem polyklonalen Antikörper AtrIgG und den in Tabelle 4-6 gezeigten und in Abbildung 4-17 charakterisierten Analytderivaten kalibriert. Eine vergleichende Darstellung der Kalibrierkurven mit den Analytderivaten DesACA, ZABA und ACA ist in Abbildung 4-21 zu sehen.

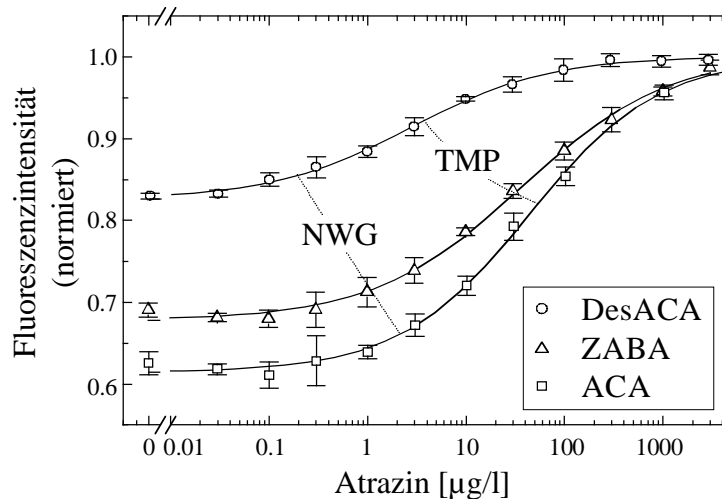


Abbildung 4-21: Kalibrierung von Atrazin mit AtrIgG ($c_{0,AtrIgG} = 150 \text{ ng/ml}$) und DesACA ($c_{0,DesACA} = 6 \text{ µg/l}$), ZABA ($c_{0,ZABA} = 4 \text{ µg/l}$) und ACA ($c_{0,ACA} = 2 \text{ µg/l}$) als kompetitive Derivate. Die Kalibrierkurven wurden auf das maximale Signal normiert. Die Verläufe der TMP und NWG sind gestrichelt angegeben.

Mit dem Analytderivat THIO konnte in der Titration keine Bindung an den Antikörper festgestellt werden. Hier ist durch die Kupplung an BSA die Mercaptopropionsäuregruppe dem Antikörper nicht mehr zugänglich. Offensichtlich stellt sie ein für die Erkennung durch den AtrIgG wesentliches Strukturmerkmal dar.

Die Kalibrierkurven zeigen bei der Reduktion von K_2 von $K_{2,ACA} = 3.6 \cdot K_1$ auf $K_{2,ZABA} = 0.73 \cdot K_1$ einen moderaten Abfall der Signaldynamik und die gewünschte Verringerung der NWG von $2 \mu\text{g/l}$ für ACA auf $1.2 \mu\text{g/l}$ für ZABA. Dies entspricht dem berechneten Kurvenverlauf aus Abbildung 4-15. Die für die maximale Signaldynamik erforderliche $c_{0,Ag(A)}$ -Konzentration stieg von $c_{0,ACA} = 2 \mu\text{g/l}$ auf $c_{0,ZABA} = 4 \mu\text{g/l}$ an (siehe Abbildung 4-13).

Die weitere Absenkung von K_2 auf $K_{2,DesACA} = 0.005 \cdot K_1$ führte entgegen dem Kurvenverlauf der Simulation zu einer starken Verminderung der *Signaldynamik* von 32 % (ZABA) auf 17 %. Dies liegt an der bereits in Kap. 4.2.2 erwähnten Überlagerung des gelöschten Donorsignals durch die sensibilisierte und direkt angeregte Akzeptorfluoreszenz. Dadurch ist die erforderliche Erhöhung der $c_{0,DesACA}$ -Konzentration über die in Abbildung 4-20 (links) ermittelte Konzentration von $c_{0,DesACA} = 6 \mu\text{g/l}$ nicht möglich.

Die NWG nimmt gleichzeitig fast um einen Faktor von 10 ab und übertrifft damit weit die Vorhersage. Dies ist zum einen darin begründet, daß die *Variationskoeffizienten* CV_0 der gemessenen Kalibrierkurven im Gegensatz zu der gemachten Annahme bei der Simulation nicht konstant sind ($CV_{0,ACA} = 2.2 \%$, $CV_{0,ZABA} = 1.1 \%$ und $CV_{0,DesACA} = 0.4 \%$) und zum anderen, daß die tatsächlich vorliegende Affinitätsverteilung bei polyklonalen Antikörpern durch die ermittelten mittleren (monoklonalen) Affinitäten nur bedingt beschrieben werden kann.

Die Auswirkung der abnehmenden Affinitätskonstanten K_2 auf die *Präzisionsprofile* der Kalibrierkurven ist in Abbildung 4-22 gezeigt. Die mit kleiner werdendem K_2 einhergehende Reduktion der Signaldynamik bewirkt über den Einfluß der *Empfindlichkeit* (Steigung) der Kurven, daß die Präzisionsprofile (siehe Kap. 2.5) bei immer höheren $se_x/c_{0,Atrazin}$ -Werten zu liegen kommen. Dadurch werden die Arbeitsbereiche der Assays immer enger und die analytische Verwertbarkeit wird auf einen kleinen Konzentrationsbereich begrenzt.

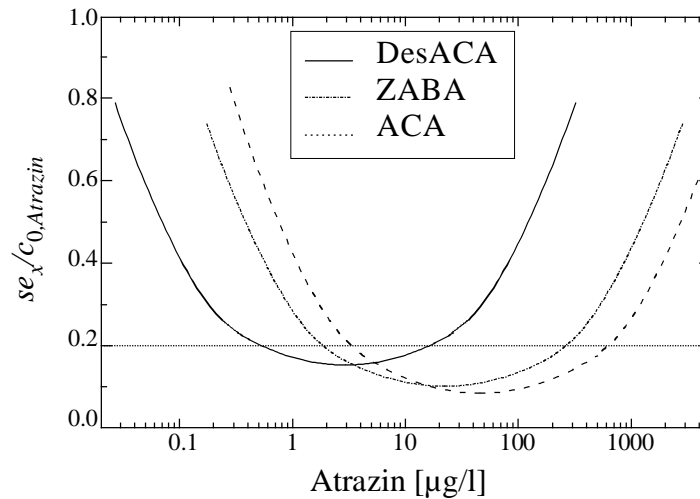


Abbildung 4-22: Vergleich der Präzisionsprofile der Kalibrierkurven aus Abbildung 4-21. Die Grenze des Arbeitsbereichs $se_x/c_{0,Atrazin} = 0.2$ ist durch eine gestrichelte Linie markiert.

Aufgrund der geringen mittleren Affinitätskonstanten K_1 konnte mit diesem System der Grenzwert für Pestizide im Trinkwasser von $0.1 \mu\text{g/l}$ nicht erreicht werden. Eine weitere Optimierung der Assays erscheint, in Anbetracht des bereits sehr guten CV_0 -Wertes und der geringen Signaldynamik die für DesACA erhalten wurde, wenig erfolgsversprechend.

Einfluß von K_1

Die Kalibrierung von Atrazin mit K4E7 wurde mit dem Analytderivat DesACA durchgeführt (siehe Abbildung 4-18). Die Analytderivate ACA und ZABA eignen sich aufgrund der hohen Affinitätskonstanten K_2 nicht als kompetitive Derivate. Die Titration mit DesACA ergab eine maximale Signaldynamik von 21 % bei $c_{0,DesACA} = 3 \mu\text{g/l}$. Dies entspricht dem in Abbildung 4-13 bestimmten Wert für $c_{0,Ag(A)}$ bei $K_2 = 1.2 \cdot 10^8 \text{ l/mol}$, für den die geringste NWG der Kalibrierkurve erwartet wird. Die mit dieser Analytderivat-Konzentration gemessene Kalibrierkurve ist in Abbildung 4-23 gezeigt. Zum Vergleich ist auch die Kurve, die für AtrAgG und DesACA erhalten wurde angegeben.

Wie erwartet führt die höhere Affinität ($K_{1,K4E7} = 6.7 \cdot K_{1,AtrAgG}$) zu der gewünschten Verschiebung der Kalibrierkurve in Richtung kleinerer Analytkonzentrationen. Die NWG ergibt sich aus der Kalibrierkurve zu $NWG = 0.07 \mu\text{g/l}$ (siehe auch Tabelle 4-8). Verglichen mit dem theoretischen Wert, der sich nach Gl. (64) zu $0.008 \mu\text{g/l}$ berechnet, ist der experimentell bestimmte Wert um einen Faktor von 10 größer.

Mit Hilfe der Lösung der kubischen Gleichung aus Kap. 4.2.1 kann, durch Einsetzen der ermittelten Affinitätskonstanten K_1 und K_2 und der im IA verwendeten Konzentrationen $c_{0,K4E7}$ und $c_{0,DesACA}$, die experimentell erhaltene Kalibrierkuve simuliert werden. In Abbildung 4-23 ist das Ergebnis der Rechnung mit den in der Tabelle angegebenen Parametern gezeigt. Es ergibt sich eine ausgezeichnete Übereinstimmung von Theorie und Experiment. Lediglich die Signaldynamik wird aufgrund der in Kap. 4.2.1 beschriebenen Voraussetzungen von der berechneten Kurve zu hoch vorhergesagt.

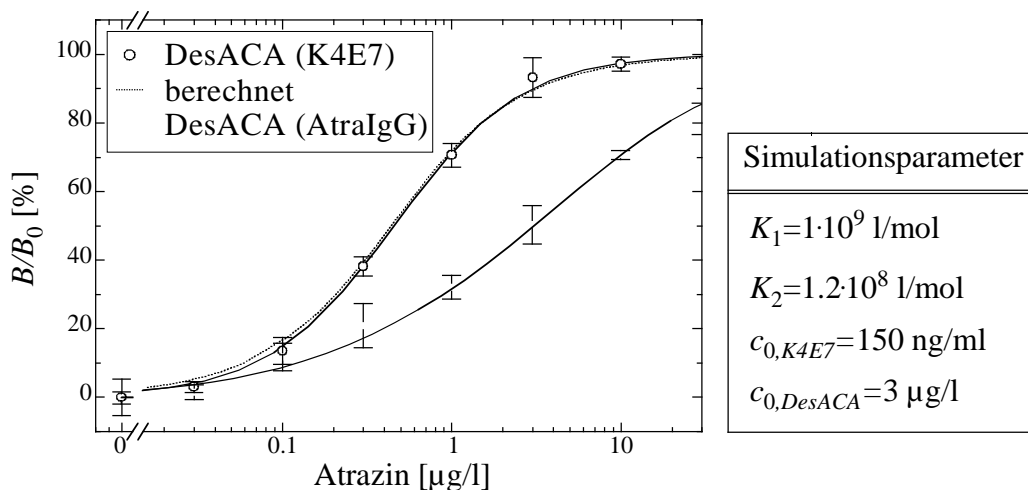


Abbildung 4-23: Kalibrierung von Atrazin mit K4E7 ($c_{0,K4E7} = 150$ ng/ml) und DesACA ($c_{0,DesACA} = 1$ µg/l) im Vergleich mit der Kurve von AtraIgG und DesACA aus Abbildung 4-21. Die angepasste Modellfunktion ist gestrichelt eingezeichnet. Die verwendeten Simulationsparameter sind in der Tabelle angegeben.

Optimierung des RETIA für Simazin, 2,4-D und Isoproturon

Die Analyte Simazin, 2,4-D und Isoproturon wurden mit einer Auswahl der in Abbildung 4-19 charakterisierten Analytderivate kalibriert. Aufgrund der hohen Affinitätskonstanten K_1 von SimIgG und der verglichen mit $1/K_1$ hohen Antikörperkonzentration, wurde für *Simazin* die erwartete hohe Signaldynamik, sowohl für DesACA ($K_2 = 0.0005 \cdot K_1$) als auch für ZABA ($K_2 = 0.36 \cdot K_1$), bei gleichzeitig sehr kleiner NWG gefunden (siehe Abbildung 4-24). Das beste Ergebnis (Signaldynamik = 51 % und NWG = 0.01 µg/l) wurde mit dem Analytderivat ZABA erhalten.

Für den Analyten 2,4-D wurden Kalibrierkurven mit den Analytderivaten MCPA und DN-1 erstellt (siehe Tabelle 4-7). Mit DN-1 wurde bei einer Signaldynamik von knapp 22 % eine NWG von 0.3 µg/l erreicht (siehe Abbildung 4-27). Eine weitere Verbesserung der NWG war aufgrund der bereits sehr geringen Signaldynamik nicht möglich.

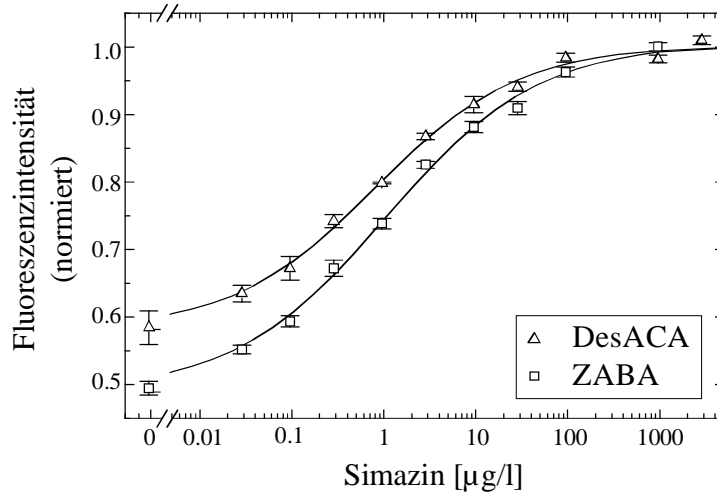


Abbildung 4-24: Kalibrierung von Simazin mit DesACA bzw. ZABA.

In Abbildung 4-25 sind die erhaltenen Kalibrierkurven für den Analyten *Isoproturon* mit den drei Analytderivaten IP30, IPA und IP5 dargestellt. Die charakteristischen Größen der Kurven zeigen den mit abnehmendem K_2 erwarteten und bereits anhand der Kalibrierung von Atrazin mit dem AtrAIgG diskutierten Verlauf (siehe Abbildung 4-21). Bedingt durch die um einen Faktor von 10 höhere Affinität K_1 des IPIgG, beträgt die NWG der mit IP5 optimierten Kalibrierkurve 0.02 µg/l bei einer Signaldynamik von 22 %.

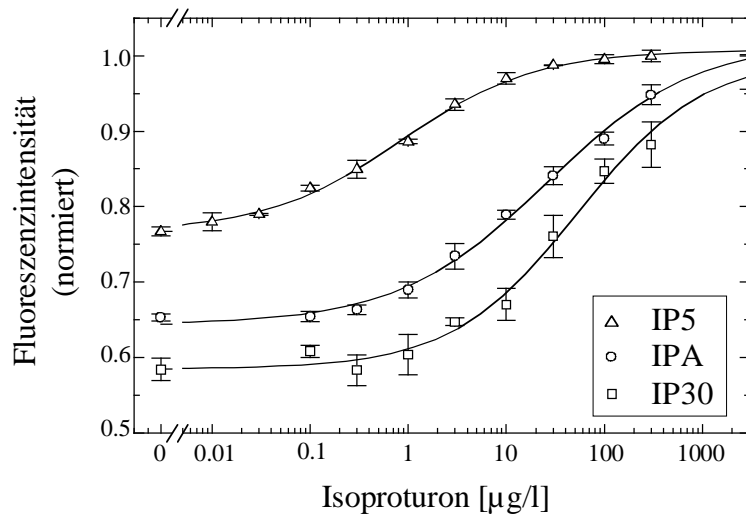


Abbildung 4-25: Kalibrierung von Isoproturon mit IP30, IPA und IP5. Die Kalibrierkurven wurden auf das maximale Signal normiert.

Analog zu der Möglichkeit, bei monoklonalen Antikörpern den gemessenen Kurvenverlauf anhand der bekannten Affinitäten und Konzentrationen mit dem Modell aus Kap. 4.2.1 zu simulieren (siehe Abbildung 4-23), kann dies auch bei polyklonalen Antikörpern unter Verwendung der *mittleren Affinitätskonstanten* durchgeführt werden. Abbildung 4-26 zeigt

beispielhaft den Vergleich des mit IP5 gemessenen Kurvenverlaufs mit der berechneten Kalibrierkurve. Die für die Berechnung verwendeten Parameter sind in der Tabelle rechts von der Abbildung angegeben. Es ist eine geringfügige Abweichung der beiden TMP zu beobachten, welche vermutlich auf *Aviditätseffekte* der Antikörper zurückzuführen ist. Durch den hohen Analytderivat-MG (siehe Tabelle 3-4) können die Antikörper zwei Analytderivate gleichzeitig binden und verringern damit die Chance, von kleinen Analytkonzentrationen verdrängt zu werden. Dies kann zu dem bezüglich der berechneten Kurve festgestellten Versatz führen.

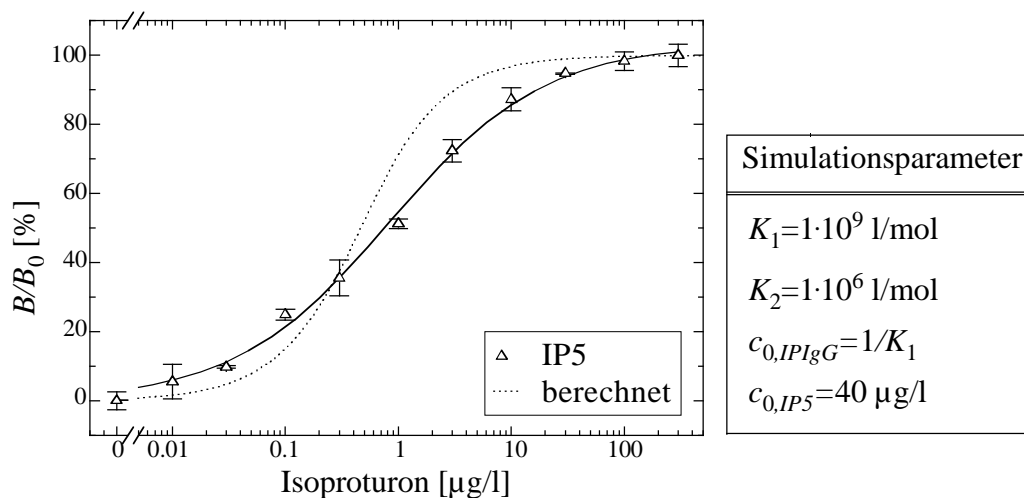


Abbildung 4-26: Gemessene Kalibrierkurve mit dem polyklonalen IPIgG und dem Analytderivat IP5 im Vergleich zu dem monoklonalen Modell.

Tabelle 4-7: Charakteristische Größen der Kalibrierkurven von Simazin, 2,4-D und Isoproturon. Die jeweils verwendeten Analytderivate sind in der 2. Spalte angegeben.

Analyt	Analytderivat	Signaldynamik [%]	TMP [µg/l]	NWG [µg/l]
Simazin	ZABA	51	1.1	0.01
	DesACA	43	0.9	0.03
2,4-D	MCPA	29	15	3
	DN-1	22	1.4	0.3
Isoproturon	IP30	42	53	4
	IPA	35	21	0.4
	IP5	23	0.84	0.02

Eine Zusammenfassung der ermittelten Parameter der beschriebenen Kalibrierkurven findet sich in Tabelle 4-7.

