

Entwicklung und Miniaturisierung heterogener Fluoreszenz-Bioassays basierend auf FRET in Nanoliterkavitäten aus Kunststoff

Dissertation

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Michael Seidel

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Februar 2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz für die interessante Themenstellung, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, für den Freiraum im Umfeld meiner Arbeit und für das große Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat.

Herrn Prof Dr. Heinz Oberhammer danke ich für die Überahme des Koreferats und seinem Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hans-Joachim Egelhaaf danke ich für die Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven des Dy630-Farbstoffs und seiner Hilfsbereitschaft, mir einen detaillierten Einblick in die photophysikalischen Eigenschaften ermöglicht hat.

Danken möchte ich dem gesamten Arbeitskreis Gauglitz, der immer hilfsbereit und offen mein Wirken unterstützte. Namentlich sollen hier Frau Dipl. Biotechn. Kerstin Kröger, mit der ich den Nuklease-Assay aufbaute, Herr Dipl. Math. Michael Kumpf, für die mathematischen Simulationen, Frau Dipl. Chem. Daniela Dankbar für die Mitarbeit im Projekt nanoMAP, Frau Dipl. Chem. Tina Mutschler für die Oberflächencharakterisierung der Goldschichten, Herr Dipl. Phys. Rüdiger Frank für die Goldbedampfung und Herr Dr. Oliver Birkert für die Zusammenarbeit bei den RfS-Experimenten mit den Polystyrolschichten erwähnt werden. Allen anderen Danke ich für das außerordentlich gute Arbeitsklima, die rege Diskussionsbereitschaft und Wissensvermittlung im Dunstkreis der Physikalischen Chemie.

Den nanoMAP-Projektpartnern danke ich für die konstruktive und persönliche Zusammenarbeit. Besonders danken möchte ich Frau Dr. Simone Günther und Herrn Dr. Steinwand von der Fa. Applera Deutschland GmbH und Herrn Prof. Dr. R. Zengerle für die enge Zusammenarbeit schon im Vorfeld des Projektes. Bei der Fa. Dyomics GmbH möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit und die Bereitstellung ihrer Dy-Farbstoffe bedanken.

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

All denen, die mir privat zur Seite standen und auf die ich mich immer verlassen konnte, kann ich gar nicht genug danken.

Für Miri

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Motivation der Arbeit..... | 1 |
| 1.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit..... | 3 |
| 2 Theoretischer Teil | 5 |
| 2.1 Bioanalytische Testverfahren | 5 |
| 2.1.1 Biologischer Hintergrund | 5 |
| 2.1.2 Biomolekulare Wechselwirkungen..... | 9 |
| 2.1.3 Enzymkinetik..... | 14 |
| 2.1.4 Immunanalytische Testverfahren | 16 |
| 2.1.5 DNA-Analytik..... | 21 |
| 2.1.6 Microarrays | 27 |
| 2.2 Kopplungschemie mit Biomolekülen | 28 |
| 2.2.1 Kopplung von Farbstoffen an Biomoleküle | 28 |
| 2.2.2 Oberflächenchemie an Goldoberflächen | 29 |
| 2.2.3 Oberflächenchemie an Kunststoffen | 30 |
| 2.2.4 Oberflächencharakterisierung | 33 |
| 2.3 Mikrodosierung | 34 |
| 2.3.1 Dosierung einzelner Tropfen | 34 |
| 2.3.2 Ink-Jet-Verfahren | 36 |
| 2.3.3 Top-Spot-Verfahren | 37 |
| 2.3.4 Microspotting..... | 38 |
| 2.4 Optische Spektroskopie..... | 38 |
| 2.4.1 Elektronenspektroskopie | 38 |
| 2.4.2 Fluoreszenzspektroskopie..... | 40 |
| 2.4.3 Resonanter Energietransfer | 44 |
| 2.4.4 Energietransfer an metallischen Oberflächen..... | 47 |
| 3 Material und Methoden | 48 |
| 3.1 Materialien..... | 48 |
| 3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien..... | 48 |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterial | 52 |
| 3.1.3 Puffer-Lösungen | 53 |
| 3.1.4 Geräte..... | 54 |
| 3.2 Methoden der optischen Spektroskopie..... | 56 |
| 3.2.1 Absorptionsspektren | 56 |
| 3.2.2 Fluoreszenzspektren..... | 56 |
| 3.2.3 Fluoreszenzquantenausbeuten | 57 |
| 3.2.4 Fluoreszenzabklingkurven..... | 57 |
| 3.2.5 Fluoreszenzmessung in der Mikrotiterplatte | 58 |
| 3.2.6 Fluoreszenzmessung in der Nanotiterplatte | 58 |
| 3.3 Synthesemethoden..... | 59 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.3.1 | Farbstoff-Markierung von Proteinen | 59 |
| 3.3.2 | Aktivierung von Atrazincapronsäure | 60 |
| 3.3.3 | Aktivierung von E ₁ 3CME in Methanol | 60 |
| 3.3.4 | Aktivierung von Histamin | 60 |
| 3.3.5 | Kopplung von Analytderivaten an farbstoffmarkiertes BSA | 61 |
| 3.3.6 | Charakterisierung der hergestellten Konjugate | 61 |
| 3.3.7 | Derivatisierung von Aminodextran in Lösung | 63 |
| 3.4 | Oberflächenmodifikation | 63 |
| 3.4.1 | Adsorptive Immobilisierung von BSA-Derivaten auf ABS-NTP | 63 |
| 3.4.2 | Goldoberfläche auf Nanotiterplatte | 63 |
| 3.4.3 | Siliziumdioxidoberfläche auf RfS-Transducern | 64 |
| 3.4.4 | Photochemische Immobilisierung auf Kunststoffoberflächen | 64 |
| 3.5 | Oberflächencharakterisierung | 65 |
| 3.5.1 | Kontaktwinkel | 65 |
| 3.5.2 | Interferenzreflexionsspektren | 65 |
| 3.5.3 | Atomic Force Microscopy (AFM) | 67 |
| 3.5.4 | Fluoreszenzbild | 67 |
| 3.5.5 | Spektrale Ellipsometrie | 68 |
| 3.6 | Automatisierte Probenhandhabung mit Nanolitervolumina | 68 |
| 3.7 | Durchführung des 3'-Exonuklease-Assays | 73 |
| 3.8 | Datenauswertung | 74 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 76 |
| 4.1 | Immobilisierungsstrategien auf Kunststoffoberflächen | 76 |
| 4.1.1 | Adsorptive Oberflächenbelegung von BSA-Derivaten auf ABS-NTP | 76 |
| 4.1.2 | Photochemische Immobilisierung | 77 |
| 4.1.3 | Schichtaufbau über SAM bei Gold-NTP | 84 |
| 4.1.4 | Zusammenfassende Diskussion | 86 |
| 4.2 | Etablierung des PSFIA in ABS-Nanoliterkavitäten | 87 |
| 4.2.1 | Prinzip des PSFIA | 87 |
| 4.2.2 | Simulation der Miniaturisierung eines heterogenen kompetitiven Testformats | 88 |
| 4.2.3 | Computergesteuerte Mikrodosierung | 93 |
| 4.2.4 | Kalibrierung von Atrazin | 94 |
| 4.2.5 | Untersuchung der Inkubationszeit | 96 |
| 4.2.6 | Zusammenfassende Diskussion | 98 |
| 4.3 | Der PSFIA auf goldbeschichteter NTP | 99 |
| 4.3.1 | Einfluss der Goldschichtdicke auf das Fluoreszenzsignal | 99 |
| 4.3.2 | Abhängigkeit der Analytderivatkonzentration | 103 |
| 4.3.3 | Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration | 106 |
| 4.3.4 | Nachweis von Estradiol in einer Gold-NTP | 108 |
| 4.3.5 | Nachweis von Histamin | 109 |
| 4.3.6 | Zusammenfassende Diskussion | 114 |
| 4.4 | Untersuchung neuer Farbstoffe für die Detektion von FRET-Ereignissen | 115 |
| 4.4.1 | Charakterisierung der Donor- und Akzeptorfarbstoffe Dy630 und DyQ660 | 116 |
| 4.4.2 | Untersuchung verschiedener FRET-Paarungen | 121 |
| 4.4.3 | Zusammenfassende Diskussion | 125 |
| 4.5 | Der 3'-Exonuklease-Assay | 126 |
| 4.5.1 | Untersuchung des Exonuklease-Assays in MTP-Format | 127 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.5.2 | Untersuchung der enzymatischen Reaktion im CGE-Experiment..... | 128 |
| 4.5.3 | Untersuchung der Exonuklease III auf einem Biosensor | 130 |
| 4.5.4 | 3'-Exonuklease-Assay auf Gold-NTPs | 132 |
| 4.5.5 | Zusammenfassende Diskussion..... | 133 |
| 5 | Zusammenfassung und Ausblick | 135 |
| 6 | Literatur | 140 |
| 7 | Anhang..... | 149 |
| 7.1 | Abkürzungen | 149 |
| 7.2 | Publikationen..... | 151 |
| 7.3 | Akademische Lehrer..... | 152 |
| 7.4 | Lebenslauf..... | 153 |

1 Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

Besonders in den bioanalytischen Feldern, wie zum Beispiel das pharmazeutische Screening, die klinische Diagnostik, Genomics und Proteomics ist der Druck groß, viele Substanzen in kürzester Zeit und kostengünstig zu analysieren (Hertzberg et al., 2000; Roses, 2000). Dieser Forderung soll die Hochdurchsatz-Analytik bzw. das Hochdurchsatz-Screening (HTS), wenn nur eine qualitative Aussage getroffen werden soll, gerecht werden. Ziel ist es heute im HTS bis zu 100.000 Substanzen pro Tag zu testen, was als ultraHTS bezeichnet wird (Fox et al., 1999). Deswegen müssen immer schnellere und effektivere Nachweismethoden entwickelt werden, welche die Kosten für die Entdeckung der aktiven Substanzen aus einer Fülle an möglichen Kandidaten senken sollen. Dies gelingt, indem man durch Parallelisierung und Miniaturisierung die Informationsdichte innerhalb eines Assays stark erhöht (Burbaum, 1998).

Die Zahl der potentiellen Wirkstoffe ist durch die kombinatorische Chemie drastisch angestiegen. Sie werden in Substanzbibliotheken gelagert, welche 10.000 bis 300.000 Komponenten mit einer großen strukturellen Diversität enthalten (Parks et al., 1998). Ihre Bioaktivität wird untersucht, indem eine biochemische Reaktion mit einem Zielmolekül, auch Target genannt, nachgewiesen wird. Diese therapeutischen Zielmoleküle sind Enzyme, Zellmembranrezeptoren, Zellkernrezeptoren, Ionenkanäle und Proteine der Signaltransduktion (Miraglia et al., 1999). 1995 hatte GlaxoWellcome angenommen, dass im HTS 45 % Targets verwendet werden, deren Funktionalität über biomolekulare Bindungsreaktionen getestet werden können und der Rest über enzymatische Reaktionen (GlaxoWellcome, 1996). Nach neuesten Erkenntnissen werden jedoch nur 28% der bekannten Targets als Enzyme eingesetzt (Müllner 2002). Nachweissysteme über biochemische Affinitätsreaktionen werden somit immer mehr zunehmen. Viele der neuen Targets werden durch moderne Techniken der Molekularbiologie, wie die automatisierte Hochdurchsatzsequenzierung oder Hybridisierungstechniken, entdeckt, so dass die Erkenntnisse des Humanen Genomprojekts Früchte tragen können (Houston et al., 1997). Zudem nimmt das Verständnis von biochemischen Reaktionen über die funktionelle Genom- und Proteomanalyse zu. Die Substanzbibliotheken können somit mit einer Vielzahl neuer molekularer Targets im HTS auf potentielle therapeutische Wirksamkeit untersucht werden (Fernandes et al., 1998).

Darüber hinaus finden die HTS-Techniken auch in anderen Bereichen Anwendung (Heybrock et al., 2000). So zum Beispiel in der Lebensmittelchemie, kosmetischen Industrie, der Agrochemie, wobei Substanzen auf spezifische chemische, biologische oder physikalische Eigenschaften untersucht werden. In allen Bereichen ist die Forderung die gleiche: Steigerung der Produktivität und Reduktion der Kosten und der Zeit für einen Testdurchlauf. Aus diesem Grund werden die Labore mit vollautomatisierten Screeningplattformen mit modernster Robotertechnologie ausgerüstet, die 24 Stunden am Tag arbeiten können (Broach et al., 1996).

Vielen bioanalytischen Nachweisverfahren dient ein spezifisches Bindungsereignis (Affinitätsbindung) zwischen Rezeptor-Ligand, Antikörper-Antigen, DNA-DNA und anderer Biomoleküle als Erkennungsereignis. Für die hochparallele Bioanalytik sind vor allem zwei Testverfahren von Bedeutung: homogene und heterogene Nachweisverfahren. Homogene

Testverfahren sind Einschrittverfahren, bei welchen die Probenaufbereitung sowie die Analyse in Lösung stattfinden. Heterogene Nachweisverfahren sind mindestens Zweischritt-Testverfahren, in denen die Probenaufbereitung, wie z.B. die Signalamplifikation in Lösung, und die Analyse (Decodierung) an der Oberfläche erfolgen. Bis heute konnten hauptsächlich homogene Testsysteme miniaturisiert werden (Sundberg, 2000). Beispiele für diese sind *Scintillation Proximity-Assays* (SPA) (Sittampalam et al., 1997), *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)-Assays (Glazer et al., 1997; Mere et al., 1999), *Fluorescence Polarisation* (FP)-Assays (Li et al., 2000), *Homogeneous Time Resolved Resonance Assays* (HTRF) (Pope et al., 1999) oder *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS)-Assays (Winkler et al., 1999; Auer et al., 1998). Der dynamische Bereich und das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis sind in diesen miniaturisierten, homogenen Testverfahren für quantitative Aussagen jedoch meist ungenügend (Hemmila, 1999).

Im HTS werden oftmals homogene Assays in Mikrotiterplatten (MTP) eingesetzt. Die traditionelle 96er-MTP wird inzwischen durch 384- bzw. 1536-well Platten ersetzt (Divers, 1999). Hierbei wird die Kavitätendichte auf der gleichen Grundfläche erhöht, indem das Kavitätenvolumen und die Rasterabstände zwischen ihnen verringert werden. Mittlerweile werden Assays schon in höheren Kavitätendichten erforscht. Die Vorteile der Verdichtung liegen auf der Hand. Die Kosten pro Nachweis können drastisch gesenkt werden, indem Assays in Probenvolumina $<1 \mu\text{l}$ ablaufen können (Schullek et al., 1997). Arbeitet man mit Kavitätenvolumina im Nanoliterbereich, so werden die Probenträger als Nanotiterplatten bezeichnet. Die Parallelisierung hat zur Folge, dass die Geräte, welche zu einem Assay gehören, angepasst werden müssen.

Für die Dosierung von Nanolitervolumina reichen die üblichen Dosierroboter nicht mehr aus. Diverse Mikrodosiersysteme werden für bioanalytische Zwecke eingesetzt, dessen Techniken von den Tintenstrahldruckern (Bubble-Jet (Okamoto et al., 2000) und Ink-Jet (Schober et al., 1993)) oder von der Kolbenpumpentechnik (Rose, 1999) abgeleitet wurden. Auch die Detektionsgeräte müssen angepasst werden (Ramm, 1999). Mit einem sequentiell arbeitenden Fluoreszenzreader benötigt man für die Auslesedichte (>1536 Kavitäten pro Probenträger) die sechszehnfache Zeit gegenüber einer konventionellen 96er-MTP, weil sich die Auslesezeit mit dem Verdichtungsgrad im Quadrat multipliziert (Burbaum et al., 1997). Deswegen werden zum Beispiel für die Nanotiterplatten scannende Verfahren eingesetzt, welche ein Fluoreszenzbild aufnehmen können. Hier ist man meistens in der Fläche begrenzt, weswegen die Probenträger insgesamt kleiner werden müssen. Die Nanotiterplatte, welche in dieser Arbeit verwendet wird, besteht z.B. aus einer Fläche von $2 \times 2 \text{ cm}^2$, innerhalb der 623 Kavitäten enthalten sind (Schobel et al., 2001). Einen limitierenden Faktor der Miniaturisierung stellt die Verdunstung in offenen Systemen dar (Burbaum et al., 1997). Die zweite Einschränkung besteht in der Erhöhung des Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses, weil dadurch die unspezifische Adsorption an den Kavitätенwänden forciert wird.

Wenn es um quantitative Aussagen geht, werden meist heterogene Verfahren statt homogene eingesetzt. Heterogene Nachweisverfahren im Mikrotiterplattenformat haben sich in der Routinediagnostik und -analytik seit langem etabliert und werden für automatisierte Testabläufe eingesetzt (Sarubbi et al., 1996). Häufig kommt hierbei der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zum Einsatz (Tijssen, 1992). Erste Ansätze in der Miniaturisierung erfolgten durch die Aufbringung von Microarrays auf den Kavitätenboden einer Mikrotiterplatte (Mendoza et al., 1999). Die Miniaturisierung eines heterogenen Nachweissystems mit einem hohen Grad der Parallelisierung ist aber bislang auf

zweidimensionalen Oberflächen, den so genannten Biochips möglich gewesen (Marshall et al., 1998; Vo-Dinh, 1998). Heterogene Assays wurden seither noch nicht in Nanoliterkavitäten erforscht.

1.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der Hochdurchsatzanalytik auf miniaturisierten Probenträgern und dem Potential heterogener Nachweissysteme bestand das Ziel dieser Arbeit darin, heterogene Fluoreszenz-Bioassays in Nanoliterkavitäten zu entwickeln und zu miniaturisieren.

Es sollte gezeigt werden, dass der Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay (PSFIA) als sensitives Nachweissystem für Analyte im Umwelt- und Diagnostikbereich eingesetzt werden kann. Der 3'-Exonuklease-Assay soll für die DNA-Analytik in Nanoliterkavitäten etabliert werden. Beide Assay-Formate sollten Erkenntnisse für die miniaturisierten heterogenen Assays in der Hochdurchsatzanalytik liefern. Die Assays sollten an folgenden Kriterien gemessen werden: An quantitativen Analyseergebnissen im subnanomolaren Bereich bei gleichzeitiger Reduktion der Reagenzien und an der Durchlaufzeit der Assays.

Als Modellanalyte für den Immunoassay sollte Atrazin, Histamin und Estradiol verwendet werden. Atrazin, das ein Pestizid war, sollte als ein Beispiel für umweltanalytische Anwendungen dienen. Histamin und Estradiol waren Vertreter von Effektoren des Menschen, die nach einer biochemischen Reaktion im Körper gebildet werden. Mit einem parallelisierten Nachweisverfahren für z.B. Histamin, das ein Mediator für allergische Reaktionen war, könnte man somit eine Vielzahl von Substanzen auf ihre allergische Wirksamkeit hin untersuchen. Estradiol war ein weibliches Sexualhormon. Der Nachweis von Estradiol war für die medizinische Diagnostik wichtig, da es ein Indikator für verschiedene Krankheiten wie Osteoporose, Brustkrebs darstellte.

Die Miniaturisierung von Nachweisverfahren in Nanoliterkavitäten, sollen die Kosten der Reagenzien senken und die Assayzeiten verkürzen. Deswegen wurde innerhalb des Projektes „Lindau“ Kunststoff-Nanotiterplatten abgeformt, welche 623 Nanoliterkavitäten mit einem Fassungsvermögen von je 75 nL enthielten. In diesen Kavitäten waren Waschschriffe, wie sie in 96-er MTPs üblich sind, nicht mehr durchführbar. Mit FRET-Assays konnte diese Problemematik umgangen werden. Homogene FRET-Assays wurden im HTS-Bereich seit den 90er-Jahren vermehrt eingesetzt. In dieser Arbeit bestand das Ziel darin, das FRET-Nachweisprinzip auf ein heterogenes Nachweissystem zu übertragen. Daraus entstand der Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay (PSFIA), dessen Prinzip auf eine Vielzahl von Bindungsassays übertragbar war. Der PSFIA sollte auf die Anwendbarkeit der Probenhandhabung mit Nanolitervolumina untersucht werden. Der PSFIA in der NTP sollte folgende Erkenntnisse für die Miniaturisierung eines heterogenen Fluoreszenz-Bioassays erbringen:

- Oberflächenchemie auf mikrostrukturierten Kunststoffoberflächen
- Mikrodosierung einzelner Probentröpfchen mit einem Volumen von 0.5 nL – 75 nL
- Verringerung der Diffusionswege durch Miniaturisierung
- Qualitätsmerkmale des Nachweissystems für Modellanalyte
- Durchlaufdauer eines Assays

Ein weiterer heterogener Fluoreszenz-Bioassay auf Kunststoffträgern sollte zum quantitativen Nachweis von DNA im Rahmen des Projektes nanoMAP aufgebaut und auf die Nanoliterkavitäten übertragen werden. Dieser Assay sollte sensitiver sein als die herkömmlichen Hybridisierungsassays auf Microarrays. Es sollte ein Nuklease-Assay entwickelt werden, welcher doppelstrangspezifisch DNA an der Oberfläche erkennen und diese fragmentieren sollte, wobei ein Fluoreszenzsignal erzeugt würde. Für diesen Assay sollten die folgenden Komponenten erarbeitet werden:

- Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Kunststoffträgern
- Charakterisierung einer doppelstrangspezifischen Exonuklease
- Entwicklung einer neuartigen FRET-DNA-Sonde mit geeignetem Donor-Akzeptorpaar
- Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe der Fa. Dyomics für die FRET-DNA-Sonde
- Nachweis der enzymatischen Reaktion in Nanoliterkavitäten

Diese Arbeiten wurden im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) geförderten Verbundprojektes „Modulare Applikationsplattform mit integrierter Nanodosierung und hochparallele Probenanalytik“, kurz nanoMAP, durchgeführt.

Gliederung

In einem einführenden theoretischen Teil werden die Grundlagen erläutert, welche die Voraussetzung für die Entwicklung und Miniaturisierung heterogener Bioassays, basierend auf FRET, darstellen. Insbesondere wird auf bioanalytische Testsysteme, Kopplungschemie mit Biomolekülen, die Mikrodosierung und die optische Spektroskopie näher eingegangen.

Nach einer Auflistung der eingesetzten Materialien und der Beschreibung der verwendeten Methoden werden im Ergebnisteil zunächst die verschiedenen Strategien zur Immobilisierung von Biomolekülen auf Kunststoffoberflächen dargestellt. Diese bildeten die Voraussetzung für die Durchführung der heterogenen Fluoreszenz-Bioassays. Die theoretischen Simulationen des miniaturisierten PSFIA werden auf ihre Übertragbarkeit im realen Nachweissystem aufgezeigt und diskutiert. Anhand des Modellanalyten Atrazin wird der PSFIA mit Hilfe von Kalibrierkurven charakterisiert. Es werden zwei verschiedene Methoden gezeigt, wie man oberflächennah einen Energietransfer erzeugen kann. Zuerst wird der Akzeptorfarbstoff Cy5.5 zusammen mit dem Analytderivat adsorptiv über BSA auf die Kunststoffoberfläche immobilisiert. In einem zweiten Schritt werden goldbedampfte NTPs verwendet, die ebenfalls stark ortsabhängig fluoreszenzlöschende Eigenschaften aufweisen. Der PSFIA auf Gold-NTPs wird zum Nachweis zweier weiterer Analyte, Estradiol und Histamin, angewendet. Für Histamin werden die entsprechenden Reaktionspartner Analytderivat und Antikörper, sowie die Oberflächenchemie charakterisiert, um sie im PSFIA einsetzen zu können. Die Kalibrierkurven im PSFIA werden jeweils charakterisiert und diskutiert.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Aufbau eines heterogenen Nuklease-Assays zur Detektion von DNA. Zunächst werden Farbstoffe der Firma Dyomics auf die Kopplungsfähigkeit an Biomolekülen und ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht. Zuletzt wird gezeigt, dass im Exonuklease-Assay die DNA konzentrationsabhängig nachgewiesen werden kann.

2 Theoretischer Teil

2.1 Bioanalytische Testverfahren

2.1.1 Biologischer Hintergrund

Antikörper und Immunabwehr

Unter dem Begriff Antikörper versteht man humorale und zelluläre multifunktionelle Glykoproteine, die das Immunsystem zum Schutz vor körperfremden Stoffe produziert. Diese Fremdstoffe werden auch als Antigene bezeichnet. In den Organismen können fremde Proteine, Glykoproteine, Viren, Bakterien und vieles mehr eindringen und müssen vom Organismus erkannt und beseitigt werden.

Beim Erstkontakt wird das Antigen von B-Lymphozyten gebunden, welche einen spezifischen Rezeptor für das Antigen an der Membranoberfläche tragen. Wird ein Antigen durch eine Affinätsbindung entdeckt, kommt es zur Vermehrung der B-Zellen und zur Differenzierung in Gedächtniszellen (primäre Immunantwort). Bei Folgeimmunisierung mit dem gleichen Antigen sorgen die Gedächtniszellen für eine schnelle Ausschüttung von Antikörpern der Klasse IgG (sekundäre Immunantwort).

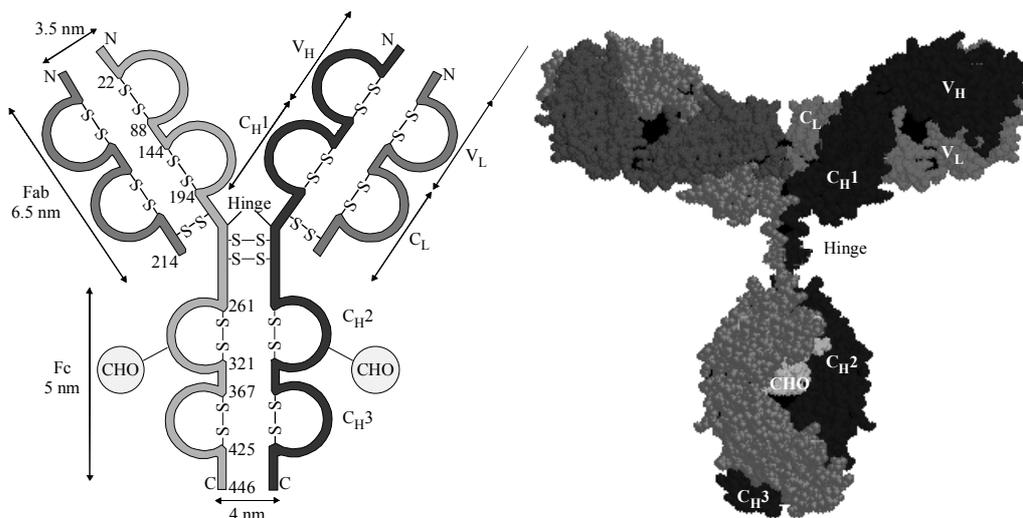


Abbildung 2.1: Links: Schematische Darstellung der Struktur eines Antikörpers am Beispiel des Immunglobulins IgG₁. Rechts: dreidimensionale Struktur des IgG₁. (Bild aus Padlan, 1994)

Bei den höheren Säugetieren sind fünf Ig-Klassen bekannt: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE, die allesamt Effektormoleküle des Immunsystems sind. Sie treten membrangebunden als Zelloberflächen-Rezeptoren oder als freie Antikörper auf. Sie unterscheiden sich aus chemischer Sicht in ihrem Molekulargewicht, ihrer elektrischen Ladung, der Aminosäuresequenz und ihrem Kohlenhydratanteil voneinander. Jedem Immunglobulin liegt eine Struktureinheit zugrunde, die aus zwei identisch schweren (heavy chain) und zwei identisch leichten Polypeptidketten (light chain) besteht, die mit Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. In den sogenannten Fab-Fragmenten (fragment antigen binding), die aus den leichten Ketten und dem N-terminalen Ende der schweren Kette bestehen, ist die

Spezifität des Antikörpers durch Varianzen in der Aminosäuresequenz lokalisiert. Das andere, konstante, leicht auskristallisierende Fragment (fragment crystallizable), spielt bei der Bindung von Antigenen keine Rolle, sondern bestimmt die Funktionalität des Antikörpers. IgA wird bei Säugern am meisten produziert. Es kommt hauptsächlich auf Schleimhautoberflächen des Verdauungstraktes, der Lungen, im Sekret exokriner Drüsen sowie im Blutplasma vor.

IgM ist ein dekavalentes, pentameres Immunglobulin von einer Proteingröße von 970 kDa und macht etwa 7% des Blutplasmas aus. Wegen seiner Größe ist es weniger gut löslich. Seine Adsorption an vielen verschiedenen Oberflächen kann mannigfache unspezifische Bindungen hervorrufen und ist deswegen nur begrenzt für bioanalytische Zwecke geeignet.

IgD und IgE sind Antikörper, die vor allem auf den Membranen von Lymphocyten und Mastzellen vorkommen. Der Antikörper IgE hat besonders in der Allergiediagnostik eine Bedeutung.

Der Antikörper IgG wird hauptsächlich in der Immunanalytik eingesetzt, weil er leicht zugänglich ist. IgGs sind durch Immunisieren in Tieren induzierbar und über Gefäßpunktion aus dem Serum leicht zu gewinnen. IgG kommt als Monomer mit einer Größe von 150 kDa vor und besteht aus vier Isotypen IgG₁₋₄.

Allergische Reaktion

Die immunologischen Effektormechanismen zielen auf die Elimination des Antigens ab, wodurch es in Folgereaktionen zur Aktivierung eines Mediatorsystems im Organismus kommt. Dies führt zu Entzündungsreaktionen im Körpers, die sich durch z.B. Schwellung, Verstopfung der Atemwege, Rötung äußern.

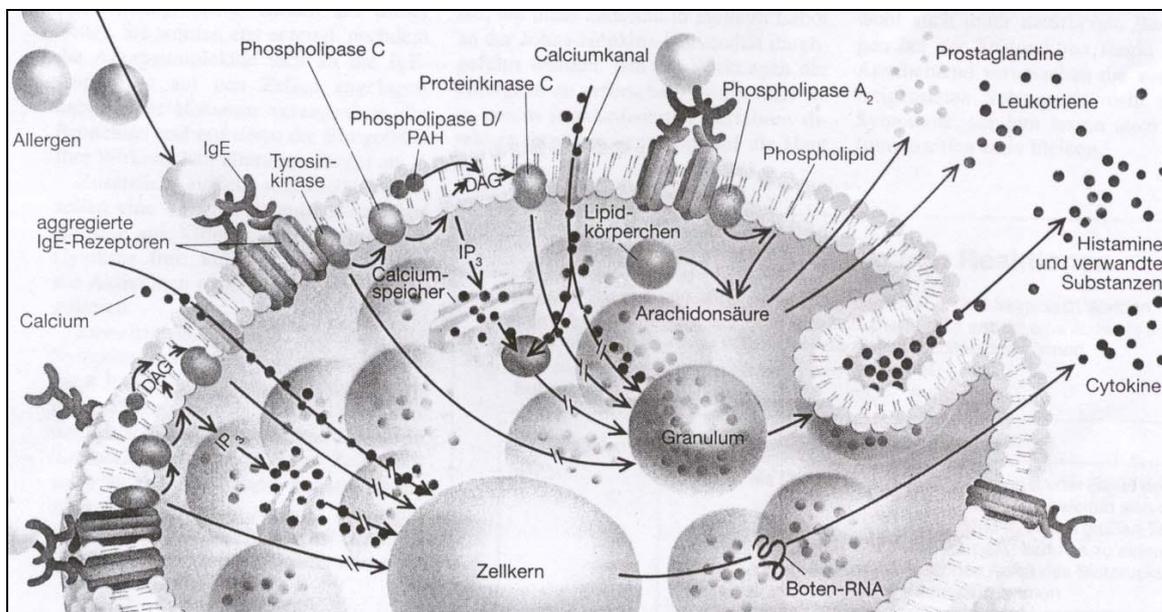


Abbildung 2.2: Reaktion einer allergischen Reaktion (entnommen von Lichtenstein, 2001)

Richten sich die immunologischen Effektormechanismen gegen primäre harmlose Antigene, etwa Milcheiweiß oder Waschmittel, resultieren für den Betroffenen unverständliche Überempfindlichkeitsreaktionen. Um solche Reaktionen zu bezeichnen, wurde von Pirquet (1927) der Begriff der „Allergie“ eingeführt.

Allergische Überempfindlichkeitsreaktionen können sich an verschiedenen Organsystemen und in einer breiten Fülle klinischer Symptome manifestieren. Gell und Coombs (Descotes

und Choquet-Kastylevsky, 2001) haben diese in vier Grundtypen der Überempfindlichkeitsreaktionen unterteilt.

Typ I: Anaphylaktische Reaktionen. Diese werden durch IgE-Antikörper vermittelt. Sie binden mit ihren Fc-Stücken an die hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Basophilen und Mastzellen. Die Bindung des entsprechenden Antigens führt zu einer Quervernetzung benachbarter IgE-Moleküle, wodurch eine Degranulation mit Freisetzung von Histamin und Entzündungsmediatoren ausgelöst wird.

Typ II: Zytotoxische Reaktionen. Diese werden durch Antikörper vermittelt, die an Zellen binden. Es kommt ausschließlich zur Aktivierung von Komplement und, bei völligem Ablauf der Komplementkaskade, zur Lyse der Zellen. Zytotoxische Reaktionen spielen eine Rolle bei Autoimmunkrankheiten, Transfusionsreaktionen und Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Medikamente.

Typ III: Immunkomplex-medierte Reaktionen. Hier wird ein Gewebeschaden durch Antigen-Antikörperkomplexe verursacht, die sich bevorzugt an Basalmembranen von Gefäßen ablagern und durch Komplementaktivierung zu Entzündungen und Gewebszerstörungen führen.

Typ IV: Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ. Dieser auch als sogenannte zellvermittelte Überempfindlichkeit bezeichnete Typ ist durch lymphozytäre Infiltration (T-Zellen) gekennzeichnet. Hierunter fallen allergische Kontaktekzeme, die entstehen, wenn niedermolekulare Substanzen an Trägerproteine binden und als Hapten eine Überempfindlichkeitsreaktion auslösen. Als Kontaktallergene sind verschiedenste Substanzen der chemischen Umwelt wie Farben, Kosmetika, Kunststoffe u.a.m. bekannt.

Die Bedeutung an in-vitro-Testverfahren nimmt immer mehr zu, um chemische und biologische Substanzen auf allergische Reaktionen hin zu untersuchen. Insbesondere Immunoassays spielen hier eine große Rolle, die unter anderem die Allergiemediatoren quantifizieren.

DNA und ihre Bausteine

Die Information für die Entwicklung von Zellen und Geweben und deren spezifischer Funktion ist in den Genen niedergelegt. Ein Gen ist ein nach Funktion und Struktur definierbarer Teil der genetischen Information. Die Gene liegen bei den Eukaryonten auf Chromosomen im Kern der Zelle. Sie bestehen aus einem komplexen langkettigen Molekül, die als Desoxyribonukleinsäure (DNS; internationale Abkürzung ist DNA) bezeichnet wird. Sie besteht aus 4 verschiedenen Nukleotidbasen, die an einen Zuckerbaustein, die Desoxyribose, gebunden sind. Die einzelnen Nukleotide sind über Phosphatreste miteinander verknüpft.

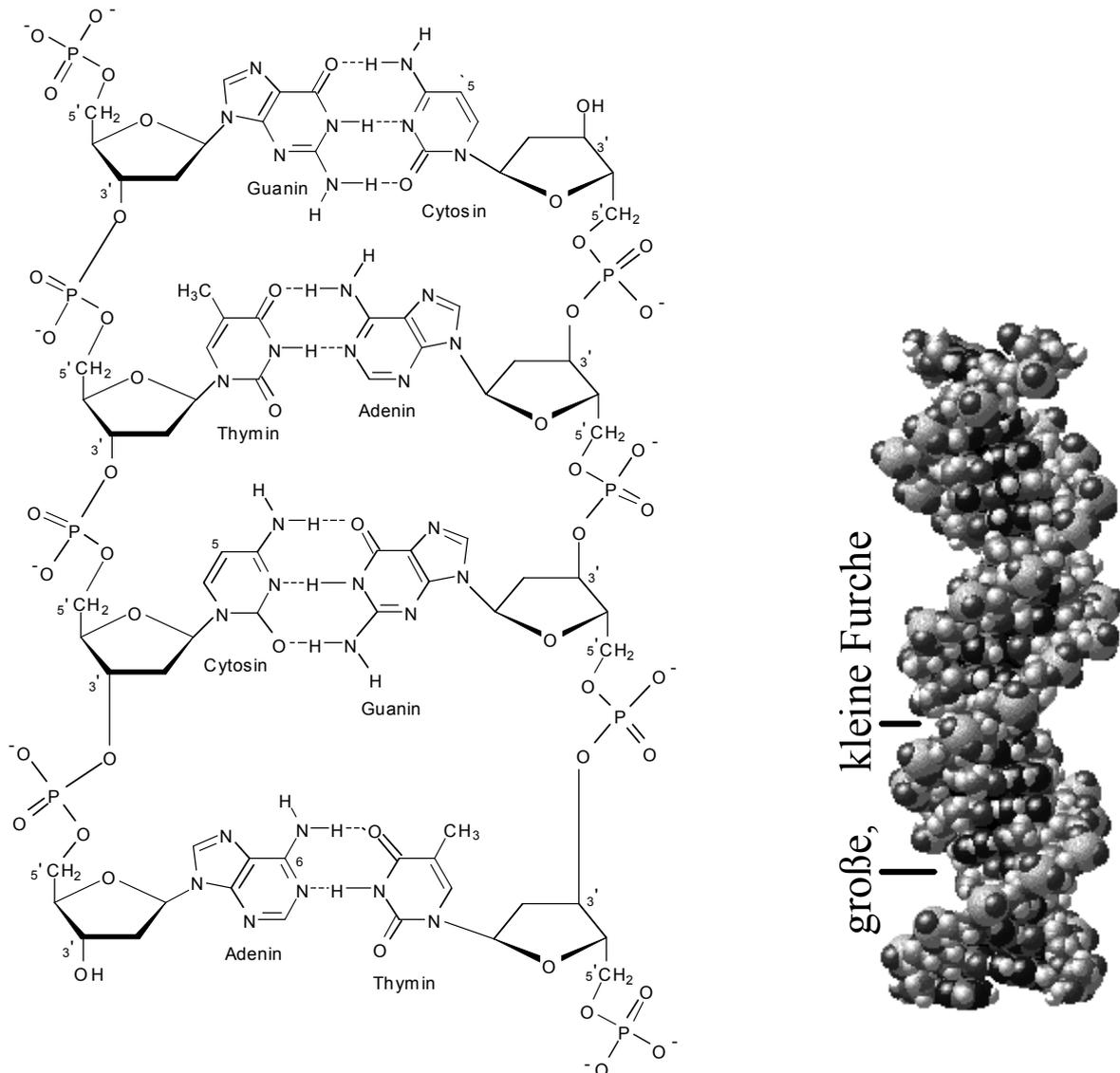


Abbildung 2.3: Struktur der DNA: a.) Basenpaarung zwischen Adenin und Thyminid bzw. zwischen Cytosin und Guanin (Falbe 1995) b.) Die Doppelhelix in dreidimensionaler Darstellung¹.

Die Chromosomen bestehen aus zwei DNA-Stränge, die zueinander komplementär sind. Die Information steckt in der Abfolge der Nukleotidbasen, wobei entweder Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin im Doppelstrang gepaart sind. Die Sequenz von jeweils drei Basenpaaren eines Stranges bedeutet ein Codewort (Codon) für eine Aminosäure. Die Verknüpfung der einzelnen Codons führt zu der Bildung eines Polypeptids.

Bei der Transkription wird die Sequenz der Nukleotidbasen von dem Matrizen-DNA-Strang auf ein weiteres informationstragendes Molekül, der mRNA, übertragen. Danach wird die Nukleotidbasensequenz der mRNA in eine Abfolge des Codons entsprechende Sequenz von Aminosäuren übersetzt. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet.

Ein Gen kann als ein Abschnitt in der DNA definiert werden, der für die Bildung eines Polypeptids verantwortlich ist. Ein oder mehrere Polypeptide bilden ein Protein. Deshalb können mehrere Gene an der Bildung eines Proteins beteiligt sein.

¹ Entnommen aus <http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/biochemistry.html>

Die vollständige Herstellung der Funktionalität eines Proteins geschieht in weiteren Prozessierungsschritten, indem Zuckerreste angebunden, Disulfidbrücken gebildet, proteolytisch Sequenz geschnitten oder es selbst phosphoryliert wird.

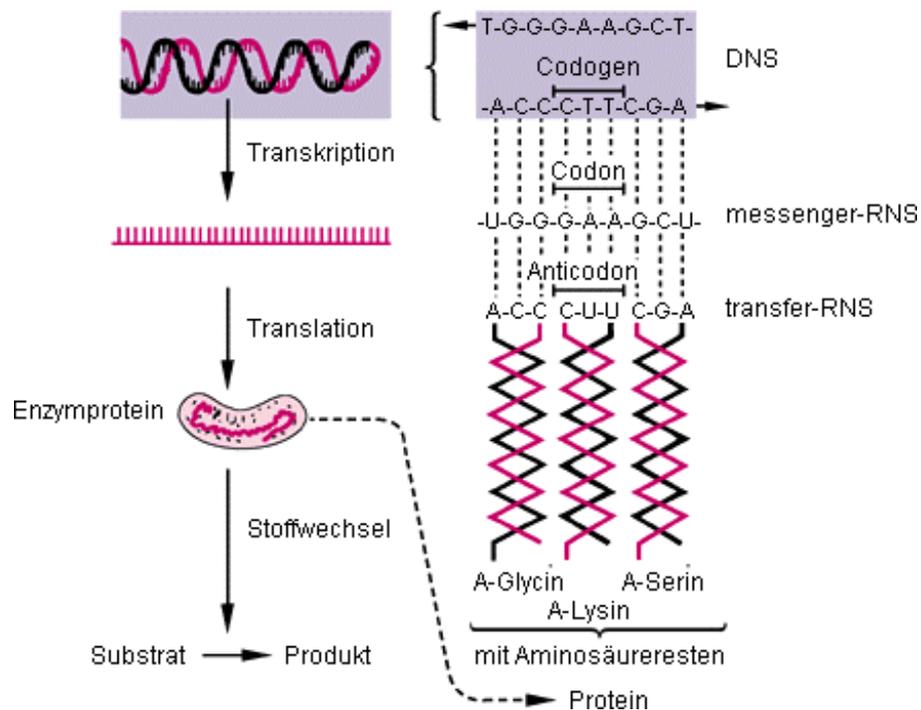


Abbildung 2.4: Schematischer Ablauf der Proteinbiosynthese (von Hahn, 1979).