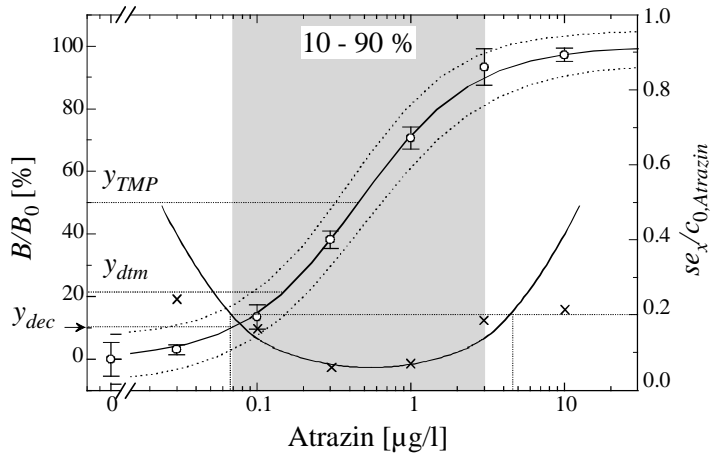
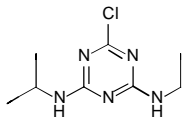
Analytische Qualitätsparameter der optimierten Kalibrierkurven der Modellanalyte

Wie in Kap. 2.5 angegeben, wurden die *analytischen Qualitätsparameter* der Kalibrierkurven ermittelt. Abbildung 4-27 zeigt die optimierten Kalibrierkurven aller Modellanalyte mit den berechneten *Vertrauensbereichen* und den *Arbeitsbereichen*, definiert als 10 - 90 % B/B_0 bzw. über die Präzisionsprofile mit $se_x/c_{0,Ag} = 20\%$. Die durchgezogenen Kurven der Präzisionsprofile wurden mit Hilfe der mittleren Standardabweichung der Kalibrierpunkte berechnet, während die Kreuze die ermittelten Präzisionen der individuellen Standardabweichungen der Kalibrierpunkte darstellen.

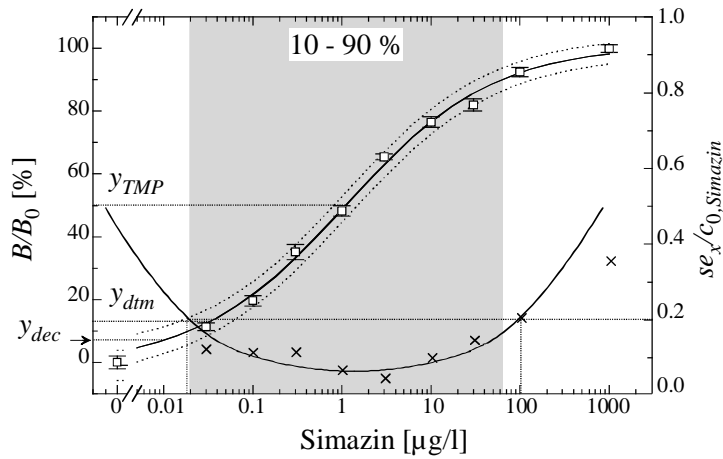
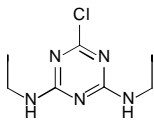
In Tabelle 4-8 sind die ermittelten *charakteristischen Daten* der Assays zusammengefaßt. Für den Analyten Simazin wurde aufgrund der hohen Affinität des SimIgG, eine NWG von 0.01 µg/l erreicht. Die NWG von Isoproturon ist mit 0.02 µg/l deutlich kleiner als die von Atrazin mit 0.07 µg/l, obwohl die K_1 -Werte der beiden Antikörper im Rahmen der Standardabweichungen identisch sind. Der Grund hierfür ist die beim polyklonalen IpIgG vorhandene Antikörperfraktion mit Affinitäten größer als die mittlere Affinität K_1 , wohingegen beim K4E7 alle Antikörpermoleküle den Analyten mit einem identischen K_1 binden. Dies führt auch zu dem beobachteten kleineren Arbeitsbereich beim monoklonalen Antikörper, wobei bei vergleichbaren Standardabweichungen und Modulationstiefen, die Präzision ($se_x/c_{0,Ag}$) aufgrund der höheren Empfindlichkeit der Kurve größer ist. 2,4-D bildet mit einer NWG von 0.3 µg/l das Schlußlicht.

Abbildung 4-27: Optimierte Kalibrierkurven der Modellanalyte Atrazin (Analytderivat: DesACA), Simazin (Analytderivat: ZABA), 2,4-D (Analytderivat: DN-1) und Isoproturon (Analytderivat: IP5). Eingezeichnet sind die analytischen Qualitätsparameter NWG (y_{dec}), BG (y_{dtm}), TMP (y_{TMP}), die Vertrauensbereiche (---) ($\alpha = 0.05$, $n = 3$) und die Arbeitsbereiche als 10 - 90 % B/B_0 (grau unterlegter Bereich) bzw. als $se_x/c_{0,Ag} = 20\%$. Die Kreuze (×) entsprechen der Präzision der einzelnen Kalibrierpunkte, die durchgezogene Kurve dem Präzisionsprofil, berechnet aus den mittleren sd_y .

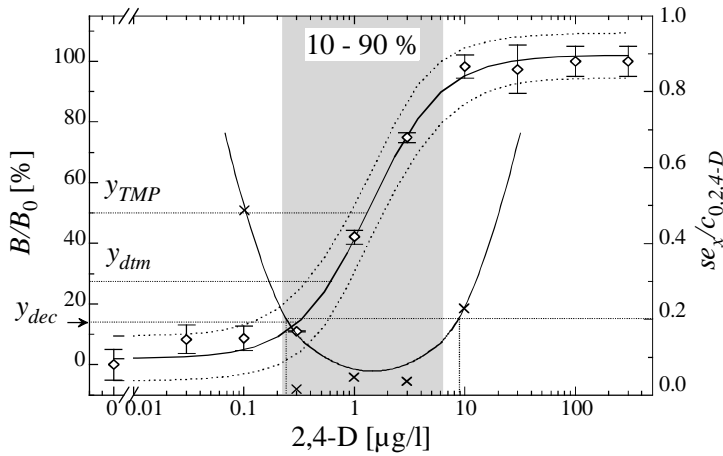
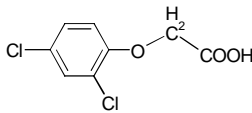
I. Atrazin



II. Simazin



III. 2,4-D



VI. Isoproturon

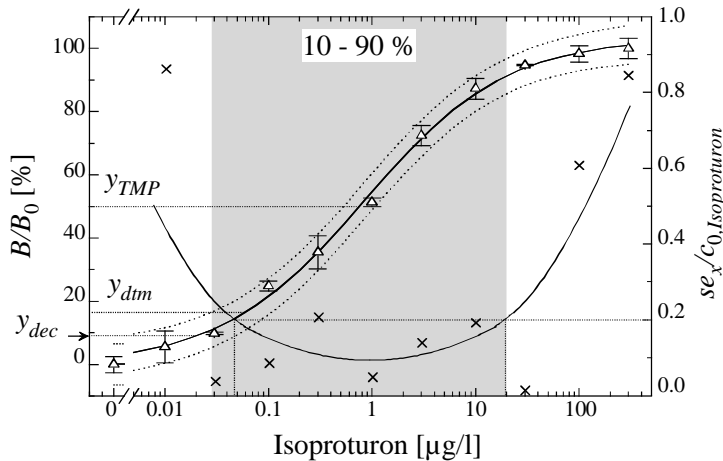
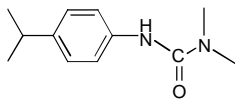


Tabelle 4-8: Analytische Qualitätsparameter der Modellanalyte, die aus den Kalibrierkurven in Abbildung 4-27 bestimmt wurden.

Analyt	TMP [µg/l]	NWG (x_{dec}) [µg/l]	BG (x_{dm}) [µg/l]	Arbeitsbereich [µg/l]		CV [%]
				10 - 90 %	Präzisionsprofil	
Atrazin	0.46	0.07	0.15	0.07 - 3	0.07 - 4.7	0.4 - 1.3
Simazin	1.1	0.01	0.03	0.02 - 65	0.02 - 100	0.7 - 2.4
2,4-D	1.4	0.3	0.6	0.22 - 6.3	0.23 - 9.0	0.04 - 1.7
Isoproturon	0.84	0.02	0.06	0.03 - 16.3	0.05 - 20	0.1 - 1.4

Die Zielvorgabe des Projekts (NWG = 0.05 µg/l und BG = 0.1 µg/l, siehe auch Kap. 1.2) konnte für die Analyten Simazin und Isoproturon erreicht werden. Mit dem Analyten Atrazin wurde sie nur knapp verfehlt, während die Werte für 2,4-D weit über den geforderten Grenzen lagen.

Ein Vergleich mit den in Tabelle 2-3 und Tabelle 2-2 angegebenen NWG für Herbizide, die in der Literatur für verschiedene homogene und heterogene (kompetitive) Testverfahren beschrieben wurden zeigt, daß die mit dem RETIA erhaltenen Werte für Simazin ($5 \cdot 10^{-11}$ M), Isoproturon ($9.7 \cdot 10^{-11}$ M) und Atrazin ($3 \cdot 10^{-10}$ M) an der unteren Grenze der aufgeführten NWG anzusiedeln sind. Unter den homogenen Testverfahren ist die kleinste NWG von $3 \cdot 10^{-11}$ M für einen Fluoreszenz-Verstärkungs IA (FEIA) für das Pestizid 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) von Aguilar-Caballos et al. (1999) beschrieben worden. Bei den heterogenen IA wurde von Winklmaier et al. (1997) die kleinste NWG von $1 \cdot 10^{-11}$ M für das Pestizid Propazin mit einem Enzymimmunoassay (EIA) erhalten, wobei die Affinität des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers mit $K_1 = 4.5 \cdot 10^{10}$ M um einen Faktor von 6 höher war als die von SimIgG. Bei den heterogenen Fluoroimmunoassays (FIA) ist die kleinste NWG von $2 \cdot 10^{-10}$ M für den Analyten Atrazin erhalten worden (Reimer et al., 1998).

In der letzten Spalte der Tabelle 4-8 sind die *Variationskoeffizienten* der vier Kalibrierkurven angegeben. Verglichen mit den Werten heterogener, kompetitiver Testverfahren wie z.B. der EIA (Testformat Ba, siehe Abbildung 2-12) mit $CV = 5 - 10$ %, stellen die CV des RETIA ausgezeichnete Werte dar. Wie bereits in Kap. 2.3.2.2 beschrieben, ist diese hohe *Präzision* in der Signaldomäne ein ausgewiesenes Charakteristikum homogener „mix & measure“ IA.

4.3.3 Validierung

Unter Validierung versteht man ganz allgemein die Sicherstellung, daß ein Analysenverfahren *reproduzierbare* und *verlässliche* Resultate liefert, die für den beabsichtigten Einsatzbereich genau genug sind (Taylor, 1983). Folgende Kriterien wurden von der „American Chemical Society’s Committee on Environmental Improvement“ (1980 und 1983) und der „Association of Official Analytical Chemistry“ (AOAC) (Conacher, 1990) in ihren Richtlinien zur Validierung von analytischen Verfahren verankert und in dieser Arbeit zur Validierung des RETIA herangezogen:

- *Präzision*,
- *Reproduzierbarkeit* und
- *Richtigkeit*.

Bei der Untersuchung der Richtigkeit des RETIA wurde zur Vermeidung von *Matrixeffekten* und dadurch bedingten systematischen Fehlern, zunächst eine geeignete *Referenzierungsstrategie* erstellt. Die Richtigkeit wurde anschließend anhand folgender Merkmale überprüft:

- *Wiederfindungsraten* und
- *Korrelation* der analytischen Ergebnisse des RETIA mit chromatographischen Methoden bei Messungen mit aufgestockten Realproben.

Da die optimierten Kalibrierkurven der Analyte Simazin und Isoproturon die Zielvorgaben des Projekts erfüllten (siehe oben), wurde mit diesen Assays die Validierung des RETIA durchgeführt. Die nachfolgend gezeigten Kalibrierkurven wurden in Standardmikrotiterplatten (MTP) in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner, Institut Dr. Jäger, durchgeführt.

4.3.3.1 Präzision

Als erstes Validierungskriterium wurde die *Präzision* des Verfahrens (siehe Kap. 2.5) herangezogen. Sie wird in Form der *Verfahrensstandardabweichung* charakterisiert und wurde bereits in Tabelle 4-8 für die optimierten Kalibrierkurven angegeben und im Text diskutiert. Als weitere Leistungsdaten der Präzision dienen die ebenfalls angegebenen Parameter wie NWG und Arbeitsbereich.

4.3.3.2 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Kalibrierkurven wurde im Hinblick auf die Signaldynamik, die NWG und den TMP untersucht. Abbildung 4-28 zeigt exemplarisch fünf Kalibrierkurven, die in einem Zeitraum von einem Monat aufgenommen wurden. Die Signaldynamik der Kurve vom Tag 1 beträgt 29 % und liegt damit deutlich unter den 51 % (siehe Tabelle 4-7), die mit der optimierten Kalibrierkurve von Simazin aus Kap. 4.3.2 erhalten wurde. Diese Abweichung ist auf eine geringere Antikörper- und Analytderivatkonzentration in der Lösung zurückzuführen und kann durch eine verstärkte Adsorption der markierten Komponenten an die Wände der Kavitäten der *Kunststoff*-MTP erklärt werden. Betrachtet man den Verlauf der Signaldynamik vom Tag 1 zum Tag 28, so stellt man eine gute Reproduzierbarkeit fest. Die geringfügige Abnahme der Dynamik von 29 % auf 26 %, ist vermutlich einerseits auf eine Verringerung der aktiven Antikörperkonzentration durch die Lagerung während des Meßzeitraums zurückzuführen, andererseits können hierfür auch Pipettierfehler verantwortlich gemacht werden.

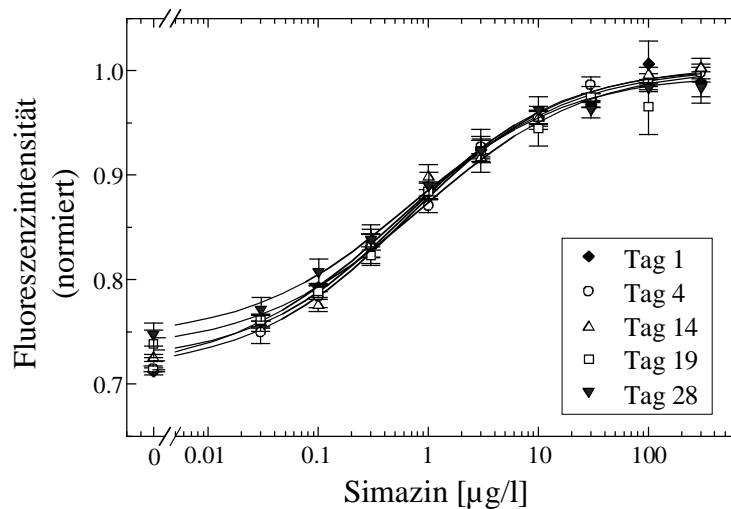


Abbildung 4-28: Reproduzierbarkeit der Kalibrierkurven demonstriert am Beispiel des Analyten Simazin. Die fünf Kalibrierkurven stammen aus einem Meßzeitraum von 1 Monat.

Aus den Kalibrierkurven in Abbildung 4-28 lassen sich die in Tabelle 4-9 aufgeführten TMP und NWG bestimmen. Die Testmittelpunkte sind, verglichen mit dem in Tabelle 4-8 angegebenen Wert, zu kleineren Werten und die NWG zu geringfügig höheren Werten verschoben. Diese Unterschiede sind auf die oben beschriebene geringere Signaldynamik der Kalibrier-

Tabelle 4-9: Berechnete TMP und NWG für die fünf Kalibrierkurven aus Abbildung 4-28.

Tag	TMP [$\mu\text{g/l}$]	NWG [$\mu\text{g/l}$]
1	0.59 ± 0.04	0.02
4	0.55 ± 0.09	0.024
14	0.56 ± 0.04	0.026
19	0.62 ± 0.07	0.031
28	0.64 ± 0.13	0.028

kurven zurückzuführen. Innerhalb der 28 Tage konnte man eine sehr gute Reproduzierbarkeit der TMP und NWG der fünf Kalibrierkurven feststellen. Eine lineare Regression für die Auftragung der TMP bzw. NWG gegen die Meßtage ergab eine Steigung von $5 \cdot 10^{-4}$ ($\mu\text{g/l}$)/Tag bzw. $2.8 \cdot 10^{-4}$ ($\mu\text{g/l}$)/Tag. Auch diese Werte dokumentieren das konstante Verhalten des RETIA über die Meßtage hinweg.

4.3.3.3 Richtigkeit

Matrixeffekte

Im Gegensatz zu *heterogenen IA*, die aufgrund der Waschschriffe im Testablauf und den konstanten Bedingungen bei der Signalerzeugung weitgehend unabhängig von gelösten Störsubstanzen sind, ist die Signalerzeugung bei *homogenen IA*, bei dem analytischen Einsatz unter Realbedingungen, naturgemäß stark von der Probenmatrix abhängig. Bei homogenen Fluoroimmunoassays können verschiedenste gelöste anorganische und organische Matrixkomponenten zu einer Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute führen (Lakowicz, 1983), wobei speziell der gelöste molekulare Sauerstoff einen der besten bekannten *Kollisionsquencher* darstellt (Kautsky, 1939). Aus diesem Grund ist eine *Probenvorbereitung* und eine geeignete *Referenzierungsstrategie* für die Sicherstellung der Zuverlässigkeit der Meßergebnisse unerlässlich.

Die Probenvorbereitung beschränkte sich im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Trinkwässer auf das gründliche Entgasen der Proben. Zur Ermittlung einer geeigneten Referenz der RETIA-Fluoreszenzsignale wurden zu jedem Kalibrierpunkt zusätzlich die Intensitäten der einzelnen Konjugate in den entsprechenden Standardlösungen ermittelt. Dies ist am Beispiel

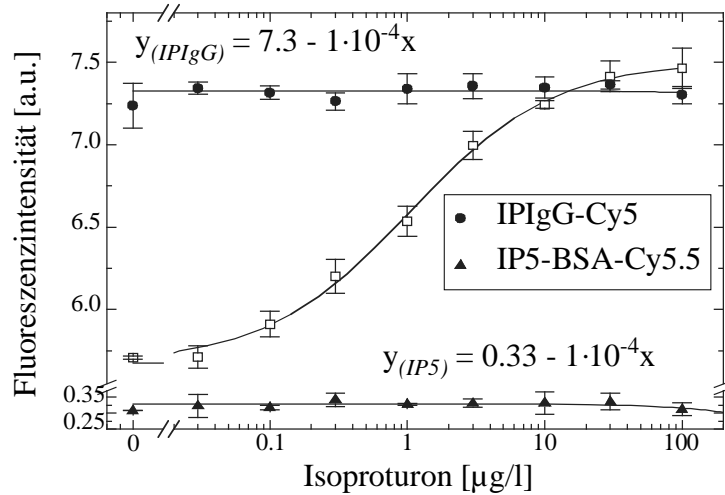


Abbildung 4-29: Referenzierungsmöglichkeiten des RETIA demonstriert anhand der Kalibrierung von Isoproturon. Zu jedem Kalibrierpunkt wurden als Referenzen zusätzlich die Fluoreszenzsignale der markierten Antikörper bzw. Analytderivate in der jeweiligen Standardlösungen gemessen.

der Kalibrierung von Isoproturon in Abbildung 4-29 gezeigt. Die Fluoreszenzintensitäten der markierten Antikörper und Analytderivate zeigen ein parallel zur x-Achse verlaufendes lineares Verhalten. Die lineare Regression ergab eine Steigung von $1 \cdot 10^{-4} (\mu\text{g/l})^{-1}$, sowohl für den markierten Antikörper, als auch für das markierte Analytderivat. Prinzipiell können also die Intensitäten beider Referenzen zur Korrektur von Matrixeffekten unabhängig von der Analytkonzentration herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die analysierten Realproben auf das Fluoreszenzsignal der markierten Antikörper bezogen (siehe Abbildung 4-30). Dazu wurde für jede Realprobe auch die IgG-Cy5-Intensität in Abwesenheit des Analytderivates bestimmt.

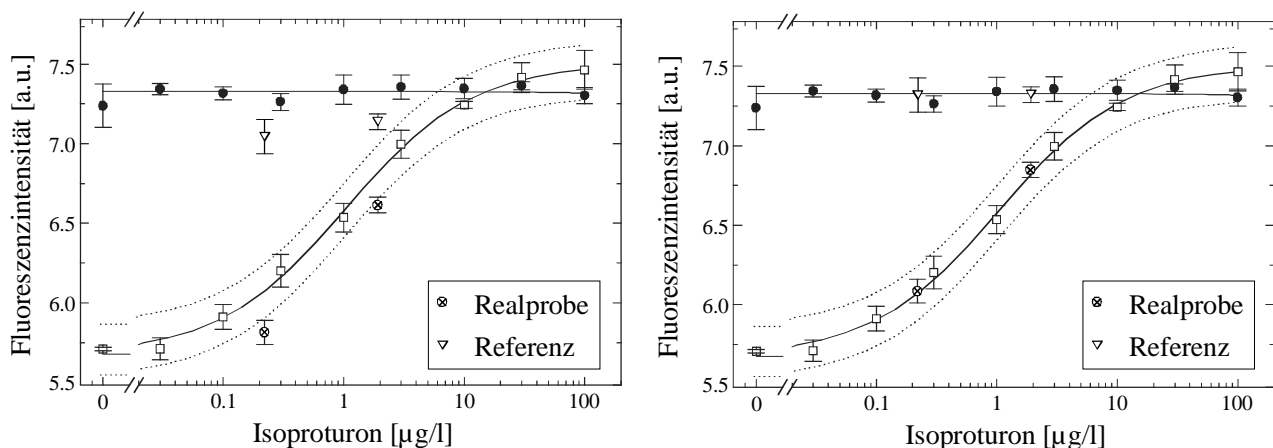


Abbildung 4-30: Referenzierung von Realproben. Links: Gemessene Intensitäten für aufgestockte Realproben und deren Referenzen. Rechts: Auf das IPIgG-Cy5-Fluoreszenzsignal der Kalibrierkurve bezogene Intensitäten.

Wiederfindungsrate

Zur Charakterisierung von *systematischen* Abweichungen des RETIA (Richtigkeit), wie sie durch Einflüsse verschiedener Verfahrensschritte oder durch die Matrix hervorgerufen werden, wurde die Wiederfindungsrate (*WFR*, siehe Gl. (71)) ermittelt. Die *WFR* wurden anhand von Realprobenmessungen für eine Vielzahl von verschiedenen Trinkwässern bestimmt. Die Pestizidkonzentrationen der Trinkwasserproben wurden mittels der klassischen Analytik nach DIN 38 407-F 6 (SPE mit anschließender GC/MS) ermittelt. Bei allen Proben lagen die Werte unter der Bestimmungsgrenze der Methode von 0.03 µg/l. Um in den Arbeitsbereich der Kalibrierkurven zu gelangen, der sich beim Analyten Simazin von 0.1 - 5.7 µg/l erstreckte (BG = 0.04 µg/l), wurden die Realproben mit Simazinkonzentrationen von 0.1 - 2.2 µg/l aufgestockt.

In Tabelle 4-10 sind die Ergebnisse der untersuchten 19 Trinkwasserproben aufgelistet. Die Proben wurden wiederholt gemessen ($n = 3$). Die Präzisionen der ermittelten Konzentrationen liegen, bis auf die Proben aus Aschaffenburg, unterhalb der Arbeitsbereich-Grenze von $se_x/c_{0,Simazin} = 0.20$ (siehe Kap. 2.5). Damit konnte sichergestellt werden, daß auch Realproben mit der gleichen *Verfahrensstandardabweichung* gemessen werden können, wie die Kalibrierungen mit den Standardlösungen in bidestilliertem Wasser. Bei den Proben aus Aschaffenburg lagen die Standardabweichungen (sd_y) deutlich über der mittleren Verfahrensstandardabweichung, was vermutlich auf einen Pipettierfehler bei dieser Messreihe zurückzuführen ist.

Die *WFR* des RETIA sind in der letzten Spalte angegeben. Die Werte reichen von 77 - 135 % und betragen im Mittel 102 %. Dieses Ergebnis ist, den Angaben der AOAC zufolge, die *WFR* einer validierten Methode in einem Bereich von 70 - 120 % festgelegt haben (Parker, 1991), im Rahmen der Standardabweichungen als gut einzustufen. Eine Verbesserung der *WFR* ist nur durch eine weiter verfeinerte Referenzierungsstrategie, wie z.B. das zusätzliche Registrieren der Fluoreszenzsignale bei einer Referenzwellenlänge mit möglichst konstanter Intensität, realisierbar.

Tabelle 4-10: Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR) des RETIA anhand von aufgestockten Trinkwasserproben. Als Analyt wurde Simazin verwendet.

Probe Herkunftsort	aufgestockte Konz. [$\mu\text{g/l}$]	gemessene Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Präzision $se_x/c_{0,\text{Simazin}}$	Vertrauens- bereich [$\pm \mu\text{g/l}$]	WFR [%]
Konstanz	0.10	0.10 ± 0.03	0.17	0.07	100
	0.12	0.12 ± 0.04	0.19	0.10	100
	0.15	0.16 ± 0.05	0.18	0.12	107
	0.43	0.50 ± 0.05	0.06	0.12	116
Aschaffenburg	0.84	0.95 ± 0.35	0.21	0.87	113
	1.40	1.4 ± 0.57	0.24	1.42	100
Zwiefalten	0.35	0.27 ± 0.04	0.09	0.10	77
	0.55	0.55 ± 0.1	0.10	0.25	100
Kirchberg (Iller)	0.65	0.57 ± 0.06	0.06	0.15	88
	1.32	1.78 ± 0.11	0.04	0.27	135
	2.20	2.55 ± 0.25	0.06	0.62	116
Nagold	0.23	0.31 ± 0.05	0.09	0.12	135
Engstingen	0.30	0.24 ± 0.08	0.19	0.20	80
	0.80	1.00 ± 0.15	0.09	0.37	125
	1.50	1.5 ± 0.21	0.08	0.52	100
Hettingen	0.40	0.33 ± 0.11	0.19	0.27	83
	0.80	0.69 ± 0.17	0.14	0.42	86
Gottmadingen	1.10	0.93 ± 0.17	0.11	0.42	85
	1.7	1.65 ± 0.29	0.10	0.72	98

Die graphische Darstellung der Korrelation zwischen den aufgestockten und den gemessenen Simazin-Konzentrationen ist in Abbildung 4-31 anhand der *Wiederfindungsfunktion* (y) gezeigt. Die lineare Regression ergab einen y -Achsenabschnitt von $b = 0.005 \pm 0.05 \mu\text{g/l}$ und eine Steigung von $m = 1.03 \pm 0.05$, bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.989$.

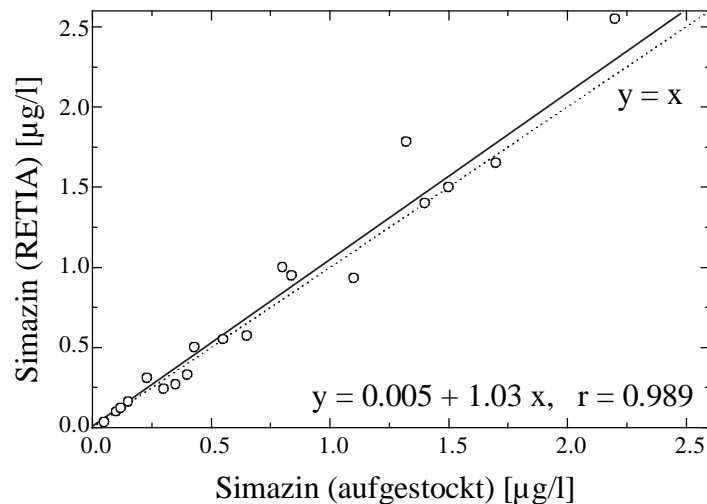


Abbildung 4-31: Korrelation von aufgestockten und mit dem RETIA gemessenen Simazin-Konzentrationen. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Regression, die gestrichelte Linie der Winkelhalbierenden ($y = x$).

Die Prüfung auf *Signifikanz* der Abweichungen von b und m von dem Idealfall $b = 0$ und $m = 1$ wurde, unter Verwendung der Vertrauensbereiche für die beiden Regressionsparameter, mit Hilfe des *t-Tests* durchgeführt. Nach Gl. (68) erhält man für die Vertrauensbereiche der beiden Parameter mit $t = 2.101$ bei $\alpha = 0.05$ und $n = 19$, $\Delta b = 0.005 \pm 0.024 \mu\text{g/l}$ und $\Delta m = 1.03 \pm 0.024$. Da der Vertrauensbereich für b den Wert $b = 0 \mu\text{g/l}$ einschließt, liegt keine konstant-systematische Abweichung auf dem Signifikanzniveau α vor. Allerdings wird für den Zusammenhang zwischen experimentell gefundener und aufgestockter Konzentration auf dem Signifikanzniveau α eine, wenn auch nur sehr geringfügige proportional-systematische Abweichung gefunden, da der Vertrauensbereich Δm den Wert $m = 1$ nicht enthält. Hierfür können sowohl systematische Fehler bei der Herstellung der aufgestockten Proben als auch Matrixeffekte verantwortlich sein.

Korrelation mit chromatographischen Methoden (GC/MS)

Als letztes Kriterium der Richtigkeit wurde die Korrelation der analytischen Ergebnisse des RETIA mit einer chromatographischen Methode (GC/MS) anhand von aufgestockten Real-

proben herangezogen. Tabelle 4-11 zeigt das Ergebnis dieser vergleichenden Messungen, die am Beispiel der Analyte Simazin und Isoproturon durchgeführt wurden. Die Arbeitsbereiche der Kalibrierkurven erstreckten sich von 0.1 - 5.7 µg/l (BG = 0.04 µg/l) bei Simazin und 0.1 - 8 µg/l bei Isoproturon (BG = 0.1 µg/l). Somit lagen die aufgestockten Werte innerhalb dieser Grenzen, was durch die Präzisionen der ermittelten Konzentrationen bestätigt wird.

Die *WFR* des RETIA reichen, ähnlich wie in Tabelle 4-10 gezeigt, von 77 - 128 % mit Mittelwerten von 101 % für Simazin und 99 % für Isoproturon. Die erhaltene Korrelation zwischen RETIA und GC/MS ist in Abbildung 4-32 dargestellt. Für Simazin ergab die lineare Regression einen b-Wert von 0.03 ± 0.12 µg/l und eine Steigung von $m = 0.91 \pm 0.07$, bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.990$, für Isoproturon wurden die Regressionsparameter zu $b = 0.005 \pm 0.2$ µg/l und $m = 0.93 \pm 0.11$ bestimmt, wobei der Korrelations-

Tabelle 4-11: Bestimmung der Korrelation zwischen RETIA und GC/MS anhand von aufgestockten Realproben mit den Analyten Simazin und Isoproturon.

Probe Herkunftsort	aufgestockte Konz. [µg/l]	gemessene Konz. RETIA [µg/l]	Präzision $se_x/c_{0,Analyt}$	gemessene Konz. GC/MS [µg/l]	<i>WFR</i> RETIA [%]	<i>WFR</i> GC/MS [%]
<i>Simazin</i>						
Konstanz	0.25	0.32 ± 0.08	0.18	0.24 ± 0.01	128	96
Bad Dürkheim	0.50	0.45 ± 0.14	0.16	0.51 ± 0.02	90	102
Brigachtal	1.00	1.08 ± 0.06	0.03	1.06 ± 0.03	108	106
Aschaffenburg	1.50	1.20 ± 0.10	0.04	1.60 ± 0.05	80	107
Radolfzell	3.00	3.0 ± 0.18	0.04	3.30 ± 0.10	100	110
<i>Isoproturon</i>						
Konstanz	0.10	0.12 ± 0.02	0.10	0.11 ± 0.01	120	110
Bad Dürkheim	0.30	0.30 ± 0.08	0.16	0.29 ± 0.01	100	97
Brigachtal	0.80	0.67 ± 0.21	0.15	0.83 ± 0.02	84	104
Fridingen	1.50	1.67 ± 0.23	0.09	1.42 ± 0.04	111	95
Radolfzell	2.00	1.54 ± 0.65	0.18	2.12 ± 0.06	77	106
Aschaffenburg	3.00	3.0 ± 0.22	0.04	3.01 ± 0.09	100	100

koeffizient $r = 0.987$ betrug. Die jeweiligen t-Tests zur Prüfung auf Signifikanz der Abweichungen von b und m vom Idealwert ergaben für keine der beiden Korrelationen, auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$, systematische Abweichungen.

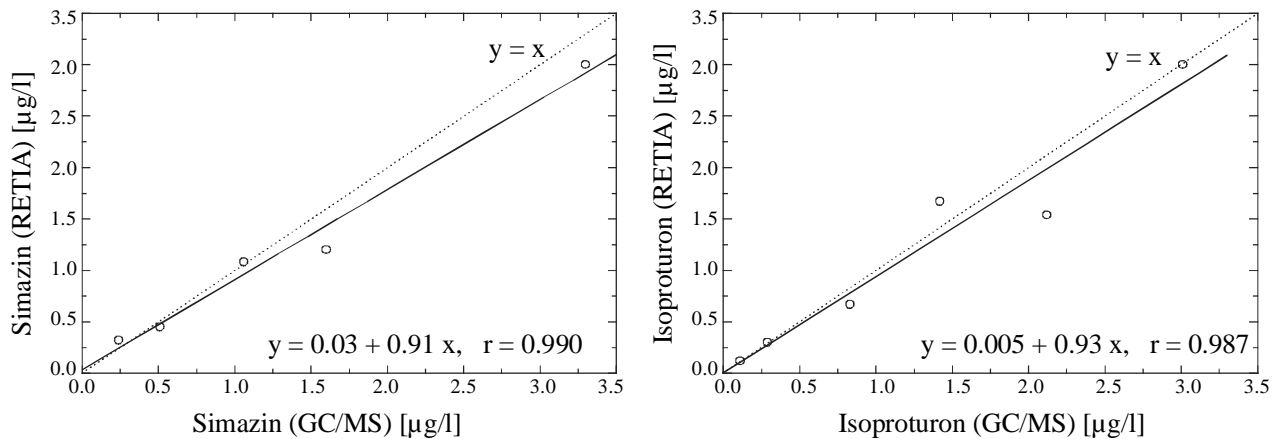


Abbildung 4-32: Vergleich der bestimmten Konzentrationen von aufgestockten Realproben mit RETIA und GC/MS am Beispiel des Analyten Simazin (links) und Isoproturon (rechts).

4.3.4 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

- ⇒ Die Optimierung des RETIA konnte analog den Berechnungen in Kap. 4.2.2 durchgeführt werden. Der berechnete Einfluß der Parameter $c_{0,Ag(A)}$, K_2 und K_1 auf die NWG, TMP und die relative Änderung der Signaldynamik der Kalibrierkurven, konnte experimentell für monoklonale Antikörper bestätigt werden. Bei polyklonalen Antikörpern ist eine qualitative Übereinstimmung festzustellen.
- ⇒ Der relative Verlauf der Signaldynamik der Kalibrierkurven kann durch das Modell nur für große K_2 -Werte prognostiziert werden. Bei kleinen K_2 -Werten wird aufgrund der überlagernden Akzeptorfluoreszenz und der damit verbundenen Limitation bezüglich der maximal einsetzbaren $c_{0,Ag(A)}$ eine wesentlich geringere Modulationstiefe erhalten.
- ⇒ Kleine K_2 -Werte führen zu Kalibrierkurven mit niedrigen NWG. Die analytische Aussagekraft dieser Kurven ist allerdings durch eine geringe Präzision in der Konzentrationsdomäne und durch einen schmalen Arbeitsbereich erheblich eingeschränkt.
- ⇒ Der Verlauf der Kalibrierkurven kann bei Kenntnis der (mittleren) Affinitäten sowohl für monoklonale als auch für polyklonale Antikörper berechnet werden. Bei monoklonalen

Antikörpern wird eine strenge Übereinstimmung erhalten, während bei polyklonalen Antikörpern nur die Lage des TMP vorhergesagt wird.

- ⇒ Die erreichten NWG und BG der optimierten Kalibrierkurven liegen für die Analyte Simazin und Isoproturon unter den Zielvorgaben des Projektes, während sich die Werte von Atrazin und 2,4-D geringfügig darüber befinden.
- ⇒ Die Durchführung des Assays in Mikrotiterplatten führt, im Vergleich zu den Werten, die in Küvetten erhalten wurden, zu einer Verringerung der Signaldynamik. Dies ist auf Adsorptionseffekte in den Kunststoff-Kavitäten zurückzuführen.
- ⇒ Die Validierung des RETIA zeigt eine ausgezeichnete Präzision und Reproduzierbarkeit des homogenen IA.
- ⇒ Nach Einführung einer geeigneten Referenzierungsstrategie wird die Richtigkeit des RETIA durch *WFR* von 77 - 135 % und durch eine weder konstant- noch eine proportional-systematische Abweichung der Korrelation mit einer chromatographischen Methode (GC/MS) belegt.

4.4 Transfer des Assays in den Nanoliterbereich

Dieser Abschnitt präsentiert die Resultate, die mit dem RETIA unter Verwendung von Nanotiterplatten als Probenträger gewonnen wurden. Zunächst wird auf die beiden Herausforderungen eingegangen, die sich aus der angestrebten drastischen Miniaturisierung und den daraus folgenden veränderten Dimensionen ergeben. Es handelt sich dabei um die Probenhandhabung der verwendeten konzentrierten Proteinlösungen im Pikoliterbereich und um die starke Adsorption der an der Signalerzeugung beteiligten Proteine und Analyte. Die Adsorption ist hauptsächlich auf das große Oberflächen/Volumen-Verhältnis in den Kavitäten der Nanotiterplatten zurückzuführen. Anschließend wird der Nanotiterplattenleser BioScan hinsichtlich seiner Intensitätsverteilung und Nachweisgrenze charakterisiert. Schließlich werden die Resultate der Kalibrierung von Simazin im Nanoliterbereich wiedergegeben, und die durchgeführte Validierung des RETIA anhand von Realproben aufgezeigt.

4.4.1 Probenhandhabung und Probenträger

Probenhandhabung

Für die Probenhandhabung wurde eine Mikrodosieranlage eingesetzt, die in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner BIAS aufgebaut wurde. Als Mikropipette wurde eine Piezopumpe verwendet (siehe Abbildung 4-33, links), die mit einem verlängerten Arm an drei Lineartischen befestigt wurde. Über eine RS-232 Schnittstelle und den dazu entwickelten Befehlssatz „multi-dos“, bestand die Möglichkeit, die abzugebende Flüssigkeitsmenge über die Parameter *Amplitude*, *Impulsdauer* und *Pulsfrequenz* des an das Piezoelement angelegten Spannungspulses genau zu kontrollieren. Um *Verdunstungsverluste* der pipettierten Volumina zu vermeiden, wurde eine klimatisierte Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit und einer mit Peltier-elementen bis kurz vor den Taupunkt gekühlten Arbeitsplatte verwendet. Zur visuellen Überwachung des Tropfenbildungs- und Pipettiervorgangs wurde eine *CCD-Kamera* und eine *Stroboskopeinheit* in die Mikropipettierstation integriert. Die speziell entwickelte Mikroskopkamera wurde an den Lineartischen befestigt, um so eine kontinuierliche Beobachtung der Pipettenspitze zu ermöglichen. Die Vergrößerung der Kamera wurde so gewählt, daß beim Pipettiervorgang 3×5 Kavitäten der NTP beobachtet werden konnten. Abbildung 4-33 zeigt rechts die Pipettenspitze, die über einer Kavität der NTP positioniert ist und diese gerade befüllt. Die Dimensionen der Kavitäten und des Tropfens sind in das Bild mit eingezeichnet.