2.1.2 Biomolekulare Wechselwirkungen

Intermolekulare und intramolekulare Bindungskräfte

Bei Biomolekülen wie Nucleinsäuren oder Proteinen sind die einzelnen Nucleotide beziehungsweise Aminosäuren über kovalente Bindungen zu einem Biopolymer verknüpft. Die räumliche Struktur hängt im Wesentlichen von nicht-kovalenten Bindungskräften ab. Man unterscheidet grob vereinfacht vier Bindungstypen:

- Ionenbindung
- Wasserstoffbrückenbindung
- van-der-Waals-Bindung
- hydrophobe Wechselwirkungen

Biomoleküle kommen in der Natur meistens in einem wässrigen Medium vor, so dass ein weiterer Faktor für die Raumstruktur die umgebende Solvathülle der Biopolymere ist.

Tabelle 2.1: Größen verschiedener Wechselwirkungsenergien.

| Bindungstyp | Bindungsstärke [kJ/mol] | Abstands- abhängigkeit | Typischer Abstand [pm] | Beispiel |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Kovalent | 200-500 | - | 150 | C-C |
| Ionisch | 10-30 | r^{-2} | 250 | Lysin- Glutamat |
| Wasserstoffbrücken- kräfte | 10-30 | r^{-6} | 300 | DNA Basen |
| Van-der-Waals-Kräfte | 1-4 | r^{-10} | 350 | Aromaten |
| Hydrophobe Wechselwirkungen | - | keine diskrete Abhängigkeit | - | Alkylreste |

Biomolekulare Wechselwirkungen sind reversibel und hoch spezifisch. Sie treten zwischen einem biochemischen Makromolekül wie der Nukleinsäure oder dem Protein, das im Folgenden als Rezeptor bezeichnet wird, und einem makro- oder niedermolekularen Liganden auf, indem der Ligand an eine spezielle Bindestelle im Rezeptor bindet. Dazu müssen zunächst die intramolekularen Bindungskräfte des Rezeptors gelöst werden.

Die affine Wechselwirkung geschieht über die Ausbildung von nicht-kovalenten Bindungen zwischen den Wechselwirkungsflächen komplementärer Bindungspartner. Die primären Anziehungskräfte, die zu einer Anlagerung von Liganden an einen Rezeptor führen, sind hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Hydrophobe Wechselwirkungen beruhen auf dem Streben nach Aggregation unpolarer Ketten und Gruppen in einem wässrigen Medium. Die treibende Kraft für die hydrophobe Anziehung solvatisierter unpolarer Gruppen liegt in der freien Enthalpie der Kohäsion von Wasser, welche durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen des ausgeschlossenen Wassers hervorgerufen werden. Die freie Enthalpie besteht aus einem enthalpischen und einem entropischen Term. Die Bindungsenthalpie hydrophober Gruppen in Wasser nimmt aufgrund von van-der-Waals-Kräften zu. Zudem kommt noch, dass die Wechselwirkungen der Wassermoleküle untereinander begünstigt sind. Eine Entropiezunahme lässt sich damit erklären, dass die Solvathülle ein geordnetes System ist und durch die Aggregation einzelne Wassermoleküle frei werden. Ionische Wechselwirkungen treten zwischen dem Ligand und Rezeptor auf, wenn sich ihre entgegengesetzte Ladung anzieht. Die Dielektrizitätskonstanten des Rezeptors nehmen drastisch ab, wenn die Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt werden. Optimale komplementäre Strukturen bestimmen über das Ausmaß der Wassereliminierung direkt die Stärke der Wechselwirkungen.

Die primären Anziehungskräfte verringern den Abstand der Bindungspartner soweit, dass Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen einen starken Einfluss nehmen können. Van-der-Waals-Bindungen beruhen auf den eher schwachen Kräften induzierter Dipole und existieren zwischen allen Atomen. Sie treten bei Kontaktdistanzen zwischen 300 und 400 pm auf. Sie tragen kumulativ zu einer effektiven Bindung bei, wenn Wechselwirkungsflächen exakt komplementär sind und sich maximal nähern können.

Bei Wasserstoffbrückenbindungen teilen sich die Elektronenpaare zweier elektronegativer Atome ein Proton, wobei das Molekül, welches das Wasserstoffatom trägt als Wasserstoffdonor und das andere als Wasserstoffakzeptor bezeichnet wird. Der Akzeptor verfügt über eine partielle negative Ladung, die das partiell positiv geladene Wasserstoffatom anzieht. Die Länge einer Wasserstoffbrücke liegt um 300 pm. Die Bindung

ist bei linearer Anordnung der drei Atome am stärksten. Diese Wechselwirkungen sind stark abstandsabhängig und sind für die sekundären Wechselwirkungen mitverantwortlich.

Dem gegenüber stehen die abstoßenden (repulsiven) Kräfte, die im Abstand von 2-3 nm wirken. Als repulsive Wechselwirkungen versteht man makroskopisch wirksame Abstoßungskräfte aufgrund der hydrophilen Natur der solvatisierten Moleküle. Die DNA ist durch ihre Phosphodiesterbrücken negativ geladen. Beim Hybridisieren komplementärer DNA-Stränge müssen die bindenden Kräfte stärker sein als die abstoßenden. Ähnlich verhält sich dies bei Proteinen, die aus hydrophilen, ionischen und hydrophoben Aminosäuren bestehen. Die Wassermoleküle lagern sich über Wasserstoffbrückenkräfte an die Sauerstoffatome, die in Richtung Wasserschicht orientiert sind. Hierdurch ist die Außenhülle der Proteine elektrostatisch geladen, was zur hydrophilen Repulsion zwischen den Proteinen führt.

Reaktionskinetik einer Affinitätsbindung

Die Reaktion zwischen Rezeptor und Ligand wird als eine Gleichgewichtsreaktion betrachtet, die mit folgender Reaktionsgleichung beschrieben wird:



wobei RL den Bindungskomplex darstellt; k_{ass} und k_{diss} sind die Assoziations- bzw. Dissoziationsratenkonstanten. Die Gleichgewichtskonstante K , die auch als Affinitätskonstante oder Bindungskonstante bezeichnet wird, ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz

$$K = \frac{k_{\text{ass}}}{k_{\text{diss}}} = \frac{c_{RL}}{c_R \cdot c_L} \quad (2)$$

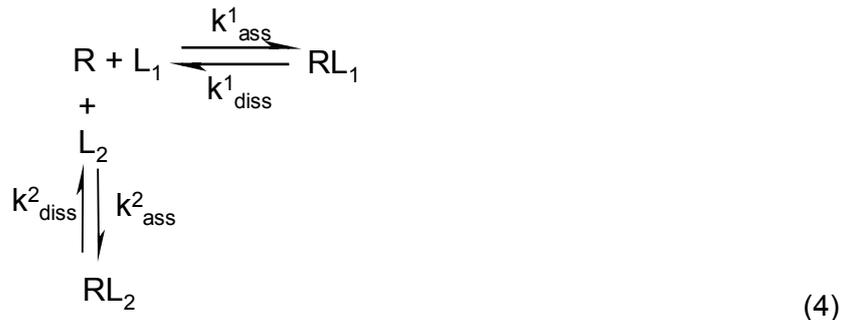
Aus der Affinitätskonstante lässt sich die freie Bindungsenthalpie ΔG^0 unter der Gleichgewichtsbedingung ($\Delta G=0$) berechnen:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (3)$$

Je stärker die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand ist, desto negativer wird die freie Bindungsenthalpie. In biologischen Systemen liegt ΔG^0 zwischen -20 kJ/mol und -90 kJ/mol. Die Affinitätskonstante K liegt dementsprechend in einem Bereich zwischen 10^4 M^{-1} und 10^{15} M^{-1} . Die große Schwankung beruht hauptsächlich aus der breiten Verteilung der Dissoziationsratenkonstante k_{diss} . Diese Werte liegen zwischen 10^4 s^{-1} für niederaffine und 10^{-6} s^{-1} für hochaffine Systeme, wie die Streptavidin-Biotin-Bindung. Typische Assoziationsratenkonstanten k_{ass} liegen in einem Bereich zwischen $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für eine biomolekulare Erkennung ist es nicht nur wichtig wie stark eine Bindung ist, sondern auch wie schnell sie erfolgt.

Kompetitive Reaktionskinetik

Eine kompetitive Reaktion zeichnet sich darin aus, dass zwei verschiedene Liganden um die Bindungstasche des Rezeptors konkurrieren.



Wie zuvor beschrieben, hängt die Erkennung eines Liganden von den intermolekularen Kräften ab. Die Affinitätsreaktion ist zwar spezifisch für ein Molekül, hängt aber stark von den Bindungsenergien ab. Dementsprechend können leichte Modifikationen im Molekül, welche die Bindungsenergie und die räumliche Anordnung wenig beeinträchtigen, ebenfalls zu einer Bindung führen. Dies kann man sich für die Bioanalytik zu nutze machen. Lässt man die Konzentration eines Liganden konstant, erhält man ein Grundsignal, das der Bindung von RL_1 entspricht. Durch Zugabe des zweiten Liganden verschieben sich die Gleichgewichte. Je mehr L_2 bindet, umso mehr wird L_1 frei. Löst freies L_1 nun ein Signal aus, kann man dieses Signal in Abhängigkeit der zweiten Ligandenkonzentration bestimmen.

Diffusion

Voraussetzung einer jeden Reaktion ist das Zusammentreffen eines Rezeptors (R) mit seinem Liganden (L). Die treibende Kraft ist der Konzentrationsgradient des Liganden zum Rezeptor. Dieser Materietransport wird als Diffusion bezeichnet und kann mit dem 1. Fickschen Gesetz beschrieben werden:

$$J = \frac{dn}{dt} = -AD \frac{dc}{dx} \quad (5)$$

Dabei ist J der Stofffluss, A die Fläche, D der Diffusionskoeffizient, c die Konzentration und x die Weglänge.

Nimmt man den Rezeptor als kugelförmig an, kann für A die projizierte Kreisfläche $4\pi r^2$ und für x der Radius r eingesetzt werden:

$$|J_L| = 4\pi r^2 D_L \frac{dc_L}{dr} \quad (6)$$

Diese Gleichung gilt, wenn man voraussetzt, dass sich ein Konzentrationsgradient des Liganden ausbildet und der Stofffluss in Richtung Rezeptor verläuft. Der Stofffluss bezieht sich auf ein einzelnes Rezeptor-Molekül.

Gleichung 6 kann nach Trennung der Variablen integriert werden, wobei man folgendes Resultat erhält:

$$c_L(r) = c_L^\infty - \frac{|J_L|}{4\pi D_L r}, \quad (7)$$

wobei c_L^∞ die Ligandkonzentration im maximalen Abstand zum Rezeptor ist. Ein maximaler Teilchenfluss J_L^{max} wird erreicht, wenn jede Begnung von Rezeptor und Ligand zu einer Reaktion führt, so dass $c_L(r)=0$ ist.

Mit dieser Bedingung lässt sich der maximale Teilchenfluss berechnen beim kleinst möglichen Abstand der Bindungspartner r_{LR} :

$$|J_L^{\text{mac}}| = 4\pi r_{LR} D_L c_L^\infty \quad (8)$$

Betrachtet man die Gesamtheit der Bindungspartner, erhält man die Reaktionsgeschwindigkeit durch Multiplikation von J_L^{\max} mit der Teilchenkonzentration N_R . Die Ableitung vernachlässigt die Bewegung des Rezeptors. Eine Berücksichtigung der gegenseitigen Bewegung von Rezeptor und Ligand führt zum Ersatz des Diffusionskoeffizienten D_L durch die Summe der ($D_L + D_R$):

$$v_{diff} = \left| J_L^{\max} \right| N_R^{\infty} = 4\pi r_{LR} (D_L + D_R) c_L^{\infty} N_R^{\infty} = k_{ass} c_L^{\infty} c_R^{\infty} \quad (9)$$

Gleichung 9 erhält man unter der Berücksichtigung von $N_R = C_R L$ (L ist die Loschmidtsche Konstante). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur Konzentration von Rezeptor und Ligand und enthält als Proportionalitätsfaktor die Assoziationsratenkonstante nach Smoluchowski (1917):

$$k_{ass} = L 4\pi r_{LR} (D_L + D_R) \quad (10)$$

Diffusionsvorgänge verlaufen sehr viel langsamer als die anschließende Bindungsreaktion. Somit handelt es bei der Bindung von Rezeptor und Ligand um eine diffusionskontrollierte Reaktion.

Biomolekulare Wechselwirkungen an Grenzflächen

Bei heterogenen Affinitätsreaktionen findet die Bindung nicht in der Lösung statt, sondern erfolgt an der Grenzfläche zwischen fester Phase und Lösung. In Abbildung 2.5 ist der Ligand an der Oberfläche verankert und der Rezeptor ist in Lösung. Über Diffusionsprozesse gelangt der Rezeptor an die Oberfläche, wo er mit ihr wechselwirkt. Durch die Bindung an die Oberfläche kommt es zu einer Verarmung an freiem Rezeptor. Dies führt zu einer Ausbildung einer Diffusionsgrenzschicht. Der Rezeptor muss die Grenzschicht passieren, um an die Bindestellen der Oberfläche zu gelangen.

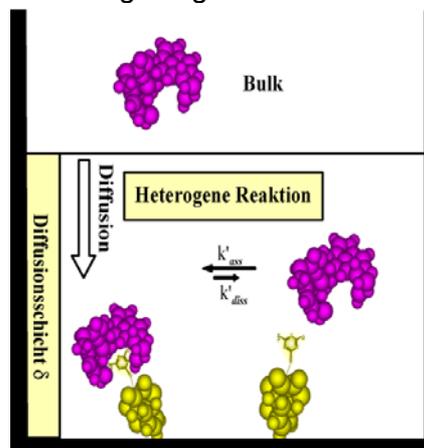


Abbildung 2.5: Heterogene Gleichgewichtsreaktion zwischen freiem Rezeptor und immobilisierten Liganden.

Wird der Rezeptor mit einem laminaren Fluss über die Oberfläche bewegt, bleibt die Diffusionsgrenzschicht über einen größeren Zeitraum konstant, während sie in einem ruhenden System von Beginn an zunimmt. Dementsprechend kann der Massentransport an die Oberfläche im Durchfluss mit dem 1. Fickschen Gesetz beschrieben werden (Glaser, 1993). In einem ruhendem System, wie es in Kavitäten vorkommt, wird dagegen der Massentransport mit dem 2. Fickschen Gesetz beschrieben (Crank, 1975):

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_x = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right)_t \quad (11)$$

Nach Nernst erhält man die Diffusionsgrenzschicht nach folgender Gleichung:

$$D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=0} = \frac{D}{\delta} (c_{x \rightarrow \infty} - c_{x \rightarrow 0}) = k_D (c_{x \rightarrow \infty} - c_{x \rightarrow 0}) \quad (12)$$

wobei c die Konzentration im Volumen, $c_{x \rightarrow \infty}$ ist die Konzentration am Flüssigkeitsrand und $c_{x \rightarrow 0}$ die Konzentration direkt an der Phasengrenze ist. D ist der Diffusionskoeffizient und δ die Diffusionsschichtdicke. Die Diffusionskonstante k_D hat die Einheit [m/s] und entspricht der Transportgeschwindigkeit. Der Diffusionskoeffizient D liegt bei Proteinen in Wasser bei Raumtemperatur in der Größenordnung von $10^{-10} - 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, für niedermolekulare Verbindungen liegt er etwa eine Größenordnung darunter.

Durch Integration des Massentransports erhält man die Oberflächenbedeckungsrate Γ (Eddowes 1987/88):

$$\Gamma(t) = \frac{n(t)}{A} = \int_0^t D \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=0} \partial t \quad (13)$$

Die zeitliche Betrachtung der Bindung an die Oberfläche entspricht einem hyperbolischen Verlauf und lässt sich als Langmuir-Isotherme beschreiben:

$$\Gamma = \Gamma_{\max} \frac{Kc}{1 + Kc} \quad (14)$$

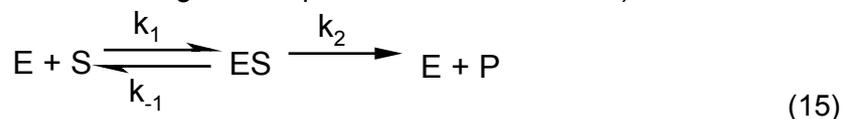
2.1.3 Enzymkinetik

Eine weitere wichtige Reaktion in biologischen Systemen ist die Umsetzung eines Substrates zu einem Produkt in Anwesenheit eines biochemischen Katalysators, der als Enzym bezeichnet wird. Enzyme gehören zu der Klasse der Proteine. In der Regel ist jedoch nur ein kleiner Bereich dieser Makromoleküle katalytisch wirksam, der aktives Zentrum genannt wird.

Ihre Bedeutung besteht in der Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit biochemischer Reaktionen. Die Aktivierungsenergie wird herabgesetzt, indem sich ein oder mehrere Übergangskomplexe bilden. Das aktive Zentrum begünstigt die Umsetzung des Substrates, indem es das Molekül für eine Reaktion leichter zugänglich macht und den Reaktionsmechanismus beeinflusst. Dies geschieht mit einem gegebenen Enzym zumeist mit außerordentlicher Spezifität bezüglich der Art der Reaktion. Enzymreaktionen finden häufig Einsatz in der Bioanalytik, indem die Änderung der Substrat- bzw. Produktkonzentration in Abhängigkeit zu der Zeit betrachtet wird.

Unter einigen Annahmen bezüglich des Ablaufs der Reaktion lässt sich ein verhältnismäßig einfaches Reaktionsschema aufstellen

- Die Bindung des Produktes am Enzym ist zu vernachlässigen
- Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist die Reaktion zu den Produkten
- Die Bildung des Produkts ist irreversibel
- Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ist konstant während des Ablaufs der Reaktion (dynamisches Gleichgewicht, quasi-stationärer Bereich)



Daraus lässt sich eine Geschwindigkeitsgleichung für die Produktbildung ableiten, die als Michaelis-Menten-Gleichung bezeichnet wird.

$$v_P = \frac{dp}{dt} = \frac{v_{\max} c_S}{K_M + c_S} \quad (16)$$

Dabei ist c_S die Substratkonzentration, v_{\max} die Maximalgeschwindigkeit bei Substratsättigung und K_M die Michaelis-Konstante. Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v_P von der Substratkonzentration bei konstanter Gesamtenzymkonzentration. Die mathematische Form entspricht einer Sättigungskinetik. Bei geringer Substratkonzentration verläuft die Reaktion linear zu c_S und entspricht einer Reaktion erster Ordnung. Ist die Substratbelegung maximal, kommt man in einen Sättigungsbereich, wo die Reaktion unabhängig von c_S abläuft. Die Reaktion läuft nach einer Reaktionskinetik 0. Ordnung ab. K_M ist eine Konstante, die die Geschwindigkeitskonstanten der Trennung des Enzymsubstratkomplexes in Relation zur Geschwindigkeitskonstanten der Bildung setzt und ist demnach ein Maß für die Bindungsstärke des Komplexes.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (17)$$

Die Michaelis-Menten-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit sind Größen, welche die Enzymreaktion beschreiben. Sie lassen sich direkt bestimmen, wenn man die Produktbildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration misst. Will man K_M und v_{\max} aus einer Messung von v_P in Abhängigkeit von c_S ermitteln, so wählt man als Auftragungsart zweckmäßigerweise die Form einer Geraden. Dazu bietet sich die Auftragung nach Lineweaver-Burk an. Trägt man $1/v_P$ gegen $1/c_S$ auf, so erhält man eine Gerade, aus deren Steigung und Achsenabschnitte sowohl v_{\max} als auch K_M erhält.

$$\frac{1}{v_P} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{c_S} \quad (18)$$

Ein Nachteil dieser Darstellung besteht in der starken Betonung der Messwerte bei kleinen Substratkonzentrationen, die häufig mit einem größeren Fehler behaftet sind. Will man diesen Nachteil vermeiden, so kann man die Auftragung nach Eadie-Hofstee wählen:

$$v_P = v_{\max} - K_M \frac{v_P}{c_S} \quad (19)$$

Wird v_P gegen v_P/c_S aufgetragen, erhält man eine Gerade mit der Steigung K_M und dem y-Achsenabschnitt v_{\max} .

Eine weitere wichtige Größe ist die katalytische Konstante k_2 , welche die maximale Zahl von Substratmolekülen darstellt, die ein einzelnes Enzymmolekül pro Zeit umsetzen kann und wird als Umsatzzahl oder molekulare Aktivität bezeichnet.

$$k_2 = \frac{v_{\max}}{c_E^0} = \frac{(dc_P/dt)_{\max}}{c_E^0} = -\frac{(dc_S/dt)_{\max}}{c_E^0} \quad (20)$$

Die Enzymaktivität A_E ist die Maximalgeschwindigkeit in einem Versuchsansatz mit dem Volumen V

$$A_E = v_{\max} \cdot V \quad (21)$$

Die Angabe einer Enzymaktivität bedarf somit weder der Kenntnis der Molmasse noch der Enzymmasse im Versuchsansatz. Man misst den Substratumsatz bei hohen Substratkonzentrationen und gibt A_E in Enzymeinheiten (units) an, wobei 1 unit einem

maximalen Substratumsatz von 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ bei einer Temperatur von 25 °C unter optimalen Versuchsbedingungen entspricht.

2.1.4 Immunanalytische Testverfahren

Immunanalytische Testverfahren basieren auf der spezifischen Affinitätsreaktion zwischen Antikörper und Antigen. Sie werden hauptsächlich für quantitative Analysen eingesetzt, wobei das Antigen den Analyten darstellt und der Antigen-Antikörper-Komplex nachgewiesen wird. Allgemein kann man Immunoassays verschiedenartig eingruppierten.

Art der Markierung und damit der Detektion

Je nach Testformat kann entweder ein Antigen oder der Antikörper markiert sein. Als Marker kommen hauptsächlich Enzyme, Radiolabel oder Fluoreszenzfarbstoffe vor. Enzyme haben den Vorteil, pro Enzymmoleküle eine hohe Anzahl an Substratmolekülen umzusetzen. In der Immunanalytik werden Substrate eingesetzt, die zu ein farbiges Produkt umgesetzt werden können. Die enzymatische Reaktion führt zu einer Signalamplifikation, was zu niedrigen Nachweisgrenzen im Enzym-Immunoassay (EIA) führt. Als Substratmolekül wird z.B. Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt, das die Merrettich-Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in ein farbiges Produkt umsetzt.

Radioaktive Marker waren lange Zeit sehr attraktiv, weil damit sehr geringe Nachweisgrenzen im Radio-Immunoassay (RIA) erreicht wurden. Heute finden sie in den modernen Labors weniger Verwendung, weil die Sicherheitsvorkehrungen zu aufwendig und kostenintensiv sind.

Fluoreszenz-Immunoassays (FIA) finden immer häufiger Anwendung. Die Detektionsmethoden sind mannigfaltig wie z.B. Fluoreszenz-Anisotropie, Fluoreszenzlebensdauer, Fluoreszenz Resonanter Energietransfer, zeitaufgelöste Fluoreszenz. Es sind zwar nicht so niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen, wie bei den oben genannten Testformaten, sie haben aber Vorteile, wenn es um die Parallelisierung und Miniaturisierung geht. Auf die unterschiedlichen fluoreszenzbasierten Testformate wird später näher eingegangen.

Moderne Entwicklungen basieren auf markierungsfreien Systemen. Es werden Immunosensoren (IS) verwendet, bei denen die biologische Erkennung auf einem Signalumwandler (Transducer) geschieht, der das spezifische Bindesignal in ein elektrisches Signal umwandelt.

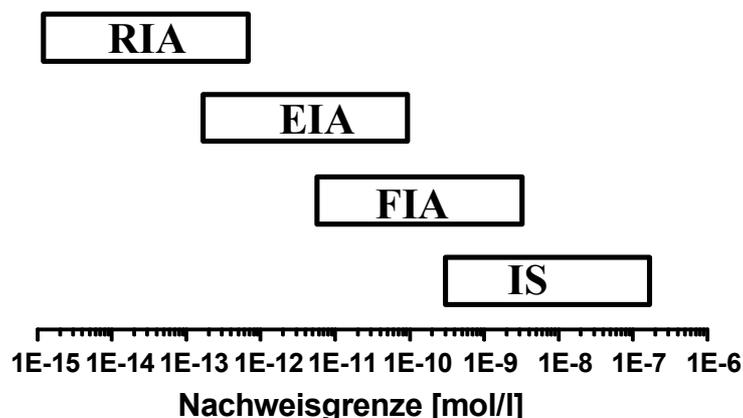


Abbildung 2.6: Vergleich der Nachweisgrenzen der immunanalytischen Verfahren Radioimmunoassay (RIA), Enzymimmunoassay (EIA), Fluoreszenzimmunoassay (FIA) und den Immunosensoren (IS).

Homogen/heterogen

Es gibt heterogene und homogene Testverfahren. Bei heterogenen Immunoassays wird eine Komponente an die Oberfläche gebunden, so dass sie für die Immun-Bindung genutzt werden kann. Die ungebundenen Reaktanten müssen physikalisch entfernt werden, indem man entweder mit einer Fluidik arbeitet oder die Flüssigkeit aufsaugt. Homogene Testverfahren detektieren den Immun-Komplex in Lösung. Nicht gebundene Substanzen beeinflussen die signalgebende Bindung nicht, weswegen sie ohne Wasch- oder Trennschritte auskommen. Sie benötigen einen Probenträger, wobei meistens eine Mikrotiterplatte verwendet wird.

Kompetitiv/nicht-kompetitiv

Das Testverfahren kann entweder kompetitiv oder nicht-kompetitiv ausgelegt sein. Bei kompetitiven Testverfahren wird sowohl der Analyt als auch ein modifiziertes Analytderivat eingesetzt, die miteinander um die Bindetasche des Antikörpers konkurrieren oder einer den anderen verdrängt. Das Analytderivat ist meistens markiert, weswegen kompetitive Assays hauptsächlich in markierten Testsystemen zum Einsatz kommen.

In nicht-kompetitiven Immuno-Assays liegen die Antikörperbindestellen im Überschuss vor. Sie kommen ohne Analyt-Derivat aus. Der Analyt-Antikörper-Komplex führt direkt zu einer Signaländerung.

Heterogene Immunoassays

Als bekanntester Vertreter der heterogenen Immunoassays ist der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zu nennen (Engval und Perlman, 1971). Er wird heutzutage in vielen diagnostischen Routinelabors eingesetzt. Kennzeichnend ist die Anbindung eines Enzyms an das Analytderivat (Abb. 2.7.A) oder an den Antikörper (Abb. 2.7.B und C). Zwischen den einzelnen Bindungsschritten sind Inkubationsphasen nötig. Anschließend müssen die ungebundenen Reste abgespült werden. Dies verzögert die Durchführung des Assays, verhindert dafür aber Matrixeffekte. Der kompetitive ELISA ist in Abb. 2.7.A gezeigt. Analyt und Analytderivat werden zusammen in eine Mikrotiterplattenkavität appliziert und konkurrieren in der Inkubationsphase um das Paratop des immobilisierten Antikörpers. In Abb. 2.7.B ist ein nicht-kompetitives Sandwich-Testformat gezeigt. Dieser Assay-Typ eignet sich besonders für größere Analyte, die verschiedene Epitope besitzen. Das Hintergrundsignal kann herabgesetzt werden, da nur ein Analyt, der an die Oberfläche bindet, ein Signal ergibt.

Die dritte Möglichkeit der Wahl eines Testformats ist die Immobilisierung des Analytderivates. Antikörper und Analyt werden zusammengemischt und in die Mikrotiterplatte gegeben. Nur der Antikörper, dessen Bindungstaschen unbesetzt sind, bindet an das Analytderivat und führt zu einem Signal.

Im Vergleich dazu wird in Abbildung 2.7.D ein fluoreszenzbasierter heterogener Immunoassay gezeigt, der Phasenseparation Fluoreszenz-Immunoassay. Der Antikörper ist mit einem Fluorophor markiert und wird mit Analyt vorinkubiert. Die belegten Antikörper können nicht an die immobilisierten Analytderivate binden und werden in eine Fluoreszenz-MTP übertragen.

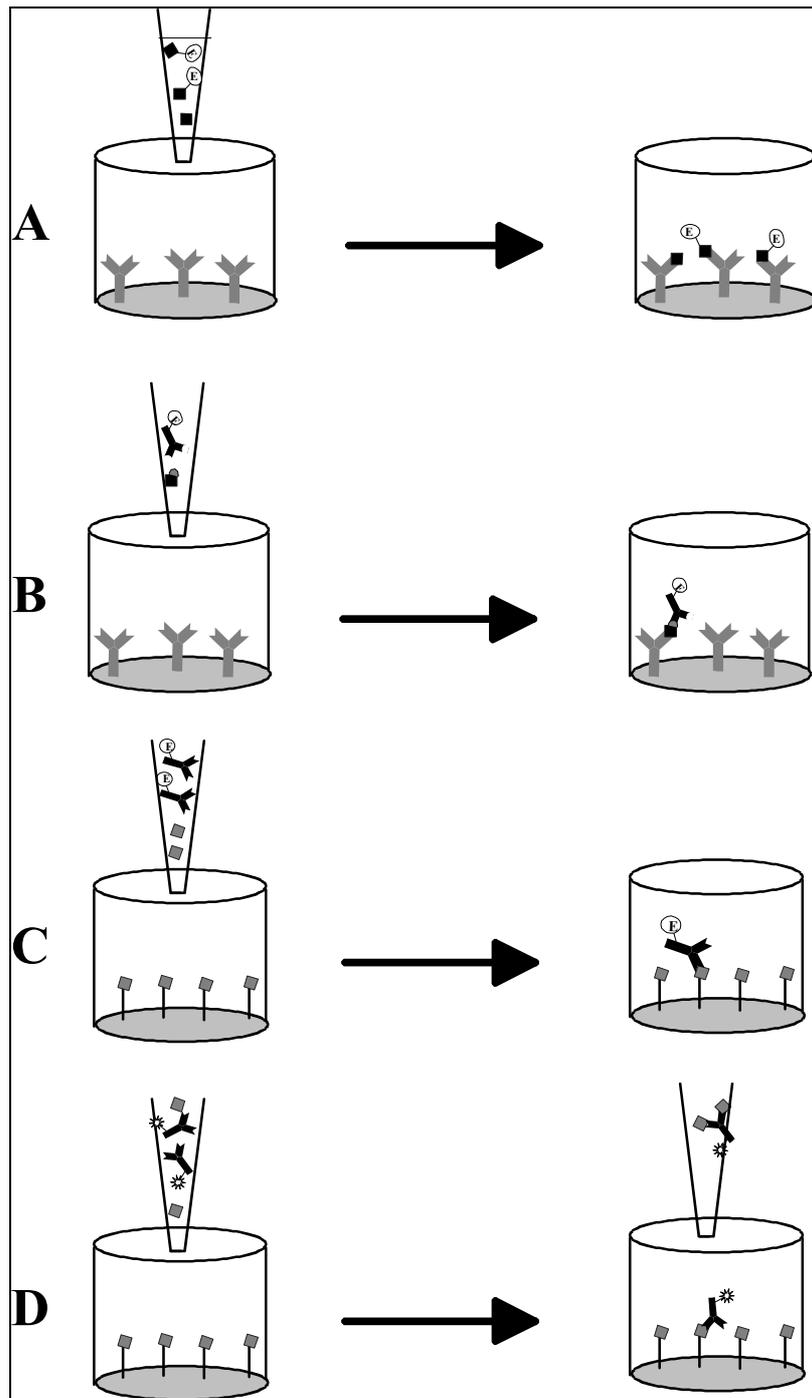


Abbildung 2.7: Heterogene Testsysteme im Mikrotiterplattenformat:

Vergleich des heterogenen ELISAs (A-C) mit dem Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay (PSFIA) in D. Bei A-C werden die Reagenzien in die Mikrotiterplatte dosiert und anschließend nach Inkubation ausgewertet. Im PSFIA in MTPs (D) wird flüssige Phase in eine Fluoreszenz-MTP transferiert und dort ausgewertet.

Direkt optische Verfahren

Neben elektrochemischen Transduktionsprinzipien finden immer mehr optische Biosensoren Einzug in die Immunanalytik. Ein Vorteil ist die direkte zeitaufgelöste Detektion der Affinitätsbindung an der Transducer-Oberfläche. Als markierungsfreie Methoden sind

reflektometrische und refraktometrische Methoden bekannt (Gauglitz, 1996). Zu den refraktometrischen Sensoren gehören die Prinzipien der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) (Jönsson, 1993), der Gitterkoppler (Tiefenthaler, 1993), der Resonant Mirror (Cush et al., 1993). Allen dieser Detektionsprinzipien ist die Änderung des Brechungsindex gemein, wenn Biomoleküle an die Oberfläche binden.

Als reflektometrische Techniken sind Ellipsometrie (Striebel et al., 1994) und die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) bekannt (Gauglitz et al., 1993). Bei einer Schichtdickenzunahme wird sowohl der Brechungsindex als auch die physikalische Schichtdicke gemessen, wobei der Brechungsindex aber eine untergeordnete Rolle spielt.

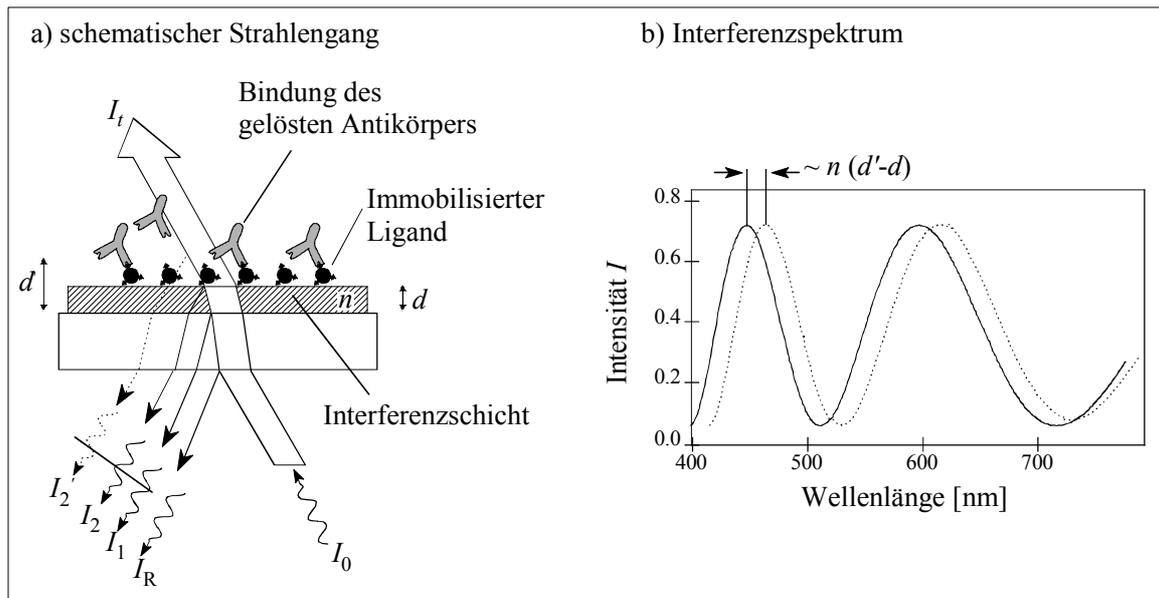


Abbildung 2.8: Prinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS): Die Überlagerung von zwei an jeder Phasengrenze teilreflektierten Strahlen (I_1 und I_2 bzw. I_2) führt in Abhängigkeit von der Phasendifferenz zu einer konstruktiven oder destruktiven Interferenz (a.). Die Weißlichtinterferenz moduliert mit den Wellenlängen (b), wobei eine Verschiebung des spektralen Interferenzmusters aufgrund einer Schichtdickenzunahme gemessen wird.

Da die RIfS-Technologie in dieser Arbeit verwendet wurde, wird im Folgenden kurz etwas näher auf sie eingegangen. 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 das Licht teilweise reflektiert (siehe Abbildung 2.8). Bei Filmen entstehen Mehrfachreflexionen an jeder Grenzschicht. Die reflektierten Strahlen überlagern sich. Durch konstruktive und destruktive Interferenz erhält man eine wellenlängenabhängige Modulation des reflektierten Lichts.

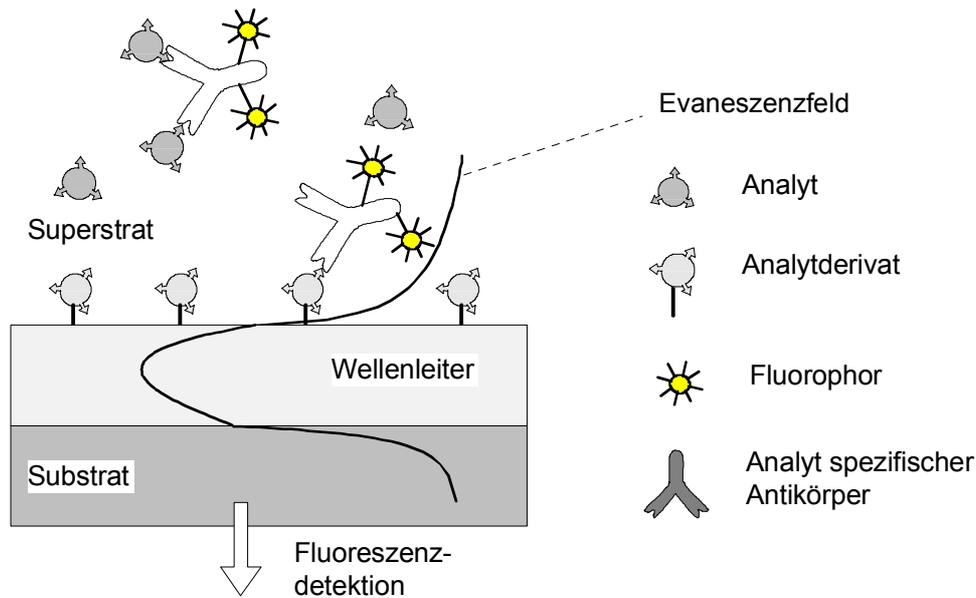


Abbildung 2.9: Oberflächennahe Fluoreszenzanregung über das Evaneszenzfeld der totalen internen Reflexion.

Neben den markierungsfreien optischen Transduktionsprinzipien werden in der Biosensorik auch oberflächensensitive Fluoreszenz-Techniken eingesetzt, die als Totale Interne Reflexion Fluoreszenz (TIRF) – Sensoren bezeichnet werden (Klotz et al., 1998). Sie beruhen auf der Ausbildung eines Evaneszenzfeldes im optisch dünneren Medium, wenn Licht unter Ausbildung von Totaler Reflexion in einen Wellenleiter eingekoppelt wird (Abb. 2.9). Das Evaneszenzfeld reicht etwa eine halbe Wellenlänge in das Umgebungsmedium hinein, so dass eine oberflächennahe Anregung zur Fluoreszenz erfolgt (Cammann, 2001).

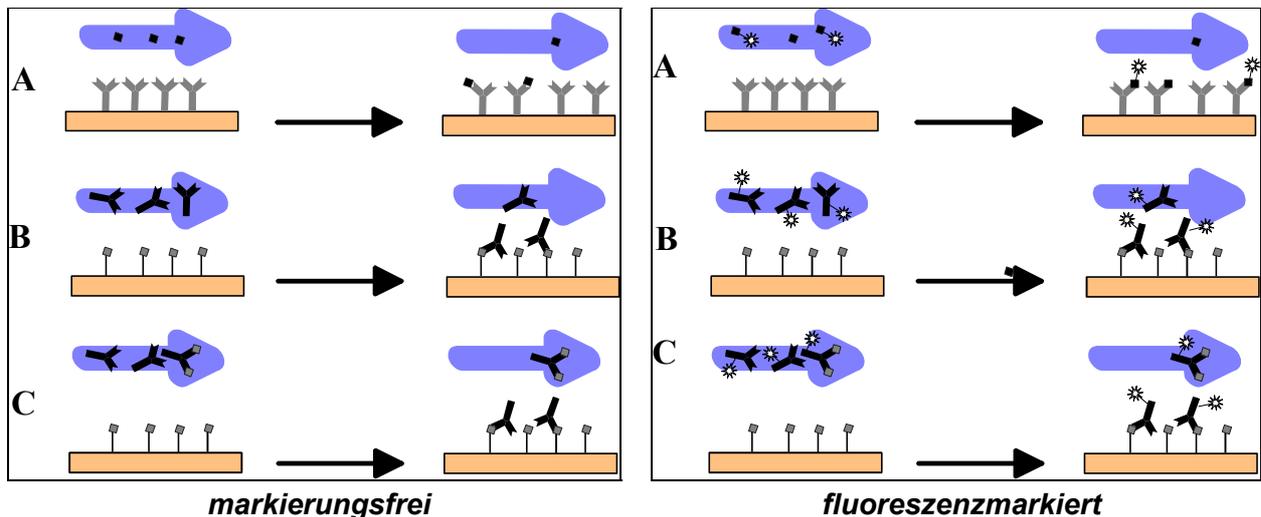


Abbildung 2.10: Vergleich der Testformate in optischen Biosensoren, die in markierungsfreie und fluoreszenzbasierte Transduktionsprinzipien unterteilt werden. Die Reagenzien werden im Fluss über die Sensoroberfläche geleitet.