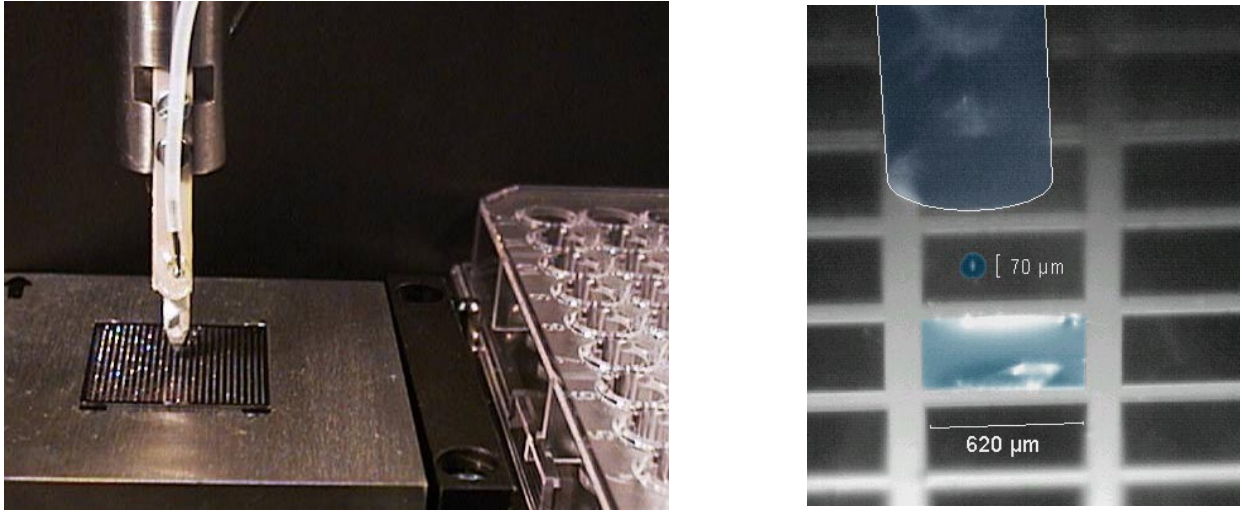


Abbildung 4-33: Bilder des Mikrodosiersystems. Links: Piezopumpe über einer Si-NTP, die auf einem gekühlten Aluminiumblock positioniert ist. Die ebenfalls abgebildete Mikrotiterplatte dient als Reservoir der Lösungen. Rechts: Befüllung einer Kavität der NTP.

Die eingebaute Stroboskopeinheit ermöglichte die *visuelle Kontrolle* der Tropfenbildung und erleichterte dadurch die optimale Einstellung der Parameter - Amplitude, Impulsdauer und Pulsfrequenz - für die jeweilige Pipettieraufgabe. Abbildung 4-34 zeigt die Bildsequenz eines *Tropfenbildungsvorganges* kurz nach Verlassen der Pipettenspitze mit optimierten Geräteparametern. Der sich zunächst bildende Satellitentropfen vereinigt sich wieder mit dem „Haupttropfen“, so daß sich letztendlich ein einzelner Tropfen von der Pipettenspitze abschnürt und senkrecht, mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 m/s, zur Nanotiterplatte fliegt. Diese Optimierung der Tropfenform, die für eine Dosierung von kleinen Volumina mit hoher Genauigkeit unumgänglich ist, wurde mit jeder verwendeten Piezopumpe durchgeführt und auch während eines Dosiervorganges in regelmäßigen Abständen überprüft. Bei Funktionsstörungen der Mikropipette wurde diese mit bidestillierten Wasser bzw. Ethanol und Ultraschall gründlich gereinigt und die Tropfensequenz erneut kontrolliert.



Abbildung 4-34: Stroboskopische Aufnahme der Tropfenemission einer Proteinelösung mit $c_{\text{Protein}} = 100 \mu\text{g/ml}$.

In Tabelle 4-12 sind die Parameter aufgeführt, welche für die Piezopumpen zur Dosierung von Proteinlösungen mit $c_{\text{Protein}} \leq 100 \mu\text{g/ml}$ verwendet wurden. Die komplette Befüllung aller Kavitäten einer Si-NTP zu 50 nl mit einer Lösung dauerte ca. 3 Minuten. Dabei benötigte der Füllvorgang in die Kavitäten 2 Minuten und 10 Sekunden und die Probenhandhabung ca. 55 Sekunden.

Tabelle 4-12: Parameter des an die Piezopumpe angelegten Spannungspulses.

Pipettentyp	Amplitude [V]	Impulsdauer [μs]	Frequenz [Hz]
SPIP	40	100	500
TMP	70	50	200

Probenträger

Als Probenträger wurden *Nanotiterplatten (NTP)* mit 625 Kavitäten und Volumina zwischen 50 nl (NTP aus Silizium, Si-NTP) und 70 nl (NTP aus Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer, ABS-NTP) verwendet. Ein Vergleich der Dimensionen der ABS-NTP mit denen der in Kap. 4.3.3 verwendeten Mikrotiterplatten (MTP) ist in Tabelle 4-13 angegeben (siehe auch Abbildung 1-1). Die *Miniaturisierung* der Kavitäten führt zu einer drastischen Erhöhung der Kavitätendichte von 1 Kavität/ cm^2 (MTP) auf 156 Kavitäten/ cm^2 (NTP), bei einer gleichzeitigen Reduktion der Volumina um einen Faktor von ca. 3600.

Tabelle 4-13: Dimensionen der Mikrotiterplatte und Nanotiterplatte (aus ABS) im Vergleich.

Probenträger	Größe [cm^2]	Anzahl der Kavitäten	Kavitätendichte [Kavität/ cm^2]	Volumen pro Kavität [μl]	Oberflächen/ Volumen [1/cm]
MTP	8×12	96	1	250 μl	8.8
NTP (ABS)	2×2	625	156	0.07 μl	76.3

Das Oberflächen/Volumen-Verhältnis der Kavitäten steigt bei der Miniaturisierung von 8.8 1/cm auf 76.3 1/cm an (siehe letzte Spalte der Tabelle 4-13) und führt damit zu der oben erwähnten Problematik der verstärkten *Adsorption* der an der Signalerzeugung beteiligten Proteine und Analyte an die Kavitätswände. Die Konsequenz daraus ist eine weitere, über die

bei den Messungen in der MTP festgestellte (siehe Kap. 4.3.3.2) Reduktion der Signaldynamik. Abbildung 4-35 zeigt dies beispielhaft an der Löschung des SimIgG-Cy5-Fluoreszenzsignals ($c_{0,SimIgG} = 3 \mu\text{g/ml}$) bei Anwesenheit von $10 \mu\text{g/l}$ ACA-BSA-Cy5.5 in Abhängigkeit vom verwendeten Probenträger (siehe Kap. 4.4.3.1). Die jeweiligen Oberflächenmodifikationen der MTP, Si-NTP und ABS-NTP sind im Methodenteil beschrieben worden¹¹. Es ist eine Abnahme der Signaldynamik von der Messung in der Küvette (61 %) über das Ergebnis in der MTP (54 %) zu dem erreichten Quenching in der Si-NTP (40 %) festzustellen. Der positive Einfluß einer verbesserten Oberflächenmodifikation auf die Signaldynamik zeigt sich am Vergleich Si-NTP vs. ABS-NTP. Hier findet man eine Zunahme der Modulationstiefe von 20 %. Mit dieser optimierten Oberflächenmodifikation wurden die nachfolgenden Messungen durchgeführt.

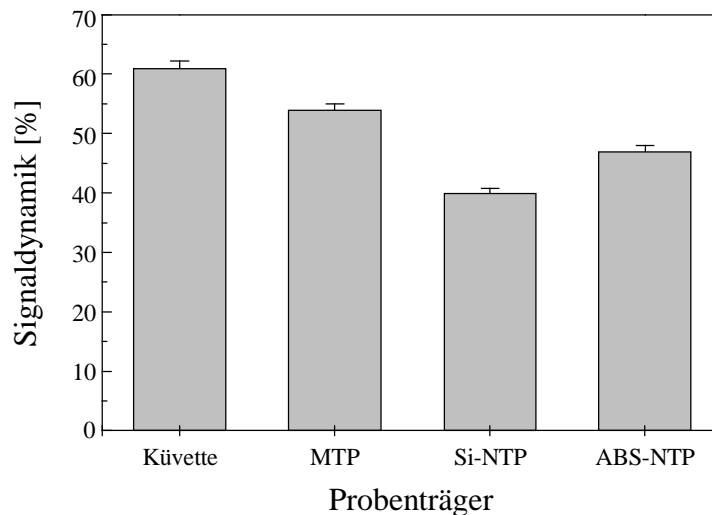


Abbildung 4-35: Modulationstiefen die in verschiedenen Probenträgern bei der Titration von SimIgG-Cy5 ($c_{0,SimIgG} = 3 \mu\text{g/ml}$) mit ACA-BSA-Cy5.5 ($c_{0,ACA} = 10 \mu\text{g/l}$) erreicht wurden.

Aufgrund der zu erwartenden geringeren Präzision und Signaldynamik wurde der Transfer des RETIA vom Mikro- in den Nanoliterbereich anhand des bereits in Kap. 4.1.3 vorgestellten Systems SimIgG-Cy5 (MG 1:3.7) / ACA-BSA-Cy5.5 (MG 3.6:1:1.6) durchgeführt. Dieses System war in Anbetracht der im Mikroformat erreichten hohen Modulationstiefe besonders gut geeignet.

¹¹ Für eine detaillierte und systematische Untersuchung von verschiedenen Protokollen zur Oberflächenmodifikation der NTP und der jeweilige Einfluß auf die Signaldynamik, sei auf eine parallel durchgeführte Arbeit verwiesen (Coille, 1999).

4.4.2 Referenzierung und Nachweisgrenze des Nanotiterplattenlesers - BioScan

Referenzierung

Die *homogene* Ausleuchtung der Kavitäten einer Nanotiterplatte (NTP) ist für die analytische Auswertbarkeit der Fluoreszenzintensitäten von zentraler Bedeutung. Aus diesem Grund wurde die Intensitätsverteilung der Fluoreszenz im BioScan auf einer Grundfläche von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ bestimmt. Dazu wurde ein homogen fluoreszierender Kantenfilter (RG 665, Schott) an der definierten Position der NTP im BioScan vermessen. Die erhaltene Intensitätsverteilung über die Fläche einer NTP ist in Abbildung 4-36 angegeben. Die Fluoreszenzintensitäten sind nicht homogen verteilt, sondern nehmen von 100 % in der Kavität (2, 2) auf 67 % in der Kavität (22, 25), ab. Mit dieser Referenzfunktion wurden alle mit dem BioScan durchgeführten Messungen korrigiert.

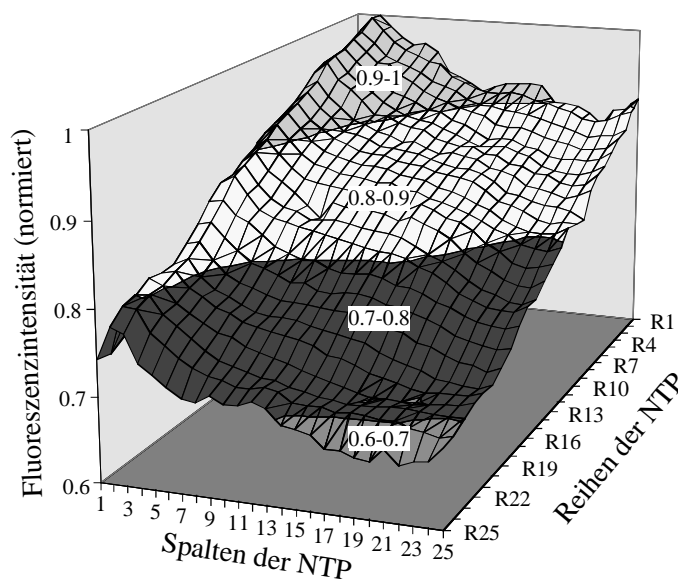


Abbildung 4-36: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz über die Fläche einer NTP im BioScan.

Nachweisgrenze

Für die Bestimmung der Fluoreszenzintensität, die sich signifikant vom Hintergrundsignal noch unterscheidet, wurde eine Verdünnungsreihe des SimIgG-Cy5-Konjugates in einer Si-NTP vermessen ($V = 50 \text{ nl}$). Dazu wurden jeweils 10 Kavitäten mit 100 Tropfen à 500 pl der Cy5-Konzentrationen ($3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ bis $1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$) befüllt, wobei zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der Mikrodosieranlage die Lösungen nur in jede vierte Kavität abgegeben wurden. Dadurch konnten eventuell fehlpipettierte oder verspritzte Lösungen im Fluoreszenzbild erkannt

werden. Abbildung 4-37 zeigt links einen Ausschnitt des erhaltenen Fluoreszenzbildes der versiegelten NTP. Es ist deutlich zu erkennen, daß Fluoreszenzsignale nur von den befüllten Kavitäten erhalten wurden. Dies belegt die senkrechte Tropfenemission und die genaue Positionierung der Mikropumpe über den Kavitäten.

Die ausgewerteten Fluoreszenzintensitäten sind in der Abbildung 4-37 (rechts) graphisch dargestellt. Aus der linearen Regression und der Standardabweichung des Hintergrundsignals läßt sich die NWG bestimmen. Sie lag für das verwendete SimIgG-Cy5-Konjugat, mit einer statistischen Sicherheit von $3 \times \text{sd}$, bei $5 \cdot 10^{-9}$ M.

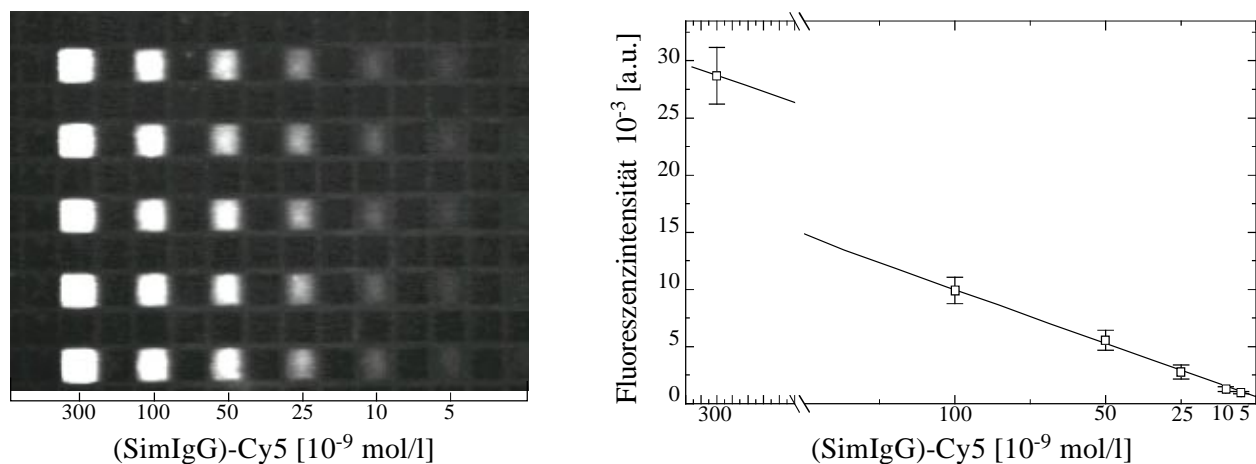


Abbildung 4-37: SimIgG-Cy5-Konzentrationsreihe (MG 1:3.7) zur Bestimmung der NWG des BioScan. Links: Ausschnitt des Fluoreszenzbildes einer Si-NTP. In den Spalten wurde die gleiche Konzentration mehrfach pipettiert. Rechts: Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der Kavitäten.

4.4.3 Kalibrierung von Simazin

4.4.3.1 Titration

Die Kalibrierung von Simazin in der NTP wurde mit einer Antikörperkonzentration von $c_{0, \text{SimIgG}} = 3 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Dies entsprach einer Cy5-Konzentration, die um einen Faktor von 15 höher lag, als die oben ermittelte NWG. Die Anpassung der ACA-BSA-Cy5.5-Konzentration an die gewählte Antikörperkonzentration wurde in der NTP und zum Vergleich auch im Mikromaßstab (Küvette, $V = 500 \mu\text{l}$) durchgeführt. Mit dem Probenvolumen von $500 \mu\text{l}$ wurde, bei einer ACA-Konzentration von $30 \mu\text{g/l}$, eine maximale Löschung der SimIgG-Cy5-Fluoreszenz von 64 % erreicht (siehe Abbildung 4-38).

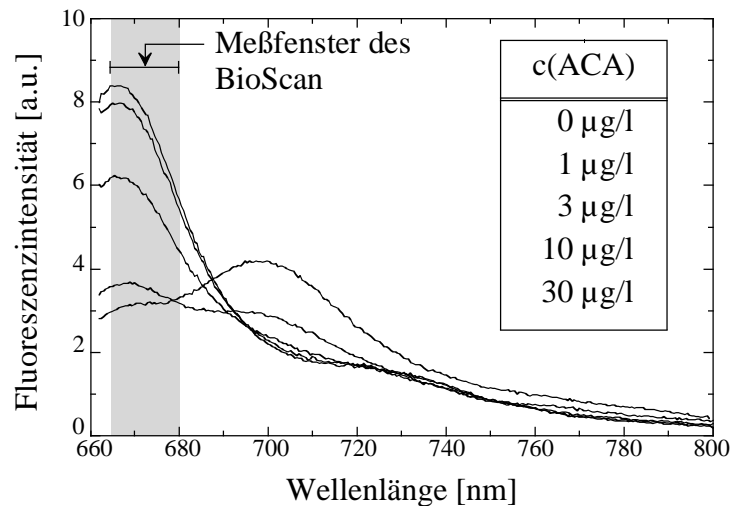


Abbildung 4-38: Titration von 3 $\mu\text{g/ml}$ SimIgG-Cy5 mit ACA-BSA-Cy5.5 in einem Probenvolumen von 500 μl . Grau hinterlegt wurde der Wellenlängenbereich, der das Filtersystem von BioScan passieren kann.

Zur Bestimmung der entsprechenden Signalmodulation in der NTP, wurden die präinkubierten Lösungen aus Abbildung 4-38 in jeweils 10 Kavitäten einer NTP pipettiert. Abbildung 4-39 zeigt links einen Ausschnitt des erhaltenen Fluoreszenzbildes. Der hierbei detektierte Wellenlängenbereich ist in Abbildung 4-38 grau hinterlegt und umfaßt ausschließlich den dynamischen Bereich der Emissionsspektren von 665 - 680 nm. Der nahezu konstante und nicht zur Signaldynamik des RETIA beitragende Bereich von 690 - 800 nm wird von der gewählten Filterkombination des BioScan ausgeblendet.

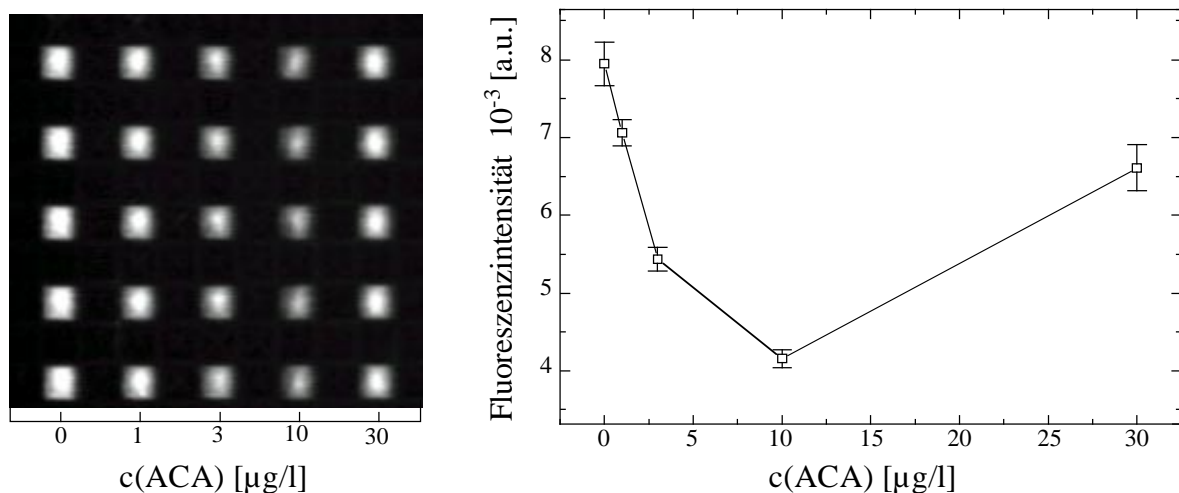


Abbildung 4-39: Titration von 3 $\mu\text{g/ml}$ SimIgG-Cy5 mit ACA-BSA-Cy5.5 in der NTP. Es wurden die präinkubierten Lösungen aus Abbildung 4-38 in jede vierte Kavität pipettiert. Links: Ausschnitt des Fluoreszenzbildes der NTP. Rechts: Auftragung der ausgewerteten Fluoreszenzintensitäten gegen die ACA-Konzentration.

Die Auswertung der Intensitäten der befüllten Kavitäten (siehe Abbildung 4-39, rechts) ergab eine maximale Signalmodulation von 47 %, bei einer ACA-Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$. Diese Diskrepanz in der maximalen Signaldynamik und in der dazu benötigten ACA-Konzentration, verglichen mit den Ergebnissen aus Abbildung 4-38, ist auf die bereits in Kap. 4.4.1 beschriebene unspezifische Adsorption zurückzuführen. Bedingt durch die kleinere, effektive SimIgG-Cy5-Konzentration in der Lösung, nimmt die erreichbare Signaldynamik ab und die erforderliche ACA-Konzentration verschiebt sich zu kleineren Werten.

4.4.3.2 Kalibrierung

Analog zu den Titrationsen wurden auch die Kalibrierungen auf beiden Plattformen parallel durchgeführt. Als ACA-Konzentration wurde bei beiden Messungen $c_{0,ACA} = 10 \mu\text{g/l}$ eingesetzt. Abbildung 4-40 zeigt links die Zunahme der Fluoreszenzintensität der Emissionsspektren, die ausgehend von dem gelöschten Signal mit steigender Simazin-Konzentration erhalten wurden. Rechts daneben ist die entsprechende Kalibrierkurve dargestellt. Der Testmittelpunkt liegt bei 5 $\mu\text{g/l}$ und der Arbeitsbereich erstreckt sich von 0.21 - 600 $\mu\text{g/l}$ ($se_x/c_{0,Simazin} = 20 \%$).

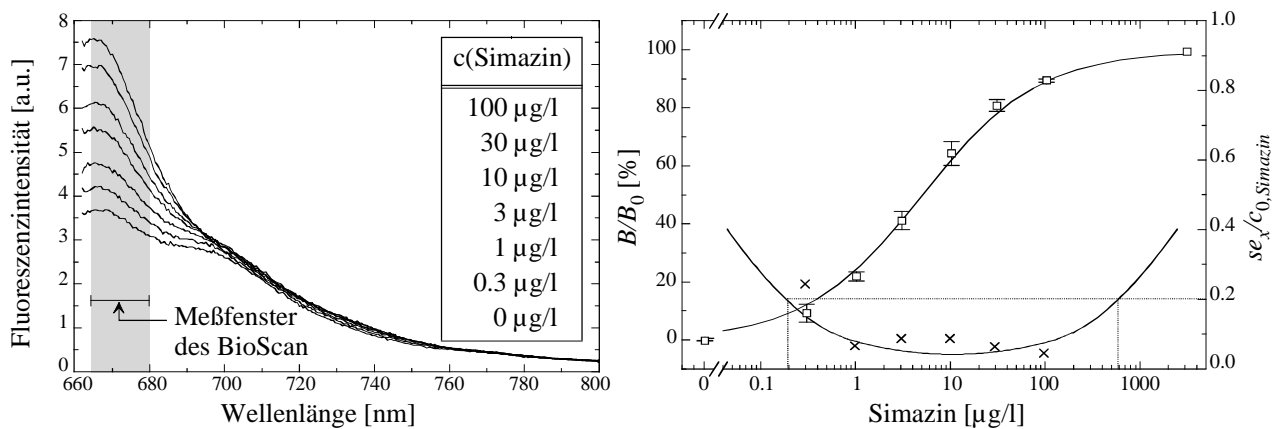


Abbildung 4-40: Kalibrierung von Simazin in einem Probenvolumen von 500 μl . Links: Zunahme der Emissionsspektren mit steigender Simazinkonzentration. Rechts: Auftragung der Fluoreszenzintensität am Maximum der Cy5-Emission (667 nm) gegen die entsprechende Simazin-Konzentration.

Bei der anschließenden Kalibrierung in der NTP wurden, im Gegensatz zu der Vorgehensweise bei der Titration, die einzelnen Lösungen *sequentiell* in die Kavitäten dosiert. Dabei wurde analog zum verwendeten Protokoll im Mikroformat die verschiedenen Simazin-Standardkonzentrationen zu 56 nl (entsprechend 80 % des Gesamtvolumens) vorgelegt und anschlie-

ßend je 7 nl der beiden Konjugate (je 10 % des Gesamtvolumens) dazupipettiert. Für jeden Kalibrierpunkt wurden alle verfügbaren Kavitäten einer Spalte der NTP befüllt.

Abbildung 4-41 zeigt oben einen Ausschnitt des Fluoreszenzbildes der NTP und unten die ausgewertete Kalibrierkurve. Die Kalibrierpunkte stellen die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten von je 25 Kavitäten dar. Die Übereinstimmung der erhaltenen Kalibrierkurve mit den Ergebnissen der Vergleichsmessung (siehe Abbildung 4-40) und der nach Gl. (108) berechneten Kurve ist optimal.

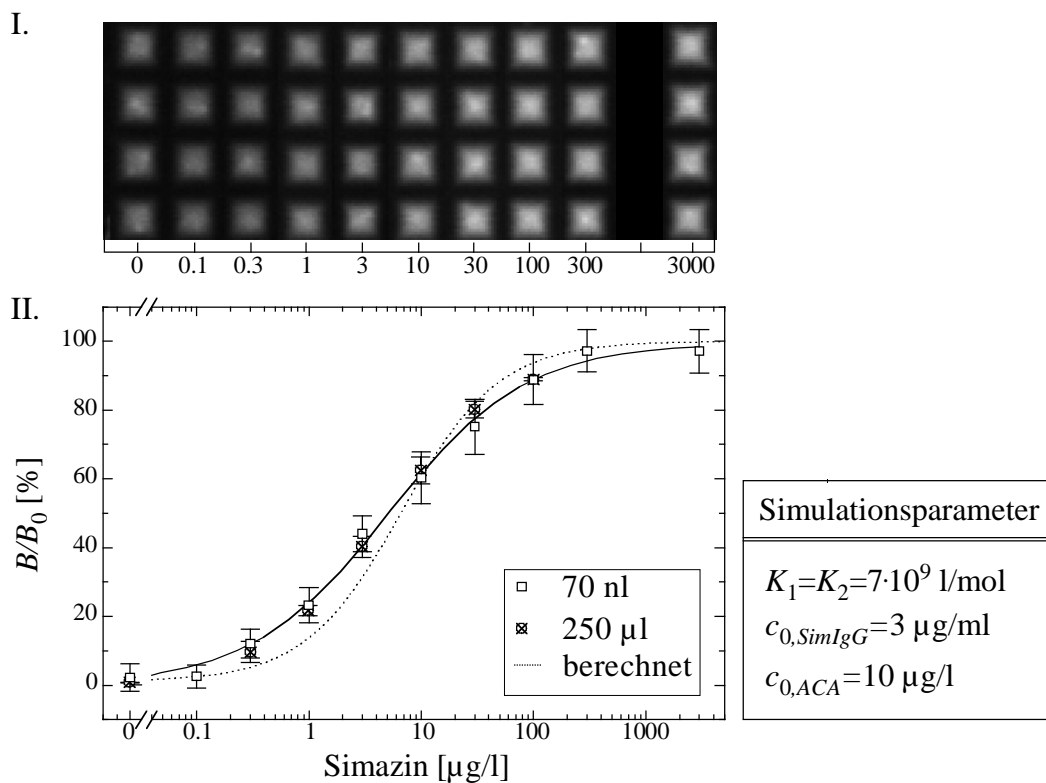


Abbildung 4-41: Kalibrierung von Simazin mit $c_{0,SimIgG} = 3$ µg/ml und $c_{0,ACA} = 10$ µg/l in der ABS-NTP. Die einzelnen Lösungen wurden sequentiell dosiert. Oben (I.): Ausschnitt des Fluoreszenzbildes der NTP. Unten: Ausgewertete Kalibrierpunkte mit angepasster logistischer Funktion (—) und Vergleich mit den Ergebnissen aus der Küvette (\otimes) und der simulierten Kurve (····).

Die ermittelten CV variieren bei dieser Kalibrierkurve zwischen 2.7 % und 4.2 % und stellen aus zwei Gründen ausgezeichnete Werte dar: (I) wie bereits oben erwähnt wurde das Signal aus einer Abfolge von drei Pipettierschritten erzeugt, wobei jeder Pipettierschritt fehlerbehaftet war und zur Gesamtstandardabweichung beitrug; (II) der gesamte Pipettiervorgang dauerte rund 23 Minuten, so daß über diesen Zeitraum hinweg Verdunstungsverluste ebenfalls einen

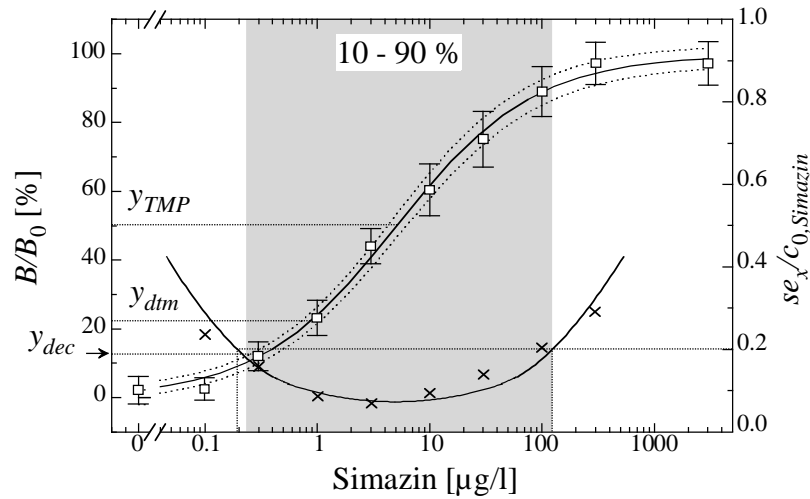


Abbildung 4-42: Bestimmung der analytischen Qualitätsparameter wie NWG (y_{dec}), BG (y_{dtm}) und TMP der Kalibrierkurve von Simazin. Eingezeichnet sind auch die Konfidenzbänder (\dots) ($\alpha = 0.05$, $n = 25$) und die Arbeitsbereiche als 10 - 90 % B/B_0 (grau unterlegter Bereich) bzw. als $se_x/c_{0,Ag} = 20\%$. Die Kreuze (\times) entsprechen der Präzision der einzelnen Kalibrierpunkte, die durchgezogene Kurve dem Präzisionsprofil, berechnet aus den mittleren sd_y .

starken Einfluß auf die Standardabweichung der Meßpunkte hatten. Die gefundenen CV belegen also die ausgezeichnete Präzision, die mit der visuell überwachten Mikropumpe erreicht werden konnte sowie die erzielte stabile Klimatisierung der Dosierkammer.

Die analytischen Qualitätsparameter des Assays, welche aus der Kalibrierkurve bestimmt wurden (siehe Abbildung 4-42), sind in Tabelle 4-14 angegeben.

Tabelle 4-14: Analytische Qualitätsparameter der Kalibrierung von Simazin in ABS-NTP bei sequentieller Dosierung der Lösungen.

Analyt	TMP [µg/l]	NWG (x_{dec}) [µg/l]	BG (x_{dtm}) [µg/l]	Arbeitsbereich [µg/l]		CV [%]
				10 - 90 %	Präzisionsprofil	
Simazin	5.0	0.32	0.85	0.23 - 123	0.22 - 123	2.7 - 4.2

4.4.4 Validierung

Die Validierung des RETIA anhand des etablierten Simazin-Assays wurde in den ABS-NTP analog zu Kap. 4.3.3 durchgeführt. Die Kriterien *Präzision*, *Reproduzierbarkeit* und *Richtigkeit* des Assays standen dabei im Vordergrund.

4.4.4.1 Präzision

Die Präzision wurde bereits in Tabelle 4-14 durch Angabe der *analytischen Qualitätsparameter* beschrieben und im Text diskutiert. Die erreichten Verfahrensstandardabweichungen betragen $CV = 2.7 - 4.2 \%$ und stellen in Anbetracht der diffizilen Probenhandhabung sehr gute Werte dar. Verglichen mit der erreichten CV von $CV = 0.04 - 2.4 \%$ im Mikroliterbereich (siehe Tabelle 4-8), sind die Werte der NTP um einen Faktor von 2 größer. Sie liegen aber immer noch deutlich unter den Werten heterogener, kompetitiver Testverfahren mit $CV = 5 - 10 \%$.

4.4.4.2 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des RETIA in der NTP wurde durch Messung von fünf Kalibrierkurven an verschiedenen Tagen bestimmt. In Tabelle 4-15 sind die Parameter - Signaldynamik, TMP und NWG - der fünf Kalibrierkurven gegenübergestellt. Die ermittelten Werte zeigen eine deutlich größere Veränderung von Tag zu Tag, als in der MTP (siehe Tabelle 4-9). Die Signaldynamik weist eine Schwankungsbreite von 7 % auf (3 % in der MTP) und die Interassay-Variationskoeffizienten der TMP bzw. NWG betragen 27 % (6.4 % in der MTP) bzw. 32 % (16 % in der MTP). Eine wahrscheinliche Erklärung für diese größere Variationsbreite ist die unzureichende Reproduzierbarkeit der Oberflächenmodifikation der ABS-NTP. Hier sollte ein standardisiertes Protokoll mit genauer Bestimmung der jeweiligen Inkubationszeiten Abhilfe schaffen (Coille, 1999).

Tabelle 4-15: Reproduzierbarkeit des RETIA im Nanoliterformat. Angegeben sind die Signaldynamik, die TMP und die NWG von fünf Kalibrierkurven, die an verschiedenen Tagen aufgenommen wurden.

Tag	Signaldynamik [%]	TMP [$\mu\text{g/l}$]	NWG [$\mu\text{g/l}$]
1	46	4.83 ± 0.65	0.32
2	42	6.37 ± 0.62	0.64
3	46	4.98 ± 1.32	0.39
6	44	3.26 ± 1.51	0.67
7	39	3.45 ± 1.04	0.69

4.4.4.3 Richtigkeit

Anhand von aufgestockten Realproben wurden die *WFR* des RETIA und die Korrelationen mit chromatographischen Verfahren (GC/MS) ermittelt. Entsprechend der Referenzierungsstrategie, die in Kap. 4.3.3.3 erarbeitet wurde, sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Realproben auf das Antikörpersignal bezogen worden. Bis zu einer Simazin-Konzentration von 30 $\mu\text{g/l}$ konnte eine konstante Intensität der Referenzlösung festgestellt werden. Bei Konzentrationen größer 30 $\mu\text{g/l}$ stieg das SimIgG-Cy5-Signal leicht an, bis bei 3000 $\mu\text{g/l}$ eine Zunahme von 6.5 % erreicht wurde. Dies konnte durch zeitaufgelöste Messungen bestätigt werden. Die *mittlere Fluoreszenzlebensdauer* von SimIgG-Cy5 stieg von $\bar{\tau}_F = 1.54 \text{ ns}$ (siehe Tabelle 4-2) auf $\bar{\tau}_F = 1.64 \text{ ns}$ bei Anwesenheit einer Analytkonzentration von 3000 $\mu\text{g/l}$. Dies entspricht einer Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute um 6.5 % und ist auf lokale Polaritätsänderungen in der Umgebung der Fluorophore zurückzuführen. Dieser Effekt wird bei Fluoreszenz-Verstärkungs IA ausgenutzt (Libudry, 1979).

Die *WFR* von elf in einem Konzentrationsbereich von 1 - 6.2 $\mu\text{g/l}$ aufgestockten Realwässern sind in Tabelle 4-16 angegeben. Sie reichen von 74 - 132 % und betragen im Mittel 98 %. Die Korrelation der aufgestockten und mit dem RETIA gemessenen Konzentrationen ist in Abbildung 4-43 links angegeben. Die lineare Regression ergab für die *Wiederfindungsfunktion* einen y-Achsenabschnitt von $b = 0.60 \pm 0.26 \mu\text{g/l}$ und eine Steigung von $m = 0.77 \pm 0.07$, bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.970$. Der durchgeführte t-Test zur Prüfung auf Signifikanz der Abweichungen von den Idealwerten ($b = 0$ und $m = 1$) ergab auf einem α -Niveau von 0.05 sowohl eine konstant-systematische als auch eine proportional-systematische Abweichung. Das gleiche Ergebnis wurde für die Korrelation RETIA vs. GC/MS erhalten (siehe Abbildung 4-43 rechts). Auch hier lagen die beiden Prüfgrößen über dem Tabellenwert der t-Verteilung.

Als mögliche Ursachen hierfür sind neben eventuellen systematischen Fehlern auch eine unzureichende Korrektur der Matrixeffekte zu diskutieren. Systematische Fehler können sowohl aus falschen Kalibrierungen als auch aus einer unkorrekten Datenauswertung hervorgehen. Diese Fehler können durch parallele Vergleichsmessungen im Mikroliterbereich erkannt und beseitigt werden. Die Matrixeffekte können nur durch eine weitere Verbesserung der Referenzierungsstrategie vollständig eliminiert werden. In Kap. 4.3.3.3 wurde bereits die Möglichkeit der zusätzlichen Registrierung einer Wellenlänge bzw. eines Wellenlängenbereichs mit

Tabelle 4-16: Bestimmung der WFR und der Korrelation zu GC/MS mittels aufgestockter Realproben. (n.b.: nicht bestimmt).