Die Testformate für optische Biosensoren sind in Abbildung 2.10 dargestellt, wobei die möglichen Testformate der markierungsfreien Biosensoren mit den fluoreszenzbasierten

Biosensoren verglichen werden. Beim Testformat A wird der Antikörper an die Oberfläche gebunden und der Analyt im Flusskanal über die Transduceroberfläche geleitet. Dieses Testformat wird seltener verwendet, weil zum einen die Immobilisierungstechniken für Proteine um einiges komplizierter zu handhaben sind, als die Immobilisierung von niedermolekularen Analytderivaten. Zum anderen ist die Signaldynamik bei der Detektion von niedermolekularen Analyten geringer. Bei fluoreszenzbasierten Immunosensoren wird ein kompetitives Testformat eingesetzt. Als signalgebendes Molekül wird ein fluoreszenzmarkiertes Analytderivat eingesetzt, das mit dem Analyten um die Bindeplätze an der Oberfläche konkurriert.

Mit dem Testformat B können Antikörperkonzentrationen titriert werden. Es dient zur Charakterisierung der Oberflächen, indem verschiedene Konzentrationen über die Oberfläche geleitet werden. Dieses Testformat ermöglicht aber auch, kinetische Bindungsstudien durchzuführen.

Zur konzentrationsabhängigen Bestimmung von Analyten wird der Bindungshemmtest eingesetzt, der in Testformat C schematisch dargestellt ist. Der Antikörper wird mit der Probe vorinkubiert, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat und anschließend wird das Inkubat über den Sensor geleitet. Dementsprechend verringert sich das Signal in Abhängigkeit zur Analytkonzentration.

2.1.5 DNA-Analytik

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die genomische DNA liegt in einem Zelllysate nur in einer Kopienzahl zwischen 10 und 10^5 vor (Whitecomb et al., 1998). Diese Anzahl reicht nach den heutigen Techniken nicht aus, um ein direktes Signal durch die Hybridisierung eines nachzuweisenden DNA-Abschnittes zu generieren. Um dieses Dilemma zu umgehen, wurde in den achtziger Jahren die Polymerasekettenreaktion von Kary Mullis erfunden (Saiki et al., 1988). Die Basis der DNA-Amplifikation ist eine in-vitro-Synthese von DNA mit einer thermostabilen DNA-Polymerase. Möglich ist dies durch eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase), die eine Erhitzung auf bis zu 95 °C ohne Verlust an Aktivität aushält. Der PCR-Ansatz enthält die Komponenten DNA-Matrize (doppelsträngige DNA), Taq-Polymerase, zwei Primer, die die Enden der zu amplifizierenden DNA flankieren und alle vier Desoxynukleotid-Triphosphate. Periodisch wird die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur so eingestellt werden, dass die Reaktionsschritte Denaturierung, Anlagerung der Primer, Verlängerung der Primer und abschließend wieder Denaturierung ablaufen können (Abb. 2.11).

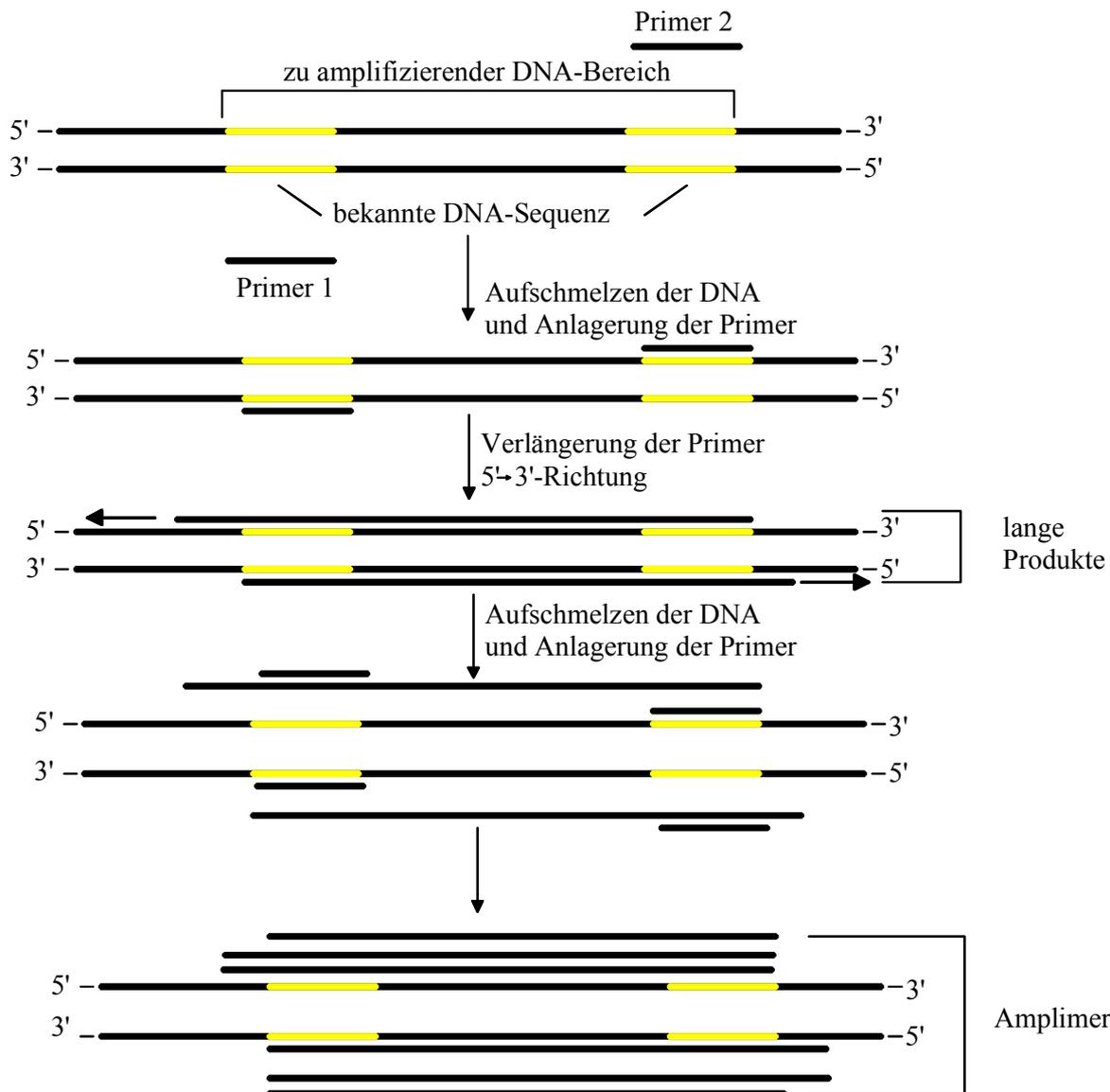


Abbildung 2.11: Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur spezifischen Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen.

Die Primer sind kurze Oligonukleotide, die jeweils die Startpunkte der DNA-Matrize festlegen. Der doppelsträngige komplementäre DNA-Abschnitt kann somit von beiden Seiten aus amplifiziert werden. Ab der zweiten Amplifikationsrunde fungieren neben der Originalmatrize auch die langen Produkte als Matrizen. Deshalb werden zusätzlich zu den zwei weiteren langen Produkten auch die DNA-Fragmente definierter Länge gebildet. Diese neu entstehenden Transkripte sind an der einen Seite durch den eingesetzten Primer und an der anderen Seite durch das Ende der Matrize begrenzt. Somit liegen am Ende des zweiten Amplifikationszyklus drei verschiedene Molekülarten vor:

- Zwei komplementäre Stränge der Originalmatrize
- Vier teilweise komplementäre Stränge (lange Produkte)
- Zwei exakt komplementäre Amplimere (begrenzt durch die zwei Primer)

Alle diese Moleküle dienen auch in den weiteren Amplifikationszyklen als Matrizen für die DNA-Polymerisation. Ausgehend von x Molekülen DNA sieht die theoretische Anzahl der Amplifikate A nach n Amplifikationszyklen wie folgt aus.

$$A = x \cdot 2^n - x - nx \quad (22)$$

Homogene Testformate zur quantitativen DNA-Analyse

Aktuelle Nachweisverfahren in der DNA-Analytik machen sich die PCR zu Nutze und verfolgen den Anstieg an PCR-Produkt direkt. Dazu eignen sich besonders Fluoreszenznachweisverfahren, die auf eine Änderung des Fluoreszenzsignals reagieren.

Der 5'-Nuclease-Assay (Taqman™) setzt Hybridisierungssonden ein, an denen jeweils an den Enden ein FRET Donor-Akzeptor-Paar gekoppelt ist (Livak et al., 1995). Die Taq DNA-Polymerase hat eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Bei der PCR-Reaktion wird von den Primern aus polymerisiert und die Hybridisierungssonde wird hydrolytisch fragmentiert, so dass der FRET-Komplex zerstört wird und die Fluoreszenz nicht mehr gelöscht wird (Morin et al., 1999). Da das gequenchte Fluoreszenz-Nukleotid nur im Hybridkomplex freigesetzt und dadurch fluoreszierend wird, ist die Entkopplung ein direktes Maß für die Menge an gebildeten Hybridkomplex und somit der nachzuweisenden Targetmoleküle, ohne, dass die im Überschuss vorhandene gequenchte Sonde abgetrennt werden muss.

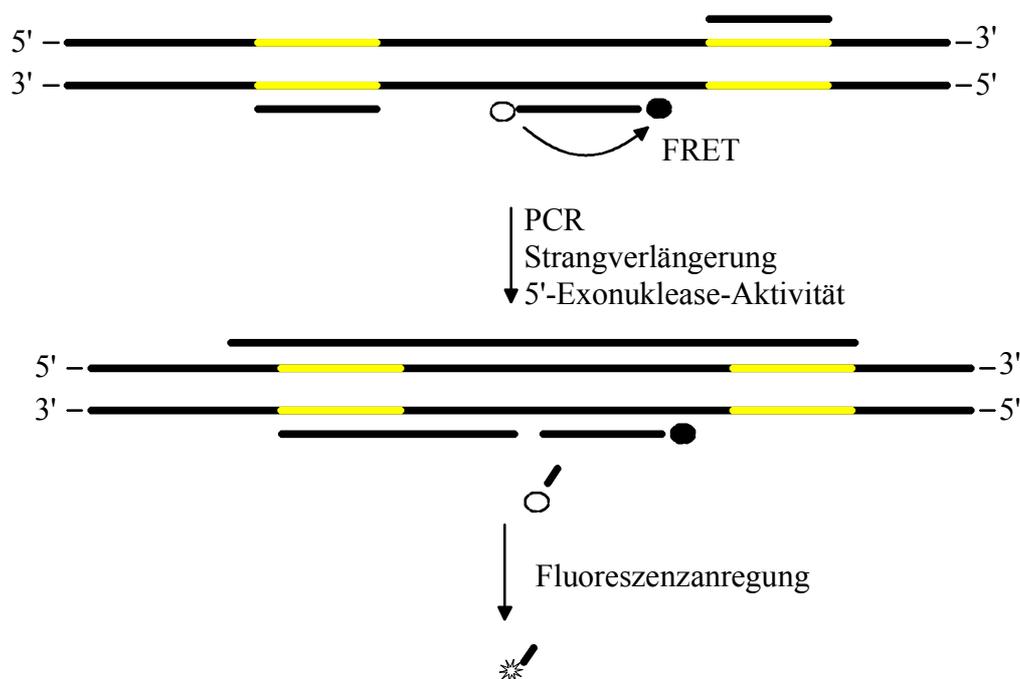


Abbildung 2.12: Prinzip des homogenen 5'-Exonuklease-Assays (TaqMan™).

Nachweisverfahren mit Molecular Beacons nutzen das Aufbrechen eines Hairpins an den Enden der DNA, wenn komplementäre DNA an die Sonde hybridisiert (Tyagi et al., 1998). Als Nachweissystem dient das Lösen eines statischen Quenchens zwischen einem Fluorophor und einem Chromophor, das durch die Nähe der beiden komplementären Enden erzwungen wird (Li et al., 2000).

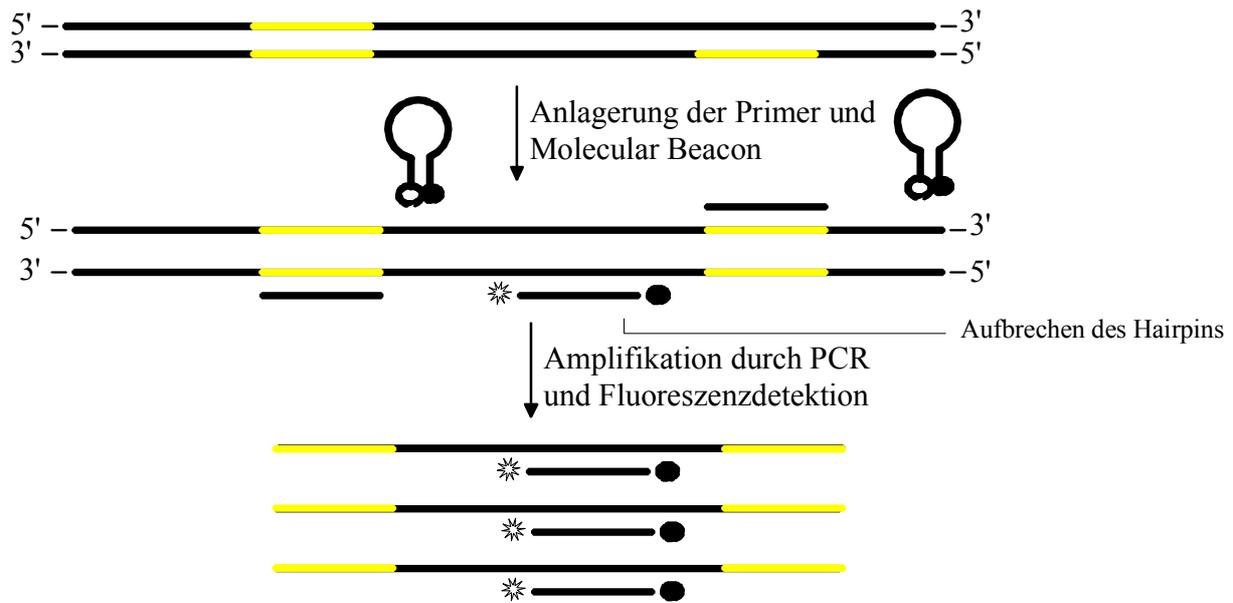


Abbildung 2.13: Prinzip der quantitativen Detektion von DNA-Sequenzen in homogener Phase mittels einer DNA-Sonde, die als Molecular Beacon bezeichnet wird.

Eine weitere Möglichkeit basiert auf interkalierenden Fluorophoren, die an doppelsträngige DNA binden. Mit dieser Methode erhält man ein Fluoreszenzsignal immer in der Polymerisationsphase, nicht aber in der Denaturierungsphase.

SNP-Diagnostik

Single nucleotide Polymorphisms (SNPs) sind einzelne Basenunterschiede in dem menschlichen Genom, die statistisch bei jeder tausendsten Base auftreten (Landegren, 1998). Sie sind die häufigste genetische Variation zwischen Individuen. Es wird angenommen, dass das Vorhandensein bestimmter SNPs mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Krankheiten korreliert. In der SNP-Analytik ist die Anforderung für ein Nachweissystem hoch. Sie müssen Sequenzunterschiede (Mutationen, Punktmutation) exakt erkennen können, müssen einen hohen Probendurchsatz zulassen und gleichzeitig einfach handhabbar sein (Whitcombe et al., 1998). Moderne Probenaufbereitungsschritte, wie sie im Invader™ Assay (Fors et al., 2000) oder im *Oligonucleotide Ligase Assay* (OLA) (Landegren et al. 1988) erfolgen, nützen zusätzlich zur Analyt-Amplifikation spezifische enzymatische Schritte, um eine Mutation genau zu detektieren (Nickerson et al., 2000).

Invader™ nutzt so genannte flap-Endonukleasen (Lyamichev, 1999). Diese erkennen im Gegensatz zu den Restriktionsendonukleasen keine spezifische Primärsequenzabfolge, sondern spezifische Strukturen, in denen sie nicht-basengepaarte 5'-Einzelstrang-Sequenzen (flap-Sonde) schneiden. Dieses Prinzip kann genutzt werden, um unter Zuhilfenahme zweier synthetischer Oligonukleotide ein Schneiden nur dann zu bewirken, wenn sich an einer Position der komplementären Basenpaarung eine Triplet-Struktur ausbildet. Die geschnittene Flap-Sonde lagert sich in einem zweiten Schritt an einer FRET-Sonde an. Es kommt zu einem Schneideereignis zwischen Donor und Akzeptor, wobei ein fluoreszierendes DNA-Fragment entsteht.

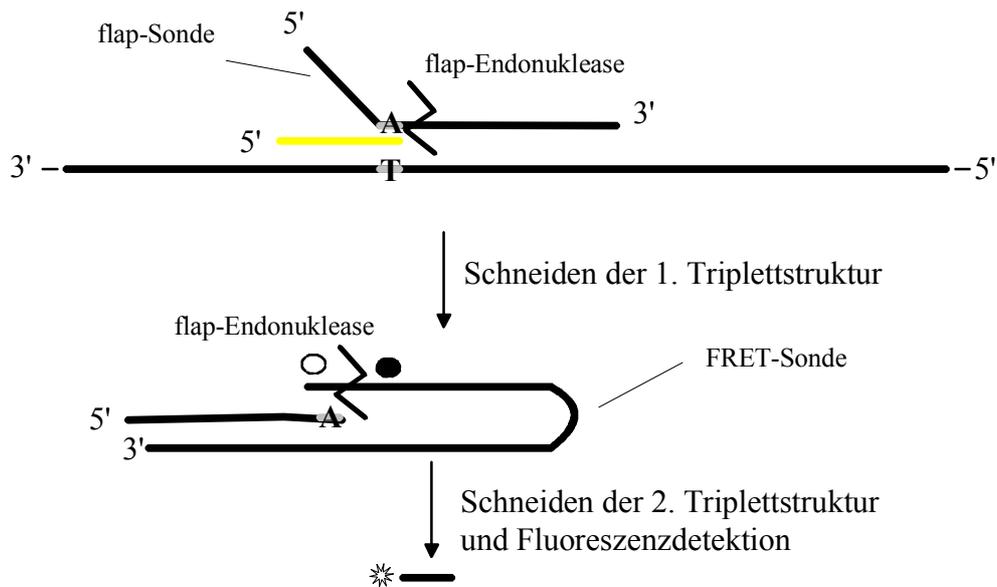


Abbildung 2.14: Prinzip des Invader-Assays™ als Detektionsprinzip in der SNP-Analytik.

Der OLA-Assay (*Oligonucleotide Ligase Assay*) basiert auf einer Verknüpfungsreaktion, wenn die perfekt gepaarten und direkt benachbarten Oligonukleotide durch eine Ligase miteinander verbunden werden (Tobe et al., 1996). Zur Analyse bekannter Mutationen stellt man Oligonukleotide her, die sich in ihrer Markierung voneinander unterscheiden und mit den allelspezifischen Oligonukleotiden an die genomische DNA binden. Nur im Fall einer perfekten Paarung kann die anschließende Ligasereaktion erfolgen. Nachfolgend werden die ligierten Oligonukleotide über eine PCR-Reaktion amplifiziert (Chen et al., 1998). Die PCR enthält sowohl einen fluoreszierenden Primer als auch einen biotinylierten Primer. Der biotinmarkierte Strang dient zur Abtrennung des Doppelstrangs. Durch Denaturierung wird der fluoreszenzmarkierte Einzelstrang abgetrennt. Die Detektion erfolgt z.B. über einen DNA-Microarray oder der Fluss-Cytometrie (Iannone, 2000).

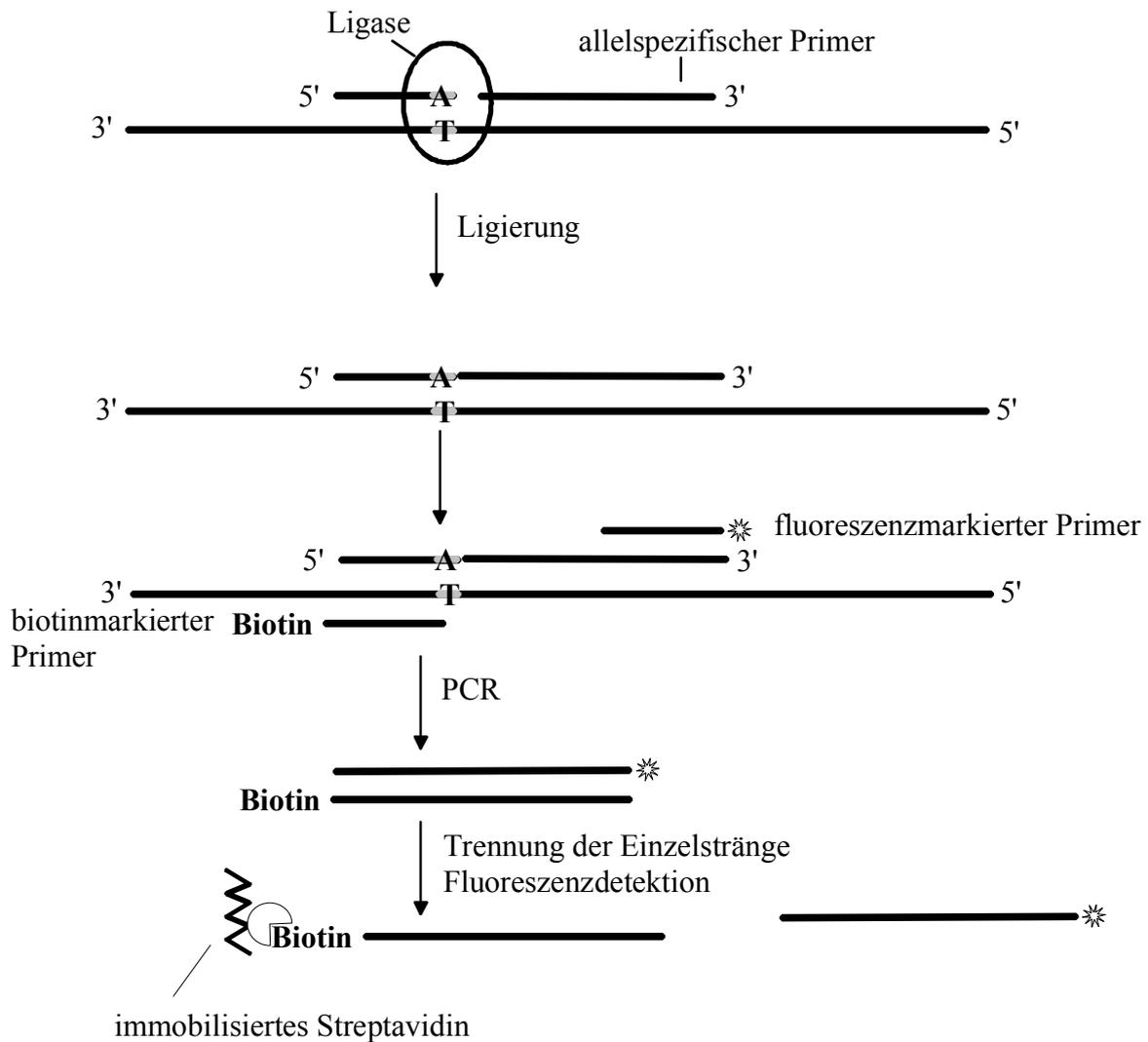


Abbildung 2.15: Prinzip des *Oligonucleotide Ligase Assay* (OLA) zur Detektion einzelner Basenunterschiede für die SNP-Analytik.

Genexpressionsanalyse

Ziel in der Genomforschung ist es, durch Änderung z.B. des Stoffwechsels auf Basis der Expression an mRNA, Rückschlüsse auf die Regulation von Zellen machen zu können (Harrington et al., 2000). Sehr wichtig kann dieser Ansatz auch für die DNA-Diagnostik von Krankheiten, wie z.B. Rheuma oder der Krebsdiagnostik sein. Das Muster an exprimierten krankheitsassoziierten Genen kann einen Hinweis auf den Krankheitszustand geben (Heller et al., 1997). Mit Abschluss des humanen Genomprojektes und der Kenntnis der Sequenzen des menschlichen Genoms sind vollständige Genexpressionsstudien möglich. Genspezifische Sequenzen werden über Microarray-Technologie auf Chipoberflächen aufgetragen (Ramsay, 1998). Die verschiedenen mRNAs werden in die stabilere cDNA umgeschrieben, und anschließend über PCR amplifiziert. Gleichzeitig können Fluorophore über die Primer eingebaut werden. Die Dekodierung erfolgt durch Detektion der Hybridisierungsereignisse über Fluoreszenz. Alternativ dazu können PCR-Fragmente auf DNA-Chips meist über Microspotting-Verfahren aufgetragen werden und die Dekodierung kann über fluoreszierende DNA-Sonden erfolgen. Allgemein erlaubt die Microarray-Technologie durch den hohen Parallelisierungsgrad eine simultane Analytik und erschließt

einem den Einblick in die differentielle Expression von Genpopulationen zwischen dem Referenzzustand und dem veränderten Zustand des Organismus (Watson et. al., 1998).

2.1.6 Microarrays

Biologisch aktive Moleküle werden in Form eines Microarrays auf einer festen Substratoberfläche immobilisiert und über einen markierten spezifischen Bindungspartner detektiert. Ein Biochip zeichnet sich durch eine hohe Moleküldichte aus. Dies wird erreicht, indem die Biomoleküle gezielt in mikroskopisch kleine Felder, den Microarrays, aufgetragen werden. Ein Feld besteht aus einzelnen Spots, die eine Größe von 10 µm bis 400 µm haben. Die Microarrays können über drei verschiedenen Technologien hergestellt werden: Photolithografie, Microspotting und Ink-Jet (Shalon et al., 1996). Die Detektion erfolgt zumeist über Fluoreszenzmarkieren und anschließend eine bioinformatische Auswertung der riesigen Datenmengen. Die größten Entwicklungsfortschritte erfolgten in der DNA-Chip-Technologie. Aber auch Proteine oder andere biologisch aktive Moleküle finden ihre Anwendung in Protein-Chips und Labor-Chips, sollen aber nicht weiter erläutert werden.

Die Microarray-Technologie revolutionierte in den 90er Jahren hauptsächlich die Genomforschung durch erste Ansätze der hochparallelen Genexpressionsanalyse. Sie stellt ein erstes miniaturisiertes heterogenes nicht-kompetitives Testsystem auf planaren Oberflächen dar. Heutzutage sind Biochips mit mehr als 400.000 Erkennungsfeldern pro Chip-Oberfläche erhältlich, die die Firma Affymetrix als GeneChip™ anbietet (Wallace, 1997). Die Informationsdichte ist so hoch, dass die vollständige genomische Information eines Säugetiers auf einem Chip enthalten ist. Eine Vielzahl von kommerziellen Biochips ist mittlerweile auf dem Markt. Es werden Genexpressionsstudien, SNP-Analytik, aber neuerdings auch Proteinbindestudien durchgeführt (Walter et al. 2000).

Grundlegend basiert der DNA-Chip auf dem Hybridisierungsereignis komplementärer Oligonukleotid-Stränge. Zwei komplementäre einzelsträngige Oligonucleotide binden spezifisch, wenn sie sich gegenläufig einander anlagern. Ist das Fängermolekül mit einer bekannten Sequenz (Sonden-DNA) auf einer festen Oberfläche immobilisiert und die gesuchte DNA (Ziel-DNA) fluoreszenzmarkiert, so kann dieses Hybrid als positives Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Pirrung et al., 2000).

Jede Position der Sonden-DNA in einem Array muß definiert sein, um sie nachher wieder identifizieren zu können. Für die Herstellung dieser Microarrays werden drei verschiedene Technologien angewandt, die grundlegend für die Anstrengungen der DNA-Chip-Hersteller sind, sich durch Modifizierung eines Verfahrens voneinander abgrenzen zu können. Das photolithografische Verfahren synthetisiert die Oligonucleotide direkt (in situ) auf der Substratoberfläche, während im piezoelektrischen (Ink-Jet) bzw. Microspottingverfahren Flüssigkeitströpfchen auf die Oberfläche aufgetragen werden. Die Tröpfchen enthalten Oligonucleotide, die in einem separaten Prozess synthetisiert und mit einem Linker versehen werden, mit dem sie auf der Oberfläche immobilisiert werden können. Der Unterschied der beiden Mikrodosierverfahren liegt bei der Abgabe der Flüssigkeiten. Eine Nadel berührt die Oberfläche beim Microspotting-Verfahren, während sich im Ink-Jet-Verfahren ein Tropfen von einem Piezokristall ausgelösten Druckwelle ablöst. Um den heutigen Qualitätsstandards gerecht zu werden, bedarf es in allen drei Verfahren einer exakten Kontrolle des Herstellungsprozesses der Microarrays auf einem DNA-Chip.

Hohe Anforderungen werden aber nicht nur der Hardware beigemessen. Die Oligonucleotidsequenzen müssen eine spezielle Abfolge haben, um eine hohe Spezifität zu

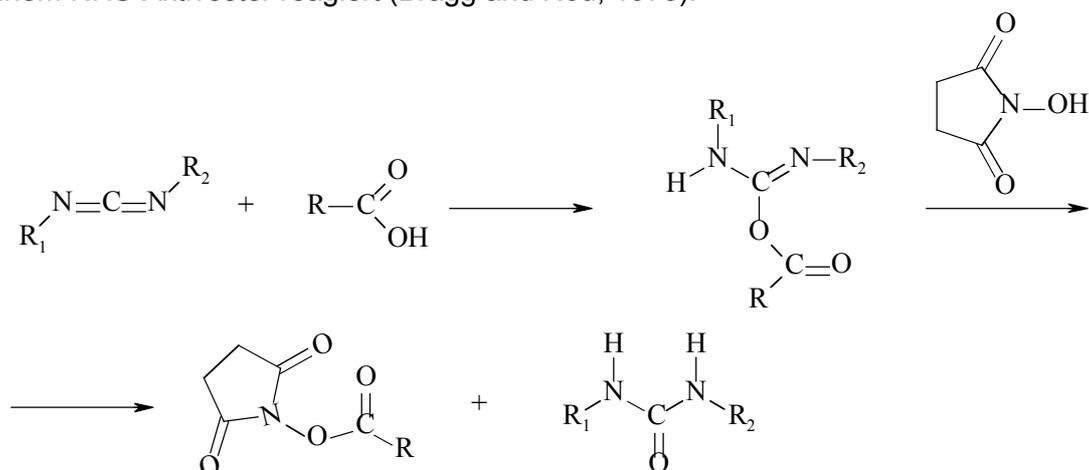
gewährleisten. Als Oligonukleotide werden nicht nur DNA- oder RNA-Moleküle verwendet. PNA-Moleküle scheinen nach dem bisherigen Stand besonders geeignet zu sein (Rinck 1999). Es handelt sich hierbei um Nukleotide, welche nicht über eine Phosphodiesterbindung miteinander verbunden sind, sondern über eine Peptidbindung (Nielsen, 1991). Diese PNA-Moleküle sind ungeladen und erfahren somit bei enger Packung auf dem Chip keine gegenseitige Abstoßung. Dies ist für die Hybridisierung von Vorteil (Jensen, 1997).

Die nachzuweisende Probe muss zuerst aufgearbeitet werden. Je nach Probe, müssen Zellen aufgeschlossen und die Moleküle aufgereinigt werden. Aus der Probe erhält man eine noch nicht nachweisbare Anzahl an Ziel-DNAs. Deswegen werden definierte DNA-Sequenzen über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dieses Amplifikat wird auf den DNA-Chip aufgetragen (Prix et al., 2002). Die Detektion der Hybridisierungsereignisse zwischen immobilisierten Oligonukleotiden und Ziel-DNA erfolgt hauptsächlich über Fluoreszenzmarkierung. Einzelne Spots leuchten auf, bei denen zuvor ein Hybridisierungsereignis stattgefunden hat. Durch Messung der Signalintensität ist eine Quantifizierung möglich. Aber auch andere Detektionsmethoden wie MALDI-TOF (Leushner und Chiu, 2000), Chemilumineszenz (Cheek et al., 2001), Lichtstreuung an Goldpartikeln (Cao et al., 2002), Radioaktivität (Whitney und Becker, 2001) und viele mehr finden bereits ihre Anwendung.

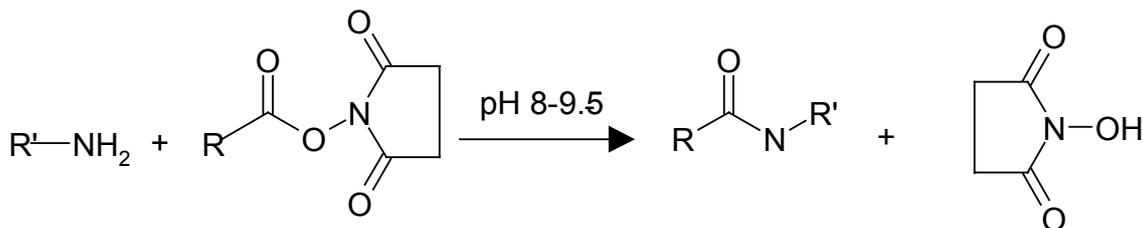
2.2 Kopplungschemie mit Biomolekülen

2.2.1 Kopplung von Farbstoffen an Biomoleküle

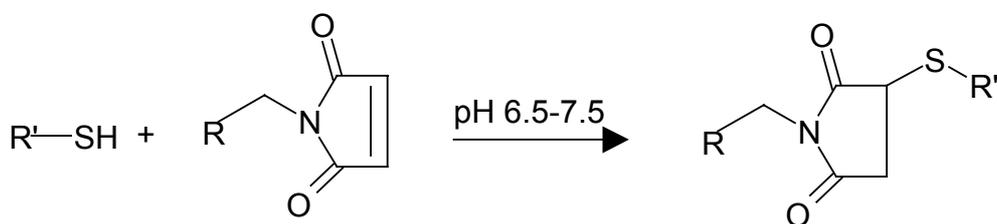
Farbstoffmoleküle müssen für die Kopplung an Biomoleküle reaktive Gruppen besitzen, die mit definierten funktionellen Gruppen der Biomoleküle reagieren können. Proteinen enthalten z.B. primäre Aminogruppen bzw. Thiolgruppen der entsprechenden Aminosäuren Lysin und Cystein, an die aktivierte Farbstoffkomplexe kovalent gebunden werden können. Dazu werden die Farbstoffe am einfachsten mit Carboxylgruppen modifiziert. Zur Kopplung an Aminogruppen wird N-Hydroxysuccinimid verwendet, das in Anwesenheit von Carbodiimiden zu einem NHS-Aktivester reagiert (Bragg and Hou, 1975).



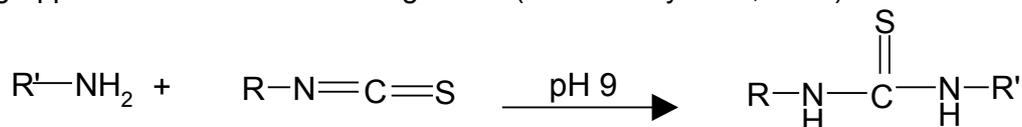
Um stabile NHS-Ester herzustellen, muss die Aktivierung der Carboxylgruppen in wasserfreiem Medium ausgeführt werden. Zur Kopplung an Proteine kann der Farbstoff-NHS in kristalliner Form zugegeben werden. Der Aktivester bildet unter basischen Bedingungen ein Amid mit dem ϵ -Amin der Lysinseitenkette.



Die kovalente Anbindung an Thiolgruppen erfolgt via Maleimide. Maleimide sind Derivate einer Reaktion vom Maleinanhydrid und Ammoniak. Die Doppelbindung der Maleimide kann eine Alkylierungsreaktion mit Thiogruppen bei pH 6.5–7.5 eingehen (Heitz et al, 1968). Dabei ist die Reaktionsratenkonstante tausendfach höher als die Reaktion mit Aminen. Dies ist ein Vorteil wenn spezifisch z.B. durch genetische Mutationen eine Cysteingruppe in das Protein eingebaut wird und die Kopplung an dieser Thiolgruppe abläuft.



Weitere bekannte Aktivierungsmoleküle sind Isothiocyanate, die ebenfalls mit primären Aminogruppen eine stabile Verbindung bilden (Podhradsky et al., 1979).

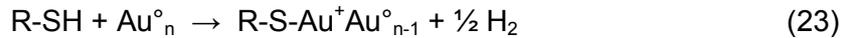


Bei der Markierung von synthetischer DNA können die Kopplungsprotokolle zwar nicht vollständig übernommen werden, es können aber die gleichen aktivierten Farbstoffe verwendet werden. DNA enthält von sich aus weder Amino- noch Thiolgruppen, die sich für eine Kopplungsreaktion eignen. Bei der DNA-Synthese wird der DNA-Strang vom 3'-Ende zum 5'-Ende synthetisiert, wobei das 3'-Ende an einen Harzträger verankert ist. Am einfachsten ist eine Endmarkierung am 5'-Ende der DNA, indem man zuvor einen Aminolinker einführt und im letzten Schritt den aktivierten Farbstoff ankoppelt. Dies kann heutzutage mittels Syntheseroboter automatisiert erfolgen. Die Markierung am 3'-Ende ist aus diesem Grund etwas komplizierter. Eine Möglichkeit besteht darin, einen Harzträger zu verwenden, der den Farbstoff enthält (Mullah et al. 1998). Dazu muss der Farbstoff aber stabil gegenüber den Reagenzien sein. Für die Endmarkierung an beiden Seiten eignet sich auch die Einbringung eines Thiolinkers am 3'-Ende und eines Aminolinkers am 5'-Ende, dann kann postsynthetisch an den jeweiligen Seiten ein Maleimid- bzw. NHS-Ester-Farbstoff angekoppelt werden.

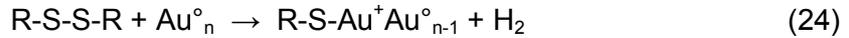
2.2.2 Oberflächenchemie an Goldoberflächen

Gold stellt für die Herstellung biomimetischer Schichten eine vorzügliche Oberfläche dar. Schwefelhaltige organische Verbindungen wie Alkanthiole, Dialkylsulfide und Dialkyldisulfide haben eine hohe Affinität zu Edelmetalloberflächen. Dabei kommt es zur Ausbildung so genannter Self-Assembled-Monolayers (SAM), indem es zu einer oxidativen Addition gefolgt

von einer reduktiven Elimination von Wasserstoff an der Grenzfläche kommt. Folgender Mechanismus gilt als hypothetisch, da die Bildung von Wasserstoff bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte (Ulman, 1991; Ulman 1996):



Im Falle von Disulfiden wird folgender Mechanismus angenommen



Oberflächencharakterisierungsmethoden wie Ellipsometrie, XPS oder Kontaktwinkel haben keinen Unterschied bei der Bildung der SAM der beiden Spezies gezeigt. Kinetische Untersuchungen ergaben eine Folgereaktion. In einem ersten schnellen Schritt, der Initialphase, lagert sich Alkylthiol an die Metalloberfläche an und in einem nachfolgendem langsameren Schritt kommt es durch Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Alkylresten zu einer Orientierung an der Oberfläche (Ferretti et al., 2000). Die Packungsdichte und Belegungsdichte hängt stark von der Alkylrestlänge ab, weswegen man meist Alkylreste mit über 10 C-Atomen für die Ausbildung der SAM verwendet.

Will man eine biologische Schicht auf Goldoberflächen aufbauen, so muss die Oberflächenchemie biokompatibel sein. Das einfachste ist, Carboxygruppen mit Aminogruppen zu einer Peptidbindung zu verknüpfen. Da man im wässrigen Medium arbeitet, wird als Kopplungsmolekül ein wasserlösliches Carbodiimid (EDC) verwendet (Patel et al., 1998). Als ein geeignetes Alkylthiol hat sich die 11-Mercaptoundecansäure herausgestellt, die mit den Aminogruppen von Proteinen oder aminomodifizierter synthetischer DNA reagieren kann.

In der heterogenen Immunanalytik werden zum Teil die Analytderivate an die Oberfläche immobilisiert. Niedermolekulare Analyte werden meist mit einem proteingekoppelten Analytderivat immunisiert, das dementsprechend zuvor carboxyliert wurde. Hier gestaltet sich die Oberflächenchemie etwas komplexer, weil die 11-Mercaptoundecansäure zunächst an der Oberfläche mit einem Diaminoalkan umgesetzt werden muss. Der Grund hierfür liegt darin, dass bislang noch kein geeignetes heterobifunktionelles Thiol mit einer Aminogruppe zugänglich ist, außer dem Cysteamin mit der Strukturformel $\text{H}_2\text{NC}_2\text{H}_4\text{SH}$ (Wirde et al., 1999). Dies bildet jedoch einen zu kurzen Alkylrest, weswegen dieses Thiol für eine direkte biomolekulare Wechselwirkung an der Oberfläche zu kurz ist.

2.2.3 Oberflächenchemie an Kunststoffen

Arbeitet man mit biochemischen Nachweissystemen für die in-vitro-Diagnostik, werden oftmals Kunststoffoberflächen statt Glasoberflächen eingesetzt. Ziel ist es, preiswerte Einwegprodukte zu verwenden. So besteht z.B. die Nanotiterplatte aus Kunststoff, welche um ein Vielfaches günstiger ist. Eine Kunststoff-NTP kann im Spritzgussverfahren in Massen hergestellt werden. Der Herstellungsprozess einer Nanotiterplatte aus Glas oder Silizium ist um ein Vielfaches aufwendiger, weil sie über mikrosystemtechnische Verfahren hergestellt wird. Die Oberflächenchemie für biomimetische Schichten ist auf Glas bereits etabliert, auf Kunststoff müssen alternative Konzepte erstellt werden. Dies liegt hauptsächlich an der chemischen Robustheit von Glas. Kunststoffe sind lösungsmittlempfindlich, zum Teil hitzelabil und haben meist nur wenige funktionelle Gruppen, die sich für eine Kopplungschemie eignen.