Probe Herkunftsort	aufgestockte Konz. [µg/l]	gemessene Konz. RETIA [µg/l]	Präzision $se_x/c_{0,Simazin}$	gemessene Konz. GC/MS [µg/l]	WFR RETIA [%]	WFR GC/MS [%]
Radolfzell	1.00	1.19 ± 0.34	0.08	1.13 ± 0.03	119	113
Konstanz	2.00	2.20 ± 1.37	0.15	2.25 ± 0.07	110	113
	2.20	2.90 ± 0.90	0.09	n.b.	132	n.b.
	2.50	1.85 ± 0.95	0.08	n.b.	74	n.b.
	2.50	2.20 ± 0.77	0.07	n.b.	88	n.b.
Heiligenberg	3.00	3.00 ± 1.43	0.18	3.09 ± 0.09	100	103
Aschaffenburg	3.50	3.50 ± 1.40	0.09	3.70 ± 0.11	100	106
	4.00	3.80 ± 1.04	0.06	4.27 ± 0.13	95	107
Bad Dürkheim	5.00	4.60 ± 1.20	0.05	5.06 ± 0.15	92	101
Nagold	6.00	5.00 ± 3.20	0.12	n.b.	83	n.b.
	6.20	5.20 ± 1.46	0.05	6.40 ± 0.19	84	103

möglichst konstanter Fluoreszenzintensität über den kalibrierten Konzentrationsbereich angesprochen. Gemäß Abbildung 4-40 würden sich dazu Wellenlängen größer 710 nm anbieten.

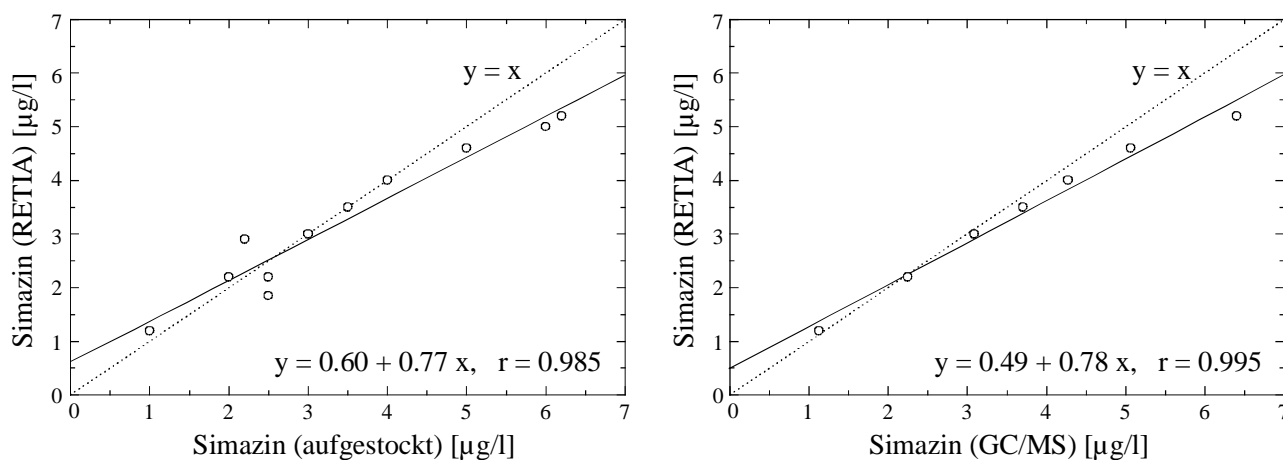


Abbildung 4-43: Korrelationen der gemessenen Konzentrationen (RETIA) mit den aufgestockten Konzentrationen (links) und den Ergebnissen der GC/MS-Messungen (rechts).

4.4.5 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

- ⇒ Die Beobachtungsmöglichkeit des Tropfenbildungsvorganges nach Installation einer Stroboskopeinheit in das Probenhandhabungssystem führt zu einer ausgezeichneten Präzision des RETIA in der NTP. Die *CV* der Kalibrierkurven liegen im Bereich zwischen 2.7 % und 4.2 %, wobei die Standard- und Konjugatlösungen sequentiell in die Kavitäten pipettiert wurden.
- ⇒ Die Signaldynamik nimmt von 64 % in der Küvette auf 40 % in der NTP ab (bei $c_{0,SimIgG} = 3 \mu\text{g/ml}$). Dies ist auf die verstärkte Adsorption der Assaykomponenten an die Wände der Kavitäten zurückzuführen und wird durch ein großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis in den Kavitäten der NTP verursacht. Durch eine optimierte Oberflächenmodifikation wird eine gute Biokompatibilität der NTP und damit eine Zunahme der Modulationstiefe von 20 % erreicht.
- ⇒ Die vergleichenden Kalibrierungen in den NTP und im Mikroliterbereich zeigen, daß die Lage der Kalibrierkurven (charakterisiert durch den TMP), trotz der Volumenreduktion um einen Faktor von 7100, übereinstimmt. Bedingt durch die höheren *CV*-Werte in der NTP liegt die NWG bei höheren Analytkonzentrationen.
- ⇒ Die Validierung des Assays zeigt eine geringere Reproduzierbarkeit der TMP und NWG als im Mikroformat. Dies ist vermutlich auf leichte Unterschiede in der Oberflächenmodifikation von NTP zu NTP zurückzuführen.
- ⇒ Die Untersuchung der Richtigkeit des RETIA führt zu *WFR* von 74 - 132 %. Die Korrelation der Ergebnisse mit der standardisierten GC/MS-Methode zeigt sowohl eine konstant- als auch eine proportional-systematische Abweichung von der Winkelhalbierenden. Mögliche Erklärungen können systematische Fehler beim Kalibrieren bzw. eine nicht ausreichende Referenzierung der Matrixeffekte sein.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein homogener Fluoroimmunoassay basierend auf *Energie-Transfer-Effekten* etabliert. Ziel war es, ein Testsystem zu realisieren, welches die Detektion von umweltrelevanten Analyten im Nanoliterbereich ($V < 100$ nl) erlaubt. Als Probenträger wurden sogenannte Nanotiterplatten (NTP) eingesetzt. Voraussetzung für den erfolgreichen Transfer des Assays in die NTP war die Auswahl geeigneter Fluoreszenzmarker und deren grundlegende Charakterisierung hinsichtlich der physikalisch-chemischen und photophysikalischen Eigenschaften. Dadurch sollte eine maximale Signaldynamik und minimale Nachweisgrenze des Testverfahrens erreicht werden.

Als Donor-Akzeptor-Paar wurden für die Etablierung des kompetitiven Resonanten-Energie-Transfer-Immunoassays (RETIA) zwei langwellig anregbare Sulfoindocyanin-Fluorophore, Cy5 und Cy5.5, ausgewählt. Dadurch konnten die Vorteile der verringerten Rayleigh Streustrahlung, der geringen Hintergrundfluoreszenz biologischer Matrixkomponenten und der Möglichkeit der Anregung durch He-Ne-Laser bzw. durch preiswerte, kompakte und leistungsstarke Laserdiodenmodule ausgenutzt werden. Die Antikörper wurden mit dem Donorfluorophor Cy5 und die Analytderivate über Rinderserum Albumin (als Trägerprotein) mit dem Akzeptorfluorophor Cy5.5 markiert. Zur Charakterisierung der spektralen Eigenschaften und der Quantenausbeuten der Protein gebundenen Fluorophore wurden Konjugate mit verschiedenen Farbstoff / Protein-Verhältnissen synthetisiert. Kleine Farbstoff / Protein-Verhältnisse führten zu einer Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeuten auf einen Wert von ca. 1. Ursache hierfür war die eingeschränkte Torsionsbewegung der Fluorophore um die zentrale Methinbrücke in der rigiden Umgebung der Proteine. Bei höheren Farbstoff / Protein-Verhältnissen wurde aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren die Bildung von nicht-fluoreszierenden Dimeren festgestellt. Durch Energie-Transfer-Prozesse von den Monomeren zu den Dimeren innerhalb eines Proteinmoleküls wurde eine starke Abnahme der Quantenausbeuten der Monomere beobachtet. Bei einem Farbstoff / Protein-Verhältnis von ca. 9 betrug die Fluoreszenzquantenausbeute nur noch 0.14. Bedingt durch diese beiden gegenläufigen Effekte wurde die maximale Fluoreszenzintensität der Cy5 markierten Antikörper bei einem Markierungsgrad von 4 ermittelt. Begleitend zu den experimentellen Arbeiten wurde die Abhängigkeit der Quantenausbeuten von den Markierungsgraden quantitativ beschrieben, wobei eine Poisson-Verteilung der Fluorophore über die Proteine angenommen wurde.

Die photophysikalischen Desaktivierungsprozesse, die zur Löschung der Fluoreszenzintensität der Cy5 Monomere im Analytderivat-Antikörper-Komplex führten, wurden charakterisiert und quantifiziert. Aus statischen und dynamischen Fluoreszenzmessungen konnten zwei verschiedene Lösprozesse abgeleitet werden. Zu je 50 % wurde die Modulation der Cy5-Fluoreszenz durch Resonanten-Energie-Transfer (Förster-Abstand: $R_0 = 7.6$ nm) und Elektronen-Transfer verursacht. Die daraus resultierende geringe sensibilisierte Cy5.5-Fluoreszenz führte zu einer außerordentlich hohen Signaldynamik von 65 %.

Die Modellanalyte Simazin, Atrazin, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Isoproturon wurden mit dem charakterisierten System zunächst im Mikroliterbereich kalibriert. Es wurde ein kompetitives Testformat etabliert und die Optimierungsmöglichkeiten der Testparameter wie Antikörperkonzentration, Analytderivatkonzentration und Affinitätskonstanten anhand von Modellrechnungen aufgezeigt und diskutiert. Im Vordergrund stand dabei die gezielte Variation dieser Parameter, um deren Einfluß auf die Signaldynamik und die Nachweisgrenze der Assays zu simulieren. Die aus diesen Rechnungen gewonnenen Erkenntnisse wurden in den Messungen umgesetzt und am Beispiel des Analyten Atrazin experimentell bestätigt. Darüber hinaus war es bei Assays mit monoklonalen Antikörpern möglich, den genauen Verlauf und die Lage der Kalibrierkurven zu berechnen. Für polyklonale Antikörper wurde ein Modell zur Bestimmung sogenannter mittlerer Affinitäten vorgestellt, wodurch auch hier zumindest die Testmittelpunkte der Assays berechnet werden konnten.

Die experimentell optimierten Kalibrierkurven zeigten für die Analyte Simazin und Isoproturon Nachweisgrenzen (NWG) von $0.01 \mu\text{g/l}$ bzw. $0.02 \mu\text{g/l}$ und Bestimmungsgrenzen (BG) von $0.03 \mu\text{g/l}$ bzw. $0.06 \mu\text{g/l}$. Damit wurden die Zielvorgaben des Projekts (NWG = $0.05 \mu\text{g/l}$ und BG = $0.1 \mu\text{g/l}$) weit übertroffen. Mit den Analyten Atrazin und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure konnten die Zielvorgaben mit den erreichten Nachweisgrenzen von $0.07 \mu\text{g/l}$ bzw. $0.3 \mu\text{g/l}$ nicht erfaßt werden. Die Steigerung der analytischen Leistungsfähigkeit dieser Assays war durch die zu geringe Affinität der Antikörper und der damit verbundenen geringen Signaldynamik im Immunoassay begrenzt.

In weiteren Arbeiten wurde der RETIA anhand von Realproben validiert. Als Kriterien wurden die Präzision, die Reproduzierbarkeit und die Richtigkeit des Assays herangezogen. Mit Variationskoeffizienten von 0.4 - 2.4 % konnte eine ausgezeichnete Präzision in der Signaldomäne dokumentiert werden. Die Präzision in der Konzentrationsdomäne wies vor allem bei

Kalibrierkurven polyklonaler Antikörper mit geringer Signaldynamik Werte $> 10\%$ auf. Dadurch wurde der Arbeitsbereich dieser Assays erheblich eingeschränkt.

Eine gute Reproduzierbarkeit (Interassay-Variationskoeffizienten der TMP von 6.4%) und Richtigkeit des Assays konnte durch Wiederholungsmessungen bzw. durch Ermittlung der Wiederfindungsfunktion und der Korrelationskoeffizienten anhand von aufgestockten Realproben ermittelt werden. Um Matrixeffekte bei der Messung mit Realproben zu reduzieren, wurde eine geeignete Strategie zur Referenzierung entwickelt. Mit einer parallelen Detektion von Referenzsignalen konnten die Intensitätswerte der Realproben korrigiert werden. Es wurden mittlere Wiederfindungsraten von 102% und Korrelationskoeffizienten von 0.989 erhalten. In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner Institut Dr. Jäger wurde weiterhin die Korrelation mit einer standardisierten, chromatographischen Methode (GC/MS) untersucht. Auch hier konnten ausgezeichnete mittlere Wiederfindungsraten von 101% (Simazin) bzw. 99% (Isoproturon) und Korrelationskoeffizienten von 0.99 bzw. 0.987 festgestellt werden. Vereinzelt wurden Wiederfindungsraten erhalten, die die obere Toleranzgrenze der „Association of Official Analytical Chemistry“ von 120% überschritten. Abhilfe sollte eine effizientere Korrektur der Matrixeffekte durch eine verfeinerte Referenzierungsstrategie schaffen.

Ein weiterer wichtiger Schritt war der Transfer des RETIA vom Mikroliterbereich in den Nanoliterbereich. Für die erfolgreiche Durchführung des Assays mußten zunächst die Probenhandhabung und die Probenträger den miniaturisierten Dimensionen angepaßt werden. Als Probenträger wurden sogenannte Nanotiterplatten (NTP) verwendet, die eine Kavitätendichte von 156 Kavitäten/cm² und ein Kavitätenvolumina von 70 nl aufwiesen. Um die unspezifische Adsorption der Assaykomponenten an die Kavitätswände minimieren zu können, wurden die Nanotiterplatten mit einer speziell entwickelten Oberflächenchemie modifiziert. Für die Probenhandhabung wurden piezoelektrische Pumpen eingesetzt, die eine präzise Dosierung von kleinsten Volumina ($0.5 - 2$ nl) erlauben. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten der pipettierten Volumina wurde eine geeignete klimatisierbare Dosierkammer entworfen. Ferner wurde zur visuellen Überwachung des Tropfenbildungs- und Pipettiervorgangs eine Mikroskopkamera und eine Stroboskopeinheit in die Dosieranlage integriert.

Der Transfer des Immunoassays wurde am Beispiel des Analyten Simazin realisiert. Zum Vergleich der Leistungsfähigkeit des Assays wurde der Analyt parallel im Mikro- (Küvette,

V = 500 µl) und im Nanoformat (NTP, V = 70 nl) kalibriert. Es wurde eine Antikörperkonzentration von 3 µg/ml eingesetzt. Tabelle 5-1 stellt die erhaltenen charakteristischen Parameter der beiden Kalibrierkurven zusammenfassend gegenüber. Die Reduktion der Testvolumina um einen Faktor von 7100 führte zu einer ebenso drastischen Reduktion des kostenbestimmenden Antikörperverbrauchs von 10 pmol auf 1.4 fmol. Dabei wurden identische Testmittelpunkte der Kalibrierkurven bei $c_{0,Simazin}(TMP) = 5 \mu\text{g/l}$ festgestellt. Aufgrund der optimierten Oberflächenmodifikation der Nanotiterplatten wurde eine gute Signaldynamik von 47 % erreicht. Diese lag trotz des drastisch erhöhten Oberflächen/Volumen-Verhältnisses um einen Faktor von 8.7 nur um 14 % unter der in der Küvette bestimmten Dynamik. Die Präzision des RETIA in der Signaldomäne betrug in den Nanotiterplatten im Mittel 3.4 % (2.7 - 4.2 %). Dieser ausgezeichnete Wert dokumentiert einerseits die hohe Präzision, mit der die Standardlösungen und Reagenzien in die Kavitäten pipettiert wurden, und andererseits die erzielte stabile Klimatisierung der Dosierkammer. Verglichen mit den erreichten Variationskoeffizienten von 0.04 - 2.4 % im Mikroliterbereich sind die Werte der Kalibrierkurven in der Nanotiterplatte um einen Faktor von 2 größer. Sie liegen aber immer noch deutlich unter den Werten heterogener, kompetitiver Testverfahren (z.B. Enzymimmunoassays) mit $CV = 5 - 10 \%$.

Tabelle 5-1: Vergleich der charakteristischen Parameter des RETIA bei der Durchführung im Mikro- (Küvette) bzw. im Nanoformat (NTP).

Probenträger	Testvolumina [µl]	Verbrauch IgG/Kavität [mol]	TMP [µg/l]	Signaldynamik [%]	Präzision [%]
Küvette	500	$1 \cdot 10^{-11}$	5	61	0.7 - 2.4
NTP	0.07	$1.4 \cdot 10^{-15}$	5	47	2.7 - 4.2

Die Validierung des RETIA anhand von aufgestockten Realproben in der Nanotiterplatte zeigte, daß die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit des miniaturisierten Assays, über den erzielten Werten im Mikroformat lagen. Die Interassay-Variationskoeffizienten der Testmittelpunkte betragen 27 % (6.4 % im Mikroformat). Als Erklärung für diese größere Variationsbreite konnte die unzureichende Reproduzierbarkeit der Oberflächenmodifikation der Nanotiterplatten identifiziert werden. Die Wiederfindungsraten reichten von 74 - 132 % und betragen im Mittel 98 %. Die Durchführung eines t-Tests ergab sowohl eine konstant-

systematische als auch eine proportional-systematische Abweichung von den Idealwerten. Diese vermutlich durch Matrixeffekte hervorgerufenen systematischen Abweichungen können durch verfeinerte Referenzierungsstrategien weitgehend behoben werden. In weiteren Arbeiten sollten deshalb noch folgende Ansätze zur Steigerung der bereits vielversprechenden Leistungsfähigkeit des Assays in den NTP verfolgt werden:

- Optimierung der Oberflächenmodifikation der Probenträger.
- Verbesserung der Präzision der Kalibrierkurven durch Verringerung der Dosierschritte.
- Erweiterung der etablierten Referenzierungsstrategie durch Intensitätsmessungen bei mehreren Wellenlängen.

6 Literatur

Abuknesha, R. (1997) Persönliche Mitteilung.

ACS Committee on environmental improvement (1980) Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 52, 2242-2249.

ACS Committee on environmental improvement (1983) Principles of environmental analysis. *Anal. Chem.* 55, 2210-2218.

Aguilar-Caballos, M. P., Gómez-Hens, A., and Pérez-Bendito, D. (1999) Pesticide determination by stopped-flow fluoroimmunoassay using Cresyl Violet as label. *Anal. Chim. Acta* 381, 147-154.

Aramendia, P. F., Negri, R. M., and Román, E. S. (1994) Temperature Dependence of Fluorescence and Photoisomerisation in Symetric Carbocyanines. Influence of Viscosity and Molecular Structure. *J. Phys. Chem.* 98, 3165-3173.

Aspelin, A.L. (1997) Pesticides Industry Sales And Usage, 1994 and 1995 Market Estimates. *US EPA*, Washington, DC.

Avrameas, S. (1992) Amplification systems in immunoenzymatic techniques. *J. Immunol. Methods* 150, 23-32.

Baker, J. L. (1992) Effects of tillage and crop residue on field losses of soil-applied pesticides. *Fate of Pesticides and Chemicals in the Environment* (J. L. Schnoor, Ed.) pp 175-187, John-Wiley & Sons, Inc., New York.

Ballesteros, B., Barceló, D., Sanchez-Baeza, F., Camps, F., and Marco, M.-P. (1998) Influence of the Hapten Design on the Development of a Competitive ELISA for the Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1015 at Trace Levels. *Anal. Chem.* 70, 4004-4014.

Barceló, D. (1993) Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. *J. Chromatogr.* 643, 117-143.

Barceló, D., and Hennion, M.-C. (1997) *Trace determination of pesticides and their degradation products in water*. Elsevier, Amsterdam.