Adsorptive Beschichtung von Kunststoffen

Probenträger wie Mikrotiterplatten sind gängigerweise aus Kunststoff. Meistens sind sie aus Polystyrol oder Polypropylen gefertigt. Besonders Polystyrol hat sich als ein geeignetes

Material erwiesen, Proteine adsorptiv zu binden (Stevens, 1995). Die hydrophoben Bestandteile der Proteine interagieren über van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen mit den Kunststoffoberflächen. Es bindet maximal eine Protein-Monolage an die Oberfläche. Die Bindekapazität hängt hauptsächlich vom pI-Wert der Proteine ab. Dieser Wert gibt den isoelektrischen Punkt an, bei dem sich die ionischen Ladungen ausgleichen. Die Bindekapazitäten sind z.B. für Rinderserumalbumin (BSA) 2.5 mg/m^2 und für Immunglobuline 3 mg/m^2 an Polystyrol (Bangs, 1999). Die maximale Bindung ist durch sterische Effekte und repulsive Kräfte bei einer Gleichverteilung an der Oberfläche erreicht. Die adsorptive Protein-Beschichtung von Kunststoffen eignet sich hervorragend für heterogene Immunoassays, wobei entweder der Antikörper direkt oder das Analytderivat via BSA an die Oberfläche immobilisiert wird. Die Fc-Region von IgG-Antikörpern besitzt hydrophobe Bereiche, so dass die Antikörper bildlich gesprochen aufrecht an die Oberfläche binden und somit keine Bindungsaktivität verloren geht. Die Bindung ist auch verhältnismäßig stabil, so dass die nötigen Waschschriffe in Immunoassays keinen Nachteil darstellen.

Kovalente Bindungen an Kunststoffen

Zur kovalenten Anbindung an die Kunststoffoberfläche müssen funktionelle Gruppen eingebracht werden, ohne dass sich die Form verändert. Kunststoffe können z.T. sehr leicht durch Hitze, Lösungsmittel oder oxidierende Säuren verformt werden. Glasoberflächen werden mit stark oxidierenden Lösungen wie Pyranhia-Lösung aktiviert. Die Oberflächenchemie läuft mit hoher Effizienz meist in organischen Lösungsmitteln unter Wasserausschluss ab. Die Oberflächenchemie auf Glasträgern lässt sich nicht auf Kunststoffe übertragen. Für die kovalente Anbindung an Kunststoffe sind radikalbildende Reaktionen an der Oberfläche sinnvoll. Es gibt vorwiegend zwei Methoden, mit denen man Radikale erzeugen kann. Das eine ist die Immobilisierung von heterobifunktionellen photoreaktiven Crosslinkern (Photolinker) und das zweite ist die plasmainduzierte Pflropfpolymerisationsreaktion. Diese beiden Methoden werden im Folgenden vorgestellt und miteinander verglichen.

Photolinker sind Moleküle, die sowohl eine Gruppe besitzen, die eine photoinduzierte radikalische Reaktion auslöst, als auch eine funktionelle Gruppe zur Anbindung an Biomoleküle. Zudem sollte die Anregungsenergie nicht zu hoch sein, um die Molekülstruktur der Biomoleküle zu zerstören. Bekannte photoreaktive Komponenten für die Bioanalytik sind Benzophenone (Dorman and Prestwich, 1994), Anthrachinone (Koch et al., 2000), Phenylazide (Brunner, 1993), Diazirine (Sigrist et al. 1995) und bestimmte Diazoverbindungen (Hermanson, 1996), welche allesamt bei einer Wellenlänge größer als 300 nm absorbieren (Abb. 2.16).

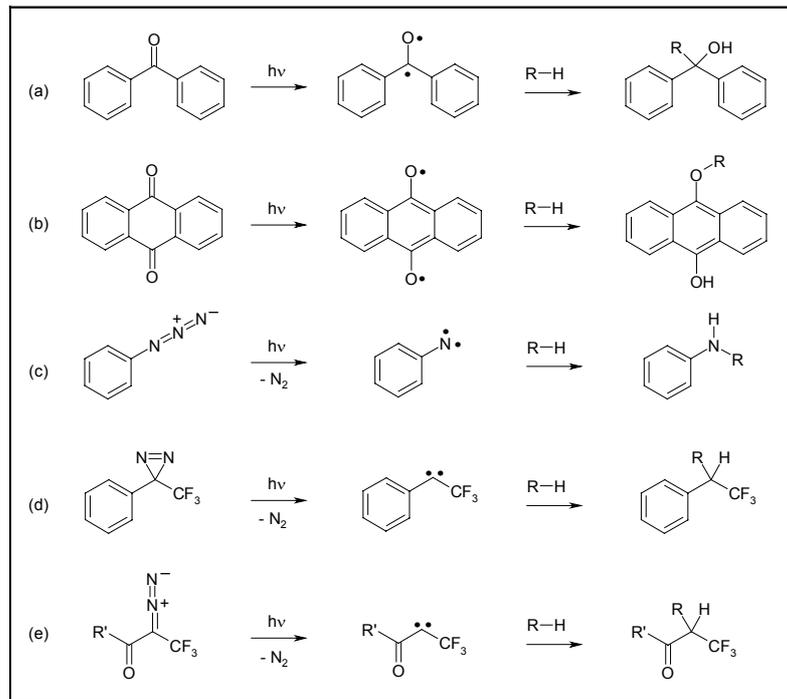


Abbildung 2.16: Bei einer Wellenlänge größer als 300 nm photochemisch aktivierbare Moleküle. A.) Benzophenone b.) Anthraquinone c.) Phenylazide d.) Diazirine e.) Diazoverbindungen.

Desweiteren sollten sie für die Immobilisierung an Kunststoffoberflächen hydrophob sein, damit sie zunächst adsorptiv an die Oberfläche binden können. Nähere Details der Reaktionsmechanismen sind in der Diplomarbeit von Frau Dankbar (Dankbar, 2002) enthalten.

Einen geeigneten Photolinker für die kovalente Kopplung an Polymeroberflächen stellte die 4-Benzoylbenzoesäure (BBS) dar [Naumann, 2002]. Durch Anregung mit elektromagnetischer Strahlung findet bei einer Festphasenreaktion zunächst ein $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang ($\lambda=338$ nm) in den niedrigsten angeregten Singulettzustand S_1 statt. Dieser Zustand wird sehr schnell unter Interkombination in einen Triplettzustand T_1 umgewandelt, wobei die Quantenausbeute nahezu bei 1 liegt. Im diradikalischen Triplett-Zustand besitzt das elektronenarme Sauerstoffatom elektrophilen Charakter und steht daher mit schwachen CH- σ -Bindungen (z.B. Alkylreste) in Wechselwirkung, was zu einer Wasserstoffabspaltung führt. Dazu muss in der Festphase aber erst in einen höheren Triplettzustand T_3 angeregt werden ($\lambda=317$ nm), aus dem eine irreversible Photochemie stattfinden kann (Bräuchle et al., 1981). Ein Nachteil dieser Reaktion kann Sauerstoff sein, der durch Beschleunigung des Relaxationsvorgangs vom Triplett- in den Singulett-Zustand die Photoreaktion unterbinden kann (Ma et al. 2000).

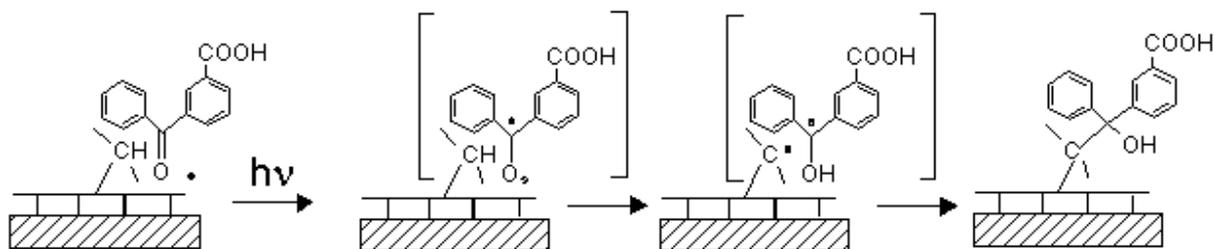


Abbildung 2.17: Photochemische Reaktion von 4-Benzoylbenzoesäure auf Kunststoffoberflächen.

Um Biomoleküle auf Kunststoffe zu immobilisieren, sind zwei Strategien denkbar. Eine Möglichkeit besteht darin, das Benzophenonderivat zuerst an das Biomolekül zu koppeln, anschließend damit die Kunststoffoberfläche zu beschichten und in einem letzten Schritt die Photoreaktion durchzuführen. Dieser Weg ist sinnvoll, wenn die UV-Bestrahlung spezifisch ist und keine ungewollten Nebenprodukte entstehen, was aber besonders bei farbstoffmarkierten Biomolekülen der Fall sein kann. Man kann aber das Benzophenonderivat auch direkt auf die Oberfläche geben, belichten und im letzten Schritt das Biomolekül kovalent an die Oberfläche koppeln. Dazu bedarf es jedoch einer geeigneten Oberflächenchemie, die im wässrigen Medium durchführbar ist. Generell verlaufen Reaktionen in Lösung schneller und effizienter ab, weil es zu keiner Diffusionslimitierung kommt.

Eine weitere Methode zur Funktionalisierung von Kunststoffoberflächen ist die plasmainduzierte Pfropfreaktion. Dazu wird im Vakuum über eine Hochspannung ein Plasma erzeugt. Sind Gasmoleküle in der Plasmaphase, so werden diese radikalisch. Diesen Effekt kann man nutzen, um Oberflächen mit Sauerstoff zu oxidieren. Dabei entstehen Aldehyde und Carboxy-Gruppen an der Oberfläche (Friedrich, 1995). Eine weitere Möglichkeit ist das Aufpfropfen von z.B. Acrylsäure (König et al., 2002). Die Plasmareaktion ist eine effektive Methode, die ohne starkes Erwärmen der Kunststoffoberflächen funktionelle Gruppen einbringen kann, so dass die plasmainduzierte Pfropfreaktion eine Alternative zu den Photoreaktionen darstellen kann.

2.2.4 Oberflächencharakterisierung

Die Oberflächenmodifikationen, die für ein heterogenes Nachweisverfahren unternommen werden, werden mit verschiedenen Charakterisierungsverfahren untersucht. Sie sollen einen Aufschluss über die Beschaffenheit der biomimetischen Schicht geben. Wichtig ist vor allem der Nachweis der funktionellen Eigenschaften, also das Bindeverhalten. Dazu eignen sich optische Biosensoren wie RfS oder SPR (Patel et al., 1997) hervorragend. Will man mehr über den Schichtaufbau verstehen, um prinzipiell das Immobilisierungsverfahren zu validieren, sind Methoden wie Ellipsometrie (Vanderah et. al, 2000) und AFM (Huang et al., 2000) geeignet. Über Ellipsometrie erhält man mit einer hohen Genauigkeit physikalische Schichtdicken im Nanometerbereich und den Brechungsindex. AFM ist ein bildgebendes Verfahren, das die Oberfläche mit einer dünnen Nadel abtastet. Dabei lernt man die räumliche Struktur der immobilisierten Schichten kennen, was insbesondere für das Verständnis des Bedeckungsgrades oder der unspezifischen Bindung an die Oberfläche wichtig ist. XPS (Yang et al., 1997; Delamarche et al., 1996), SIMS und ATR-IR-Spektroskopie (Reiter, 2002) eignen sich besonders zur Untersuchung der chemischen Eigenschaften und können die Anwesenheit der Immobilisate direkt nachweisen.

Kontaktwinkelmessungen geben Aufschluss über die Oberflächenspannung und die Oberflächenrauigkeit.

Die Untersuchung dreidimensionaler Oberflächen, wie es z.B. die Nanotiterplatte ist, eignet sich nur gering für Oberflächencharakterisierungen. Dementsprechend wird die Oberfläche auf eine zweidimensionale Ebene transferiert, indem auf einem Silizium- oder Glasträger eine vergleichbare Schicht aufgetragen wird. Die Oberflächenchemie kann mit den oben genannten Methoden untersucht und anschließend auf die dreidimensionale Problemstellung übertragen werden.

2.3 Mikrodosierung

Mikrodosierung bedeutet eine präzise Abgabe von Flüssigkeitsmengen in einem Volumenbereich kleiner als einem Mikroliter. Ab diesem Volumen reißt ein Tropfen von einer Dosierkapillare nicht allein durch seine Gewichtskraft ab. Die Adhäsionskräfte haben einen immer größeren Einfluss. Durch den Einsatz dünner Kapillaren mit einem Innendurchmesser kleiner als 100 μm und den Einsatz von Aktuatoren, die auf eine Flüssigkeitssäule einen Druck ausüben, wird den Adhäsionskräften entgegenwirkt. Reißt ein Tropfen mit einem Durchmesser kleiner als 100 μm ab, erreicht man die Dosierungen einzelner Tropfen mit einem Volumen von etwa 500 pL.

Spritzenpumpen, die im HTS zur Dosierung in 96er MTP oder 384er MTP eingesetzt werden, arbeiten bis in den Bereich einiger Mikroliter. Das Bestreben, die Kavitätendichte noch weiter zu erhöhen, indem man unter einem Mikroliter Kavitätenvolumen auskommt, aber auch im Bereich der Microarray-Technologie, werden Mikrodosierverfahren benötigt, die in einem Volumenbereich von Nanoliter bis Pikoliter auskommen (Rose, 1999). Die Flüssigkeitsmengen müssen schnell und präzise abgegeben werden, um den angestrebten hohen Durchsatz zu gewährleisten. Es sind eine Vielzahl von Nanoliter-Dosiersystemen bekannt (Ink-Jet-Druckköpfe, Bubble-Jet-Druckköpfe, TopSpot u.a.) (Graveson et al., 1993; Schena et al., 1998;). Die unterschiedlichen Dosierprinzipien werden im Folgenden näher beleuchtet und zuvor eine theoretische Grundlage geschaffen.

2.3.1 Dosierung einzelner Tropfen

Herkömmliche Dosiersysteme arbeiten überwiegend mit Dosierpumpen, die eine Flüssigkeitsmenge in einer Kapillare durch Druck aktiv verdrängen, weswegen sie auch als Aktuatoren bezeichnet werden. Die verdrängte Flüssigkeit bildet einen kugelförmigen Tropfen am Rand aus.

Ein freifliegender Tropfen wird gebildet, indem der Tropfen sich von der Berandung einer vertikal gehaltenen Kapillare abschnürt, die mit der Dosierflüssigkeit gefüllt ist. Die Adhäsionskräfte an der Phasengrenze Kapillarrand/Flüssigkeit stehen im Gleichgewicht mit der Gewichtskraft, die den Tropfen nach unten zieht. Die verdrängte Flüssigkeitsmenge bildet einen kugelförmigen Tropfen mit dem Tropfenradius R_T an der Kapillare mit folgender Gewichtskraft aus:

$$F_G = \frac{4}{3}\pi R_T^3 \rho g, \quad (25)$$

wobei g die Erdbeschleunigung und ρ die Dichte der Flüssigkeit ist.

Die Adhäsionskraft ist abhängig von der Länge der inneren Berandung der Kapillaröffnung mit Innenradius r_I und der spezifischen Oberflächenenergie der Flüssigkeit ε :

$$F_a = 2\pi\varepsilon r_I \quad (26)$$

Dementsprechend ändert sich der Tropfenradius, vorausgesetzt die Adhäsionskraft ist im Gleichgewicht mit der Gewichtskraft, mit der dritten Potenz zum Kapillarrinnenradius r_l :

$$R_T = \sqrt[3]{\frac{3\varepsilon r_l}{2\rho g}} \quad (27)$$

Da man daran interessiert ist, kleinste Tropfen zu dosieren, wird der Kapillardurchmesser möglichst klein gewählt. Dieser Maßnahme ist jedoch schnell eine Grenze gesetzt. Die Gewichtskraft verringert sich um die dritte Potenz zum Kapillarradius. Je kleiner der Radius gewählt wird, desto stärker nehmen die Oberflächenkräfte Einfluss auf das Dosiersystem, bis dass sich der Tropfen nicht von der Kapillare mehr lösen kann.

Es gibt nun zwei Wege, die eingeschlagen werden können. Entweder der Tropfen wird auf einer Oberfläche abgesetzt oder es wird aktiv für kurze Zeit über eine Pumpe ein so großer Druck angelegt, dass eine feine Flüssigkeitssäule mit sehr hoher Beschleunigung die Kapillare verlässt. Dieser Vorgang wird als Zertropfen bezeichnet. Demgegenüber spricht man von Abtropfen, wenn sich der Tropfen aufgrund seines Gewichts von der Kapillare löst. Der aktiv aufgewandte Druck wirkt den Kapillarkräften und den Trägheitskräften in der Kapillare entgegen. Um eine Flüssigkeit in einer Kapillare zu verdrängen, muss folgender Druck aufgewendet werden, um dem Staudruck (Term 1) mit der Fließgeschwindigkeit v und dem Kapillardruck (Term 2) entgegen zu wirken:

$$P = \frac{\rho v^2}{2} + \frac{2\sigma}{r_l} \quad (28)$$

Der Kapillardruck hängt vom Innenradius einer Kapillare und der Oberflächenspannung σ der verdrängten Flüssigkeit ab. Der Staudruck ist abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit des Fluids und seiner Dichte. Wirkt ein stärkerer Druck auf die Flüssigkeitsmenge, so erhöht sich der Staudruck. Ist der Staudruck größer als der Kapillardruck, wird die Kapillarflüssigkeit zertropft. Es entsteht ein Flüssigkeitsstrahl. Solange der Staudruck aber kleiner ist, wird die Flüssigkeit abgetropft (Patzner, 1996).

Abbildung 2.18 vergleicht die beiden gängigen Methoden zur Erzeugung einzelner freifliegender Mikrotropfen und stellt die Art der Aktuatoren und deren Pumpen zusammen.

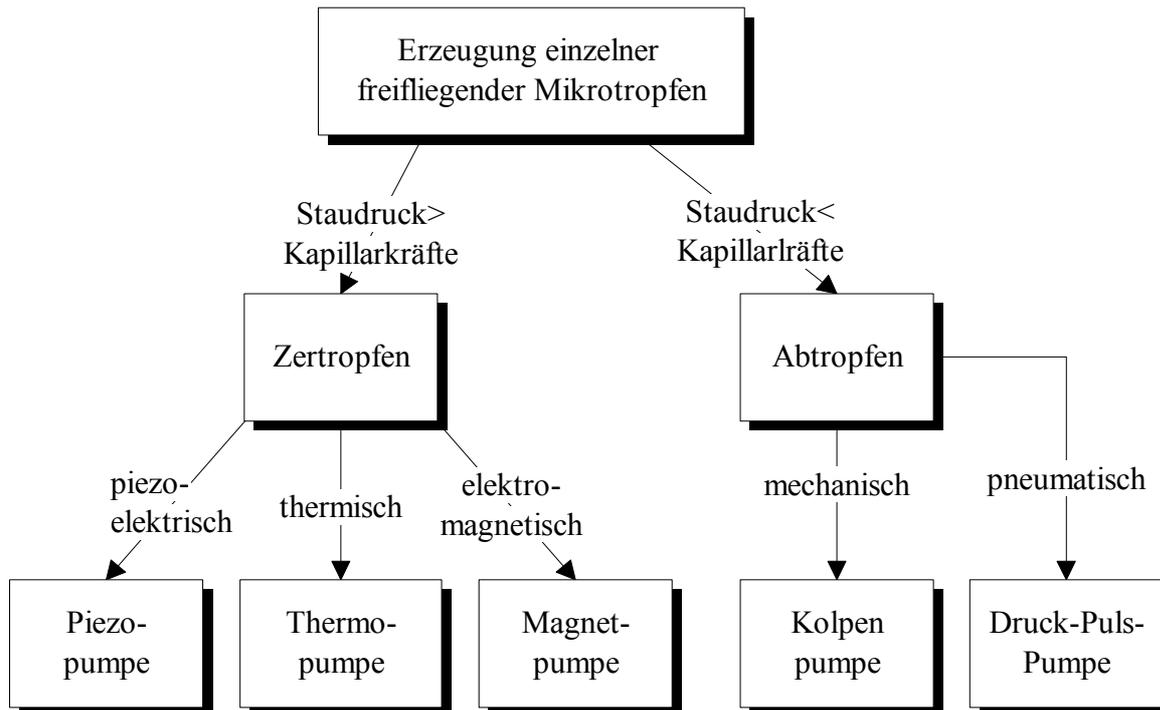


Abbildung 2.18: Erzeugung freifliegender Tropfen im Vergleich.

Grundlegende Unterschiede liegen an dem Wirkungsort des Aktuators. Beim Zertropfen wirkt der Aktuator an der Außenwand der Kapillare. Dieser umschließt den vorderen Teil der Kapillare. Beim Abtropfen wird Druck auf die Oberfläche der gefüllten Flüssigkeitssäule in der Kapillare ausgeübt. Die Kolbenpumpe erzeugt einen Druck durch Verschieben eines Kolbens. Bei der Druck-Puls-Pumpe wirkt ein Luftdruck, indem kurzzeitig das Luftvolumen komprimiert wird.

Ganz ohne Aktuatoren arbeiten die Microspotting-Systeme, die allein durch Oberflächenberührung Tropfen absetzen. Die aufgetragenen Spots hängen von den Grenzflächenkräften und dem Kapillardurchmesser ab. Ein Nachteil dieser Technologie ist das vorausgesetzte Absetzen der Nadel auf der Oberfläche, weswegen es zu einem Zerkratzen der Oberfläche kommt. Außerdem reichen bei hydrophoben Materialien wie z.B. Kunststoffen die Adhäsionskräfte nicht aus, den Tropfen auf die Oberfläche abzusetzen.

2.3.2 Ink-Jet-Verfahren

Die Piezopumpe ist eine Kapillare mit einem piezoelektrischen Element. Wird an die Elektroden der Piezokeramik eine Spannung angelegt, so deformiert sich das Element, wodurch in der Flüssigkeit, die inkompressibel ist, ein sehr schneller Druckanstieg erzeugt wird. Dieser Druckanstieg pflanzt sich mit Schallgeschwindigkeit durch die Flüssigkeit zu der Düsenöffnung fort. Die Druckwelle wird in eine Bewegung der Flüssigkeit transformiert, so dass eine feine Flüssigkeitssäule mit hoher Beschleunigung die Düse verlässt (Beschleunigung von 100000 g (Döring, 1991)). Der Ausstoß verläuft so schnell, dass die Flüssigkeit ausgestoßen wird, ohne den Kapillarrand zu benetzen. Diese Methode wurde zuerst bei Tintenstrahldruckern angewandt und hat deswegen den Namen Ink-Jet-Verfahren. Es können Tropfen im Bereich von 50 pl bis 500 pl erzeugt werden (Eggers und Ehrlich, 1995).

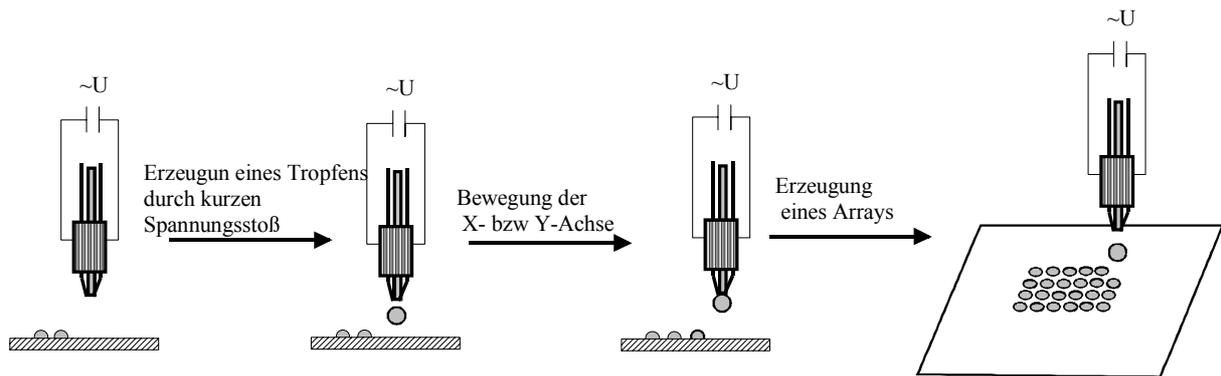


Abbildung 2.19: Herstellung von Mikroarrays mit dem piezoelektrischen Ink-Jet-Verfahren, indem ein kurzer Spannungstoß eines Piezoelements einen so hohen Druck erzeugt, dass einzelne Tropfen abgeschnürt werden.

2.3.3 Top-Spot-Verfahren

Das Top-Spot-Verfahren ist ein Druck-Puls-Verfahren, indem durch Luftkompression ein kurzer Druckimpuls auf einem Array von Flüssigkeitssäulen wirkt (Ducree et al., 2000). Die Flüssigkeiten werden in Reservoirs gefüllt, die über selbstbefüllende Kapillaren mit dem Düsenarray verbunden sind. Sind die Mikrodüsen befüllt, wird ein kurzer pneumatischer Druck erzeugt, wodurch Nanolitertröpfchen parallel abgegeben werden. Die Größe der abgegebenen Tropfen wird durch den Düsendurchmesser und dem Druckpuls definiert.

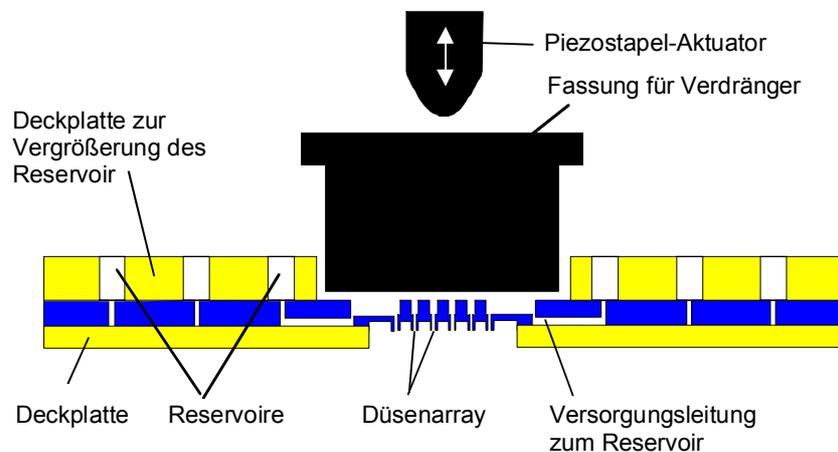


Abbildung 2.20: Parallele Mikrodosierung über einen Düsenarray mit dem TopSpot™-Verfahren.

Der Parallelisierungsgrad ist gegenüber den Ink-Jet-Verfahren stark erhöht. Das HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen, bietet mittlerweile Druckköpfe mit einem 24 – 96 Düsenarray an. Dementsprechend entfallen die einzelnen Waschschriffe, die für jeden Probenwechsel im Ink-Jet-Verfahren benötigt werden.

2.3.4 Microspotting

Das Microspotting-Verfahren ist ein oberflächenberührendes Verfahren, das bei der Microarray-Herstellung häufig angewandt wird. Man dosiert keine Flüssigkeitsmengen in Kavitäten zu, sondern setzt möglichst exakt positionierte Spots auf eine Oberfläche ab. Das Microspotting ist ein passives Mikrodosierverfahren, das ein Dosieren allein aufgrund der Grenzflächenkräfte ermöglicht. Es werden Flüssigkeiten auf einer Oberfläche abgesetzt, indem ein Stift oder eine Nadel, an der ein Tropfen hängt, mit der Z-Achse eines Roboters nach unten verfahren wird. Es werden sehr hohe Anforderungen an die Positionierung der Z-Achse gestellt, denn die Spitzen sind sehr empfindlich und außerdem sollte eine Positioniergenauigkeit unter einem Mikrometer erreicht werden. Durch den Roboter an sich und einem Mehrfach-Dosierkopf ist sowohl eine Automatisierung als auch eine Parallelisierung möglich. Die Miniaturisierung ist jedoch durch die Stärke der Metallstifte eingeschränkt.

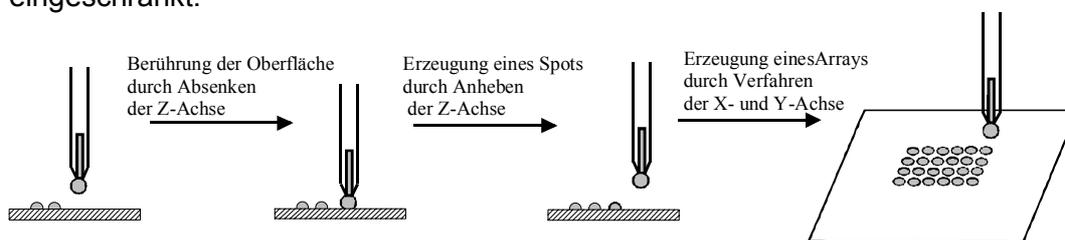


Abbildung 2.21: Erzeugung von Microarrays mit dem Microspotting-Verfahren, indem einzelne Spots mit einer Stahladel durch Berührung der Oberfläche abgesetzt werden.

Bei der Array-Herstellung gibt es drei verschiedene Verfahren, die sich in der Probenaufnahme unterscheiden. Im Tip-Printing wird eine Stahladel eingesetzt, die einen Spalt enthält. Über Kapillarkräfte werden die Flüssigkeiten aufgenommen.

Das Tip-Ring-Verfahren nutzt die Flüssigkeitsfilmbildung in einem Stahlring. Ein Metallstift durchstößt die Flüssigkeit und setzt einzelne Tropfen ab. Es werden Spots mit einem Durchmesser von 50 bis 300 μm erzeugt (Rose, 1998)

Eine stärkere Miniaturisierung wurde durch das MicroContactPrinting (μCP) erreicht, indem ein mikrostrukturierter Stempel eingesetzt wird. Die Strukturen können einen Microarray mit einer Rasterung bis zu 1 μm erreichen (Wölfel, 2000). Schwierigkeiten bereiten dem System unterschiedliche Substanzen aufzunehmen und nachfolgende Stempelschritte korrekt zu positionieren.

2.4 Optische Spektroskopie

2.4.1 Elektronenspektroskopie

Übergangsdipolmoment

Trifft Licht mit geeigneter Energie $h \cdot \nu$ auf Materie, so wird die Energie im System absorbiert. Unter Erfüllung der Resonanzbedingung

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu \quad (29)$$

erzeugt dieses Photon einen Übergang von einem Energieniveau auf ein höheres. Der UV/VIS-Spektralbereich ($\lambda = 200 \dots 780 \text{ nm}$) ist so energiereich, dass Elektronen durch

Absorption von Licht angeregt werden. Die Wechselwirkung zwischen dem elektromagnetischen Feld und den Elektronen führt zu einer Ladungsverschiebung im Molekül. Die Molekülbestandteile, die für die Absorption verantwortlich sind (Chromophore), besitzen eine bestimmte räumliche Ladungsverteilung und damit ein elektrisches Dipolmoment $\vec{\mu}_{el}$. Da die Energiezustände in Atomen und Moleküle gequantelt sind, können Elektronen nur diskrete Energieniveaus besetzen und auch nur bestimmte Wellenfunktionen und damit Elektronendichteverteilungen im Raum einnehmen. Die Anregung erfolgt in höhere Schwingungs- und Rotationsniveaus, bei denen die Wellenfunktion überlappen und damit das Übergangsdipolmoment $\mu_{EA} > 0$ ist:

$$\vec{\mu}_{EA}^{el} = \int \Psi_E^* \vec{\mu}_{el} \Psi_A dV \quad (30)$$

Das Übergangsdipolmoment drückt eine Wahrscheinlichkeit eines elektronischen Übergangs aus.

Lambert-Beersches Gesetz

Die relative transmittierte Intensität I/I_0 eines monochromatischen Lichtstrahls der Einstrahlintensität I_0 nimmt in einer ideal verdünnten Lösung eines absorbierenden Stoffes exponentiell mit seiner Weglänge und der Konzentration ab.

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c d} \quad (31)$$

Das Absorptionsspektrum wird durch die Auftragung des Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ oder der Extinktion $E(\lambda)$ als Funktion von λ in Abhängigkeit zur Konzentration an Chromophore und der Schichtdicke d dargestellt:

$$E = \lg \frac{I}{I_0} = -\varepsilon c x \quad (32)$$

Für Lösungen, in denen mehrere Chromophore i vorliegen, wird die Extinktion als additive Größe betrachtet.

$$E = \sum_i \varepsilon c d \quad (33)$$

Der Extinktionskoeffizient wird bei der Wellenlänge bestimmt, bei der die Absorption eines Chromophors maximal ist, und wird als λ_{\max} bezeichnet.

Biomoleküle, wie Proteine oder Oligonukleotide sind Polymere mit einer Vielzahl von chromophoren Gruppen. Der Extinktionskoeffizient setzt sich aus der Summe der Einzelmoleküle zusammen und ist für jedes Biomolekül verschieden. Das Absorptionsmaximum ist ebenfalls unterschiedlich. Bei Proteinen überwiegt jedoch der Anteil der Absorption von Tryptophan, so dass das Absorptionsmaximum von Proteine bei 278 nm liegt. Bei DNA-Molekülen zeigt Adenosin eine sehr starke Absorption. Tabelle 2.3 fasst die Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der biologisch interessanten Chromophore zusammen.

Tabelle 2.3: Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten einiger biologisch interessanter Chromophore (Winter und Noll, 1998)

| Chromophor | | $\lambda_{\max} / \text{nm}$ | $\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ |
|-------------|--------------|------------------------------|---|
| Aminosäuren | Tryptophan | 280 | 5600 |
| | Phenylalanin | 257 | 200 |
| Proteine | Tyrosin | 274 | 1400 |
| | BSA | 278 | 69000 |
| | IgG | 278 | 150000 |
| Nukleobasen | Adenosin | 259 | 14900 |
| | Guanosin | 276 | 9000 |
| | Cytidin | 271 | 9100 |
| | Thymidin | 267 | 9700 |
| | Uridin | 261 | 10100 |
| DNA | | 258 | 6600 |
| RNA | | 258 | 7400 |

2.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Bei Raumtemperatur befinden sich fast alle Moleküle im Schwingungsgrundzustand S_0 . Innerhalb von 10^{-15} s kann das Molekül in einen höherenergetischen Zustand angeregt werden. Im UV/VIS Spektralbereich finden elektronische Übergänge in angeregte Schwingungs- und Rotationszustände eines höheren elektronischen Zustands S_1 , S_2 , ... statt. Ein durch Absorption eines Photons angeregtes Molekül, versucht die überschüssige Energie wieder abzugeben. Durch Stöße mit der Umgebung relaxiert das Molekül innerhalb von ca. 10^{-12} s in den Schwingungszustand des ersten angeregten elektronischen Zustandes (vibratorische Relaxation, *thermal equilibration*, TE). Der S_1 -Zustand ist mit 10^{-10} bis 10^{-7} s relativ langlebig. Aus diesem Zustand erfolgen verschiedene Desaktivierungsprozesse, die im Folgenden beschrieben werden:

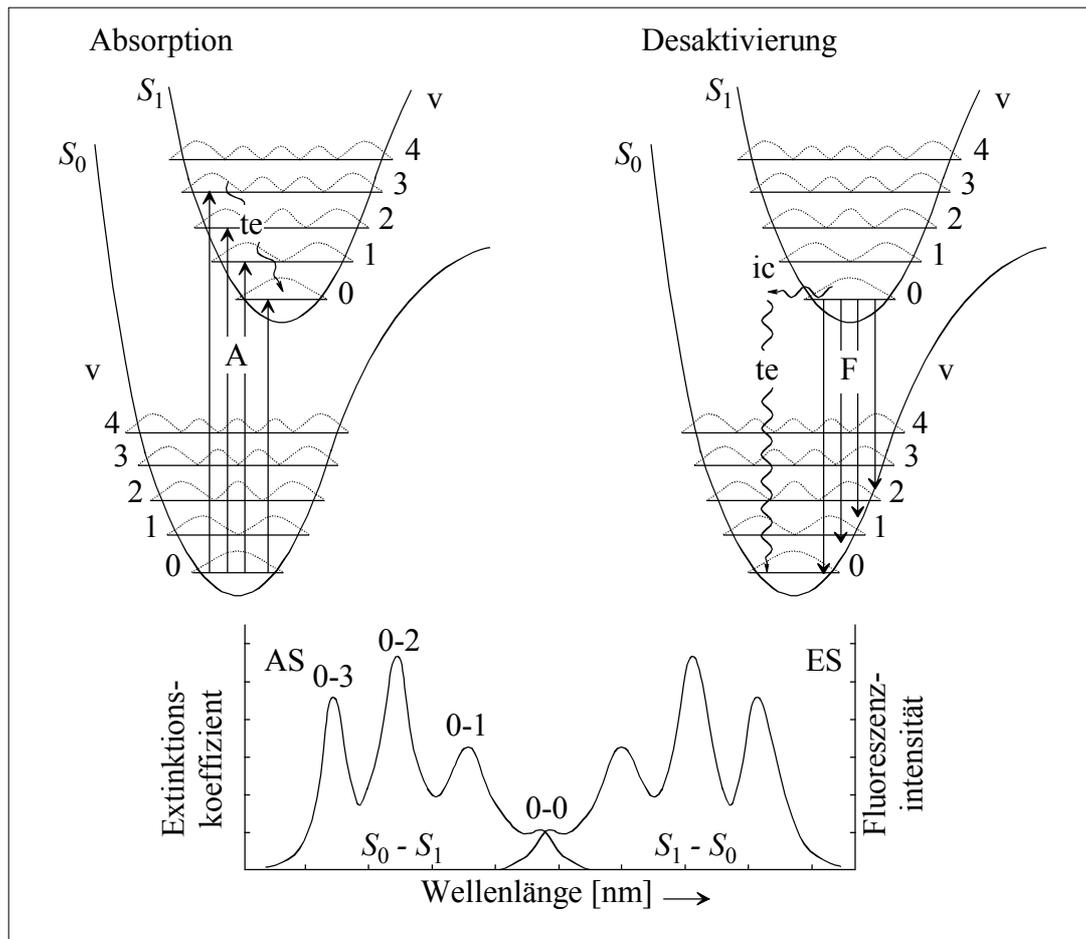


Abbildung 2.22: Vereinfachte Energiepotentialkurven mit den Wahrscheinlichkeitsdichten der Schwingungsniveaus zur Erklärung von Absorption (A), der strahlungslosen Desaktivierung (ic, te), der Fluoreszenz (F) und der Spiegelbildsymmetrie des Emissionsspektrums (ES) bezüglich des Absorptionsspektrums (AS).

- **Strahlungslose Desaktivierung:** Durch innere Umwandlung (*internal conversion*, IC) gelangt das Molekül in einen höheren angeregten Schwingungs- und Rotationszustand des elektronischen Grundzustandes, ohne dabei Energie abzugeben und relaxiert durch thermische Äquilibration in den Schwingungsgrundzustand ($v=0$)
- **Fluoreszenz:** Durch Abgabe elektromagnetischer Strahlung kann das Molekül in die verschiedenen Schwingungszustände des S_0 -Zustandes zurückkehren. Die freiwerdende Strahlung ist aufgrund der strahlungslosen Energieverluste durch die thermische Äquilibration im S_1 -Zustand energieärmer, ist also rotverschoben.
- **Intersystem crossing:** Beim Interkombinationsübergang (*intersystem crossing*, ISC) findet ein Übergang durch vibratorische Relaxation in den elektronischen Triplett-Zustand T_1 unter Spinumkehr statt, die in erster Näherung verboten ist. Er kann aber bei geringen Energiedifferenzen zwischen T_1 und S_1 -Zuständen auftreten. Die erneute Spinumkehr in den Singulett-Grundzustand ist wiederum verboten, so dass die Relaxation in diesen langsam erfolgt. Der Übergang ist mit einer Lichtemission verbunden, die Phosphoreszenz genannt wird. Da der T_1 -

Zustand energieärmer ist als der S_1 -Zustand, erscheint Phosphoreszenzlicht gegenüber dem Fluoreszenzlicht stark rotverschoben.

- **Photoreaktion:** Das Anregungslicht kann auch für eine chemische Reaktion ausgenutzt werden. Dabei wird die aufgenommene Energie genutzt, um z.B. Radikale zu bilden.
- **Fluoreszenzquenchen:** Die absorbierte Energie kann direkt auf ein benachbartes Molekül, z.B. durch Stöße übertragen werden, wobei die Emission von Licht unterbleibt. Das angeregte Fluorophor bildet kurzzeitig einen Stoßkomplex mit dem Quencher. Beim Lösen des Komplexes wird die Energie strahlungslos in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben.
- **Resonante Energieübertragung:** Über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen erfolgt eine strahlungslose Energieübertragung auf ein anderes Teilchen (siehe Kapitel 2.4.3).

Quantenausbeute

Die Quantenausbeute wird definiert über den Anteil der absorbierten Energie, die in Form von Photonen emittiert wird.

$$\Phi_F = \frac{N(\text{emittierter Photonen})}{N(\text{absorbierter Photonen})} = \frac{I_F}{I_A} \leq 1 \quad (34)$$

Mit den Übergangsraten k_F für die Fluoreszenz, k_{IC} für die innere Umwandlung, k_{ISC} für den Interkombinationsübergang, k_Q für die Fluoreszenzlöschung sowie mit k_{RET} für den resonanten Energietransfer wird die Quantenausbeute kinetisch folgendermaßen beschrieben

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q + k_{RET}} \quad (35)$$

Die Quantenausbeute ist unabhängig von der Anregungswellenlänge, da alle beteiligten Prozesse vom niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten Zustandes aus ablaufen.

Dynamische Fluoreszenzmessung

Die Bestimmung der Abklingzeiten angeregter elektronischer Zustände ist über zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie möglich. Die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors ist die durchschnittliche Verweildauer im angeregten Zustand. Befinden sich zunächst N_0 Moleküle im angeregten Zustand, so ist die Zahl N an Molekülen, die pro Zeiteinheit, durch Fluoreszenz in den Grundzustand übergehen, gegeben durch

$$-\frac{dN(t)}{dt} = k_F N(t) \quad (36)$$

und damit ist

$$N(t) = N_0 e^{-k_F t} \quad (37)$$

Die Zeit t , innerhalb der die Zahl der angeregten Moleküle auf N_0/e zurückgegangen ist, wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und ist über die Ratenkonstante definiert:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad (38)$$

Die Fluoreszenz bei einer sehr kurzen gepulsten Anregung klingt demnach exponentiell ab.

$$I_F(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (39)$$

wobei I_0 die Fluoreszenzintensität bei $t=0$ ist. Die Fluoreszenzlebensdauer wird durch verschiedene Prozesse beeinflusst, wie man im Jablonski-Thermschema (Abb. 2.2) sehen kann. Für eine Betrachtung der tatsächlichen Lebensdauer τ der strahlenden Moleküle müssen die strahlungslosen Prozesse mit einbezogen werden.

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q + k_{RET}} \quad (40)$$

Die Lebensdauer τ ist die experimentell zugängliche Messgröße. Die Fluoreszenzlebensdauer ist mit der Fluoreszenzquantenausbeute verknüpft.

$$\tau = \Phi_F \cdot \tau_F \quad (41)$$

Das exponentielle Abklingen der Fluoreszenz ist jedoch nur in einer niederviskosen, homogenen Molekülumgebung gegeben. In heterogenen Umgebungen, wie es z.B. bei fluoreszenzmarkierten Biomolekülen der Fall ist, findet man eine Abweichung vom monoexponentiellen Verhalten. Die Abklingkurven werden durch die Summe an Exponentialfunktionen angepasst.

$$I_F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_{F,i}}} \quad (42),$$

mit dem präexponentiellen Faktor α_i und der mittleren Abklingzeit $\bar{\tau}_F$:

$$\bar{\tau}_F(t) = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_{F,i}^2}{\sum_i \alpha_i \tau_{F,i}} \quad (43)$$

Die partiellen Abklingzeiten $\tau_{F,i}$ kann man in den meisten Fällen nicht zu konkreten Molekülumgebungen zuordnen. Es muss vielmehr angenommen werden, dass in der heterogenen Umgebung eine Verteilung der Abklingzeiten vorliegt.

Statische Fluoreszenzmessung

Bei der statischen Fluoreszenzmessung wird kontinuierlich monochromatisches Licht in eine Probe eingestrahlt. Der Detektor, der die Emissionsstrahlung misst, ist senkrecht zur Anregungsstrahlung angeordnet. Da nicht jedes absorbierte Photon zur Fluoreszenz führt, wird das Verhältnis zwischen emittierter zu absorbierten Lichtquanten durch die Quantenausbeute beschrieben. Die gemessene stationäre Fluoreszenzintensität I_F ist das Produkt aus Quantenausbeute und der Intensität des absorbierten Lichtes:

$$I_F = \Phi_F I_A \quad (44)$$

I_A ist dabei die Zahl der absorbierten, also nicht transmittierten Photonen I_T . Wenn man die Zahl der eingestrahelten Photonen als I_0 bezeichnet und dies in Gl. 44 einsetzt, erhält man:

$$I_F = \Phi_F (I_0 - I_T) \quad (45)$$

Das absorbierte Licht ist nach dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz definiert

$$I_A = I_0 - I_T = I_0 (1 - e^{-\alpha(\lambda)xc}) \quad (46)$$

und dies lässt sich in Gleichung 46 einsetzen. Damit ergibt sich die für die Fluoreszenzintensität folgende Gleichung:

$$I_F = \Phi_F I_0 (1 - e^{-\alpha(\lambda)xc}) \quad (47)$$

Die letzte Gleichung zeigt, dass das Emissionssignal proportional zur Quantenausbeute und zur eingestrahelten Lichtintensität I_0 ist, jedoch nicht zur Konzentration an Fluorophore. Der

Absorptionskoeffizient bezieht sich auf die Anregungswelle. Beim Absorptionsmaximum ist die maximale Fluoreszenz zu erwarten.

Die Reihenentwicklung einer Exponentialfunktion liefert:

$$e^x = 1 + \frac{x}{1} + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots \quad (48)$$

Für kleine Werte von x sind die höheren Potenzen zu vernachlässigen. Da bei negativen x -Werten die aufeinanderfolgenden Glieder der Reihe abwechselnd addiert und subtrahiert werden, kann man für $e^{-x} = 1-x$ schreiben.

Wenn man dies für Gleichung in erster Näherung anwendet, erhält man für die Fluoreszenzintensität folgende Gleichung:

$$I_F = \Phi_F I_0 x c \alpha(\lambda) \quad (49)$$

Ersetzt man den Absorptionskoeffizienten durch den molaren Extinktionskoeffizienten, erhält man die nach dem Entdecker als Parker-Gesetz benannte Formel:

$$I_F = 2,303 \Phi_F I_0 x c \varepsilon(\lambda) \quad (50)$$

Hiermit kann man sagen, dass für ausreichend verdünnte Proben die Linearität von Fluoreszenz ausreichend gewährleistet ist.

Die Fluoreszenz ist eine sehr empfindliche Detektionsmethode. In der Bioanalytik ist die Probenmenge oftmals begrenzt, so dass man mit sehr geringer Probenkonzentration auszukommen muss. Fluoreszenzmessungen werden deswegen zum Teil mit gepulsten Lasern durchgeführt, die eine hohe Leistung und damit eine hohe Lichtintensität einbringen. Ein weiterer Punkt ist geeignete Fluoreszenzfarbstoffe zu synthetisieren, deren Fluoreszenzeigenschaften sich durch eine hohe Quantenausbeute, einen hohen Extinktionskoeffizienten und eine hohe Photostabilität auszeichnen.

2.4.3 Resonanter Energietransfer

Während bei statischer Fluoreszenzlöschung ein Quencher-molekül direkt in Kontakt mit dem Fluorophor kommt, wird beim Fluoreszenz Resonanten Energie Transfer (FRET) strahlungslos die Anregungsenergie auf ein Chromophor übertragen. Die Energieübertragung geschieht durch Dipol-Dipol-Kopplung von Donor-Farbstoff und Akzeptorfarbstoff (Förster, 1946), wenn die Energie des angeregten Zustands des Donor der Energie des Akzeptors entspricht und der Akzeptor in einem Abstand von 1-10 nm entfernt ist, so nimmt die Fluoreszenz des Donors ab und gleichzeitig fluoresziert der Akzeptor (Van der Meer et al., 1994). Die Fluoreszenz ist dementsprechend stark rotverschoben.

Die zur Beschreibung notwendige Theorie wurde im Wesentlichen bereits 1948 von T. Förster entwickelt. Der Energietransfer ist nur dann möglich, wenn das Absorptionsspektrum des Akzeptors mit dem Fluoreszenzspektrum des Donors überlappt.

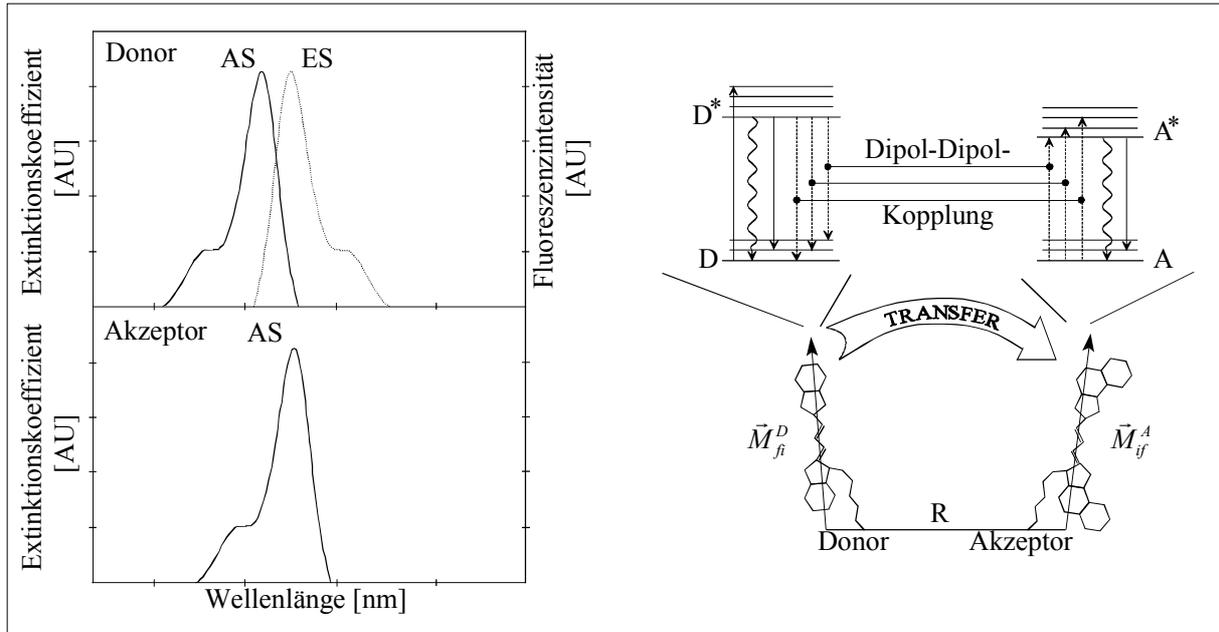


Abbildung 2.23: Prinzip des Fluoreszenz Resonanten Energietransfers: Links: Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Rechts: Schematische Darstellung des FRET von einem angeregten Donor (mit dem Übergangsdipolmoment der Emission) zu einem sich im Abstand R befindlichen Akzeptor (mit dem Übergangsdipolmoment) anhand eines vereinfachten Termschemas.

Die Reaktion kann folgendermaßen beschrieben werden:



Der Teil der absorbierten Photonen, der strahlungslos auf den Akzeptor übertragen wird, bezeichnet man als Transfereffizienz (E). Praktisch ist die Effizienz des Energietransfers über die Quantenausbeute bestimmbar, indem die Quantenausbeute bei Ab- und Anwesenheit des Akzeptors gemessen wird:

$$E = 1 - \frac{\Phi_{DA}}{\Phi_D} \quad (52)$$

Die Quantenausbeute für den Energietransfer Φ_{DA} und die Quantenausbeute der Donorfluoreszenz Φ_D sind wie folgt definiert:

$$\Phi_{DA} = \frac{k_F}{k_{RET} + k_{IC} + k_F + k_Q} \quad (53)$$

$$\Phi_D = \frac{k_F}{k_{IC} + k_F + k_Q} \quad (54)$$

Bei Kenntnis von R_0 ergibt sich aus der Effizienz des mittleren Abstands R der Moleküle D und A. R_0 wird auch als Försterradius bezeichnet und ist der Abstand, bei dem 50% der absorbierten Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (55)$$

Für biomolekulare Interaktionsanalysen ist die starke Abstandsabhängigkeit der Transferrate von enormer Bedeutung. Der mittlere Abstand R geht mit der sechsten Potenz in die Transferrate ein.

$$k_{RET} = (k_{IC} + k_F) \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 = \frac{1}{\tau_F} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (56)$$

Die Transferratekonstante k_{RET} liegt oft um $10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und ist damit viel größer als die Diffusionskonstante. Dies bedeutet, dass die Effektivität des Energieübertrags bei einer Bindung zweier Biomoleküle gegeben ist. Die Bindung kann entweder eine kovalente Bindung oder eine Affinitätsbindung sein.

Ein wichtiger Punkt bei der Untersuchung des Förster-Energietransfers für biomolekulare Untersuchungen ist die Kenntnis des Försterradius R_0 . Antikörper haben zum Beispiel einen Radius von 5 nm, so dass für einen optimalen Energietransfer ein R_0 von mehr als 5 nm erreicht werden sollte. Der Försterradius lässt sich unter Kenntnis der Quantenausbeute des Donors, des spektralen Überlappungsintegral und des Brechungsindex der Probe berechnen.

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_F J}{128\pi^5 n^4 N_{AV}} \quad (57)$$

In der Gleichung ist ebenso der Orientierungsfaktor κ^2 enthalten. Der Orientierungsfaktor ist definiert als

$$\kappa^2 = (\cos\theta_{RET} - 3\cos\theta_F \cos\theta_A)^2 \quad (58)$$

wobei die Winkel die relativen Orientierungen der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander angeben. κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Wegen der Rotationsbewegungen der Moleküle wechseln sämtliche Richtungen in den meisten Fällen sehr rasch, so dass normalerweise der statistische Mittelwert $\kappa^2 = 2/3$ über sämtliche Orientierungen eingesetzt werden kann.

Das Überlappungsintegral, das die Größe des spektralen Überlapps zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors darstellt, lässt sich folgendermaßen bestimmen

$$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (59)$$

wobei λ die Wellenlänge, $\epsilon_A(\lambda)$ das Absorptionsspektrum normiert auf den Extinktionskoeffizienten und $f_D(\lambda)$ das normierte Fluoreszenzspektrum sind. Das Fluoreszenzspektrum muss hierbei auf die Wellenlängenskala normiert werden.

$$f_D(\lambda) = \frac{F_{D\lambda}(\lambda)}{\int_0^{\infty} F_{D\lambda}(\lambda) d\lambda} \quad (60)$$

Welche Voraussetzungen müssen nun Farbstoffe mit sich bringen, um als Kandidaten für ein effektives Donor-Akzeptor-Paar in Frage zu kommen?

- Hohe Quantenausbeute des Donorfarbstoffs (>0.2)
- Hoher Extinktionskoeffizient des Akzeptors ($>100000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- Optimaler spektraler Überlapp von Donor und Akzeptor

2.4.4 Energietransfer an metallischen Oberflächen

Metallische Oberflächen wie Gold, Silber oder ähnliche haben die Eigenschaften eines Spiegels (Chance et al., 1975). Wird die Fluoreszenz in Reflektion detektiert, wird sowohl die direkt abgestrahlte Emission als auch die reflektierte Emission im Detektor aufgenommen. Dies führt insgesamt zu einer Überhöhung des Fluoreszenzsignals.

Nahe der metallischen Oberfläche wird die Übergangsrate der Fluoreszenz k_{ET} in Abhängigkeit zum Abstand zwischen Oberfläche und Fluorophor stark beeinflusst (Chance et al., 1978). Ist der Abstand in der Größenordnung der emittierten Wellenlänge wird ein oszillierendes Verhalten der Fluoreszenzlebensdauer festgestellt (Drexhage, 1974). Dies erklärt man sich mit den konstruktiven und destruktiven Interferenzen der direkt emittierenden Strahlen der Fluoreszenzmoleküle und den reflektierten Strahlen. Bei Abständen kleiner als 10 nm findet ein strahlungsloser Energietransfer von Fluorophor auf metallische Oberfläche (Ritchie und Burstein, 1981). In diesen geringen Distanzen reduziert sich die Fluoreszenzlebensdauer um mehrere Größenordnungen (Cnossen et al., 1993).

Dieser Effekt kann für den Aufbau von Nachweissysteme genutzt werden, die Oberflächen zum Quenchen nutzen (Perez-Luna et al., 2002). Geeignet hierfür sind besonders Goldoberflächen, weil die Immobilisierung von Analytderivaten über Thiole eine etablierte Methode darstellt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Standardchemikalien

- Standardchemikalien und -biochemikalien wurden, soweit nicht andere Quellen angegeben sind, von FLUKA, Neu-Ulm, SIGMA, Deisenhofen und Riedel de Haën, Seelze bezogen.

Chemikalien für Kopplungschemie

- Aminodextran (AMD) 40 kDa wurde von der Fa. Molecular Probes, Leiden bezogen.
- 11-Mercaptoundecansäure wurde von der Fa. Aldrich, Taufkirchen bezogen
- Dicarboxy-PEG (3000 Da) von Rapp Polymere, Tübingen, bezogen
- 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) wurde von der Fa. Fluka, Neu-Ulm bezogen.
- 4-Aminonutyltrimethylmethoxysilan (ABDMS) wurde von Fa. ABCR, Karlsruhe bezogen.
- N-Hydroxysuccinimid wurde (NHS) von der Fa. Sigma, Deisenhofen bezogen.
- Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurde von der Fa. Sigma, Deisenhofen bezogen.
- 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) wurde von der Fa. Sigma, Deisenhofen bezogen.

Farbstoffe

- NHS-Aktivester von Cy5 (monofunktionell) und Cy5.5 (bifunktionell) von Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg.
- NHS-Aktivester und Maleimid-Farbstoffe Dy630, DyQ660 wurden von Dyomics GmbH, Jena zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1: Strukturformeln des Donor- und Akzeptorfarbstoffs Cy5 und Cy5.5

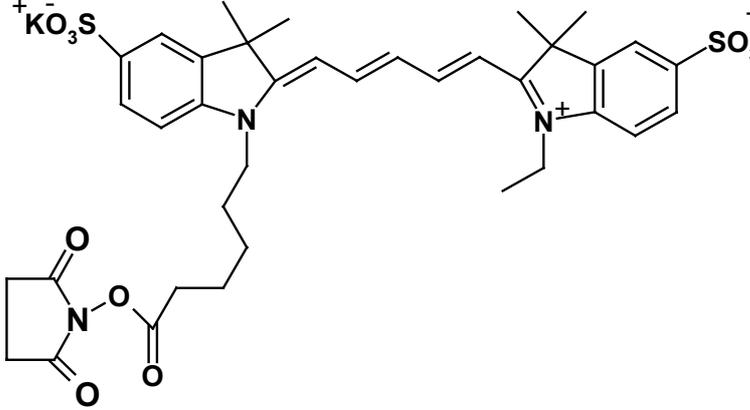
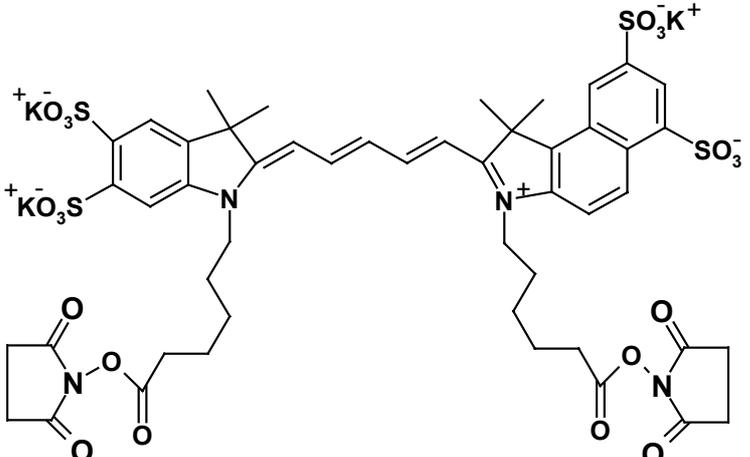
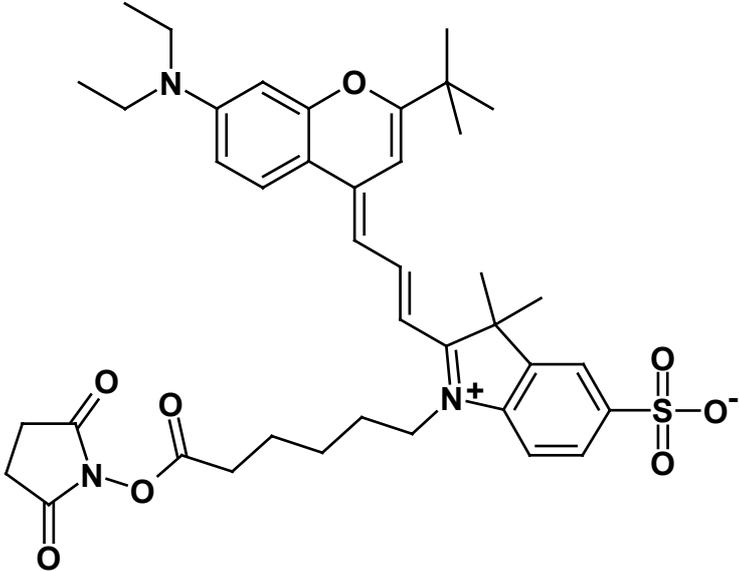
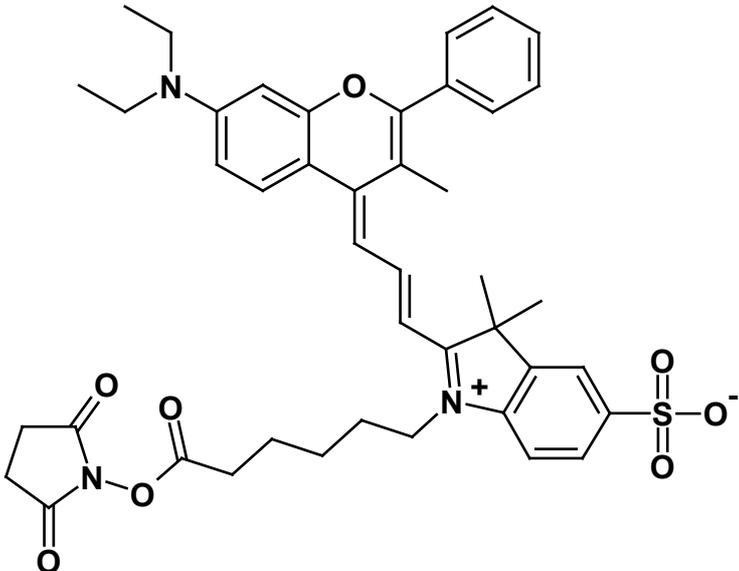
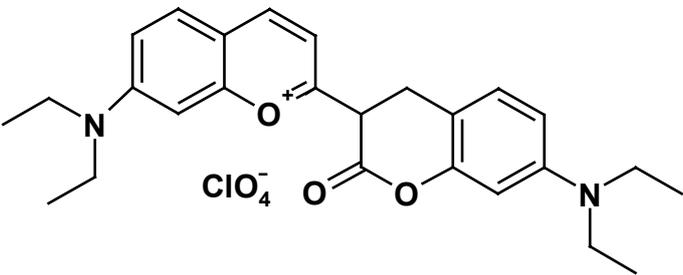
| Name | Strukturformel | MG [g/mol] |
|-----------|---|------------|
| Cy5-NHS |  | 732 |
| Cy5.5-NHS |  | 1312 |

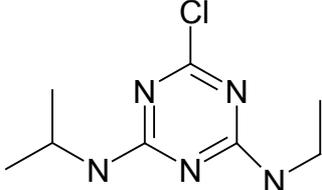
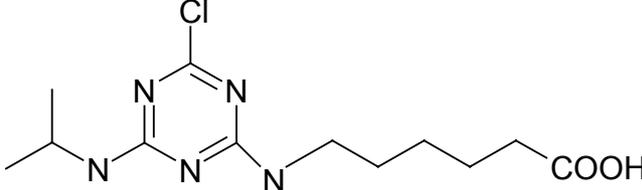
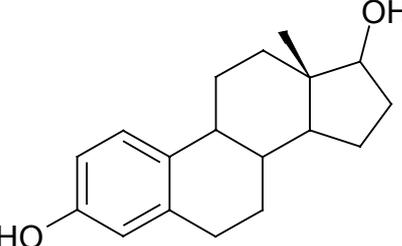
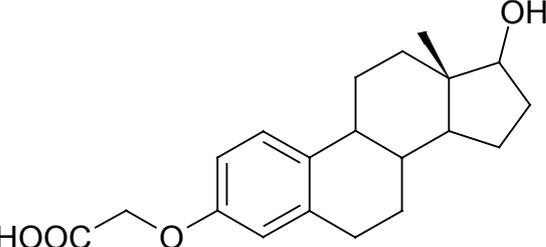
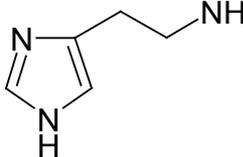
Tabelle 3.2: Untersuchte langwellige Farbstoffe der Firma Dyomics

| Name | Strukturformel | MG [g/mol] |
|-------------------|--|-------------------|
| Dy630-NHS |  | 732 |
| DyQ660-NHS |  | 766 |
| Dy665X |  | 515 |

Analyte und Analytderivate

- Histamin free base wurde von der Fa. Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach.
- Kopplungsfähige Analytderivate Atrazincapronsäure (ACA) und Estron-3-carboxymethylether (E₁3CME) wurde von Dr. Ram Abuknesha, King's College, London synthetisiert und zur Verfügung gestellt.
- Estradiol wurde von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen.
- Atrazin wurde von der Fa. Sigma, Deisenhofen bezogen.

Tabelle 3.3: Analyte (A) und Derivate (D) für PSFIA

| Name | Strukturformel | MG [g/mol] |
|--|--|-------------------|
| <i>Atrazin</i> ^A |  | 215.7 |
| <i>Atrazincapronsäure</i> ^D |  | 301.8 |
| <i>Estradiol</i> ^A |  | 272.4 |
| <i>Estron-3-carboxymethylether, E₁3CME</i> ^D |  | 328.4 |
| <i>Histamin</i> ^{A,D} |  | 110.2 |

Antikörper

- Polyklonaler Atrazin-Antikörper (Schaf-IgG) immunisiert mit Hapten Atrazincabronsäure gekoppelt an OVA von Dr. Ram Abuknesha, King's College, London.
- Polyklonaler Histamin-Antikörper (Schaf-IgG) kommt von Seramun GmbH. Als Immunogen wurde OVA-Histamin eingesetzt. Die Kupplung wurde mit dem homobifunktionellen Crosslinker BBS durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte über Affinitätsreinigung und wurde in PBS-Puffer bei -18°C gelagert.

Sonstige Proteine

- Exonuclease III von USB, Cleveland, Ohio, USA.
- Concanavalin A Callbiochem-Novabiochem, Schwalbach.

Oligonukleotide

- Sämtliche DNA-Oligomere, die unmarkiert, Cy5 markiert, mit Aminolinker, mit Thiolinker oder mit Biotinmarker vorlagen, wurden von IBA GmbH (Göttingen) synthetisiert, HPLC gereinigt und lyophilisiert.
- Oligonukleotide, die mit den Farbstoffen von Dyomics GmbH markiert waren, wurden von Jena Bioscience GmbH (Jena) synthetisiert, HPLC gereinigt und lyophilisiert.
- PNA mit Aminolinker wurde von Applied Biosystems, Weiterstadt synthetisiert, HPLC gereinigt und lyophilisiert worden.

Tabelle 3.4: Verwendete DNA- und PNA-Sequenzen

| Name | Sequenz |
|---------------------|--|
| <i>miSHCy5</i> | 5'-HS-GGAATGATGTAGCTTGTAGCG-3'-Cy5 |
| <i>mi</i> | 5'-AACGCTACTAGCTACATCATTCC-3' |
| <i>Micha3a</i> | Cy5.5'-AACGCTACTAGCTACATCATTCC-3' |
| <i>mssk21biotin</i> | 5'-Biotin-GGAATGATGTAGCTTGTAGCG-3'-Cy5 |
| <i>midy630</i> | 5'-Dy630-GGAATGATGTAGCTTGTAGCG-3' |
| <i>mssk21</i> | 5'-NH ₂ -GGAATGATGTAGCTTGTAGCG-3'-Cy5 |
| <i>OIA3aminp</i> | 5'-NH ₂ -AACGCTACAACCTACATCATTCC-3' |
| <i>OIA4amino</i> | 5'-NH ₂ -GGAATGATGTAGCTTGTAGCG-3' |
| <i>PNA</i> | 5'-NH ₂ -OO-ATGTAGGTTGTAGCG-3' |
| <i>rraanti8449</i> | 5'-CCTACGCCACCAGCTCCAACGATAACGCTACAACCTACAT-3' |
| <i>antiras8449</i> | 5'-TATCGTTGGAGCTGGTGGCGTA-3'-Cy5 |

3.1.2 Verbrauchsmaterial

- Mikrokonzentratoren „Microcon 30“ mit einer Porengröße von 30000 Da von Millipore,
- Sephadex G-25 Säulen für die Gelchromatographie von Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- Fluoreszenz-Mikrotiterplatten (96er-MTP) von Perkin Elmer, Überlingen
- Streptavidin-MTP (96er-MTP) mit einer Belegungsdichte von 5ng/Kavität Biotin von Greiner, Frickenhausen.
- Transparentes Klebeband zum Versiegeln der NTP von Adhesives Research, Inc., Glen Rock, USA.

- Die Kunststoff-Nanotiterplatte (Abb. 3.1) bestehend aus einem Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS). Auf einer Fläche von 2x2 cm sind 25x25 pyramidenstumpfförmige Kavitäten angeordnet. Zwei Kavitäten dienen als Positionsmarken und sind dementsprechend nicht hohl. Das Füllvolumen der einzelnen Kavitäten beträgt 75 nl. Die NTPs wurden in einem Spritzgussverfahren von Bias (Bremen) hergestellt.

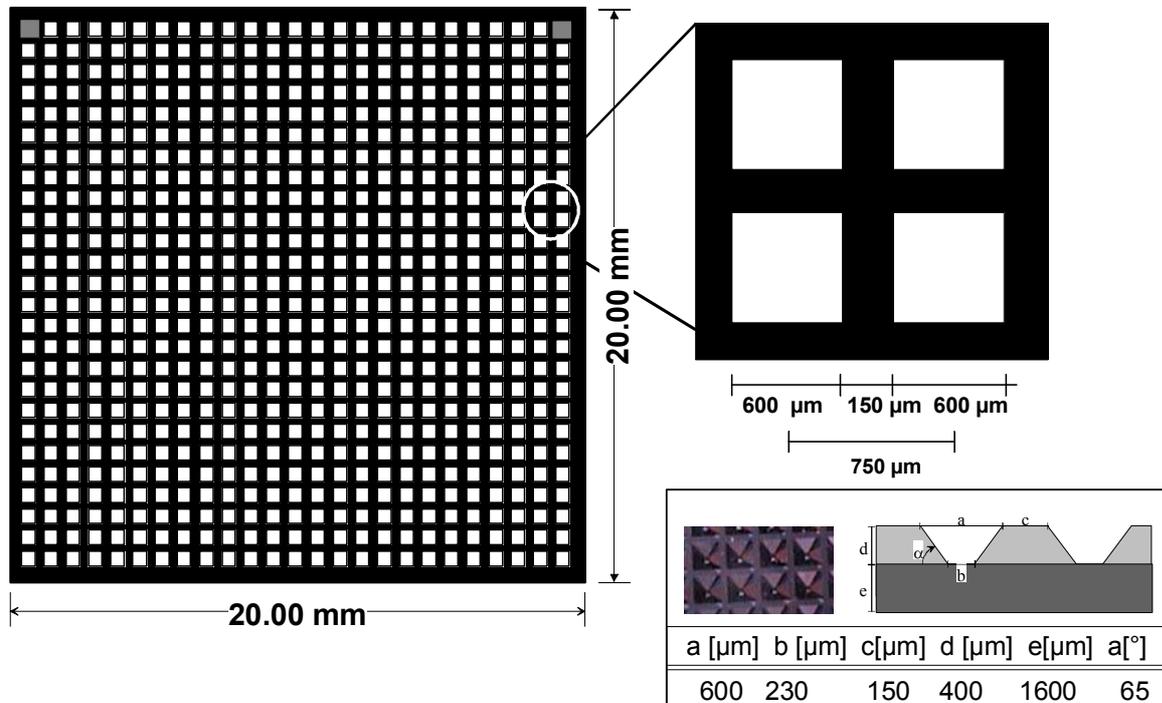


Abbildung 3.1: Bemaßungen der ABS-Nanotiterplatte

3.1.3 Puffer-Lösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

150 mM NaCl

50 mM KH_2PO_4

mit 2 M KOH auf pH 7.4 einstellen.

HEPES-Puffer [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure-Puffer

10 mM HEPES

150 mM NaCl

mit 2 M KOH auf pH 7.4 einstellen.

ExoIII-Nuklease-Puffer

66 mM Tris-HCl pH 8.0

5 mM DTT

0.05 mg/ml BSA

6 mM MgCl_2

10-fach HEPES-Puffer

100 mM HEPES

1.5 M NaCl

mit 2 M KOH auf pH 7.4 einstellen.

10-fach Tris-Puffer

0.66 M Tris HCl pH 8.0

50 mM DTT

0.5 mg/ml BSA

50-fach MgCl_2

330 mM MgCl_2

getrennt von einander autoklavieren

ConA-Puffer

10 mM HEPES-Puffer pH 7.4
0.1 mM MnCl_2
0.2 mM CaCl_2

Carbonatpuffer

100 mM Na_2CO_3
mit 100 mM NaHCO_3
auf pH 9.5 einstellen.

Piranha-Lösung

40 Vol.-% H_2O_2 (30 %)
60 Vol.-% H_2SO_4 (96 %)

Acetonitril Regenerationslösung

bidestilliertes Wasser 50 %
Acetonitril 50 %
Propionsäure 1 %

3.1.4 Geräte**Standardlaborgeräte**

- Verschiedene Kolbenhubpipetten von Eppendorf, Hamburg.
- Kühlzentrifuge Biofuge 15 von Heraeus Sepatech, Osterode.
- Mikrotiterplattenschüttler Typ MTS 2 von IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.

UV-VIS-Spektrometrie

- Registrierendes Spektralphotometer Lambda 15 von Perkin Elmer, Weiterstadt.

Fluoreszenzspektrometer und -Lesegeräte

- Lumineszenz Spektrometer LS-50 B mit rotempfindlichem Photomultiplier R928 von Perkin Elmer, Überlingen.
- Fluoreszenzmikrotiterplattenleser LSR 200 von Perkin Elmer, Überlingen.
- 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).
- BioScan Nanotiterplattenleser im epi-fluoreszenten Aufbau 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.

RfS-Spektrometer

RfS-Standardlaboraufbau mit

- FIA- Anlage ASIA und Autosampler von Ismatec, Wertheim-Mondfeld
- Polymerlichtleiter (PMMA), 1 mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von Micro-Parts, Dortmund
- Diodenzeilenspektrometer MCS 410 von Carl Zeiss, Jena.

River Analyser (TIRF-System):

River Analyser ist ein Prototyp, der in Kooperation mit der Fa. Applera Deutschland GmbH, Überlingen, aufgebaut wurde. Er besteht aus:

- Autosampler
- FIA mit Spritzenpumpe
- Flusszelle aus Plexiglas mit eingefrästem Flusskanal und Bohrung für Ein- und Auslass des Trägerstroms
- Laserdiode mit einer Wellenlänge von 635 nm, 8.6 mW Leistung
- Wellenleiter, Filter
- Lockin-Verstärker
- Transducerplättchen: Glas (60x15x1.5) von der Fa. DESAG, Grünenplan, mit einer polierten 45°-Kante

Mikrodosierung

- Mikrodosierroboter von Microdrop mit:
 - Druckverteilungseinheit (1) (AD-E-140-8)
 - Druckregelung (2) (AD-E-130)
 - Dosierkopftreiber (3) (AD-E-110)
 - Mikrodosierpipette (AD-K-301) (4) mit 70 µm Düseninnen-durchmesser
 - x-y-z-Positioniereinheit (5) (MD-P-701)
 - Tropfenkontrolle über Stroposkop und Kamera (6)
 - Dosierkontrolle über Video-Kamera (7)
 - NTP-Kühlung über Peltier-Element (8)
 - Luftfeuchtigkeitskammer (9)

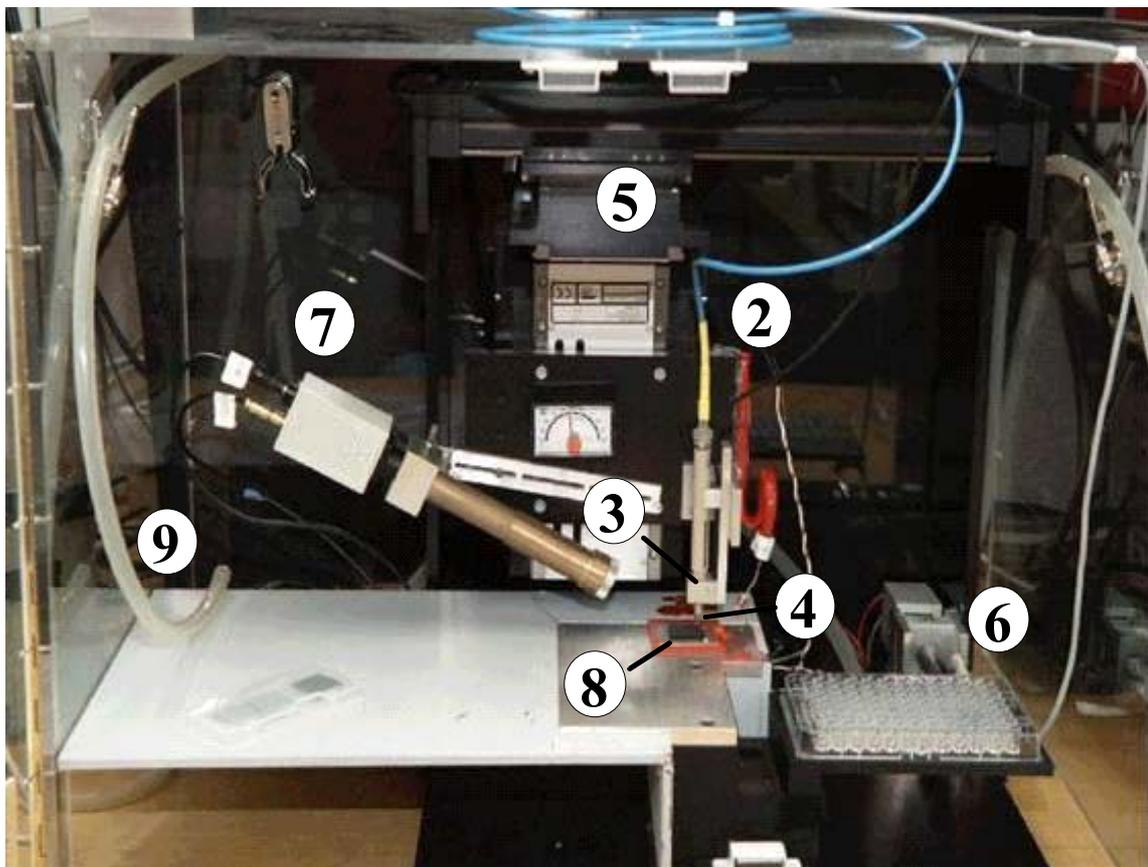


Abbildung 3.2: Aufbau des Mikrodosierroboters

- **Kontaktwinkel**

Zur Messung der statischen Kontaktwinkel wurde eine Cam 200 der Fa. KSV/Finnland verwendet. Die Auswertung wurde mit der dazugehörigen KSV-Software vorgenommen.

- **Ellipsometer**

Die Ellipsometriemessungen wurden mit einem Spektralellipsometer ES4G der Firma Sopra durchgeführt.

| | |
|----------------------|---|
| Lichtquelle: | Xenon Hochdrucklampe L 2174-01 von Hamamatsu |
| Monochromator: | Doppelmonochromator, 400 μm Spaltweite |
| Spektralbereich: | 230 nm - 930 nm |
| Spektrale Auflösung: | 0,05 nm |

- **AFM**

Für die AFM-Abbildungen wurde ein Multimode™ SPM-Gerät verwendet, der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, California, USA.

- **Lichtmikroskop**

Für die lichtmikroskopischen Abbildungen wurde ein Lichtmikroskop von Olympus des Typs BX 60 verwendet.

- **Bestrahlungsapparatur**

Die Bestrahlung der Kunststoffoberflächen wurde mit einer Philips HPK 125 W Quecksilberdampf Lampe durchgeführt, wobei als Filter ein LP4-Kantenfilter (Durchlässigkeit < 0,01% unterhalb 300 nm) verwendet wurde. Die Proben wurden in einem Abstand von 14 cm bestrahlt (theor. Strahlungsdichte 0,05 W/cm²).

3.2 Methoden der optischen Spektroskopie

3.2.1 Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren wurden am Spektralphotometer Lambda 15 mit einer Spaltbreite von 2 nm und einer Registriergeschwindigkeit von 120 nm/min aufgenommen. Als Referenzen dienten die reinen Lösungsmittel, wobei Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet wurden.

3.2.2 Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzemissions- bzw. Fluoreszenzanregungsspektren wurden mit dem Lumineszenz Spektrometer LS-50 B in der 90°-Anordnung aufgenommen. Die Standardeinstellungen am LS-50 B waren: fünf akkumulierte Emissionsspektren bei einer fest eingestellten Anregungswellenlänge, einer Spaltbreite von 5 nm, einer Registriergeschwindigkeit von 120 nm/min und einer Schrittweite von 1 nm. Für Lösungen mit Dy630 wurde eine Anregungswellenlänge von 600 nm und für Lösungen mit Cy5 von 635 nm gewählt. Es wurden Fluoreszenz-Quarzküvetten mit einem Volumen von 500 μl verwendet.

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

3.2.3 Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Fluoreszenzquantenausbeute der Dy630 markierten Biomoleküle wurde nach der relativen Methode bestimmt (Demas und Crosby, 1971).

$$\Phi_F(\text{Probe}) = \Phi_F(\text{Std}) \frac{A_F(\text{Probe}) \cdot (1 - 10^{-E(\text{Std})}) \cdot n_{\text{Probe}}^2}{A_F(\text{Std}) \cdot (1 - 10^{-E(\text{Probe})}) \cdot n_{\text{Std}}^2}. \quad (61)$$

Darin bedeutet A_F die Fläche unter der Fluoreszenzbande, die durch das Lampenspektrum korrigiert ist, und n der Brechungsindex der jeweiligen Lösung. E ist die Extinktion bei der Anregungswellenlänge, die nicht über einer Extinktion von 0.05 liegen soll. Die Anregungswellenlänge war bei 600 nm. Die Extinktionen wurden so gewählt, dass sich das Absorptionsspektrum des Standards mit dem zu untersuchenden Fluoreszenzfarbstoff schnitten. Als Standard (*Std*) diente der Fluoreszenzfarbstoff Dy665X in Dichlormethan, der eine bekannte Quantenausbeute Φ_{Std} von 75% hat (Brecht, 1988) Dichlormethan hatte einen Brechungsindex von $n_{\text{Std}}=1.4240$ und Wasser hatte einen von $n_{\text{Probe}}=1.3300$.