- Bauer, R., und Königstein, C. (1993) Inter- und intramolekularer Energietransfer und Ladungstrennung in kovalent gebundenen Cyanin - Farbstoff - Viologen - Systemen. *Z. Naturforsch.* 48 b, 461-470.
- Beitz, H., Schmidt, H., and Herzel, F. (1994) Occurrence, Toxicological and Ecotoxicological Significance of Pesticides in Groundwater and Surface Water. *Pesticides in Ground and Surface Water* (H. Börner, Ed.) pp 1-57, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Beresini, M. H., Davalian, D., Alexander, S., Toton-Quinn, R., Barnett, B., Cerelli, M. J., Hu, M. W., Berger, D. E., Blohm, W. P., and Jaklitsch, A. (1993) Evaluation of EMIT[®] Cyclosporine Assay for Use with Whole Blood. *Clin. Chem.* 39, 2235-2241.
- Berger, T. A. (1994) Separation of Phenylurea Herbicides by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 32, 25-29.
- Berson, S. A., and Yalow, R. S. (1959) Quantitative aspects of reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. Clin. Invest.* 38, 1996.
- Bhattacharjee, A. K., and Glaudemans, C. P. J. (1978) Dual binding specificities in MOPC 384 and 870 murine myeloma immunoglobulins. *J. Immunol.* 120, 411-413.
- Bosworth, N., and Towers, P. (1989) Scintillation proximity assay. *Nature* 341, 167-168.
- Brinkley, M. (1992) A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjugate Chem.* 3, 2-13.
- Buscarlet, L., Grassi, J., Créminon, C., and Pradelles, P. (1999) Cross-Linking of 17 β -Estradiol to Monoclonal Antibodies by direct UV Irradiation: Application to an Enzyme Immunometric Assay. *Anal. Chem.* 71, 1002-1008.
- Brecht, A., Gauglitz, G., and Polster, J. (1993) Interferometric immunoassay in a FIA-system: a sensitive and rapid approach in label-free immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* 8, 387-392.
- Brecht, A., und Gauglitz, G. (1995) Optical probes and transducers. *Biosens. Bioelectron.* 10, 923-936.
- Brecht, A., und Gauglitz, G. (1997) Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications. *Sens. Actuators B* 38-39, 1-7.

- Carlsson, C., Larsson, A., Jonsson, M., Albinsson, B., and Nordén, B. (1994) Optical and Photophysical Properties of the Oxazole Yellow DNA Probes YO and YOYO. *J. Phys. Chem.* 98, 10313-10321.
- Chan, D. W., Perlstein, M. T. (Eds.) (1987) *Immunoassay: A Practical Guide*. Academic Press, Inc., San Diego.
- Chang, I.-N., Lin, J.-N., Andrade, J. D., and Herron, J. N. (1995) Photoaffinity Labeling of Antibodies for Application in Homogeneous Fluoroimmunoassays. *Anal. Chem.* 67, 959-966.
- Chappey, O., Debray, M., Niel, E., and Scherrmann, J. M. (1994) Association constants of monoclonal antibodies for hapten: Heterogeneity of frequency distribution and possible relationship with hapten molecular weight. *J. Immunol. Meth.* 172, 219-225.
- Chiem, N., and Harrison, D. J. (1997) Microchip-based capillary electrophoresis for immunoassays: analysis of monoclonal antibodies and theopylline. *Anal Chem.* 69, 373-378.
- Churchill, M. E. A., Stura, E. A., Pinilla, C., Appel, J. R., Houghten, R. A., Kono, D. H., Balderas, R. S., Fieser, G. G., Schulze-Gahmen, U., and Wilson, I. A. (1994) Crystal Structure of a Peptide Complex of Anti-influenza Peptide Antibody Fab 26/9: Comparison of Two Different Antibodies Bound to the Same Peptide Antigen. *J. Molec. Biol.* 241, 534-556.
- Cohn, E. J., Hughes Jr., W. L., and Weare, J. H. (1947) Preparation and properties of serum and plasma proteins. XIII. Crystallization of serum albumins from ethanol-water mixtures. *J. Am. Chem. Soc.* 69, 1747-1761.
- Cohen, S.Z. (1990) Pesticides in ground water: an overview. *Environmental Fate of Pesticides* (D. H. Hutson and T. R. Roberts, Eds.) pp 13-24, John Wiley & Sons Ltd, Chichester New York.
- Coille, I. (1999) Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen. In Vorbereitung.
- Comacher, H. B. S. (1990) Validation of Methods used in crisis situations: task force report. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 (2), 332-334.

- Cullander, C. (1994) Imaging in the far-red with electronic light microscopy: requirements and limitations. *J. Microsc.* 176, 281-286.
- Cush, R., Cronin, J. M., Stewart, W. J., Maule, C. H., Molloy, J., Goddard, N. J. (1993) The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosens. Bioelectron.* 8, 347-354.
- Dale, R. E., and Teale, F. W. J. (1970) Number and distribution of chromophore types in native phycobiliproteins. *Photochem. Photobiol.* 12, 99-117.
- Dandliker, W. B., Alonso, R., De Saussure, V. A., Kierszenbaum, F., Levison, S., and Schapiro, H. C. (1967) The Effect of Chaotropic Ions on the Dissociation of Antigen-Antibody Complexes. *Biochemistry* 6 (2), 1460-1467.
- Dandliker, W. B., and de Saussure, V. A. (1970) Fluorescence polarisation in immunochemistry. *Immunochemistry* 7, 799-827.
- Danzer, K., Than, E., Molch, D., und Küchler, L. (Hrsg.) (1987) *Analytik - Systematischer Überblick*. 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH, Stuttgart.
- Davies, D. R., Sheriff, S., Padlan, E. A. (1988) Antibody-antigen complexes. *J. biol. Chem.* 263, 10541-10544.
- Doizi, D., and Mialocq, J. C. (1987) Photosensitised electron - transfer reaction in the first excited singlet state of a polymethin - cyanine dye. *J. Phys. Chem.* 91, 3524-3530.
- Dosch, M., Weller, M. G., Bückmann, A .F., and Niessner, R. (1998) Homogeneous immunoassay for the detection of trinitrotoluene (TNT) based on the reactivation of apoglucose oxidase using a novel FAD- trinitrotoluene conjugate. *Fresenius J. Anal. Chem.* 361, 174-178.
- Dzgoev, A., Mecklenburg, M., Larsson, P.-O., and Danielsson, B. (1996) Microformat imaging ELISA for pesticide determination. *Anal. Chem.* 68, 3364-3369.
- Dudley, R. A., Edwards, P., Ekins, R. P., Finney, D. J., McKenzie, I. G. M., Raab, G. M., Rodbard, D., and Rodgers, R. P. C. (1985) Guideline for immunoassay data processing. *Clin. Chem.* 31, 1264-1271.

- Dzgoev, A., Mecklenburg, M., Xie, B., Miyabayashi, A., Larsson, P.-O., and Danielsson, B. (1997) Optimization of a charge coupled device imaging enzyme linked immuno sorbent assay and supports for the simultaneous determination of multiple 2,4-D samples. *Anal. Chim. Acta* 347, 87-93.
- Eaton, D. F. (1990) Recommended methods for fluorescence decay analysis. *Pure & Appl. Chem.* 62, 1631-1648.
- EEC, (30 August 1980) *European Economic Community Drinking Water Guideline*, 80/778/EEC, No. L229, Brussels.
- Ekins, R. P. (1960) The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin. Chim. Acta* 5, 463-469.
- Ekins, R. P. (1989) A shadow over immunoassay. *Nature* 340, 256-258.
- Ekins, R. P. (1997) Immunoassay Design and Optimisation. *Principles and Practice of Immunoassay*. (C. P. Price and D. J. Newman, Eds.) pp 175-205, Second Edition, Stockton Press, New York.
- Ekins, R. P. (1998) Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin. Chem.* 44, 2015-2030.
- Ekins, R. P., Chu, F. W. (1991) Multianalyte microspot immunoassay - microanalytical „compact disk“ of the future. *Clin. Chem.* 37, 1955-1967.
- Engel, W. D., and Khanna, P. L. (1992) CEDIA in vitro diagnostics with a novel homogeneous immunoassay technique: Current status and future prospects. *J. Immunol. Meth.* 150, 99-102.
- Fairclough, R. H., and Cantor, C. R. (1978) The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. *Methods Enzymol.* 48, 347-379.
- Fatori, D., and Hunter, W. M. (1980) Radioimmunoassay for Serum Paraquat. *Clin. Chim. Acta* 100, 81-90.
- Feller, K.-H., and Gadonas, R. (1996) Energy and electron transfer processes in polymethine dyes. *AIP Conf. Proc.* 364, 78-90.

- Fischer, R., Siebers, J., Blacha-Puller, M. (1997) *Methodenbuch Rückstandsanalytik - Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. Parey Buchverlag, Berlin-Dahlem.
- Fischer-Früholz, St. (1997) Das Labor auf dem Chip. *BioTec 1*, 40-41.
- Fischer Weltalmanach (1998), Systema Verlag GmbH, München.
- Fielding, M., Barceló, D. Helweg, A., Galassi, S., Torstensson, L., van Zoonen, P., Wolter, R., Angeletti, G. (1992) Water Pollution report, 27. *Pesticides in ground and drinking water*, Commission of the European Communities, Brussels.
- Förster, Th. (1946) Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwiss.* 6, 166- 175.
- Förster, Th. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik* 2, 55-75.
- Förster, Th. (1949) Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Z. Naturforsch.* 4a, 321-327.
- Förster, Th. (1960) Zwischenmolekularer Übergang von Elektronenanregungsenergie. *Z. Elektrochem.* 64, 157-165.
- Förster, Th., und König, E. (1957) Absorptionsspektren und Fluoreszenzeigenschaften konzentrierter Lösungen organischer Farbstoffe. *Z. Elektrochem.* 61, 344-348.
- Fortune, D. (1993) Binding and Kinetics - New Dimensions in Optical Biosensor Analysis, *Biosens. Bioelectron.* 8, xxxii-xxxiv.
- Freytag, J. W., Lau, H. P., and Wadsley, J. J. (1984) Affinity-column-mediated immunoenzymometric assay: Influence of affinity-column Ligand and Valency of Antibody-Enzyme Conjugates. *Clin. Chem.* 30/9, 1494-1498.
- Gallop, M. A., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. A., Gordon, E. M. (1994) Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J. Med. Chem.* 37, 1233-1251.
- Gauglitz, G. (1996) Opto-chemical and opto-immuno sensors. *Sensors Update Band 1* (H. Baltes, W. Göpel, J. Hesse, Eds.) pp 1-35, Verlag Chemie, Weinheim.
- Gauglitz, G., Brecht, A., Kraus, G., and Nahm, W. (1993) Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers. *Sens. Actuators B* 11, 21-27.

- Gee, S. J., Hammock, B. D., Van Emon, J. M. (1994) A User's Guide to Environmental Immunochemical Analysis. *EPA/540/R-94/509*.
- Gennis, R. B., and Cantor, C. R. (1972) Use of nonspecific dye labeling for singlet energy-transfer measurements in complex systems. A simple model. *Biochemistry* 11, 2509-2517.
- Gerdes, M., Meusel, M., and Spener, F. (1997) Development of a Displacement Immunoassay by exploiting Cross-Reactivity of a Monoclonal Antibody. *Anal. Biochem.* 252, 198-204.
- Giersch, T. (1993) A new monoclonal antibody for the sensitive detection of atrazine with immunoassay in microtiterplate and dipstick format. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1006-1011.
- Goodrow, M. H., Harrison, R. O., and Hammock, B. D. (1990) Hapten Synthesis, Antibody Development, and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for s-Triazine Herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 38, 990-996.
- Goodrow, M. H., and Hammock, B. D. (1998) Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAS for environmentally deleterious small molecules. *Anal. Chim. Acta* 376, 83-91.
- Gorman, E. G., Arentzen, R., Bedzyk, W., and Cassidy, L. A. (1997) An Overview of Immunoassay Automation. *Principles and Practice of Immunoassay*. (C. P. Price and D. J. Newman, Eds.) pp 301-320, Second Edition, Stockton Press, New York.
- Gosling, J. P. (1990) A Decade of Development in Immunoassay Methodology. *Clin. Chem.* 36, 1408-1427.
- Guyot, C. (1994) Strategies to Minimize the Pollution of Water by Pesticides. *Pesticides in Ground and Surface Water* (H. Börner, Ed.) pp 87-152, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg.
- Härmä, H., Lehtinen, P., Takalo, H., and Lövgren, T. (1999) Immunoassay on a single microparticle: the effect of particle size and number on a miniaturized time-resolved fluorometric assay of free prostate-specific antigen. *Anal. Chim. Acta* 387, 11-19.
- Hamilton, R. G. (1987) Production of Immunoassay Reagents. *Immunoassay: A Practical Guide* (D. W. Chan, Ed.) pp 25-48, Academic Press, Inc., San Diego.

- Harper, M., Lema, F., Boulot, G., and Poljak, R. J. (1987) Antigen specificity and cross-reactivity of monoclonal anti-lysozyme antibodies. *Molec. Immunol.* 24, 97-108.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Chapter 5, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hatrik, S., Tekel, J. (1996) Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. *J. Chromatogr. A* 733, 217-233.
- Hemmilä, I. (1985) Fluoroimmunoassays and immunofluorimetric assays. *Clin. Chem.* 31, 359-370.
- Henderson, K. M., Camberis, M., and Hardie, A. H. (1995) Evaluation of antibody- and antigen-coated enzymeimmunoassays for measuring oestrone-3-glucuronide concentrations in urine. *Clin. Chim. Acta* 243, 191-203.
- Hermanson, G. T. (Ed.) (1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, Inc., San Diego.
- Hock, B. (1997) Antibodies for immunosensors. A review. *Anal. Chim. Acta* 347, 177-186.
- Hock, B. (1995) Immunochemical Assay of Environmental Pollutants Using Pesticides as an Example. *Immunochemical Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water Cycle* (B. Hock, R. Niessner, Eds) pp 3-24, VCH, Heidelberg.
- Hock, B., Dankwardt, A., Kramer, K., Marx, A. (1995) Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis. A review. *Anal. Chim. Acta* 311, 393-405.
- Horwitz, W., Kamps, L. R., and Boyer, K. W. (1980) Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 1344-1353.
- Hourd, P., and Edwards, R. (1989) Measurement of human growth hormone in urine: Development and validation of sensitive and specific assay. *J. Endocrinol.* 121, 167-175.
- Huston, J. G., and Banks, M. (1997) The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 734-740.
- Ishikawa, E. (1987) Development and Clinical Application of Sensitive Enzyme Immunoassay for Macromolecular Antigens-A Review. *Clin. Biochem.* 20, 375-385.

- ISO/CD 15089 (1997) Water Quality: Guideline for Selective Immunoassay for the Determination of Plant Treatment and Pesticide Agents. *ISSO/TC/47/Sc. 2, No. 352*, 13 pp.
- IVA (1997) Jahresbericht 1996/1997. Industrieverband Agrar e. V., Frankfurt/Main.
- Jackson, T. M., and Ekins, R. P. (1986) Theoretical limitations on immunoassay sensitivity. Current practice and potential advantages of fluorescent Eu^{3+} chelates as non-radioisotopic tracers. *J. Immunol. Meth.* 87, 13-20.
- Jönsson, U., and Malmqvist, M. (1992) Real-time biospecific interaction analysis. The integration of surface plasmon resonance detection, general biospecific interface chemistry and microfluidics into one analytical system. *Adv. Biosens.* 2, 291-336.
- Karlsson, R., and Roos, H. (1997) Reaction Kinetics. *Principles and Practice of Immunoassay* (C. P. Price, and D. J. Newman, Eds) pp 101-118, Stockton Press, New York.
- Kautsky, H. (1939) Quenching of luminescence by oxygen. *Trans. Faraday Soc.* 35, 216-219.
- Killard, A. J., Deasy, B., O'Kennedy, R., Smyth, M. R. (1995) Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *Trends Anal. Chem.* 14 (6), 257-265.
- Killesreiter, H. (1979) Energy transfer in competition to charge transfer as a method to determine the rate constant for charge carrier injection in the sandwich system: Cyanine dye monolayer/p-Chloranil crystal. *Z. Naturforsch.* 34 a, 737-747.
- Klotz, A., Brecht, A., Barzen, C., Gauglitz, G., Harris, R. D., Quigley, G. R., Wilkinson, J. S., and Abuknesha, R. A. (1998) Immunofluorescence sensor for water analysis. *Sens. & Act. B* 51, 181-187.
- Kobayashi, Y., Tsubota, N., Miyai, K., and Watanabe, F. (1980) Fluorescence quenching immunoassay of serum cortisol. *Steroids* 36, 177-183.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kolb, J. M., Yamanaka, G., and Manly, S. P. (1996) Use of a Novel Homogeneous Fluorescent Technology in High Throughput Screening. *J. Biomolecular Screening* 1(4), 203-210.
- Korenman, S. G. (1968) Radio-ligand binding assay of specific estrogens using a soluble uterine macromolecule. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 127.

- Koutny, L. B., Schmalzing, D., Taylor, T. A., and Fuchs, M. (1996) Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal. Chem.* 68, 18-22.
- Kricka, L. J. (1998) Miniaturization of analytical systems. *Clin. Chem.* 44 (9), 2008-2014.
- Lakowicz, J. R. (Ed.) (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York.
- Leder, P. (1982) The Genetics of Antibody Diversity. *Scientific American* 246, 72-83.
- Lee, C.-S., Lee, J.-D., Han, C.-H. (1998) New fabrication process of single-crystalline silicon islands using double diffusion: Application to a heating resistor of a thermal inkjet printhead. *Jpn. J. Appl. Phys.* 37 (12B) Pt.1, 7100-7103.
- Lee, L. G., Woo, S. L. Head, D. F., Dubrow, R. S., and Baer, T. M. (1995) Near-IR dyes in three-color volumetric capillary cytometry: cell analysis with 633- and 785-nm laser excitation. *Cytometry* 21, 120-128.
- Lehotay, S. J. (1997) Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *J. Chromatogr. A* 785, 289-312.
- Lemmo, A. V., Fisher, J. T., Geysen, H. M., and Rose, D. J. (1997) Characterization of an inkjet chemical microdispenser for combinatorial library synthesis. *Anal. Chem.* 69, 543-551.
- Li, Q., and Peng, B.-X. (1998) Benzimidazolindocarbocyanines: Aggregation Behaviour, Redox Potential and Photographic Properties. *Dyes and Pigment* 36, 323-337.
- Liburdy, R.P., (1979) Antibody induced fluorescence enhancement of an N-(3-pyrene)-maleimide conjugate of rabbit anti-human immunoglobulin G: quantitation of human IgG. *J. Immunol. Methods* 28, 233-242.
- Lim, C. S., Miller, J. N., and Bridges, J. W. (1980) Energy-transfer immunoassay: a study of the experimental parameters in an assay for human serum albumin. *Anal. Biochem.* 108, 176-184.
- Litborn, E., Stjernström, M., and Roeraade, J. (1998) Nanoliter titration based on piezoelectric drop-on-demand technology and laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* 70, 4847-4852.