3.2.4 Fluoreszenzabklingkurven

Die Fluoreszenzabklingkurven wurden mit dem Spex Fluorolog 112 nach der Methode der Einzelphotonenzählung aufgenommen (Eaton, 1990). Zur optischen Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 653$ 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 $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm für Dy630 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):

$$G(t) = \int_0^t L(t') \cdot F(t-t') dt'. \quad (62)$$

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. (64) so lang verändert, bis die gewichtete und normierte Summe der Fehlerquadrate χ^2 einen festgelegten Wert unterschritt

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n w_i^2 \cdot (G(t_i) - Y_F(t_i))^2. \quad (63)$$

Darin ist w_i der Gewichtungsfaktor im Kanal i mit $w_i = 1 / \sqrt{G(t_i)}$, $G(t_i)$ ist 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

$$r(t_i) = \frac{G(t_i) - Y_F(t_i)}{w_i}, \quad (64)$$

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:

$$c_j = \frac{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^m R_i R_{i+j}}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n R_i^2}. \quad (65)$$

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

$$DW = \frac{\sum_{i=n_1+1}^{n_2} (r(t_i) - r(t_{i-1}))^2}{\sum_{i=n_1}^{n_2} r(t_i)^2} \quad (66)$$

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.

3.2.5 Fluoreszenzmessung in der Mikrotiterplatte

Die MTP-Fluoreszenzmessungen erfolgten nach 30 minütiger Inkubation im Fluoreszenzreader LSR200. Fluoreszenz-MTP mit einem Gesamtvolumen von 250 μ l 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.

3.2.6 Fluoreszenzmessung in der Nanotiterplatte

Die Fluoreszenz der befüllten und anschließend mit Hilfe eines nicht fluoreszierenden, transparenten Klebandes versiegelten NTP wurden mit dem Fluoreszenzscanner „BioScan“ detektiert.

Der schematische Aufbau des „BioScan“ ist in Abb. 3.3 gezeigt. Es handelt sich um einen Fluoreszenzscanner, der in Reflektion die Fluoreszenz aufnimmt, indem Anregung und Detektion von derselben Seite erfolgt. Die Fläche wird mit einem aufgeweiteten Laserstrahl

($\lambda=639$) angeregt, indem ein 2D-Scanner sie zeilenweise abrastert. Das Emissionslicht wird mit einer hochgeöffneten Linsenoptik (numerische Apertur von 0.24 und einer Effizienz der Lichteinsammlung von fast 1 %) eingesammelt und auf einen Photomultiplier abgebildet. Zum Blocken des anregenden Laserlichts dient ein dichroitischer Strahlteiler, ein Kantenfilter (EFLP 665) und ein Bandpassfilter (IF 670). Der beobachtete Wellenlängenbereich liegt zwischen 665 und 680 nm. Die verwendeten Systemparameter waren, soweit im Text nicht andere Parameter angegeben sind:

- PMT-Hochspannung: $U = 1000$ V
 - Vorschubgeschwindigkeit: $v = 150$ m/s
 - Datenintervall: $s = 20$ μm
 - Integrationszeit: $t = 100$ μs
- ⇒ Gesamtmesszeit für eine NTP: $t = 2.8$ 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 Software Bildau durchgeführt wurde, nicht berücksichtigt.

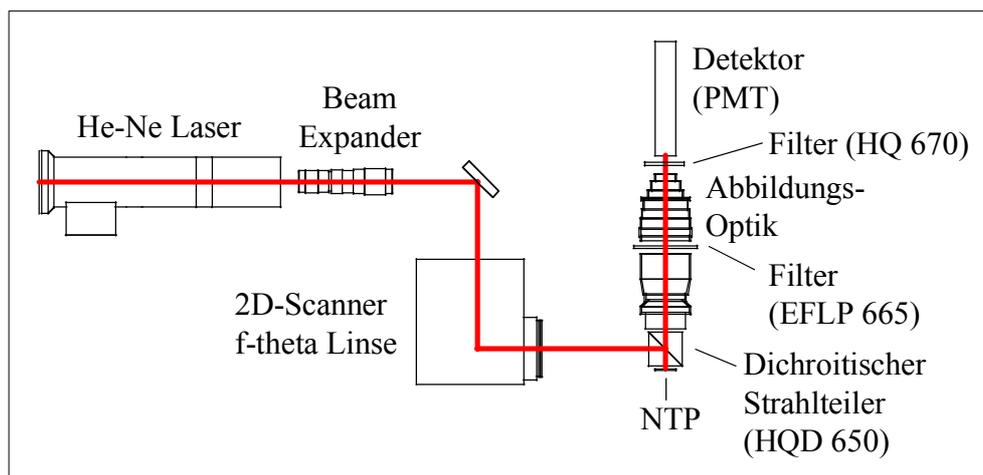


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Fluoreszenzscanners „BioScan“.

3.3 Synthesemethoden

3.3.1 Farbstoff-Markierung von Proteinen

Markierung mit Cy5-NHS

Die Markierung mit Cy5-NHS wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde 1 mg Protein in 500 μL Carbonatpuffer bei pH 9.5 gelöst und zu einem 1 mL-Reaktionsgefäß gegeben, das den Aktivester in kristalliner Form enthielt. Die Reaktion wurde nach einer Stunde abgebrochen, indem die ungebundenen Farbstoffmoleküle abgetrennt wurden. Das Farbstoff-Protein-Konjugat wurde zunächst durch ein Microcon-30 zentrifugiert (5 Minuten bei $12000 \times g$) und anschließend mit einer PD-10-Gelsäule nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie gereinigt. Als Elutionspuffer wurde, wenn nicht anders

beschrieben, PBS-Puffer verwendet. Es wurde der entsprechende Markierungsgrad bestimmt und anschließend die Aliquots bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Markierung mit den aktivierten Chromophoren von Dyomics

Die Chromophore von Dyomics lagen ebenfalls als NHS-Aktivester in kristalliner Form vor. Da sie sehr hydrophob sind, wurden sie zunächst in wasserfreiem DMF gelöst ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 1.5 mM). $20\text{ }\mu\text{L}$ einer Lösung des reaktiven Farbstoffs wurde zu einer Lösung von 1 mg Protein in $500\text{ }\mu\text{L}$ Carbonatpuffer gegeben. Bei der Untersuchung verschiedener Markierungsgrade wurde die Farbstoffkonzentration variiert. Die Reaktion und die Reinigungsschritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.3.2 Aktivierung von Atrazincapronsäure

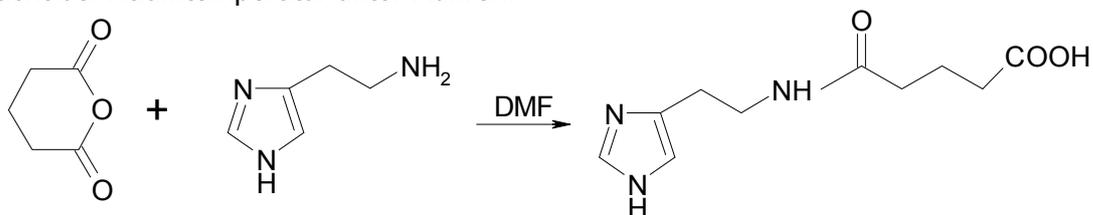
Das Analytderivat (5 mg) wurde zu einer gerührten, eisgekühlten Lösung N,N-Dicyclohexylcarbodiimid ($1.5 \times n(\text{Analytderivat})$) und N-Hydroxysuccinimid ($1.1 \times n(\text{Analytderivat})$) in $200\text{ }\mu\text{L}$ absolutem DMF gegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Dicyclohexylharnstoff abzentrifugiert und der entstandene Analytderivat-NHS-Aktivester abdekantiert.

3.3.3 Aktivierung von E₁3CME in Methanol

Das Analytderivat (5 mg) wurde zu einer gerührten, eisgekühlten Lösung N,N-Dicyclohexylcarbodiimid ($1.5 \times n(\text{Analytderivat})$) und N-Hydroxysuccinimid ($1.1 \times n(\text{Analytderivat})$) in $500\text{ }\mu\text{L}$ Methanol gegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Dicyclohexylharnstoff abzentrifugiert und der entstandene E₁3CME-NHS-Aktivester abdekantiert.

3.3.4 Aktivierung von Histamin

Die Histaminderivatisierung erfolgte im ersten Schritt über eine Anhydridreaktion (Klotz, 1967; Khan et al., 1987). Dazu wurden 1 mg ($9 \cdot 10^6\text{ mol}$) Histamin free base (Callbiochem) mit 1.7 mg ($1.5 \cdot 10^{-5}\text{ mol}$) Glutarsäureanhydrid (GA) in $50\text{ }\mu\text{L}$ Dimethylformamid (DMF) umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde 8 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Carboxy-Gruppen mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Dazu wurde das carboxylierte Histamin zuerst kurz auf Eis gestellt und anschließend 2.8 mg N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1.15 mg NHS zugegeben. Die Reaktion verlief über Nacht bei Raumtemperatur unter Rühren.



(67)

In einem weiteren Schritt wurde der Histamin-Aktivester mit Rinderserumalbumin (BSA) konjugiert. 1 mg ($1.4 \cdot 10^{-8}\text{ mol}$) BSA wurde in $500\text{ }\mu\text{L}$ Carbonatpuffer pH 9.5 gelöst und $10\text{ }\mu\text{L}$ ($1.8 \cdot 10^{-6}\text{ mol}$) Histamin-GA-NHS hinzugegeben. Die Reaktion verlief 1 h unter Rühren bei Raumtemperatur. Die Abtrennung von ungebundenem Histamin-GA erfolgte über

Mikrofiltration mit Microcon-30 (5 Minuten, 12000 x g, 4°C). Zur Herstellung des Histamin-BSA-DyQ660-Konjugats wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

3.3.5 Kopplung von Analytderivaten an farbstoffmarkiertes BSA

Kopplung von Histamin an BSA

Der Histamin-GA-Aktivester wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) konjugiert, indem 1 mg ($1.4 \cdot 10^{-8}$ mol) BSA in 500 μ l Carbonatpuffer pH 9.5 gelöst und 10 μ l ($1.8 \cdot 10^{-6}$ mol) Histamin-GA-NHS hinzugegeben wurde. Die Reaktion verlief 1 h unter Rühren bei Raumtemperatur. Die Reaktionsbedingungen und Reinigungsschritte entsprachen den Angaben, welche bei der Farbstoffmarkierung vorgenommen wurden. Die Kopplungsprodukte wurden aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt.

Kopplung von Atrazincapronsäure an BSA

Der ACA-NHS-Aktivester wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) konjugiert, indem 1 mg ($1.4 \cdot 10^{-8}$ mol) BSA in 500 μ l Carbonatpuffer pH 9.5 gelöst und 10 μ l ($1.8 \cdot 10^{-6}$ mol) Histamin-GA-NHS hinzugegeben wurde. Die Reaktion verlief 1 h unter Rühren bei Raumtemperatur. Die Reaktionsbedingungen und Reinigungsschritte entsprachen den Angaben, welche bei der Farbstoffmarkierung vorgenommen wurden. Die Kopplungsprodukte wurden aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt.

Kopplung von ACA-NHS-Aktivester an BSA-Cy5.5

Eine Lösung von ACA-NHS-Aktivester in absolutem DMF wurde zu einer Lösung von 400 μ g (5.8 nmol) BSA-Cy5.5-Konjugat in 250 μ l Carbonatpuffer mit pH 9.5 gegeben und vorsichtig verrührt. Die Reaktionsbedingungen und Reinigungsschritte entsprachen den Angaben, welche bei der Farbstoffmarkierung vorgenommen wurden. Die Kopplungsprodukte wurden aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt.

Kopplung von Histamin-GA-NHS-Aktivester an BSA-DyQ660

Eine Lösung von Histamin-GA-NHS-Aktivester in absolutem DMF wurde zu einer Lösung von 400 μ g (5.8 nmol) BSA-Cy5.5-Konjugat in 250 μ l Carbonatpuffer mit pH 9.5 gegeben und vorsichtig verrührt. Die Reaktionsbedingungen und Reinigungsschritte entsprachen den Angaben, welche bei der Farbstoffmarkierung vorgenommen wurden. Die Kopplungsprodukte wurden aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt.

3.3.6 Charakterisierung der hergestellten Konjugate

Farbstoff/Protein-Verhältnis

Das Farbstoff/Protein-Verhältnis der Konjugate wurde photometrisch bestimmt. Die Molmassen, die Absorptionsmaxima und die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine (*P*) und der Cy5-Farbstoffe (*F*) sind in Tabelle 3.4 angegeben. Die photometrischen Daten für die Dyomics-Farbstoffe wurden selbst bestimmt (s. Kap. 4.4). 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 3.4: Charakteristische Daten der Proteine und Farbstoffe zur Bestimmung des Markierungsgrades der Konjugate. Y gibt den Anteil der Absorption der Fluorophore bei $\lambda = 278$ nm bezüglich der Absorption am Maximum an.

| | λ_{\max} (Abs) [nm] | λ_{\max} (Em) [nm] | $\epsilon_{\lambda_{\max}}$ [l/mol·cm] | Y = $\epsilon_{\lambda 278}/\epsilon_{\lambda_{\max}}$ | M [g/mol] | Literatur |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|---|---|--------------|-----------------------|
| Cy5 | 647 | 665 | 250000 | 0.05 | 792 | Majumdar et al., 1993 |
| Cy5.5 | 681 | 704 | 250000 | 0.13 | 1312 | Majumdar et al., 1996 |
| ConA | 278 | - | 98400 | - | 104000 | - |
| BSA | 278 | - | 45540 | - | 69000 | Cohn, 1947 |
| IgG | 278 | - | 170000 | - | 150000 | Wells, 1966 |

In der Tabelle 3.4 ist das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten $Y = \epsilon_{278}/\epsilon_{\lambda_{\max}}$ angegeben. Der Markierungsgrad wurde mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet

$$\frac{c_F}{c_P} = \frac{\epsilon_{P,\lambda_{\max}} E_{F,\lambda_{\max}}}{\epsilon_{F,\lambda_{\max}} (E_{278} - Y E_{F,\lambda_{\max}})} \quad (68)$$

Analytderivat/BSA-Verhältnis

Zur Bestimmung des Analytderivat/BSA-Verhältnisses wurden die photometrische Bestimmung der Stoffmengen des Proteins und des Analytderivats über UV-VIS-Spektroskopie verwendet (Wittmann und Hock, 1989). Bei der photometrischen Charakterisierung der Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugate bzw. Dy660-Konjugate wurden nach der Kupplungsreaktion mit dem Analytderivat ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen und davon das zuvor registrierte BSA-Cy5.5-Spektrum bzw. BSA-DyQ660-Spektrum abgezogen. In Abbildung 3.4 ist dies am Beispiel eines Atrazincapronsäure-BSA-Cy5.5-Konjugats demonstriert.

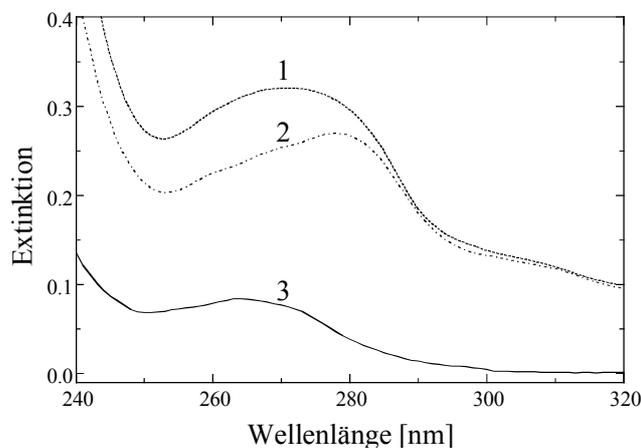


Abbildung 3.4: Photometrische Bestimmung der Analytderivatkonzentration (hier am Beispiel der Atrazincapronsäure) in einem Analytderivat-BSA-Cy5.5-Konjugat (1).

Das Analytderivat-Spektrum (3) wird durch Subtraktion der BSA-Cy5.5-Absorption (2) von (1) erhalten.

Aus dem resultierenden Analytderivat-Spektrum kann der Markierungsgrad bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient von Atrazin ist $\epsilon(\lambda_{\max}=264)=3100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, der von Histamin ist $\epsilon(\lambda_{\max}=262\text{nm})=236 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.3.7 Derivatisierung von Aminodextran in Lösung

AMD 40 kDa wurde in Carbonatpuffer pH 9.5 gelöst und mit NHS-Aktivester in DMF (ACA-NHS, BBS-NHS oder Cy5-NHS) versetzt. Die Reaktion wurde nach 1 h abgebrochen, indem die Lösung in Methanol gefällt wurde. Nach 10 minütiger Zentrifugation (12000 U/min; 4°C) wurde der Überstand abdekantiert und das Präzipitat in Wasser gelöst. Die Reinigungsprozedur wurde zweimal wiederholt.

3.4 Oberflächenmodifikation

3.4.1 Adsorptive Immobilisierung von BSA-Derivaten auf ABS-NTP

ACA-BSA-Cy5.5 wurde adsorptiv an die ABS-Copolymeroberfläche der Kavitätenwände immobilisiert. Dazu wurden mittels Ink-Jet-Verfahren 70 nL des Hapten-BSA-Cy5.5-Konjugats (0.7 pmol ACA) in jede einzelne Kavität gefüllt. Die Nanotiterplatte wurde gedeckelt und über Nacht bei 4°C gelagert. Das Eintrocknen in die Kavitäten sollte verhindert werden. Durch Kapillarität an den Kanten der pyramidalen Kavitäten werden die Wände nicht gleichmäßig belegt. Nach der Beschichtung mit Analytderivat wurden die Kavitätenwände mit einer hohen Konzentration von BSA (10 mg/ml) belegt, um freie Bindungsstellen an der Oberfläche abzudecken. Die Inkubation der gedeckelten NTP verlief über Nacht bei 4°C. Die behandelte Nanotiterplatte wurde intensiv mit Wasser gewaschen mit Stickstoff getrocknet und bei 4°C gelagert.

3.4.2 Goldoberfläche auf Nanotiterplatte

Goldbeschichtung

Die fluoreszenzquenchende Oberfläche der Nanotiterplatte wurde durch Goldbedampfung im Hochvakuum hergestellt. Durch ein Wolfram-Schiffchen wurde Strom geleitet, so dass das Gold zum Schmelzen gebracht wurde. Die Nanotiterplatte war in einem Abstand von 10 cm mit der Oberseite nach unten mit einem wasserlöslichen Kleber an eine Halterung geklebt. Mit diesem Abstand war das Gold soweit abgekühlt, dass die Nanotiterplatte nur bis etwa 50 °C erwärmt wurde, so dass es zu keiner Verformung kam.

Die NTP wurde zunächst mit 3 nm des Haftvermittlers Chrom beschichtet und anschließend wurde das Gold bei einer Aufdampfgeschwindigkeit von 3 Å/s aufgedampft. Die Gesamtschichtdicke wurde über einen Schwingquarzmonitor aufgenommen.

Immobilisierung von Histamin

Die Oberfläche wurde mit einer 10 mM Lösung 11-Mercaptoundecansäure in Ethanol funktionalisiert, indem die Lösung ganzflächig über die Gold-Nanotiterplatte aufgetragen und

unter einer gesättigten Ethanolatmosphäre über Nacht inkubiert wurde. Durch die geringe Oberflächenspannung hatte die Flüssigkeit jede Kavität vollständig benetzt. Die Nanotiterplatten wurden mit Ethanol und Wasser gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Vor der Kopplung von Histamin an die Carboxyoberfläche wurde die Oberfläche 15 Minuten lang mit 15 mM NHS und 75 mM EDC in Wasser aktiviert und anschließend 10 mM Histamin free base in Wasser zur Lösung zugegeben. Die Befüllung erfolgte über den Mikrodosierroboter, damit eine vollständige Oberflächenbenetzung gewährleistet ist. Die Kopplung verlief über Nacht unter Wasserdampf Atmosphäre. Ungebundenes Histamin wurde durch intensives Waschen mit destilliertem Wasser entfernt.

Immobilisierung von E₁3CME

Die Oberfläche wurde zunächst wie oben beschrieben mit 10 mM 11-Mercaptoundecansäure funktionalisiert. In einem nächsten Schritt wurden die Carboxygruppen statistisch zu Aminogruppen umfunktionalisiert. Dazu wurden die Carboxygruppen wie im vorigen Abschnitt mit 15 mM NHS und 75 mM EDC aktiviert und 15 mM Diaminopropan in Wasser zugegeben und über Nacht unter Wasserdampf Atmosphäre inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde 100 µl NHS-aktiviertes E₁3CME über die ganze NTP-Fläche verteilt. Die Aktivierung erfolgte in Methanol. Der Aktivester wurde abdekantiert und auf die NTP gegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht in gesättigter Methanolatmosphäre.

Immobilisierung von ACA

Die NTP-Fläche wurde mit 10 mM ACA-BSA (andere Konzentrationen sind im Text angegeben) belegt und über Nacht in Wasserdampf Atmosphäre inkubiert. Ungebundenes ACA-BSA wurde durch intensives Waschen entfernt.

Immobilisierung von DNA

Auf die Goldoberfläche wurde DNA via Thio-Linker immobilisiert. Die Nanoliterkavitäten wurden über das Ink-Jet-Verfahren mit 1 µM thiomodifizierter DNA belegt und über Nacht in Wasserdampf Atmosphäre inkubiert. Ungebundene DNA wurde durch intensives Waschen entfernt.

3.4.3 Siliziumdioxidoberfläche auf RfS-Transducern

Die RfS-Transducer wurden mit frisch zubereiteter Piranha-Lösung 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Es folgte die Silanisierung mit 3-Glycidylpropyl-trimethoxysilan (GOPTS), indem 10 µl GOPTS im Sandwich zweier Transducer 1 h in einer verschlossenen Glaskammer reagierte. Nach kurzem Spülen mit Aceton und Trockenblasen mit Stickstoff wurde auf die Oberflächen Dicarboxy-Polyethylenglycol (2000 Da, 4 mg/ml in Dichlormethan) aufgetragen und im Ofen bei 70°C über Nacht immobilisiert. Die carboxylierte Oberfläche wurde mit 1 M NHS und 1.5 M 1,3-Diisopropylcarbodiimid (DIC) aktiviert. Die Immobilisierung von Histamin erfolgte in einer Lösung von 0.5 mg/µl in DMF.

3.4.4 Photochemische Immobilisierung auf Kunststoffoberflächen

Herstellung von Polystyrolschichten auf Glas

Die RfS-Transducer wurden mit frisch zubereiteter Piranha-Lösung 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden sie mit 15 µl 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan (ABDMS) im

Sandwich zweier Transducer silanisiert. An die Oberflächen wurde 5 μl ($n=1.1 \mu\text{mol}$) 4-BBS-NHS-Aktivester gekoppelt. In Aceton gelöstes Polystyrol wurde auf die Oberfläche gegeben und eintrocknen gelassen. Die Oberfläche wurde 30 min mit einer UV-Lampe (Wellenlänge $>300 \text{ nm}$) bestrahlt. Die Transducer wurden mit Aceton und Wasser gereinigt

Immobilisierung von ACA-AMD auf Polystyrolschichten

1 mg/ml 4-BBS in DMF wurde auf die Polystyrolschichten gegeben und mit der Bestrahlungsapparatur kovalent immobilisiert. Die freien Carboxylgruppen wurden mit NHS/DIC aktiviert und darauf ACA-AMD gekoppelt.

Immobilisierung von BBS-AMD-Cy5

Das Aminodextran, an das 4-Benzoylbenzoesäure und Cy5 synthetisiert wurde, wurde mit der Mikrodosierpipette in die Nanoliterkaviäten der Nanotiterplatte gefüllt und mit der Adhäsionsfolie gedeckelt. Die Folie ist bis zu einer Wellenlänge von 300 nm lichtundurchlässig, so dass die Bestrahlungsapparatur ohne Filter eingesetzt wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 4 h wurde das AMD-Konjugat 30 min mit der Bestrahlungsapparatur belichtet. Die ungebundenen Moleküle wurden durch mehrmaliges Waschen abgespült.

3.5 Oberflächencharakterisierung

3.5.1 Kontaktwinkel

Bei der Bestimmung der Kontaktwinkel von Wasser auf Kunststoffoberflächen wurde nach der statischen Methode des aufliegenden Tropfens gearbeitet. Dazu wurde mit einer Spritze ein kleiner Wassertropfen auf der gereinigten Oberfläche abgesetzt und mit einer Kamera aufgenommen. Die Form des Tropfens wurde mit Hilfe der KSV-Software polynomisch angepasst und daraus der Kontaktwinkel bestimmt. Dabei ist der Kontaktwinkel der Winkel zwischen fester Oberfläche und der Tangente, die den Punkt P berührt. P ist, wie in Abbildung 3.5 zu sehen, in einem 2-dimensionalen Bild der Schnittpunkt dreier Phasengrenzlinien flüssig, gasförmig und fest.

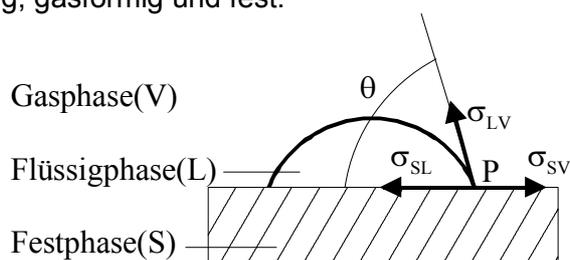


Abbildung 3.5: An einer Dreiphasenlinie angreifende Grenzflächenspannungen und daraus resultierender Kontaktwinkel

3.5.2 Interferenzreflexionsspektren

RfS wurde als Standardmethode zur Charakterisierung der Funktionalität der Oberflächen und des Bindeverhaltens des Histaminantikörpers eingesetzt. Abbildung 3.6 zeigt den zur Messung von Interferenzreflexionsspektren verwendeten Aufbau. Es wurde mit einem Diodenzellenspektrometer der Firma Zeiss gearbeitet, das über einen Y-Lichtleiter mit einer Lampe und einer verbunden wurde. Die Lampe wurde mit einem Hohlspiegel, einem

Kondensor 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 Glyzerin (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.

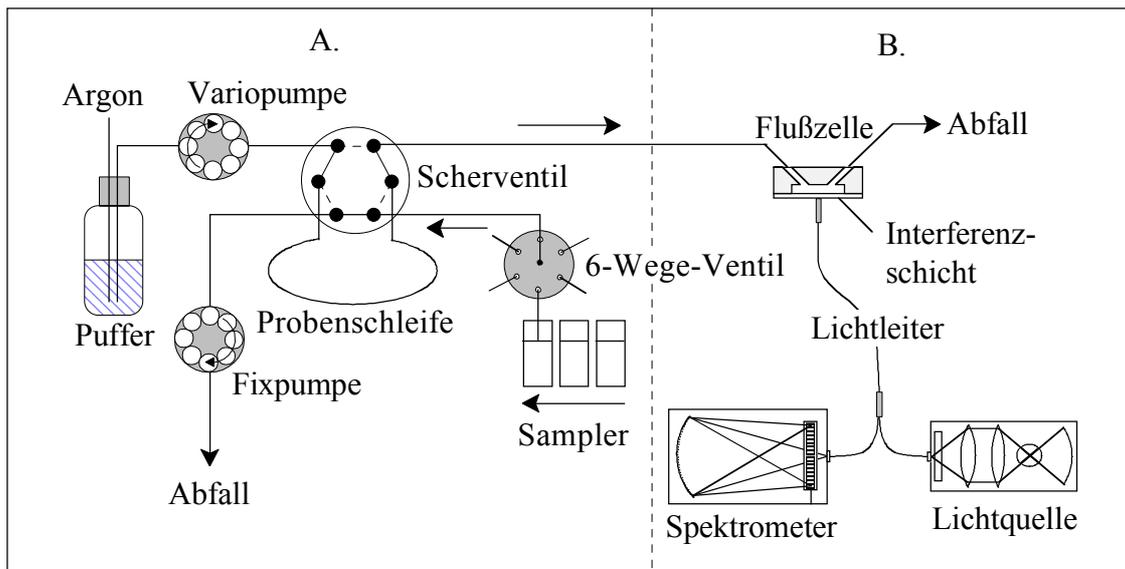


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau zur Messung von Interferenzspektren mit RfS. A. Probenhandhabung mit FIA und Autosampler. B. Detektion der Affinitätsreaktionen.

Als Transducer wurden Interferenzschichten aus SiO_2 auf einem Glassubstrat mit einer dünnen reflektionsverstärkenden Zwischenschicht aus Ta_2O_5 verwendet.

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 Interferenzschicht gemessen. Damit wurde die gemessene Intensität nach:

$$I_{Ifz} = \frac{I(\lambda) - I_0(\lambda)}{I_{REF}(\lambda) - I_0(\lambda)} \quad (69)$$

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.

Durchführung der RfS-Messungen

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 $\mu\text{l}/\text{min}$ innerhalb eines Zeitraums von 2 Minuten wurde die

Probe mit erhöhter Pumprate (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) 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.

3.5.3 Atomic Force Microscopy (AFM)

Mit der Rasterkraftmikroskopie wurde das Schichtsystem auf planaren Goldoberflächen untersucht. Es wurde 1x1 cm Siliziumwafer mit einer Wafersäge zugeschnitten und in Piranha gereinigt (15 min im Ultraschallbad). Mit der Aufdampfanlage mit 3 nm Titan als Haftvermittler und 80 nm Gold bedampft. Die Bedampfung mit Gold und die einzelnen Kopplungsschritte wurden entsprechend Kapitel 3.4.2 durchgeführt. Die Kopplung von Histamin erfolgte, indem der Histamin-GA-Aktivester zwischen zwei Goldoberflächen im Sandwich aufgegeben wurde. Die einzelnen Schichtsysteme wurden mit AFM im *tapping mode* charakterisiert.

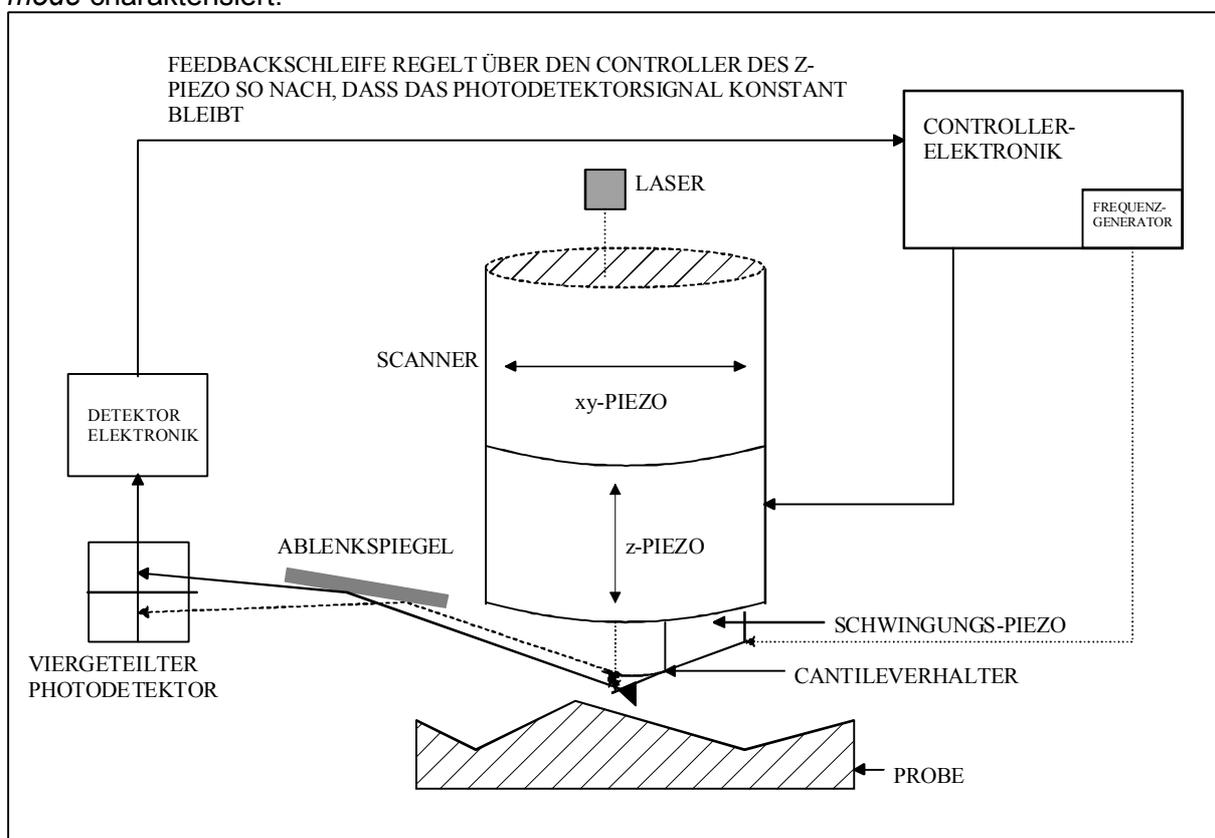


Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.

3.5.4 Fluoreszenzbild

Die gleichmäßige Belegung der Kavitätenwände mit ACA-BSA-Cy5.5 wurde mit dem Fluoreszenzreader Bioscan untersucht. Da der Bioscan die Fluoreszenz zwischen 660-680 nm durchlässt und das Fluoreszenzspektrum von Cy5.5 zwischen 650 und 750 nm liegt, kann ein Teil der Fluoreszenz aufgenommen werden. Die Fluoreszenz wurde in jeder einzelnen Kavität detektiert und daraus die mittlere Fluoreszenz und die Standardabweichung über alle Kaviäten (n=623) bestimmt.

3.5.5 Spektrale Ellipsometrie

Es wurden 2x2 cm Siliziumplättchen mit Gold bedampft und die Schichtdicke von immobilisiertem 11-MUA und daran gekoppeltem Histamin gemessen. Die Präparation wurde wie im Kapitel 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Aufdampfung wurde zunächst die Goldschicht vermessen, um daraus die Referenz zu erstellen.

Die Oberfläche wurde im Spektralbereich 400 – 800 nm mit einer Schrittweite von 5 nm pro Messpunkt vermessen. Die Messung wurde über Cauchy-Parameterisierung unter einem konstantem Brechungsindex von $n=1.46$ ausgewertet und damit die physikalische Schichtdicke angepasst.

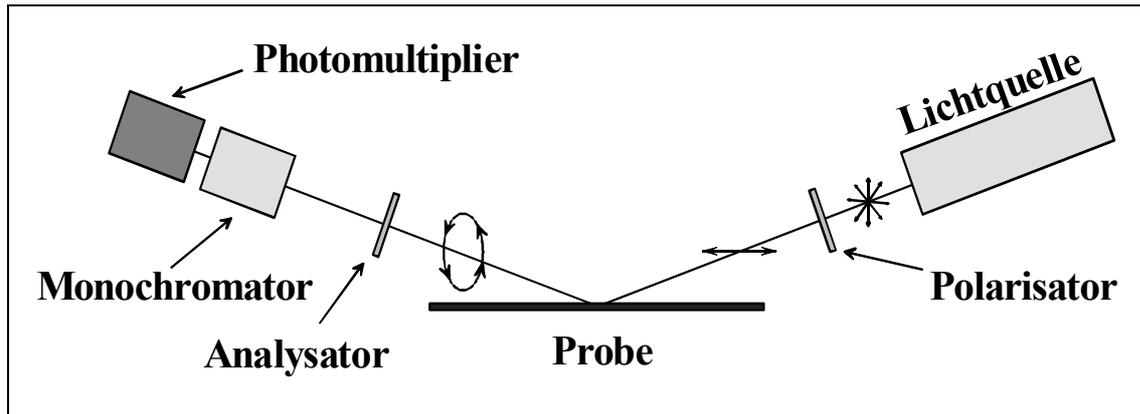


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau eines spektralen Ellipsometers

3.6 Automatisierte Probenhandhabung mit Nanolitervolumina

Mikrodosierung

Als Mikrodosierroboter wurde der das computergesteuerte Ink-Jet-System der Firma Microdrop verwendet. Die Mikrodosierpipette besteht aus einer Glaskapillare, um die konzentrisch ein Piezokristall-Aktuator angeordnet ist (Abb. 3.9).

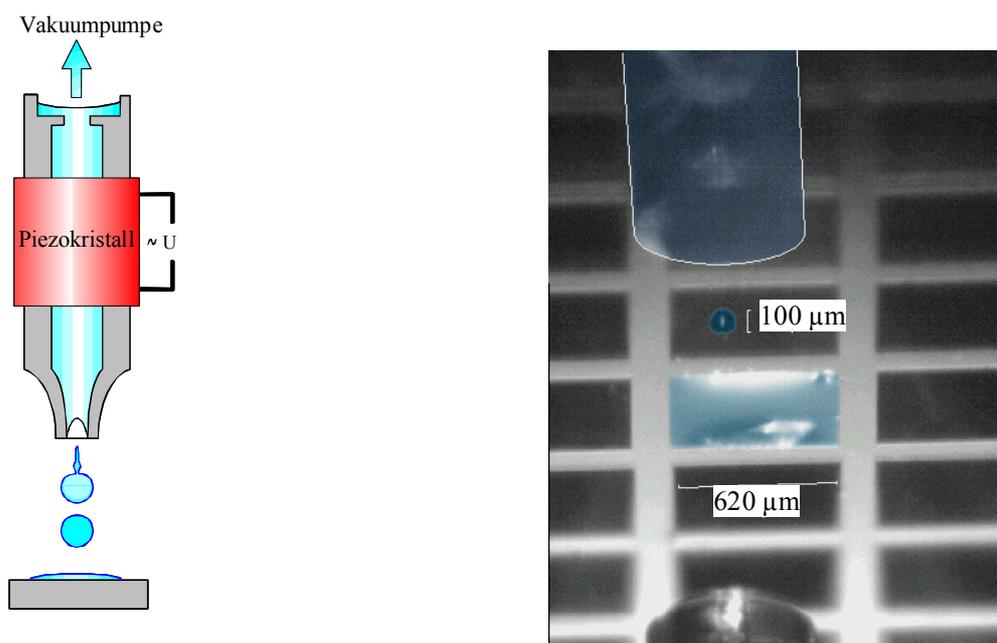


Abbildung 3.9: Dosierung freifliegender Tropfen mit einem Piezokristall getriebenen Mikrodosierpipette.

Das Mikrodosiervolumen wird hauptsächlich durch den Innendurchmesser der Düse bestimmt. Es wurde eine Mikrodosierpipette mit einem Innendurchmesser von 70 μm verwendet. Es wurden einzelne Tröpfchen durch Anlegen eines definierten Spannungspulses an den Piezokristall-Aktuator erzeugt. Die optimale Tropfenbildung kann durch Variation der Amplitude und der Pulsdauer eingestellt werden. Zur Tropfenkontrolle wurde die Mikrodosierpipette zur Stroposkopeinheit gefahren, die ein stehendes Bild eines abgerissenen Tröpfchens visualisierte. Für die Dosierung von Proteinlösungen wurden folgende Parameter festgelegt:

- Amplitude 91 V
- Pulsdauer 87 μs
- Frequenz 672 Hz

Das Tropfenvolumen kann berechnet werden, indem der Durchmesser d eines kugelrunden Tropfens im Stroposkobildd bestimmt wird.

$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 \quad (70)$$

In Abbildung 3.9 ist ein Tropfen mit einem Durchmesser von $100 \pm 5 \mu\text{m}$ abgebildet. Das Volumen berechnet sich nach der Volumengleichung einer Kugel mit 600 pL.

Eine weitere Methode zur Kalibrierung der Mikrodosierpipette ist das Abwiegen von 1000 Tröpfchen, die in ein 1 mL-Reagenzgefäß dispensiert werden.

$$V = \frac{m}{\rho} \quad (71)$$

Die Nanotiterplatte ist ein offenes System, wobei es bei diesen kleinen Probenvolumina zu starken Verdunstungsproblemen kommt. Deswegen wurde die Nanotiterplatte mit einem Peltierelement auf 15 °C gekühlt und die Luftfeuchtigkeit durch ein Luftbefeuchtungssystem zwischen 50-60% gehalten. Bei den Goldoberflächen reichte die Kühlung allein aus. Ein wichtiger Punkt war es etwas unterhalb des Taupunktes zu arbeiten, weil es ansonsten zur Kondensation an den Stegen der NTP kommt und dies beim Deckelungsprozess zu einer gleichmäßigen Verteilung der Flüssigkeit über die NTP führt.

Deckelung

Nach dem Befüllen der NTP wurde die Nanotiterplatte mit einer transparenten Adhäsivfolie gedeckelt. Dazu wurde ein quadratisches Stück, das etwas größer als 2x2 cm war, ausgeschnitten und auf die NTP gedrückt. Der Deckelungsprozess verlief am optimalsten, wenn an die Folie an einer Kante angelegt und mit einer Elastomer-Rolle übergerollt wurde.

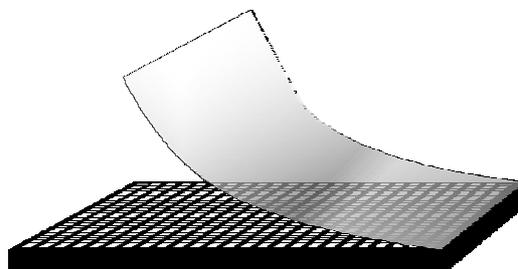


Abbildung 3.10: Deckelung der NTP mit einer transparenten Adhäsionsfolie.

Robotersystem

Die Mikrodosierpipette wurde über ein dreiaxsiges Robotersystem positioniert. Das computergestützte Positioniersystem wird über DC Servomotoren bewegt, die eine Präzision von 10 μm haben. Die Steuerung der Achsen erfolgt über das Programm Microdrop 3.1.

Dieses Programm kommuniziert mit einem Testpoint-Programm, das die Abfolge der Dosier- und Waschschr tte definiert.

Mikrodosierschemata

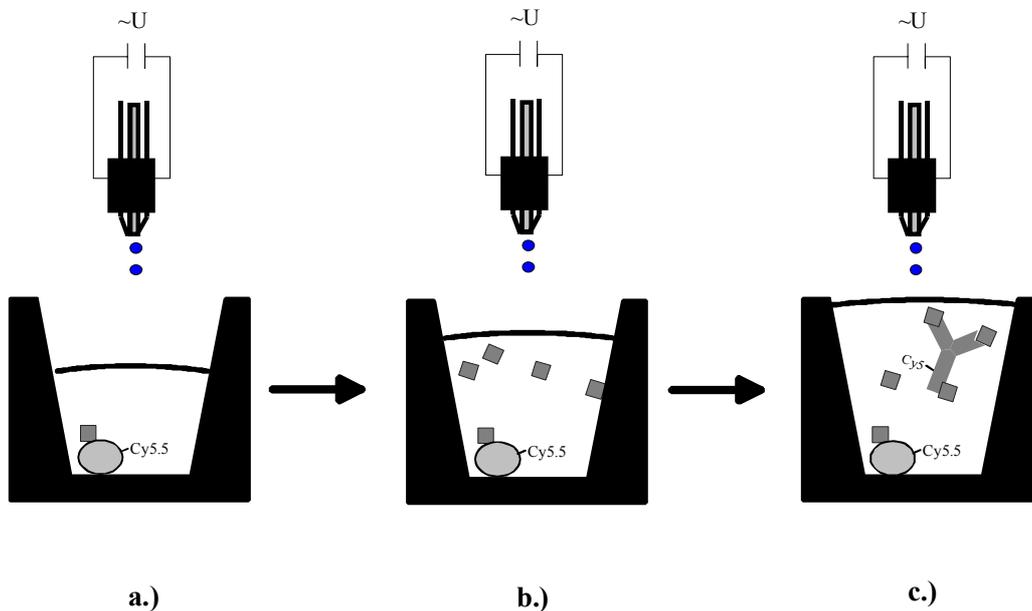


Abbildung 3.11: Computergesteuerte Dosierung der einzelnen Reagenzien. a.) Dosierung von Puffer b.) Einstellung verschiedener der Analytkonzentration c.) Dosierung des markierten Antikörpers.

Bei Ink-Jet-Verfahren sind die Waschschr tte des Innenraums der Mikrodosierpipette der zeitintensivste Schritt, weswegen sie möglichst minimiert werden müssen. Eine Verringerung von Waschschr tten erreicht man, indem man die unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen, die für eine Kalibrierkurve benötigt werden, direkt in den Kavitäten einstellt. Die benötigte Pufferlösung, Analyt-Stammkonzentrationen und Antikörperlösung, sowie Waschlösung (bidestilliertes Wasser) wurden in Kavitäten einer 96er-MTP vorgelegt. Dazu wird eine unterschiedliche Zahl an Analyt-Tröpfchen mit Puffer verdünnt und anschließend bis zu einem Endvolumen mit Antikörperlösung aufgefüllt. Für die vollständig auspipettierte Konzentrationsreihe und Zugabe von Antikörper benötigte man 5 Waschschr tte für die Abdeckung eines Konzentrationsbereiches von 5 Zehner-Potenzen.

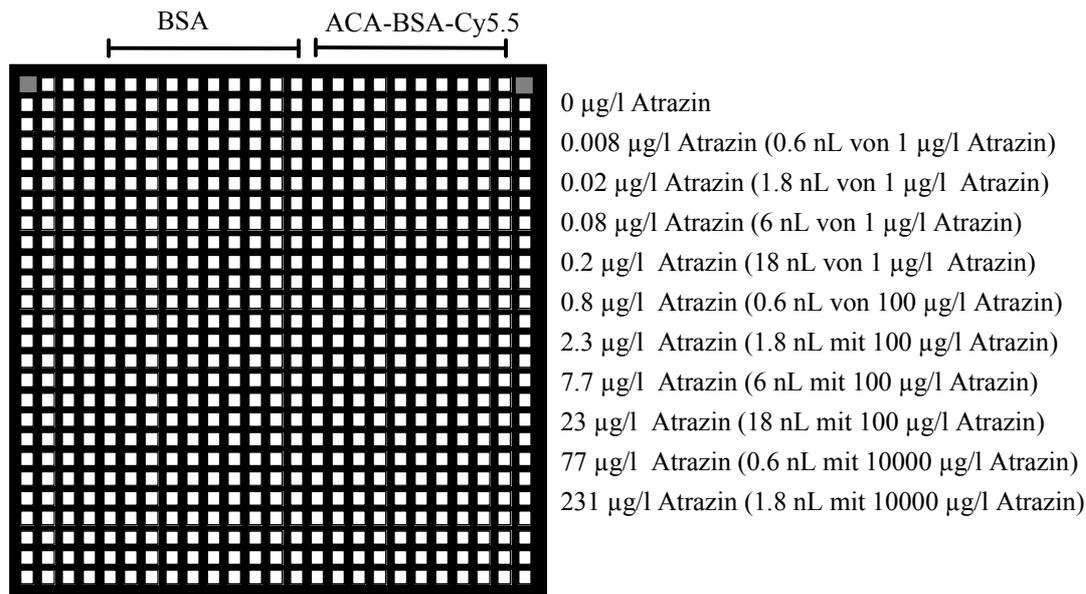


Abbildung 3.12: Dosierschema zur Kalibrierung von Atrazin mit dem PSFIA in der ABS-NTP

Zuerst wurden die entsprechenden Puffermengen in jede einzelne Nanoliterkavität vorgelegt und erst anschließend die Analyt-Tröpfchen zugegeben, so dass in jeder Kavität ein Volumen von 48 nL war (Tabelle 3.6). Danach wurde in jede Kavität 30 nL Anti-ACA IgG-Cy5 (25 nM) zugegeben. Die Endkonzentration an Antikörper war dementsprechend 10 nM.

Tabelle 3.6: Mikrodosierschema für Atrazin-Kalibrierung

| Atrazin-Stammlösung [µg/ml] | Tropfenzahl | | Endkonzentration Analyt [µg/l] |
|-----------------------------|-------------|--------|--------------------------------|
| | Puffer | Analyt | |
| 1 | 80 | 0 | 0 |
| | 79 | 1 | 0.008 |
| | 77 | 3 | 0.023 |
| | 70 | 10 | 0.077 |
| | 50 | 30 | 0.23 |
| 100 | 79 | 1 | 0.76 |
| | 77 | 3 | 2.31 |
| | 70 | 10 | 7.69 |
| | 50 | 30 | 23.1 |
| 10000 | 79 | 1 | 76.92 |

Für die goldbeschichteten NTP wurde insgesamt 60 nL Reaktionslösung eingesetzt. Davon wurden 30 nL Anti-Atrazin IgG-Cy5 mit einer Konzentration von 8 nM bzw. 4 nM in die NTP appliziert. In Tabelle 3.7 ist die Einstellung der Atrazinkonzentrationen aufgelistet.

Tabelle 3.7: Atrazin-Kalibrierung auf goldbeschichteter NTP

| Atrazin- Stammlösung [$\mu\text{g}/\text{ml}$] | Tropfenzahl | | Endkonzentration Analyt [$\mu\text{g}/\text{l}$] |
|--|-------------|--------|---|
| | Puffer | Analyt | |
| 1 | 50 | 0 | 0 |
| | 49 | 1 | 0.01 |
| | 47 | 3 | 0.04 |
| | 40 | 10 | 0.13 |
| | 20 | 30 | 0.38 |
| 100 | 49 | 1 | 1.25 |
| | 47 | 3 | 3.75 |
| | 40 | 10 | 12.5 |
| | 20 | 30 | 37.5 |
| | 10000 | 49 | 1 |
| | 47 | 3 | 375 |

Für die Kalibrierung mit Estradiol auf goldbeschichteten NTP wurde insgesamt ein Reaktionsvolumen von 60 nL verwendet. Es wurde 30 nL Anti-Estron IgG-Cy5 (MG=7) mit einer Konzentration von 2 nM mit zunehmender Konzentration zu 30 nL Estradiol in die NTP appliziert. Tabelle 3.8 stellt die mikrodotierte Verdünnungsreihe von Estradiol dar.

Tabelle 3.8: Kalibrierung von Estradiol auf goldbeschichteter NTP.

| Estradiol- Stammlösung [$\mu\text{g}/\text{ml}$] | Tropfenzahl | | Endkonzentration Analyt [$\mu\text{g}/\text{l}$] |
|--|-------------|--------|---|
| | Puffer | Analyt | |
| 1 | 80 | 0 | 0 |
| | 79 | 1 | 0.008 |
| | 77 | 3 | 0.023 |
| | 70 | 10 | 0.077 |
| | 50 | 30 | 0.23 |
| 100 | 79 | 1 | 0.76 |
| | 77 | 3 | 2.31 |
| | 70 | 10 | 7.69 |
| | 50 | 30 | 23.1 |
| | 10000 | 79 | 1 |

Für die Kalibrierung von Histamin in Gold-NTPs wurde derivatisiertes Histamin mit einer zunehmenden Konzentration zwischen 0.83 nM und 830 nM in die Nanoliterkavitäten appliziert und mit 2 nM Anti-Histamin IgG-Cy5 (MG=1.7) in PBS-Puffer pH 7.4 mit 1 mg/mL aufgefüllt.

Tabelle 3.9: Kalibrierung von Cy5 in goldbeschichteter bzw. unbeschichteter NTP

| Cy5-Stammlösung [nM] | Tropfenzahl | | Endkonzentration Analyt [nM] |
|----------------------|-------------|--------|------------------------------|
| | Puffer | Analyt | |
| 10 | 100 | 0 | 0 |
| | 99 | 1 | 0.1 |
| | 97 | 3 | 0.3 |
| | 95 | 5 | 0.5 |
| | 92 | 8 | 0.8 |
| | 90 | 10 | 1 |
| | 70 | 30 | 3 |
| | 50 | 50 | 5 |
| | 20 | 80 | 8 |
| | 1000 | 99 | 1 |
| 97 | | 3 | 30 |
| 95 | | 5 | 50 |
| 92 | | 8 | 80 |

3.7 Durchführung des 3'-Exonuklease-Assays

3'-Exonuklease-Assay in der MTP

Eine Streptavidin-MTP (Bindungskapazität 20 pmol/Kavität) wurde 1 h lang mit 100 pmol biotinylierter Cy5 markierter DNA (mskk21biotin) inkubiert. Ungebundene DNA wurde durch intensives Spülen entfernt. Um eine Kalibrierkurve zu erstellen, wurde unmarkierte DNA unterschiedlicher Konzentration zugegeben und die 30 min Lösungen in den Kavitäten inkubiert. Die Kavitäten wurden erneut intensiv gewaschen. Die enzymatische Reaktion der doppelsträngigen DNA erfolgte, indem 1 U/μl Exonuklease III, die in einem speziellen Reaktionspuffer gelöst war, in jede Kavität gegeben wurde. Der Reaktionspuffer bestand aus 0.066 M Tris pH 8.0, 6.6 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol und 0.05 mg/ml BSA. Nach 30 minütiger Reaktionszeit wurde der Überstand abgenommen und in eine Fluoreszenz-MTP transferiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit dem MTP-Lesegerät LSR 200 von PerkinElmer ausgelesen.

3'-Exonuklease-Assay in der Gold-NTP

An die Kavitätenwände der Gold-NTP wurde 75 fmol der Cy5 markierten DNA-Sonde, an die am 5'-Ende ein Thiolinker synthetisiert war, immobilisiert. Unmarkierte DNA, die in Tris-Puffer pH 8.0 gelöst war, wurde mit zunehmender Konzentration (0.25 nM bis 75 nM) mit Hilfe des Mikrodosierroboters appliziert. Nachdem man die Lösung eintrocknen ließ, wurde 10⁻⁴ U/nL der Exonuklease III im Reaktionspuffer (siehe oben) zugegeben. Die NTP wurde gedeckelt und nach 30 min wurde im Bioscan ein Fluoreszenzbild aufgenommen.

CGE-Experimente

Es wurde zwei komplementäre DNA Stränge mit einer Konzentration von jeweils 1.24 · 10⁻⁴ M in Exonukleasepuffer (mit und ohne Magnesium Ionen) zusammen mit 1U/μl Exonuklease III 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 0.01 M EDTA abgestoppt. Als Kontrollexperiment wurde die Reaktion wie oben beschrieben nur mit der doppelten Konzentration an Einzelstrang-DNA (2.48 · 10⁻⁴ M) durchgeführt. Die Reaktionslösungen

wurden über Nacht gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde mit einer Kapillargelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 260 nm.

RfS-TIRF-Kopplung

Es wurde ein PNA-RfS-Transducer verwendet, der nach Kröger et al., 2002, präpariert wurde. An die PNA-Oberfläche wurde zunächst 10 µg/ml des langen DNA-Strangs, der als Bindeglied zwischen PNA-Oberfläche und zweiter DNA diente, hybridisiert und anschließend 10 µg/ml der kürzeren fluoreszenzmarkierten DNA.

3.8 Datenauswertung

Kompetitive Testformate

In den kompetitiven Testformaten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, konkurriert ein markiertes Analytderivat mit dem Analyten um die Bindestelle des Rezeptors. An den Rezeptor ist ein Donor-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, an das Analytderivat der Akzeptorfarbstoff, so dass es bei einer Bindung zu einem strahlungslosen Energieübertrag kommt und das Fluoreszenzsignal des Donors gesenkt wird. Dieses Prinzip kann man sowohl in homogener als auch in heterogener Phase anwenden. In heterogener Phase wurde der Akzeptor entweder über BSA an die Kunststoffoberfläche adsorptiv immobilisiert oder es wurde eine Goldoberfläche verwendet. In allen Fällen ergibt sich eine konzentrationsabhängige Signalzunahme, wenn Analyt in Lösung ist und die Bindestellen des Rezeptors blockiert. Bei halblogarithmischer Auftragung der Analytkonzentration erhält man eine sigmoidale Kalibrierkurve. Es ist üblich, die gemessenen Kalibrierpunkte durch eine 4-Parameter-logistische Funktion anzupassen. Die allgemeine Form der Gleichung lautet (Dudley et al)

$$y = \frac{A - B}{1 + (x/C)^D} + B \quad (72)$$

wobei y die Fluoreszenzintensität, x die Analytkonzentration, A und B die obere bzw. untere Asymptote, C die Konzentration bei 50% der maximalen Fluoreszenzintensität (IC_{50} oder Testmittelpunkt TMP) und D die Steigung am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve darstellt.

Auf der y-Achse wird entweder die gemessenen Fluoreszenzintensitäten I_F oder die normierten, dimensionslosen Einheiten B/B_0 aufgetragen, wobei

$$\frac{B}{B_0} = \frac{I - I_{\max}}{I_{\max} - I_{\min}} \cdot 100 \quad (73)$$

ist. Als maximale Fluoreszenzintensität wurde die Fluoreszenzintensität bei Analytsättigung in Lösung und als minimale Fluoreszenzintensität die Nullmessung ohne Analyt gewählt.

3'-Exonuklease-Assay

Der nicht-kompetitive Assay hat bei niedrigen Substratkonzentrationen einen linearen Signalverlauf, der bei Limitierung der Analytkonzentration x asymptotisch gegen eine maximale Fluoreszenzintensität geht. Dementsprechend lässt sich der Kurvenverlauf mit einer Langmuir-Gleichung anpassen.

$$y = I - I_0 = \frac{I_{\max} \cdot x}{K + x} \quad (74)$$

wobei y die Differenz der gemessenen Fluoreszenzintensität I und dem Nullwert ohne Substrat I_0 , y_{\max} die maximale Fluoreszenzintensität, c_S die eingesetzte Konzentration und K die Konzentration bei halbmaximaler Analytättigung ist.

Statistische Bewertung

Den Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten erhält man aus den Replikamessungen:

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad (75)$$

Als n wurden die Messwerte ausgewählt, die auswertbar waren. Es wurden die Fluoreszenzintensitäten nicht hinzugezogen, die nach Auswertung des Fluoreszenzbildes entweder als Staubpartikel oder Luftblasen identifiziert wurden und dadurch zu hohe bzw. zu niedrige Intensitäten ergaben.

Die Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten berechnet sich folgendermaßen:

$$sd_y = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (76)$$

Der Fehler der Fluoreszenzintensitäten $y(Er\pm)$ bei einer bestimmten Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$y(Er\pm) = \frac{sd_y}{(I_{\max} - I_{\min})} \cdot 100 \quad (77)$$

Die Standardabweichungen sd der einzelnen Fluoreszenzintensitäten wird in Relation zu der Differenz der maximalen und minimalen Fluoreszenzintensität gesetzt.

Als Nachweisgrenze wird diejenige Analytkonzentration definiert, die sich aus der Kalibrierkurve aus dem kleinsten detektierbaren Signal y_{dec} (Erkennungsgrenze) ergibt. Als Erkennungsgrenze wurde die Nullmessung ohne Analyt verwendet. Die Erkennungsgrenze berechnet sich wie folgt:

$$y_{\text{dec}} = y_B + 3 \cdot sd_B \quad (78)$$

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

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Immobilisierungsstrategien auf Kunststoffoberflächen

In dieser Arbeit sollten heterogene Nachweisverfahren auf Kunststoffträgern etabliert werden. Die Nanotiterplatte war aus einem Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) gefertigt. Dieses Kunststoffmaterial war lösungsmittel- und hitzeempfindlich. Dementsprechend mussten geeignete Protokolle zur Immobilisierung von Analytderivaten erarbeitet werden, die ohne Lösungsmittel auskamen und Hitze vermieden. In dieser Arbeit wurden drei mögliche Immobilisierungsstrategien untersucht:

- Adsorptive Oberflächenbelegung
- Photochemische Immobilisierung
- Goldbeschichtung und Immobilisierung über Thiolchemie

Ein weiteres Problem der Nanotiterplatte war, dass es kein Verfahren gab, direkt die Oberflächen in den Nanoliterkavitäten zu charakterisieren. Ein Ausweg war die Fluoreszenzdetektion mit markierten Systemen oder die Übertragung auf ebene Oberflächen. Deswegen wurden Kunststoffoberflächen auf Glas-Transducern immobilisiert und mit der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) die Oberflächen auf Funktionalität der immobilisierten Schichtsysteme untersucht.

Die Goldschichten ließen sich über spektrale Ellipsometrie und Rasterkraftmikroskopie (AFM) charakterisieren.

4.1.1 Adsorptive Oberflächenbelegung von BSA-Derivaten auf ABS-NTP

Für den Aufbau eines Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassays (PSFIA) auf ABS-Nanotiterplatten musste sowohl das Analytderivat Atrazincapronsäure (ACA) als auch der Akzeptorfarbstoff Cy5.5 immobilisiert werden. Als eine einfache und effektive Methode zur Immobilisierung von ACA an die Polymer-Oberfläche erwies sich die adsorptive Oberflächenbelegung mit Rinderserumalbumin, an das sowohl ACA als auch Cy5.5 kovalent gekoppelt waren. Ein wichtiger Punkt für den PSFIA war die gleichmäßige Verteilung von ACA-BSA-Cy5.5 an den Kavitätenwänden. Die Nanoliterkavitäten haben die Form von Pyramidenstümpfen, so dass es beim Eintrocknen der Flüssigkeit zu Kapillarströmen hin zu den Kanten kam. An den Kanten wurde ACA-BSA-Cy5.5 angehäuft, wie die Fluoreszenzaufnahme in Abb 4.1 zeigt.

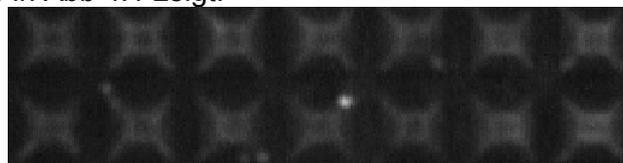


Abbildung 4.1: Fluoreszenzbild von in die Nanoliterkavitäten eingetrocknetem ACA-BSA-Cy5.5.

Dies hätte zur Folge, dass der Antikörper z.T. unspezifisch an die unbedeckten Flächen der Kavitätenwände binden könnte und somit sich die Konzentrationsverhältnisse und damit die Gleichgewichte im PSFIA verändern würden.

Eine gleichmäßige Belegung erreichte man, indem man die einzelnen Kavitäten der Nanotiterplatte mittels der Mikrodosierpipette mit ACA-BSA-Cy5.5 befüllte, deckelte und über Nacht im Kühlschrank stehen ließ. Mit einem Fluoreszenzbild ließ sich die homogene

Fluoreszenzverteilung nachweisen, denn ein kleiner Anteil des Fluoreszenzspektrums von Cy5.5 konnte vom Bioscan detektiert werden.

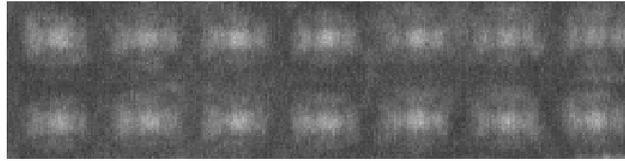


Abbildung 4.2: Fluoreszenzbild zeigt eine gleichmäßige Fluoreszenzverteilung an den Wänden der Nanoliterkavitäten. Die Kavitäten wurden mit ACA-BSA-Cy5.5 befüllt, gedeckelt, inkubiert und zuletzt gewaschen und getrocknet.

In jede Kavität wurde $20 \mu\text{M}$ ACA-BSA-Cy5.5 gefüllt. Die gleichmäßige Bedeckung bedeutete, dass in jeder Kavität die Fluoreszenzintensität gleich war. Die Fluoreszenz an den Wänden der Nanoliterkavitäten betrug $\text{FI} = 22490 \pm 1370$. Abbildung 4.3 zeigt die gemessene Fluoreszenz in jeder einzelnen Nanoliterkavität.

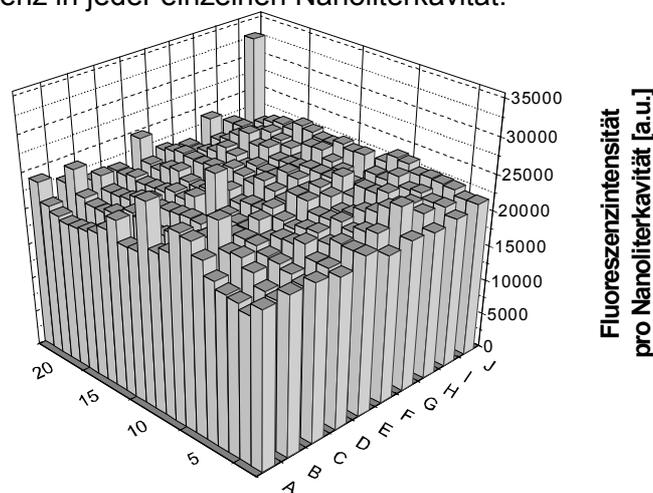


Abbildung 4.3: Verteilung der Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Nanoliterkavitäten.

Die wenigen Ausreißer waren Artefakte, die ein falsches Fluoreszenzsignal hauptsächlich aufgrund von Streuung erzeugten.

Schlussfolgerungen

- ACA-BSA-Cy5.5 ließ sich gleichmäßig in jeder einzelnen ABS-Nanoliterkavität adsorptiv immobilisieren.
- Um das Eintrocknen zu verhindern, wurde die Nanoliterplatte nach dem Befüllen mit der Mikrodosierpipette gedeckelt in den Kühlschrank gestellt.
- Die Charakterisierung der Oberflächenbelegung über eine orts aufgelöste Fluoreszenzdetektion erwies sich als eine sinnvolle Methode, weil sie die einzige zerstörungsfreie Oberflächencharakterisierungsmethode ist, mit der die dreidimensionale Kunststoffstrukturen untersucht werden konnten.

4.1.2 Photochemische Immobilisierung

Werden Waschprozesse innerhalb eines Nachweisverfahrens notwendig, wie es im Projekt nanoMAP der Fall war, sollte das Analytderivat beziehungsweise die DNA-Sonde kovalent auf der Kunststoffoberfläche immobilisiert werden. Als geeignetes Verfahren stellte sich die Immobilisierung über photoaktivierbare Gruppen, die als Photolinker bezeichnet werden, heraus. Dieser Photolinker sollte folgende Eigenschaften besitzen:

- Hydrophobe Gruppen
- Funktionelle Gruppe
- Photoaktivierbar mit $\lambda > 300$ nm

Die hydrophoben Eigenschaften ermöglichen dem Molekül zunächst adsorptiv an die Oberfläche zu binden, denn ohne Berührung ist auch keine Reaktion an der Oberfläche möglich. Die funktionelle Gruppe dient als Kopplungsstelle für die Biomoleküle, die letztendlich immobilisiert werden sollten. Die kovalente Bindung wird durch Radikalbildung erzeugt, nachdem der Photolinker mit Licht angeregt wurde. Das Anregungslicht sollte eine Wellenlänge größer als 300 nm haben, damit die Biomoleküle nicht zerstört werden.

Als Photolinker wurde das Benzophenonderivat 4-Benzoylbenzoesäure (BBS) gewählt, das allen Anforderungen entsprach.

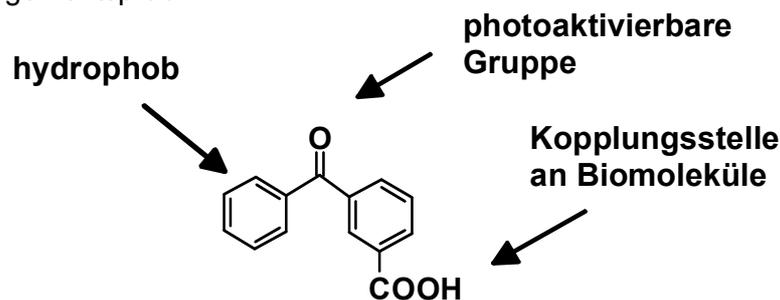


Abbildung 4.4: Strukturformel und Eigenschaften des Photolinkers 4-Benzoylbenzoesäure

Immobilisierung von ACA-AMD in der Nanoliterkavitäten

Erste Untersuchungen wurden direkt in der Nanotiterplatte durchgeführt. Dazu wurde an den Aminozucker Aminodextran (AMD) sowohl der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 als auch der Photolinker 4-Benzoylbenzoesäure gekoppelt. Als Negativkontrolle wurde AMD allein mit Cy5 markiert. Beide Moleküle wurden über die Mikrodosierpipette in die jeweiligen Kavitäten gefüllt. Nach dem Befüllen trocknete die Flüssigkeit in den Kavitäten ein und anschließend wurde die NTP mit einer Quecksilberdampfampe 30 Minuten beleuchtet. Vor der Nanotiterplatte wurde ein Kantenfilter eingesetzt, der Licht oberhalb einer Wellenlänge von 300 nm durchließ. Die Nanotiterplatte wurde nach dem Beleuchten intensiv gewaschen. Alle Schritte wurden über die Fluoreszenzdetektion im Bioscan verfolgt (Abb. 4.5):

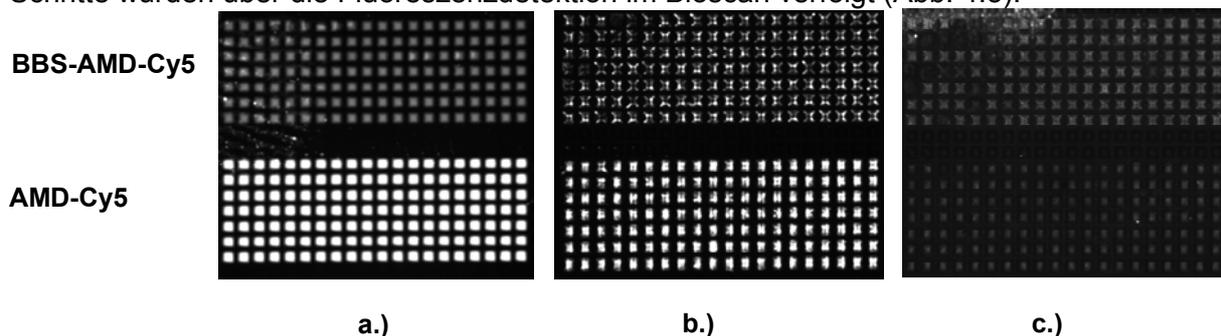


Abbildung 4.5: Erster Immobilisierungsversuch von BBS-AMD-Cy5 auf die Wände der Nanoliterkavitäten. a.) Befüllung mit BBS-AMD-Cy5 und als Kontrolle AMD-Cy5 b.) Eintrocknen lassen c.) Fluoreszenzbild nach Photoimmobilisierung, Waschen und Trocknen.

Es war zu erkennen, dass prinzipiell das Aminodextran, an das Benzophenon gekoppelt wurde, besser an die Wände der Nanoliterkavitäten gebunden hat als das AMD-Cy5-Konjugat. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 adsorbierte jedoch auch an die Oberfläche, so dass

die spezifische Bindung von BBS-AMD-Cy5 nicht direkt über Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer Punkt, der schon in Kapitel 4.1 erwähnt wurde, war die unregelmäßige Fluoreszenz nach dem Eintrocknen. Deswegen wurde die Nanotiterplatte nach dem Befüllen mit der Adhäsionsfolie gedeckelt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Dadurch sollten die hydrophoben Anteile des derivatisierten Aminodextrans adsorptiv an die Oberfläche binden und sich gleichmäßig an den Wänden verteilen.

Genau diesen Effekt konnte in Abbildung 4.6 nachgewiesen werden. Das Schaubild zeigt ein Intensitätsprofil in vertikaler Richtung über eine Kavitätenreihe der NTP. Die Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche war bei BBS-AMD-Cy5 wiederum höher als bei AMD-Cy5. Gleichzeitig war im Fluoreszenzbild die gleichmäßige Verteilung an den Wänden der Nanoliterkavitäten gut zu erkennen.

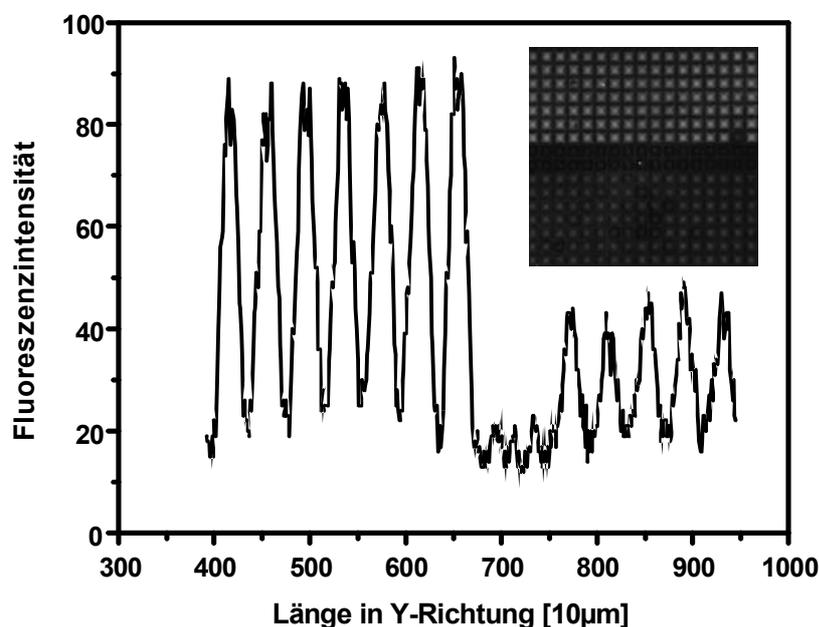


Abbildung 4.6: Fluoreszenzprofil in Y-Richtung über eine Kavitätenreihe. Oben wurde BBS-AMD-Cy5 in die NTP gefüllt und unten die Kontrolle AMD-Cy5. Die Photoimmobilisierung erfolgte in der mit Adhäsionsfolie gedeckelten NTP. Anschließend wurde die NTP gewaschen und getrocknet.

Charakterisierung der Oberflächenchemie mit 4-Benzoylbenzoesäure

Für die dreidimensionalen Kunststoffstrukturen reichten die Fluoreszenzmessungen nicht aus, um die Oberfläche zu charakterisieren. Deswegen wurde die Kunststoffoberfläche auf eine ebene Fläche aufgetragen. Dazu eigneten sich die Glastransducer, die zur RfS-Detektion, eingesetzt wurden. Die Kunststoffoberfläche sollte kovalent auf Glas angebunden werden. Auf die Glasoberfläche wurde ein Aminosilan, das 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan (ABDMS), immobilisiert. Daran wurde die 4-Benzoylbenzoesäure über seinen Aktivester gekoppelt. Daraufhin wurde in Aceton gelöstes Polystyrol auf die Oberfläche gegeben und mit der Quecksilberdampfampe bei $\lambda > 300$ nm beleuchtet. Mit dieser Methode konnte kovalent Polystyrol auf Glas fixiert werden. In einem nächsten Schritt wurde Aminodextran, das mit ACA derivatisiert wurde, auf Polystyrol kovalent gebunden. Auf die Polystyroloberfläche wurde 4-BBS photochemisch immobilisiert. Das Aminodextran wurde

immobilisiert, indem die Oberfläche mit N-Hydroxysuccinimid und Diisopropylcarbodiimid (DIC) aktiviert wurde, die mit den freien Aminogruppen von AMD reagierten. Dieser Schichtaufbau ist in Abbildung 4.7 zusammengefasst.

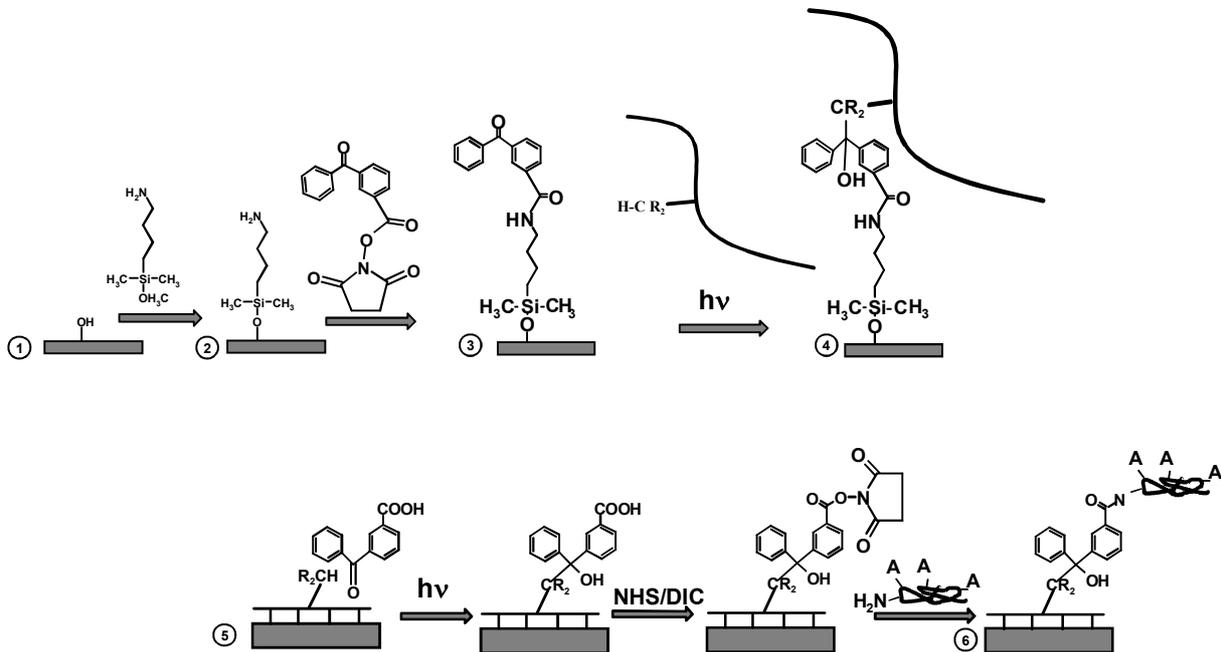


Abbildung 4.7: Prinzip des Schichtaufbaus von Polystyrol und AMD-Analytderivat auf Glasoberflächen. 1. Silanisierung, 2. Kopplung von BBS-NHS-Aktivester, 3. Beschichtung mit Polystyrol, 4. Photoimmobilisierung, 5. Carboxylierung mit BBS 6. Immobilisierung von ACA-AMD.

Der Schichtaufbau wurde mit Kontaktwinkelmessungen verfolgt. Dazu wurde die Methode des aufliegenden Tropfens (*sessil drop*) angewandt. Die Oberflächen konnten über die Randwinkelmessungen nach hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften charakterisiert werden. Diese Methode gab nur Summenereignisse wieder, da nicht nur die oberste Schicht enthalten war, sondern untere Schichten ebenso miteinbezogen wurden.

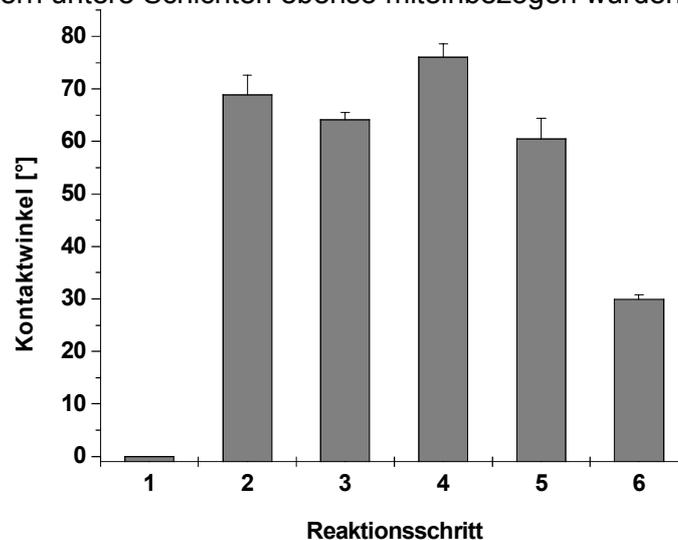


Abbildung 4.8: Verfolgung des Schichtaufbaus über Kontaktwinkelmessungen (n=5).

Der Kontaktwinkel von aktiviertem Siliziumdioxid war nicht bestimmbar, weil die Oberflächenenergie so hoch war, dass der Tropfen vollständig spreizte. Er wird mit 0° angenommen. Die einzelnen Schichten hatten verhältnismäßig hohe Kontaktwinkel. Der von Polystyrol war am höchsten und lag bei $76 \pm 3^\circ$. Hier waren die meisten hydrophilen Gruppen durch das Polystyrol abgedeckt worden. Das hydrophile Aminodextran ergab einen niedrigen Kontaktwinkel von $30 \pm 1^\circ$. Die Kontaktwinkelmessungen waren eine einfache Methode, um die einzelnen Reaktionsschritte auf der Glasoberfläche zu verfolgen.

Die unterschiedlichen Stadien des Schichtaufbaus der Kunststoffoberfläche wurden mit RfS auf unspezifische Wechselwirkung mit der Oberfläche untersucht. Bekannt war, dass an Polystyrol sowohl OVA als auch Antikörper binden. Es wurde in der Reihenfolge OVA, $2 \mu\text{g/ml}$ Anti-ACA und $10 \mu\text{g/ml}$ Anti-ACA über die Oberflächen geleitet und das Bindeereignis über die optische Schichtdicke nachgewiesen (Abb. 4.9).

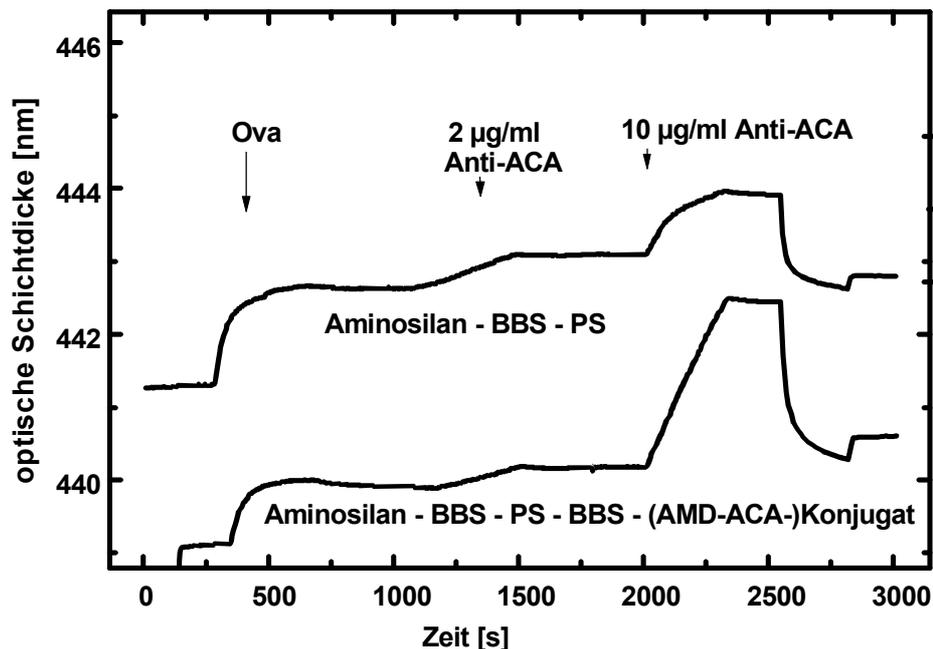


Abbildung 4.9: Untersuchung der unspezifischen Bindung mit RfS von Ova und IgG auf Polystyrolschichten (PS) und auf spezifischer ACA-AMD-PS-Schicht.

Wie es zu erwarten war, hatten der Antikörper und das Ovalbumin unspezifisch an die Kunststoffoberfläche gebunden. Im RfS-Experiment war darüber hinaus zu erkennen, dass der Polystyroluntergrund der ACA-AMD-Schicht eine unspezifische Adsorption von OVA verursachte. Deswegen konnte in diesem Experiment die ACA-AMD-Schicht nicht auf spezifische Bindung des Anti-ACA Antikörpers untersucht werden.

In einem nächsten Schritt wurde die spezifische Bindung durch den Bindungshemmtest untersucht. Dazu wurde der Anti-ACA IgG zunächst wie oben beschrieben über die Oberfläche geleitet und anschließend ein vollständig mit Atrazin inhibierter Anti-ACA-Antikörper (Abb. 4.10).