- Long, G. L., and Winefordner, J. D. (1983) Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55, 712A-724A.
- Mank, A. J. G., Lingenman, H., and Gooijer, C. (1996) Diode laser-based detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.* 15, 1-11.
- Maskasky, J. E. (1991) Molecular orientation of individual J aggregates on gelatin-grown AgBr tabular microcrystals. *Langmuir* 7, 407-421.
- Mathis, G. (1993) Rare Earth Cryptates and Homogeneous Fluoroimmunoassay with Human Sera. *Clin. Chem.* 39, 1953-1959.
- Matuszczyk, G., Knopp, D., and Nießner, R. (1996) Development of an ELISA for 2,4-D: characterization of two polyclonal antisera. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354, 41-47.
- Matveeva, E. G., Melik-Nubarov, N. S., Miethe, P., and Levashov, A. V. (1996) Antigen-Antibody Interactions in the Reverse Micellar System: Quenching of the Fluorescence of Fluorescein-Labelled Atrazine by Antibodies against Atrazine. *Anal. Biochem.* 234, 13-18.
- Mialocq, J. C., and Doizi, D. (1983) Picosecond study of an electron transfer in the first excited state of DODCI. *Chem. Phys. Lett.* 103, 225-230.
- Mian, I. S., Bradwell, A. R., and Olson, A. J. (1991) Structure, Function and Properties of Antibody Binding Sites. *J. Molec. Biol.* 217, 133-151.
- Michael, K. L., Taylor, L. C., Schultz, S. L., and Walt, D. R. (1998) Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays. *Anal. Chem.* 70, 1242-1248.
- Min, H., Park, J., Yu, J., and Kim, D. (1998) The Spectroscopic Studies on the Aggregation Behaviour of Cyanine Dyes. *Bull. Korean Chem. Soc.* 19, 650-654.
- Mirejovsky, D., and Arnett, E. M. (1983) Heat capacities of solutions for alcohols in polar solvents and the new view of hydrophobic effects. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 1112-1117.
- Möbius, D. (1978) Designed monolayer assemblies. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 82, 848-858.
- Moog, R. S., Kuki, A., and Boxer, S. G. (1984) Excitation transport and trapping in a synthetic chlorophyllide substituted hemoglobin: orientation of the chlorophyll S₁ transition dipole. *Biochemistry* 23, 1-13.

- Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis C. J., and Waggoner, A. S. (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* 4, 105-111.
- Mujumdar, S. R., Mujumdar, R. B., Grant, C. M., and Waggoner, A. S. (1996) Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* 7 (3), 356-362.
- Murphy, B. E. P., Engelberg, W., and Pattee, C. J. (1963) A simple method for the determination of plasma corticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 23, 293.
- Narayanan, N., Streckowski, L., Lipowska, M., and Patonay, G. (1995) A New Method for the Synthesis of Heptamethine Cyanine Dyes: Synthesis of New Near-Infrared Fluorescent Labels. *J. Org. Chem.* 60, 2391-2395.
- Netzel, T. L., Nafisi, K., and Zhao, M. (1995) Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromophoric DNA Stains. *J. Phys. Chem.* 99, 17936-17947.
- Nilsson, J., Szecsi, P., and Schafer-Nielsen, C. (1993) A flow-through microsampling device applied to an ion-exchange chromatography system. *J. Biochem. Biophys. Methods* 27, 181-190.
- Nunes, G. S., Toscano, I. A., Barceló, D. (1997) Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *Trends Anal. Chem.* 17 (2), 79- 87.
- Önnerford, P., Eremin, S. A., Emneus, J., and Marko-Varga, G. (1998) Fluorescence polarisation for immunoreagent characterisation. *J. Immunol. Meth.* 213, 31-39.
- Oncley, J. L., Scatchard, G., and Brown, A. (1947) Physical-chemical characteristics of certain of the proteins of normal human plasma. *J. Phys. Colloid Chem.* 51, 184-198.
- Otto, M. (Hrsg.) (1997) *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Padlan, E. A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology* 31, 169-217.
- Pantano, P., Walt, D. R. (1996) Ordered nanowell arrays. *Chem. Mater.* 8, 2832-2835.

- Papanastasiou-Diamandi, A., Conway, K., Diamandis, E. P. (1989) Digoxin Immunoassay with Monoclonal and Polyclonal Antibodies Using Time-Resolved Fluorometry. *J. Pharm. Sci.* 78, 617-621.
- Parker, G. A. (1991) Validation of methods used in the florida department of agriculture and consumer services' chemical residue laboratory. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (5), 868-871.
- Piebler, J. (1997) Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern. *Dissertation Universität Tübingen.*
- Piebler, J., Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., Gauglitz, G. (1997a) Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Methods* 201, 189-206.
- Piebler, J., Brecht, A., Giersch, T., Kramer, K., Hock, B., Gauglitz, G. (1997b) Affinity characterization of monoclonal and recombinant antibodies for multianalyte detection with an optical transducer. *Sens. Actuators B* 38-39, 432-437.
- Pihlström, T., Hellström, A., Axelsson, V. (1997) Gas chromatographic analysis of pesticides in water with off-line solid phase extraction. *Anal. Chim. Acta* 356, 155-163.
- Pimentel, D., and Levitan, L. (1986) Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests. *BioScience* 36 (2), 86-91.
- Plückthun, A. (1990) Antibodies from Escherichia coli. *Nature* 347, 497-498.
- Pope, M., and Swenberg, C. E. (Eds.) (1982) *Electronic processes in organic solvents*. Oxford University Press, New York.
- Price, C. P. (1998) Progress in Immunoassay Technology. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36 (6), 341-347.
- Price, C. P., Newman, D. J. (Eds.) (1997) *Principles and Practice of Immunoassay*. Second Edition, Stockton Press, New York.
- Rast, J. (1983) *Netz - Formeln der Mathematik* (H. Netz, Hrsg.) pp 501-502, Carl Hanser Verlag, München.

- Reichstein, E., Shami, Y., Ramjeesingh, M., and Diamandis, E. P. (1988) Laser-Excited Time-Resolved Solid-Phase Fluoroimmunoassays with the New Europium Chelate 4,7-Bis(chlorosulphophenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic Acid as Label. *Anal. Chem.* 60, 1069-1074.
- Reimer, G. J., Shirley, J. G., and Hammock, B. D. (1998) Comparison of a Time-Resolved Fluorescence Immunoassay and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Analysis of Atrazine in Water. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3353-3358.
- Richards, F. F., Konigsberg, W. H., Rosenstein, R. W., Varga, J. M. (1975) On the specificity of Antibodies: Biochemical and biophysical evidence indicates the existence of polyfunctional antibody combining regions. *Science* 187, 130-137.
- Riedel-de Haën, Laborchemikalien GmbH & Co. KG (1999) ELISA-Systeme für die Nahrungs-, Futtermittel- und Wasseranalytik: Mikrotiterplatten-Test zum Nachweis von Triazinen. Art.-Nr. 45150.
- Rigler, R. (1997) Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening: Application in biotechnology. *J. Biotechnol.* 41, 177-186.
- Rivera, J., Ventura, F., Caixach, J., de Torres, M., Figueras, A., and Guardiola, J. (1987) GC/MS, HPLC and FAB mass spectrometric analysis of organic micropollutants in Barcelona's water supply. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 29, 15-35.
- Ro, K. S., and Chung, K. H. (1994) Pesticides and herbicides. *Water Environ. Res.* 66 (4), 432-433.
- Roberts, V. A., Getzoff, E. D., and Tainer, J. A. (1993) Structural basis of antigenic cross-reactivity. *Structure of Antigens* Vol. 2 (M. H. V., Van Regenmortel, Ed.) pp 31-53, CRC Press, Boca Raton.
- Rubenstein, K. E., Schneider, R. S., and Ullman, E. F. (1972) „Homogeneous“ enzyme immunoassay: a new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 846-851.
- Schober, A., Günther, R., Schwienhorst, A., Döring, M., and Lindemann, B. F. (1993) Accurate high-speed liquid handling of very small biological samples. *BioTechniques* 15 (2), 324-329.

- Schober, A., Schlingloff, G., Thamm, A., Kiel, H. J., Tomandl, D., Gebinoga, M., Döring, M., Köhler, J. M., and Mayer, G. (1997) Systemintegration of microsystems/chip elements in miniaturized automata for high-throughput synthesis and screening in biology, biochemistry and chemistry. *Microsystem Technologies* 4, 35-39.
- Schröder, H. Fr. (1989) Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie - Eine schnelle und zukunftsweisende Analysenmethode in der Wasser- und Abwasseranalytik. *Vom Wasser* 73, 111-136.
- Schröder, H. Fr. (1993) Pollutants in drinking water and waste water. *J. Chromatogr.* 643, 145-161.
- Schullek, J. R., Butler, J. H., Ni, Z.-J., Chen, D., Yuan, Z. (1997) A high-density screening format for encoded combinatorial libraries: assay miniaturization and its application to enzymatic reactions. *Anal. Biochem.* 246, 20-29.
- Serpone, N., and Sahyun, M. R. V. (1994) Photophysics of Dithiacarbocyanine Dyes: Subnanosecond Relaxation Dynamics of a Dithia-2,2'-carbocyanine Dye and Its 9-Methyl-Substituted Meso Analog. *J. Phys. Chem.* 98, 734-737.
- Sherma, J. (1995) Pestizides. *Anal. Chem.* 67, 1R-20R.
- Sidorowicz, A., Pola, A., and Dobryszycski, P. (1997) Spectral properties of 3,3'-diethyloxadicarbocyanine included in phospholipid liposomes. *J. Photochem. Photobiol. B* 38, 94-97.
- Siitari, H., Hemmilä, I., Soini, E., and Lövgren, T. (1983) Detection of hepatitis B surface antigen using time-resolved fluoroimmunoassay. *Nature* 301, 258-260.
- Silzel, J. W., Cercek, B., Dodson, C., Tsay, T., and Obremski, R. J. (1998) Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection. *Clin. Chem.* 44, 2036-2043.
- Smith, D. S. (1977) Enhancement fluoroimmunoassay of thyroxine. *FEBS Lett.* 77, 25-27.
- Soini, E., and Hemmilä, I. (1979) Fluoroimmunoassay: Present status and key problems. *Clin. Chem.* 25, 353-361.
- Soini, E., and Kojola, H. (1983) Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates - a new generation of non-isotopic immunoassays. *Clin. Chem.* 29, 65-68.

- Southwick, P. L., Ernst, L. A., Tauriello, E. W., Parker, S. R., Mujumdar, R. B., Mujumdar, S. R., Clever H. A., and Waggoner, A. S. (1990) Cyanine dye labeling reagents - carboxymethyl-indocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* 11, 418-430.
- Stenroos, K., Hurskainen, P., Eriksson, S., Hemmilä, I., Blomberg, K. and Lindquist, C. (1998) Homogeneous time-resolved IL-2-IL-2R alpha assay using fluorescence resonance energy transfer. *Cytokine* 10(7), 495-499.
- Stevens, F. J. (1987) Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody. *Mol. Immunol.* 24, 1055-1060.
- Steward, M. W., Steensgaard, J. (1983) *Antibody Affinity: Thermodynamic Aspects and Biological Significance*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Strickler, S. J., and Berg, R. A. (1962) Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.* 37, 814-822.
- Striebel, Ch., Brecht, A., Gauglitz, G. (1994) Charakterization of biomembranes by spectral ellipsometry, surface plasmon resonance and interferometry with regard to biosensor application. *Biosens. Bioelectron.* 9, 139-146.
- Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 819-846.
- Sundström, V., and Gillbro, T. (1985) Excited state dynamics and photophysics of aggregated dye chromophores in solution. *J. Chem. Phys.* 83, 2733-2743.
- Sviridov, D. V., Shapiro, B. I., and Kulak, A. I. (1992) Spectral sensitization of a semiconductor by mixtures of aggregated cyanine dyes: photoelectrochemical study. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 67, 377-383.
- Taylor, J. K. (1983) Validation of analytical methods. *Anal. Chem.* 55, 600A-608A.
- Terpetschnig, E., Szmackinski, H., Ozinskas A., and Lakowicz, J. R. (1994) Synthesis of squaraine-N-Hydroxysuccinimide esters and their biological application as long-wavelength fluorescent labels. *Anal. Biochem.* 217, 197-204.
- Tiefenthaler, K. (1993) Grating couplers as label-free biochemical waveguide sensors. *Biosens. Bioelectron.* 8, xxxv-xxxvii.

- Tijssen, P. (1985) *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- TrinkwV, (5 Dezember 1990) *Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe* (Trinkwasserverordnung - TrinkwV).
- Udenfriend, S., Gerber, L., and Nelson, N. (1987) Scintillation proximity assay: a sensitive and continuous method for monitoring ligand/receptor and antigen/antibody interactions. *Anal. Biochem.* 161, 494-500.
- Ullman, E. F., and Khana, P. L. (1981) Fluorescence excitation transfer immunoassay. *Meth. Enzymol.* 74, 28-60.
- Ullman, E. F., Schwarzberg, M., and Rubenstein, K. E. (1976) Fluorescent Excitation Transfer Immunoassay - A general method for determination of Antigens. *J. Biol. Chem.* 251, 4172-4178.
- Van Der Meer, B. W., Coker III, G., and Chen, S.-Y. S. (Eds.) (1994) *Resonance energy transfer - theory and data*. VCH Publishers, Inc., New York.
- Van Emon, J. M., Lopez-Avila, V., (1992) Immunochemical Methods for Environmental Analysis. *Anal. Chem.* 64, 79A-88A.
- Van Oss, C. J. (1995) Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. *Molec. Immunol.* 32, 199-211.
- Van Weemen, B. K., and Schuurs, A. H. W. M. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 15, 232-236.
- Von Büнау, G., und Wolff, T. (1987) *Photochemie - Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Wadkins, R. M., Golden, J. P., Pritsiolas, L. M., and Ligler, F. S. (1998) Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 13 (3-4), 407-415.
- Wells, A. F., Miller, C. E., and Nadel, M. K. (1966) Rapid Fluorescein and Assays Method for Fluorescent-Antibody Conjugates. *Appl. Microbiol.* 14, 271-275.
- West, W., and Pearce, S. (1965) The Dimeric State of Cyanine Dyes. *J. Phys. Chem.* 69, 1894-1903.

- Wikel, J. H., and Higgs, R. E. (1997) Applications of Molecular Diversity Analysis in High Throughput Screening. *J. Biomolecular Screening* 2(2), 65-67.
- Williams, R. J., Peralta, J. M., Tsang, V. C. W., Narayanan, N., Casay, G. A., Lipowska, M., Streckowski, L., and Patonay, G. (1997) Near-infrared heptamethine cyanine dyes: A new tracer for solid-phase immunoassays. *Appl. Spectrosc.* 51 (6), 836-843.
- Wilson, I. A., and Stanfield, R. L. (1994) Antigen-antibody interactions: new structures and new conformational changes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 857-867.
- Winklmaier, M., Weller, M. G., Mangler, J., Schlosshauer, B., Niessner, R. (1997) Development of a high sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 358, 614-622.
- Wittmann, C., Hock, B. (1989) Improved Enzyme Immunoassay for the Analysis of s-Triazines in Water Samples. *Food Agric. Immunol.* 1, 211-224.
- Wortberg, M., and Cammann, K. (1993) Determination of triazine herbicides with time-resolved fluoro-immunoassay using europium(III)-chelates. *Fresenius J. Anal. Chem.* 346, 757-760.
- Wu, P., and Brand, L. (1994) Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* 108, 176-184.
- Yalow, R. S., and Berson, S. A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39, 1157-1175.
- Zhao, C. Q., Anis, N. A., Rogers, K. R., Kline, R. H., Wright, J., Eldefrawi, A. T., and Eldefrawi, M. E. (1995) Fiber optic immunosensor for polychlorinated biphenyls. *J. Agric. Food Chem* 43, 2308-2315.
- Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B., and Trubaceva, J. N. (1997) Homogeneous enzyme immunoassay for pyrethroid pesticides and their derivatives using bacillary alpha-amylase as label. *Anal. Chim. Acta* 347, 131-138.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer
ACA	Atrazincapronsäure
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry
AtraIgG	Polyklonaler anti-Atrazin-Antikörper
BG	Bestimmungsgrenze
BSA	Rinderserum Albumin
CDR	Complementary-determining regions
CV	Variationskoeffizienten
DesACA	Desisopropylatrazin-capronsäure
DMF	Dimethylformamid
DN-1	2,4-Dichloroanilin-glutarsäure
E2G2	Monoklonaler anti-2,4-D-Antikörper
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ET	Elektronen-Transfer
Fab	Antikörper-Fragment
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
IA	Immunoassay
IgG	Immunglobulin G
IP30	3-(4-Isopropylphenyl)-1-methyl-1-carboxy-propylharnstoff
IP5	4-Isopropylphenoxy-essigsäure

IPA	4-Isopropylanilin-carboxyphthalat
IPIgG	Polyklonaler anti-Isoproturon-Antikörper
IVA	Industrieverband Agrar e.V.
K	Affinitätskonstante, Bindungskonstante
K ₁	Affinitätskonstante der Antigen-Antikörper-Bindung
K ₂	Affinitätskonstante der Antigenderivat-Antikörper-Bindung
K4E7	Monoklonaler anti-Atrazin-Antikörper
KR	Kreuzreaktivität
MCPA	2-Methyl-4-chlor-phenoxyessigsäure
MG	Markierungsgrade
MTP	Standardmikrotiterplatte
NTP	Nanotiterplatte
NWG	Nachweisgrenze
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSM	Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel
RET	Resonanter-Energie-Transfer
RfS	Reflektometrische-Interferenz-Spektroskopie
SimIgG	Polyklonaler anti-Simazin-Antikörper
SPE	Festphasen Extraktion
THIO	Desethylatrazinmercaptopropionsäure
TMP	Testmittelpunkt
US EPA	US Environmental Protection Agency
WFR	Wiederfindungsrate
ZABA	Atrazin-4-amino-benzoesäure

7.2 Publikationen

- Brecht, A., Rothmund, M., Schütz, A., Schobel, U., Gauglitz, G. (1998) Optische Methoden im High-Throughput-Screening zur Wirkstoffsuche. *BioTec* 3, 26-28.
- Brecht, A., Schobel, U. and Gauglitz, G. (1998) Resonant Energy Transfer Detection for Low Volume Immunoassay in Environmental Applications. *Biosensors for Environmental Diagnostics* (Hock, Barceló, Cammann, Hansen, and Turner, Eds.) pp 11-27, B.G. Teubner, Stuttgart.
- Schobel, U., Egelhaaf, H.-J., Brecht, A., Oelkrug, D., Gauglitz, G. (1999) A New Donor-Acceptor Pair for Fluorescent Immunoassays by Energy Transfer. *Bioconjugate Chem.*, im Druck.
- Schobel, U., Egelhaaf, H.-J., Fröhlich D., Brecht, A., Oelkrug, D., Gauglitz, G. (1999) Mechanisms of Fluorescence Quenching in Donor-Acceptor Labelled Antibody-Antigen Conjugates. *J. Fluorescence*, zur Publikation angenommen.
- Schobel, U., Barzen, C., Gauglitz, G. (1999) Immunoanalytical techniques for pesticide monitoring based on fluorescence detection. *Fresenius J. Anal. Chem.*, zur Publikation angenommen.
- Schobel, U., Brecht, A., Steinwand, M., Gauglitz, G. (1999) Miniaturization of a homogeneous fluorescence immunoassay based on energy-transfer. in Vorbereitung.

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, J. Gelinek[†], W. Göpel[†], G. Häfelinger, H. P. Hagenmaier, M. Hanak, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack[†], B. Koppenhöfer, A. Kovar, D. Krug, E. Lindner, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, A. Rieker, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter

7.4 Lebenslauf

Name: Uwe Schobel

Geburtsdatum: 10. Juli 1969

Geburtort: Mediasch / Rumänien

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1975 - 79 Grundschule Kronstadt
1979 - 83 Honterus-Gymnasium, Kronstadt
1983 - 88 Mörike-Gymnasium, Göppingen
1988 Abitur

Wehrdienst: 10/1988 - 12/1989 beim 2. Panzerartilleriebataillon 565, München

Studium: SS 1990 - September 1996 Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Diplomprüfung: Januar 1996

Diplomarbeit: März 1996 - September 1996 bei Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen.
Titel: „Untersuchung eines langwellig anregbaren Förster Donor-Akzeptor-Paares für Immunoaffinitätsmessungen“

Promotion: September 1996 - Dezember 1999 unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen.
Titel: „Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines homogenen Fluoroimmunoassays für die Affinitätsanalytik in Nanoliter-volumina“.