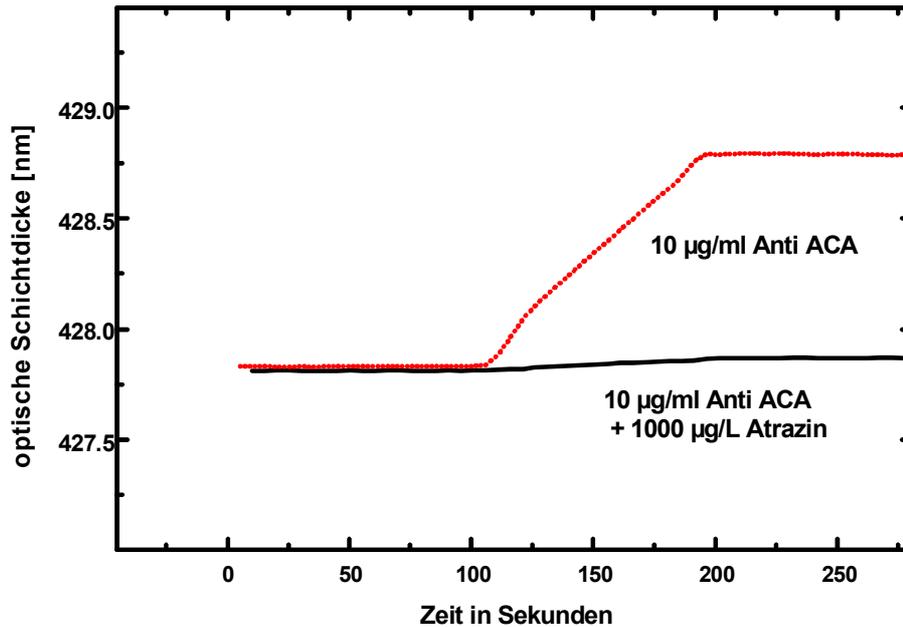


Abbildung 4.10: Nachweis der spezifischen Bindung mit RIfS von Anti-ACA Antikörper auf ACA-AMD-PS-Schichten.

Der inhibierte Antikörper wechselwirkte nicht mit der Oberfläche, weswegen von einer spezifischen Bindung von Anti-ACA IgG an die ACA-AMD auszugehen war.

Mit der RIfS-Methode wurde das Schichtsystem AMD-ACA auf kovalent gebundenem Polystyrol auf seine Stabilität hin untersucht. Dazu wurde über die Oberfläche zuerst Ovalbumin (OVA) zur Charakterisierung der unspezifischen Bindung und anschließend der polyklonale Antikörper Anti-ACA in niedriger und hoher Konzentration über die Oberfläche geleitet. Danach wurde der Transducer mit HCl regeneriert und im Folgenden nochmals mit OVA und Anti-ACA charakterisiert (Abb. 4.11).

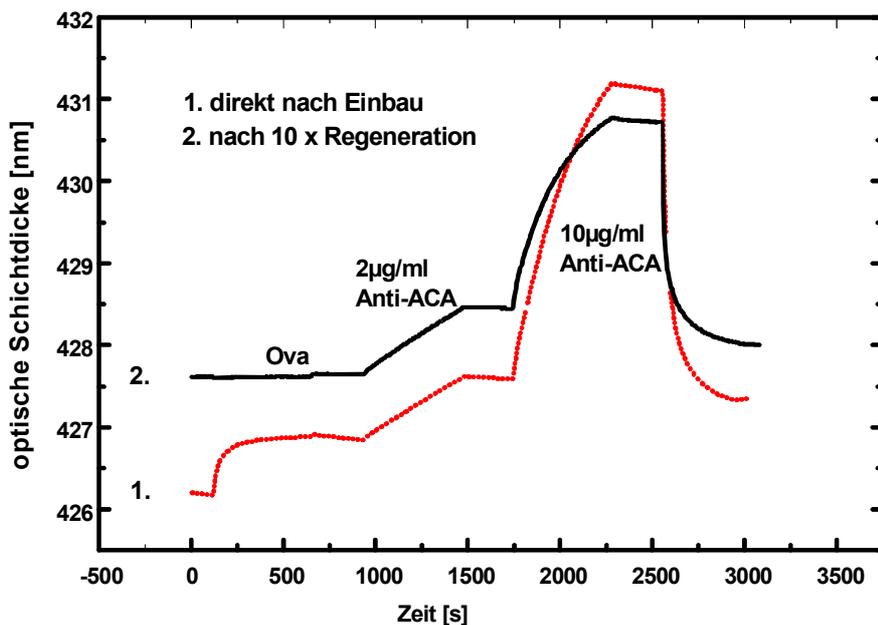


Abbildung 4.11: Charakterisierung der ACA-AMD-PS-Schichten mit RIfS.

Das Schichtsystem zeigte zunächst unspezifische Bindung von OVA, die aber nach Reinigung der Oberfläche mit dem Regenerationsmittel HCl zu vernachlässigen war. Mit einer niedrigen Konzentration von Anti-ACA IgG wurde ein linearer Verlauf der Bindung an die Oberfläche detektiert. Bei einer hohen Konzentration verlief die Bindung nach dem Langmuir-Verhalten. Die AMD-ACA- Schicht auf immobilisiertem Polystyrol war über 10 Regenerationen hinweg stabil. Mit der Photoimmobilisierung von Polystyrol auf Glas wurde eine Möglichkeit gezeigt, wie man mit RfS Kunststoffoberflächen untersuchen kann.

Anwendung der Photochemie auf die Immobilisierung von DNA

Die Erfahrungen, die in dieser Arbeit mit der photochemischen Immobilisierung von Benzophenonderivaten gemacht wurden, flossen in das Projekt nanoMAP ein. Dort sollten Oligonukleotide auf Kunststoffoberflächen immobilisiert werden. In der Diplomarbeit von Frau Dankbar (2002) zeigte sich, dass 4-Benzoylbenzoesäure ein geeigneter Photolinker für die kovalente Kopplung von DNA an Kunststoffoberflächen war. Der Nachweis wurde in einem Hybridisierungsexperiment erbracht. Dazu wurde an eine DNA, die am 5'-Ende einen Aminolinker enthielt, die 4-Benzoylbenzoesäure gekoppelt. Diese Sonde (mskk21) wurde auf die Oberfläche gespottet und photochemisch mit $\lambda > 300$ nm immobilisiert. Die Bindung wurde über Fluoreszenz nachgewiesen, indem ein zu mskk21 komplementärer Cy5-markierter DNA-Strang (micha3a) an die Sonde hybridisierte. Zur Kontrolle wurden Sonden mit einem Basenunterschied (OIA4) und eine mit völlig verschiedener Sequenz (OIA3) immobilisiert. Die Fluoreszenzintensität der Spots war bei der komplementären Sonde am stärksten (Abb 4.12).

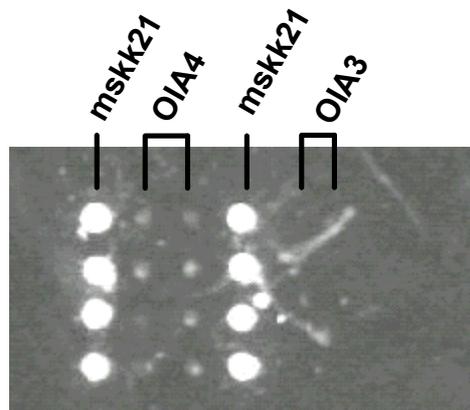


Abbildung 4.12: Photoimmobilisierung von DNA auf Kunststoffoberflächen und Nachweis der Immobilisierung über komplementären Cy5-markiertem DNA-Strang (Dankbar, 2002).

Schlussfolgerungen:

- Der Photolinker 4-Benzoylbenzoesäure eignete sich zur kovalenten Immobilisierung biomimetischer Schichtsysteme auf Kunststoffoberflächen über eine photochemische Radikalreaktion.
- Es wurde auf Glasoberflächen eine Kunststoffschicht kovalent immobilisiert.
- Mit der RfS-Methode wurde die kovalente Anbindung von Aminodextran, an das das Atrazinderivat ACA gekoppelt war, an Kunststoffoberflächen auf spezifisches oder unspezifisches Bindeverhalten von OVA und Anti-Atrazin Antikörper untersucht.
- Der Photolinker 4-Benzoylbenzoesäure wurde im Projekt nanoMAP zur photochemischen Immobilisierung von Oligonukleotiden erfolgreich eingesetzt

4.1.3 Schichtaufbau über SAM bei Gold-NTP

Für den Aufbau eines Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay in goldbeschichteten Nanotiterplatten wurde ein Protokoll etabliert, indem Analytderivate über Self-Assembled-Monolayers an die Goldschicht immobilisiert wurden. Als Modellsystem wurde der Aufbau eines Schichtsystems mit 11-Mercaptoundecansäure (11-MUA) und dem immobilisierten Histamin mit spektraler Ellipsometrie und AFM auf ebenen Silizium-Wafern charakterisiert. Dazu wurden die Silizium-Wafer mit einer 80 nm Goldschicht bedampft. Darauf lagerte sich das in Ethanol gelöste Thiol 11-MUA selbständig an, indem die Thiolgruppe mit der Goldoberfläche reagierte. Die freien Carboxylgruppen wurden mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC und N-Hydroxysuccinimid aktiviert und daran Histamin gekoppelt (Abb. 4.13).

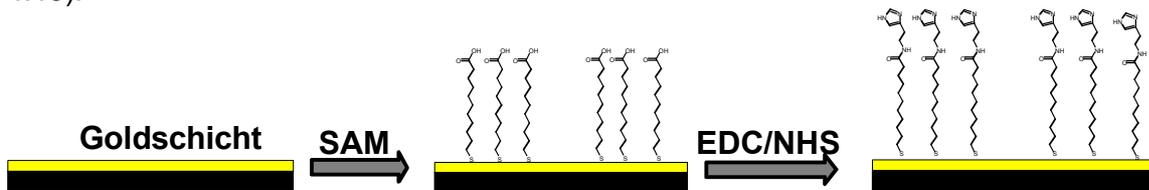


Abbildung 4.13: Immobilisierung von Histamin auf Goldoberflächen über self-assembled-monolayers von 11-Mercaptoundecansäure.

Mit der spektralen Ellipsometrie wurde die physikalische Schichtdicke einer Monolage 11-MUA auf Gold bestimmt. Der Brechungsindex wurde aufgrund der dünnen Goldschicht konstant gehalten. Es ergab sich ein Schichtdicke von 0.72 ± 0.12 nm bei einem konstanten Brechungsindex $n=1.46$ (Sirkar et al., 2000). Die Moleküllänge von 1.83 nm wurde aus den einzelnen Bindungslängen berechnet (Atkins, 1996). In der Literatur wurde beschrieben, dass Thioalkane an Goldoberflächen mit eine Schräge von ca. 30° auf der Goldoberfläche stehen (Chang et al. 1994). Dies würde eine theoretische Schichtdicke von 1.58 nm ergeben. Die gemessene Schichtdicke war aber sehr viel geringer. Dies könnte daher rühren, dass sich keine vollständige Monolage ausgebildet hat. Um dies näher zu untersuchen, wurde mit der Rasterkraftmikroskopie die Oberfläche auf molekularer Ebene ortsaufgelöst abgebildet. Abbildung 4.14.a zeigt AFM-Aufnahmen einer 80nm-Goldschicht auf einem Silizium-Wafer. Daneben wird in Abbildung 4.14.b das Rasterbild der 11-Mercaptoundecansäure auf der Goldschicht gezeigt.

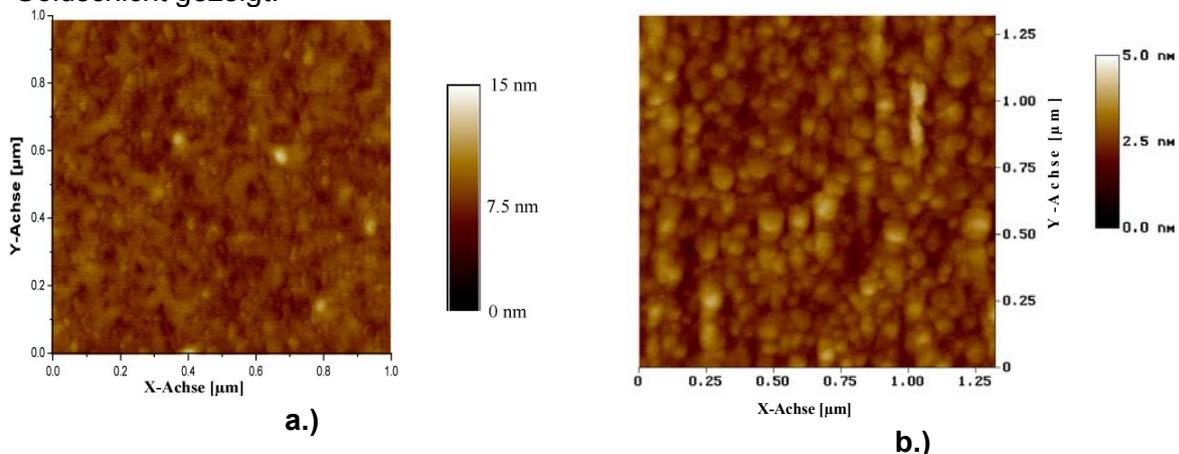


Abbildung 4.14: A.) AFM-Bild eines 80 nm Goldfilms auf einem Siliziumwafer. B.) AFM-Bild der Monolage 11-Mercaptoundecansäure auf der Goldunterlage.

Durch die Bedampfung mit Gold entstanden Goldcluster auf dem Silizium-Wafer. Die 11-Mercaptoundecansäure bildete darauf größere Cluster mit einem Durchmesser von etwa 100 nm (Abb 4.15). Die Molekülhöhe der einzelnen Cluster waren allesamt aber höher als 0.7 nm. Deswegen konnte man daraus schließen, dass die Unregelmäßigkeiten der Grund für die zu niedrig gemessene Schichtdicke waren.

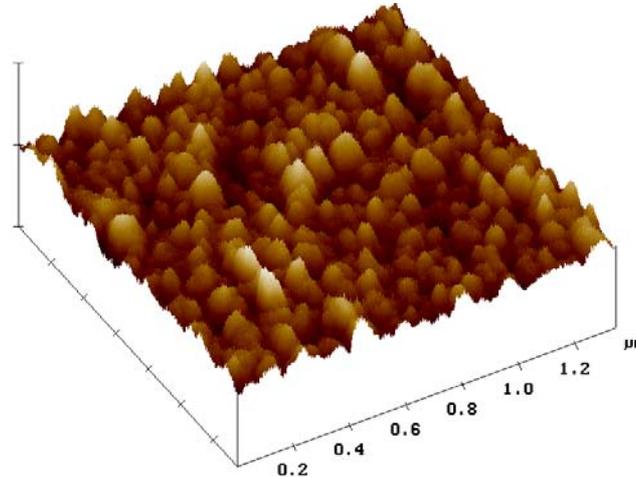


Abbildung 4.15: Dreidimensionales AFM-Bild der SAM-Schicht von 11-MUA auf Gold

Die Schichtdickenänderung aufgrund der Anbindung von Histamin auf die Oberfläche lag unterhalb des Auflösungsvermögens des spektralen Ellipsometers. Die AFM-Aufnahmen zeigten eine Verbreiterung der Inseln.

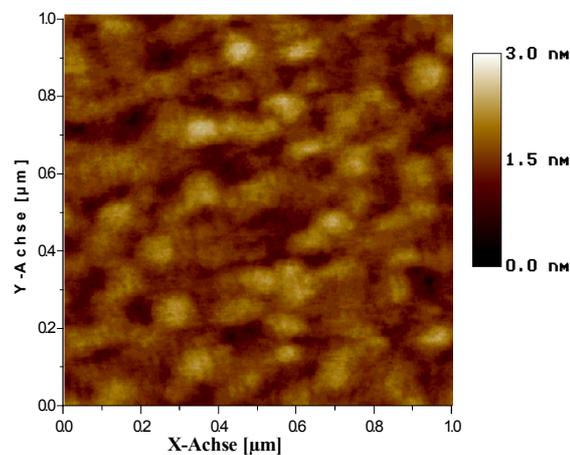


Abbildung 4.16: AFM-Bild von immobilisiertem Histamin.

Letztendlich konnte aber keine Aussage getroffen werden, ob Histamin an die Goldoberfläche immobilisiert wurde. Dies konnte nur im Experiment in der Nanotiterplatte nachgewiesen werden, indem der PSFIA ausgeführt wurde.

Schlussfolgerungen

- Mit spektraler Ellipsometrie ließ sich die Schichtdicke der Self-Assembled-Monolayer

auf Goldoberflächen bestimmen.

- Ortsaufgelöste AFM-Aufnahmen wurden zusätzlich zu der spektralen Ellipsometrie hinzugezogen, um die Modellannahme bei der spektralen Ellipsometrie zu verifizieren.

4.1.4 Zusammenfassende Diskussion

Für Kunststoffoberflächen wurden 3 Methoden untersucht, Biomoleküle zu immobilisieren. Die adsorptive Belegung von Kunststoffoberflächen war effektiv, wenn man Analytderivate über BSA immobilisiert. Die adsorptive Belegung war jedoch auf Biomoleküle begrenzt, die hydrophobe Gruppen enthielten. Zudem musste die Oberfläche vor unspezifischer Bindung abgeschirmt werden, aber die Zugänglichkeit der Analytderivate erhalten bleiben. Kleine Moleküle an der Oberfläche können von BSA als Abschirmungsprotein überdeckt werden.

Eine weitere Methode war die kovalente Photoimmobilisierung über Benzophenderivate, bei der durch Licht mit einer Wellenlänge > 300 nm Radikale erzeugt wurden, die mit den Alkylresten an der Kunststoffoberfläche reagierten. Gezeigt wurde sowohl die Immobilisierung von Analytderivaten, die an Dextrane gekoppelt waren als auch die Immobilisierung von Oligonukleotiden. Für die Herstellung von Microarrays auf Kunststoffoberflächen war dies die geeignete Methode.

Zuletzt wurde die Ausbildung von Self-Assembled Monolayers auf Goldoberflächen untersucht, die besonders wegen der fluoreszenzlöschenden Eigenschaften von Fluorophoren nahe der Oberfläche interessant waren. Auf den Goldoberflächen konnten Analytderivate kovalent immobilisiert und im PSFIA eingesetzt werden.

Es wurden verschiedene Methoden zur Oberflächencharakterisierung der Schichtsysteme, die im PSFIA aufgebaut werden sollten, angewandt. Für die Untersuchungen der Belegungen mit dem fluoreszenzmarkiertem Analytderivat ACA-BSA-Cy5.5 wurde die ortsaufgelöste Fluoreszenzdetektion eingesetzt, mit der die gleichmäßige Bedeckung der NTP-Kavitätenwände nachgewiesen werden konnte. Für markierungsfreie Analytderivate wurde kein geeignetes Verfahren gefunden, die Oberfläche der Nanoliterkavitäten zu charakterisieren. Aus diesem Grunde wurde die Oberflächenchemie auf ebene Oberflächen übertragen. Mit der RfS-Methode konnte die Funktionalität der Oberflächen nachgewiesen werden, die eine Voraussetzung im PSFIA zur spezifischen Bindung des Antikörpers an die Oberfläche war.

Für die Immobilisierung von Biomolekülen auf Kunststoffoberflächen wurde der Einsatz des heterobifunktionellen Photolinkers 4-Benzoylbenzoesäure etabliert. Er eignete sich sowohl für die kovalente Immobilisierung von Kunststoffoberflächen auf Glas, als auch für die Immobilisierung von Analytderivaten wie z.B. den DNA-Sonden oder dem Pestizidderivat ACA.

Für Goldoberflächen wurde ein Protokoll verwendet, das die effektive Immobilisierung von Analytderivaten über die Ausbildung von Self-Assembled-Monolayers nutzte. Diese Schichtsysteme wurden mit spektraler Ellipsometrie und AFM untersucht. Die Immobilisierung von 11-Mercaptoundecansäure konnte mit diesen Methoden gezeigt werden. Für den Nachweis der Ankopplung des Analyten Histamin reichten die experimentellen Daten nicht aus, dies musste über das PSFIA-Experiment nachgewiesen werden.

4.2 Etablierung des PSFIA in ABS-Nanoliterkavitäten

4.2.1 Prinzip des PSFIA

Der Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay (PSFIA) ist ein heterogener kompetitiver Fluoreszenzimmunoassay (FIA). In Konkurrenz um die Antikörperbindestelle treten die immobilisierten Analytderivate mit den Analyten in Lösung. Um ein erstes miniaturisiertes Testsystem zu etablieren, wurde als Analyt Atrazin, als Analytderivat Atrazincapronsäure (ACA) und als Antikörper der polyklonale Anti-ACA Antikörper verwendet.

In heterogenen Testformaten ist die Trennung zwischen gebundenem und freiem Antikörper zwingend, weil es ansonsten zu keinem Signalunterschied kommt. Nützt man die Nanotiterplatte als Probenträger, so müssen Waschschriffe in den einzelnen Nanoliterkavitäten vermieden werden, denn die Flüssigkeiten können nicht vollständig aus den einzelnen Kavitäten entfernt werden. Bei der Miniaturisierung des Assays auf dem NTP-Format machte man sich eine physikochemische Trennung zu Nutze, indem man das Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energietransfers (FRET) einsetzte. FRET findet statt, wenn zwei verschiedene Chromophore mit einem optimalen spektralen Überlapp auf molekularer Ebene sich nähern (siehe Kapitel 2.4.3). Im PSFIA wurde als Donorfarbstoff Cy5 verwendet, mit dem die Antikörper markiert waren. Der strahlungslose Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor fand an der Oberfläche der Kavitätenwände statt. Bei den ABS-NTPs wurde als Akzeptor der Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 verwendet, dessen Absorptionsspektrum einen optimalen Überlapp mit dem Fluoreszenzspektrum von Cy5 aufwies. Der Akzeptorfarbstoff wurde an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt. Bei den Gold-NTPs wurde der Akzeptorfarbstoff durch eine flächendeckende Goldbeschichtung ersetzt, wobei die oberflächennahen fluoreszenzquenchenden Eigenschaften von Gold genutzt wurden.

Als ein Modellsystem wurde der Nachweis von Atrazin mit dem PSFIA untersucht. Dabei wurde das Analytderivat ACA an BSA gekoppelt, so dass die Oberfläche sowohl fluoreszenzlöschende Eigenschaften als auch Antikörperbindestellen besaß. War kein Analyt in Lösung, so waren die Paratope des Antikörpers frei. Er diffundierte an die Oberfläche, wechselwirkte mit immobilisiertem ACA, so dass und gleichzeitig die Fluoreszenz gelöscht wurde. War der Analyt Atrazin in Lösung, so war das Paratop des Antikörpers besetzt und er konnte nicht an die Oberfläche binden. Dies führte zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals, die abhängig von der Analytkonzentration war.

Der PSFIA ist ein kompetitiver Assay, bei dem die beiden Phasen, die heterogene und die homogene, um die Bindestellen des Antikörpers konkurrieren. Nach der Einstellung des Gleichgewichts entscheidet die Konzentration des Analyten, wenn die Antikörperkonzentration und die Belegungsdichte an der Oberfläche immer gleich ist, wieviel Antikörper in Lösung ist und damit wie hoch das Fluoreszenzsignal ist.

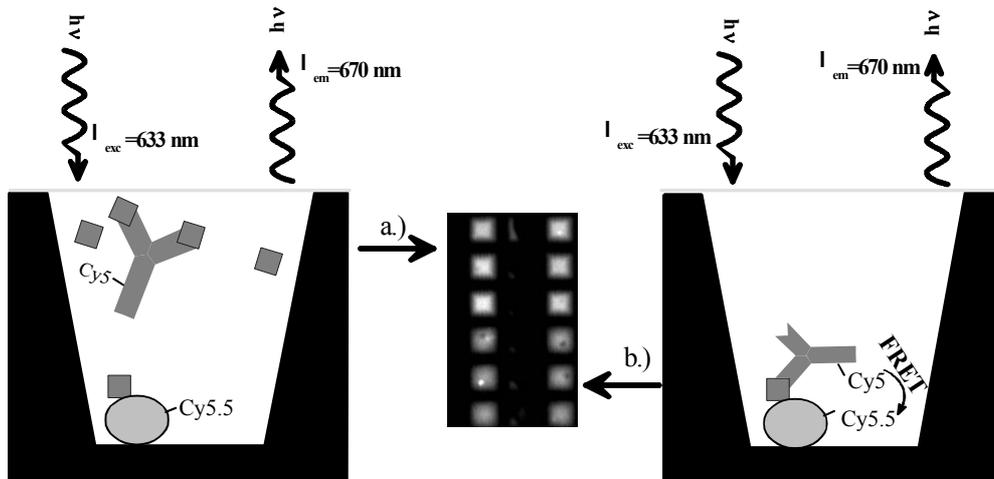


Abbildung 4.17: Prinzip des Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay in ABS-NTPs. Analytderivat und Akzeptorfarbstoff sind über BSA adsorptiv auf die Nanoliterkavitäten immobilisiert. Analyt und Cy5-markierter Antikörper werden in NTP gefüllt und anschließend wird die NTP gedeckelt. Freier markierter Antikörper bindet an Analytderivat, wodurch die Fluoreszenzintensität über FRET an der Oberfläche reduziert wird. Analytgebundener Antikörper kann nicht an die Oberfläche binden, so dass kein FRET auftritt und ein hohes Fluoreszenzsignal im Bioscan ($\lambda_{\text{EXC}}=633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=660\text{-}680 \text{ nm}$) detektiert wird.

4.2.2 Simulation der Miniaturisierung eines heterogenen kompetitiven Testformats

Diffusion des Antikörpers an die Oberfläche der Kavitätenböden

Der PSFIA ist ein heterogenes Nachweissystem in Nanoliterkavitäten. Die Kavitäten stellen ein ruhendes System dar, bei dem der freie Antikörper zu den Wänden diffundiert. Die Antikörper, die nicht mit Analyt belegt sind, binden an die immobilisierten Analytderivate. Dieser Massentransport an die Oberfläche wurde theoretisch simuliert, um eine Vorstellung zu bekommen, wie sich ein heterogener Immunoassay in der Nanotiterplatte im Gegensatz zur Mikrotiterplatte verhielt.

Durch Bindung des Antikörpers an die Oberfläche kam es zu einer Konzentrationsverarmung der Lösung, wodurch sich eine Diffusionsgrenzschicht ausbildete. In einem ruhenden System wuchs die Diffusionsgrenzschicht beginnend mit der Zudosierung der Lösung ständig an. Dieser Verlauf konnte mit dem 2. Fickschen Gesetz (Gl. 9) beschrieben werden.

Zur Lösung des 2. Fickschen Gesetz wurden zunächst folgende Annahme getroffen. Das Problem wurde als eindimensionales System angesehen. Der gelöste Antikörper befand sich in einer Flüssigkeitssäule mit der Höhe l über dem Kavitätenboden. Die Diffusion des Antikörpers sollte entlang der Ortskoordinate x nur in Richtung Oberfläche ($x=0$) ablaufen. Dazu wurden folgende Anfangs- und Randbedingungen aufgestellt:

$$\text{Anfangsbedingung:} \quad C_{R(x,t=0)} = C_{R0} \quad (79)$$

$$1. \text{ Randbedingung:} \quad C_{R(x=l,t)} = C_{R0} \quad (80)$$

$$2. \text{ Randbedingung:} \quad C_{R(x=0,t)} = 0 \quad (81)$$

Als Anfangsbedingung wurde festgelegt, dass die Rezeptorkonzentration C_R zum Zeitpunkt $t=0$ für alle Ortskoordinaten x gleich der Ausgangskonzentrationen C_{R0} ist. Diese Bedingung war gegeben, weil eine bestimmte Konzentration C_{R0} in die einzelnen Kavitäten dispensiert wurde. Die erste Randbedingung besagte, dass an der Flüssigkeitsoberfläche die Ausgangskonzentration gegeben ist. Mit der zweiten Randbedingung wurde definiert, dass der Antikörper sofort gebunden wurde, wenn er die Oberfläche berührte und an der Oberfläche blieb.

Unter diesen Bedingungen wurde die Differentialgleichung der Gleichung gelöst², die die Antikörperkonzentration zu jeder beliebigen Zeit t an jeder beliebigen Ortskoordinate x angibt (Eddowes, 1987/88):

$$C_{R(x,t)} = \sum_n \frac{4C_{R0}}{(2n-1)\pi} e^{-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 D t}{l^2}} \sin \frac{(2n-1)\pi x}{l}, (n \in N) \quad (82)$$

Mit dieser Lösung wurden Konzentrationsprofile für die Kavitätenhöhe 5 mm (entspricht einer Befüllung von 50 μl in einer MTP-Kavität (Schütz, 2000) und eine Kavitätenhöhe von 400 μm (entspricht der Füllhöhe in den Nanoliterkavitäten der NTP) erstellt, die in Abbildung 4.18 dargestellt sind.

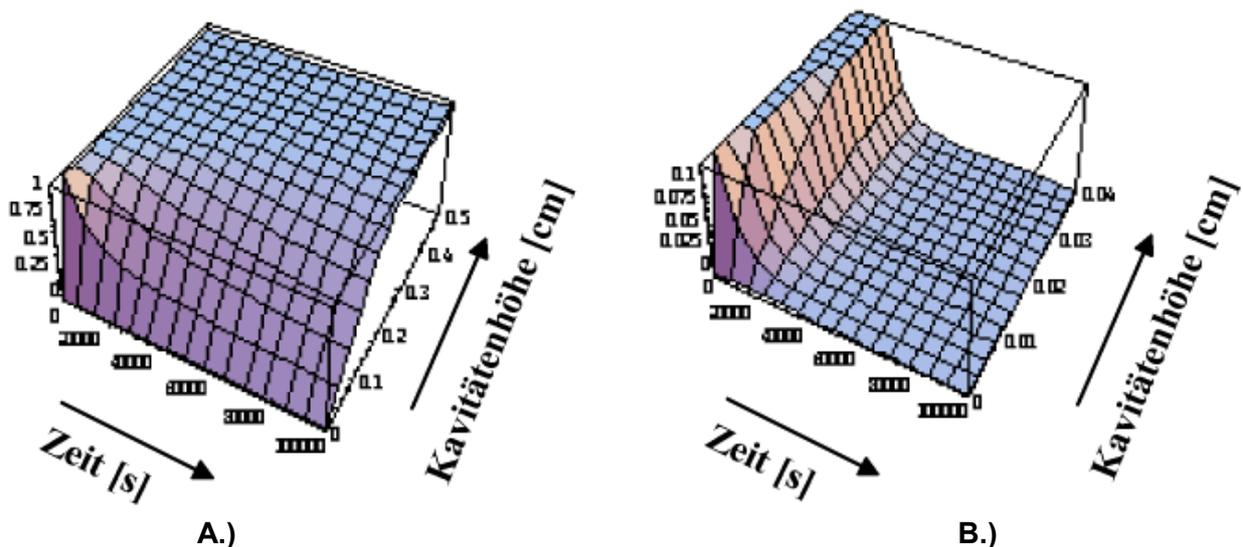


Abbildung 4.18: Diffusion eines Antikörpers mit einem Diffusionskoeffizienten $D=10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ in ruhenden Flüssigkeiten an die Oberfläche des Kavitätenbodens A.) Kavität mit der Höhe 0.5 cm B.) Kavität mit der Höhe 400 μm .

Es ist zu erkennen, dass sich in einer MTP-Kavität eine Diffusionsgrenzschicht aufbauen kann und oberhalb davon die Bulk-Phase existiert. Ein Großteil der Antikörper kann erst nach einer sehr langen Inkubationszeit an den Kavitätenboden diffundieren. Anders ist dies in den Nanoliterkavitäten; nach kürzester Zeit hat sich die Diffusionsgrenzschicht über die gesamte Flüssigkeitssäule ausgebreitet, so dass sich alle Moleküle innerhalb der Diffusionsgrenzschicht befinden. Die Diffusionswege sind so kurz, dass ein viel größerer Anteil an Antikörper in derselben Zeit an die Oberfläche binden kann. Nach 30 Minuten kann in der Simulation nur 3 % der Antikörper in einer MTP-Kavität an die Oberfläche binden. Dagegen sind es 40 % in den Nanoliterkavitäten. Die Abhängigkeit der Kavitätenhöhe von der Inkubationszeit ist

² Die Differentialgleichung wurde von Herrn Dipl. Math. Michael Kumpf gelöst

in Abbildung 4.19 dargestellt. Dabei wurde die Zeit gewählt, bei der 90% des Antikörpers mit der Oberfläche reagieren soll.

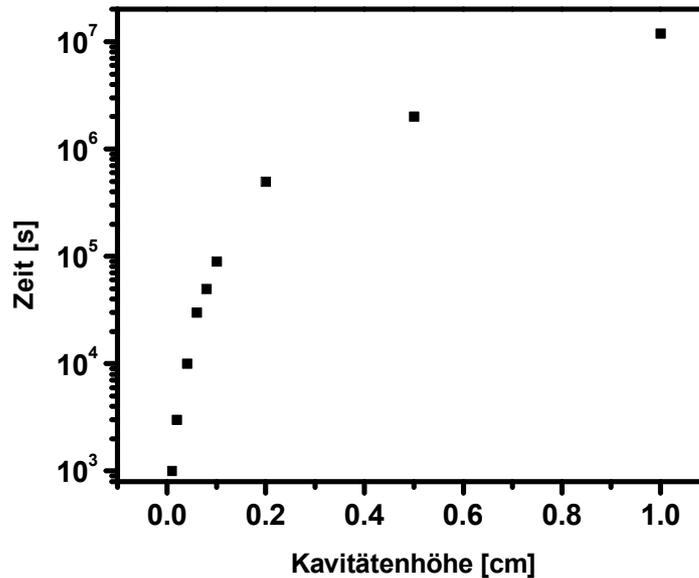


Abbildung 4.19: Zeit in der 90 % des Antikörpers an den Kavitätenboden diffundiert in Abhängigkeit zur Kavitätenhöhe.

Je kleiner die Kavitätenhöhe gewählt wird, desto kürzere Inkubationszeiten bei heterogenen Assays sind möglich. Der Zeitverlauf, bis 90% der Antikörper an die Oberfläche diffundieren, kann bis zu 10^7 s dauern, weil sich ein Teil der Antikörper oberhalb der Diffusionsgrenzschicht, also in der Bulk-Phase befindet. In Nanoliterkavitäten befinden sich die Antikörper vollständig innerhalb der Diffusionsgrenzschicht, so dass in einer sehr viel kürzeren Zeit alle Antikörper an die Oberfläche binden können.

Abbildung 4.20 zeigt die Oberflächenbindung nach 3000 s in Abhängigkeit von der Kavitätenhöhe.

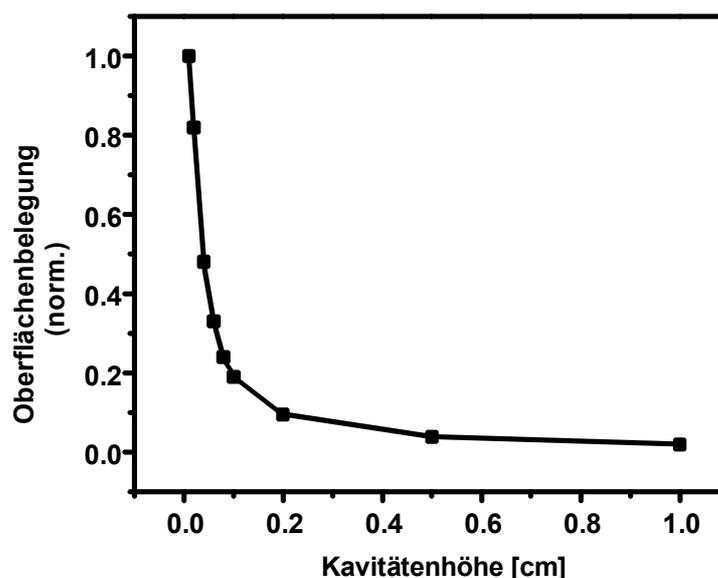


Abbildung 4.20: Bindung an die Oberfläche in Abhängigkeit zur Kavitätenhöhe nach 3000 s Wartezeit.

Die Oberflächenbelegung fällt in der Simulation exponentiell zur Kavitätenhöhe ab. Das heisst, dass zur selben Zeit im Vergleich zur MTP bei der NTP viel mehr Antikörper an die Oberfläche binden können. Für den PSFIA heisst dies, dass die Nanoliterkavitäten Vorteile für die Signaldynamik bringen kann. Würde man Mikrotiterplatten für den PSFIA verwenden, müsste man zu lange warten bis die unbesetzten Antikörper an die Oberfläche binden.

Gleichgewichtsreaktion im kompetitiven PSFIA

Um ein näheres Verständnis für die Konzentrationsverhältnisse von immobilisiertem Analytderivat, Analyt und Antikörper in Lösung im PSFIA zu erbringen, wurde in der Arbeit von I. Stemmler (1999) ein mathematisches Modell entwickelt.

Als Vereinfachung wurde ein monovalenter Antikörper (AK) gewählt, um dessen Bindungsstellen sowohl der Analyt (A) in Lösung und das immobilisierte Analytderivat A_{het} konkurrieren. Dementsprechend lauten die beiden Teilgleichgewichte und deren Massenwirkungsgesetze:



Für die Randbedingungen

$$c_0(AK) = c(AK) + c(AAK) + c(A_{het}AK) \quad (85)$$

$$c_0(A) = c(A) + c(AAK) \quad (86)$$

$$c_0(A_{het}) = c(A_{het}) + c(A_{het}AK) \quad (87)$$

lässt sich das Gleichungssystem auflösen. Man erhält eine Gleichung dritten Grades, die für den Fall lösbar ist, wenn die Gleichgewichtskonstanten der homogenen und heterogenen Reaktion gleich sind

$$c(A_{het}AK) = \frac{Kc_0(A_{het})[Kc_0(A_{het}) + Kc_0(AK) + 1]}{2K^2[c_0(A_{het}) + c_0(A)]} \pm \frac{\sqrt{\{Kc_0(A_{het})[Kc_0(A_{het}) + Kc_0(A) + Kc_0(AK) + 1]\}^2 + 4K^4[c_0(A_{het}) + c_0(A)]c_0(A_{het})c_0(AK)}}{2K^2[c_0(A_{het}) + c_0(A)]} \quad (88),$$

wobei nur die negative Wurzel sinnvolle Ergebnisse liefert.

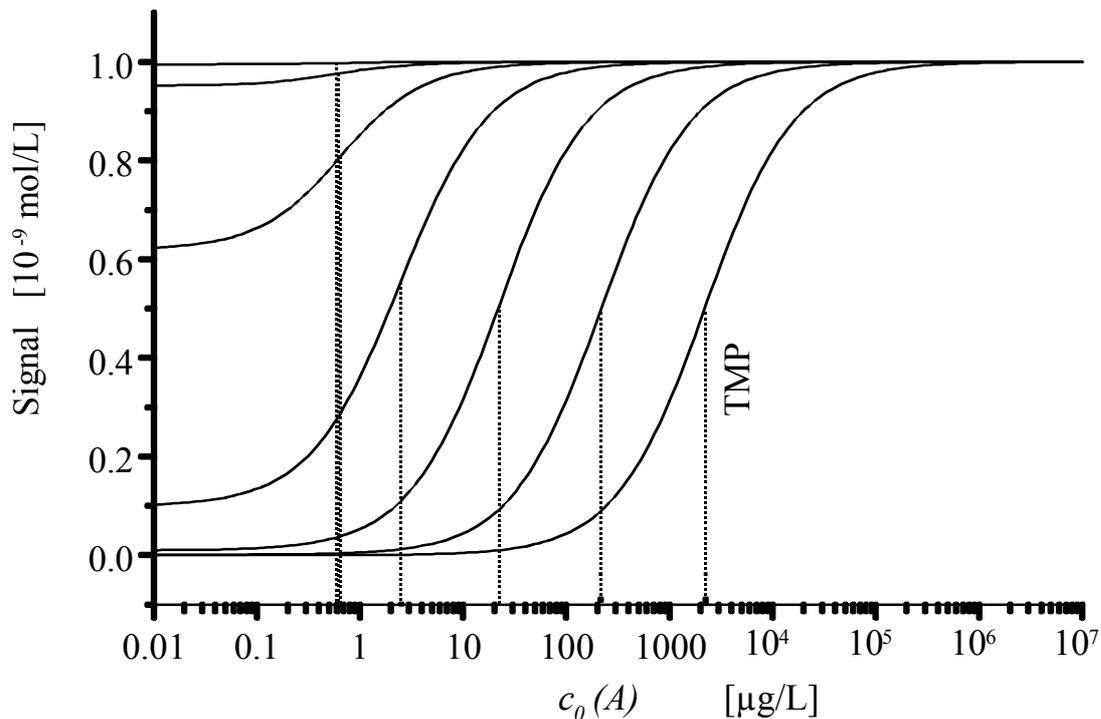


Abbildung 4.21: Simulierte Kalibrierkurven von Analyt in einem kompetitiven Assay bei zunehmender (von links nach rechts) Belegungsdichte von Analytderivat (Stemmler, 1999).

In Abbildung 4.21 sind Kalibrierkurven dargestellt, bei denen im mathematischen Modell die Belegungsdichte an immobilisiertem Analytderivat ($c(A_{\text{het}})=10^{-11}$ - 10^{-5} M) variiert wurde. Bei einer angenommenen Antikörperkonzentration von 10^{-9} M, einem Molekulargewicht des Analyten von 220 g/mol und einer Gleichgewichtskonstante $K_{\text{het}}=K_{\text{hom}}=10^9$ M $^{-1}$ ergaben sich folgende Kalibrierkurven.

Es wurde erkenntlich, dass durch die Belegungsdichte an Analytderivat der Testmittelpunkt im PSFIA verschoben werden konnte. Zu kleine Konzentrationen an Analytderivat verringern die Signaldynamik.

Schlussfolgerungen:

- Die Miniaturisierung eines heterogenen Assays in Nanoliterkavitäten sollte den Massentransport an die Oberfläche beeinflussen, weil die Diffusionswege in den Nanoliterkavitäten der NTP gegenüber den Kavitäten der MTP verkürzt sind.
- Die Inkubationsdauer, die zur Einstellung eines Gleichgewichts im PSFIA wichtig sind, sollte in der NTP stark verkürzt sein.
- Die Belegungsdichte an immobilisiertem Analytderivat sollte im PSFIA den Testmittelpunkt von Kalibrierkurven beeinflussen.
- Je niedriger die Konzentration an der Oberfläche ist, desto niedriger sollte der Testmittelpunkt sein und damit verbunden auch die Nachweisgrenzen.
- Zu kleine Belegungsdichten sollten die Signaldynamik vermindern und dementsprechend sollte die Nachweisgrenze erhöht werden.

4.2.3 Computergesteuerte Mikrodosierung

Um den PSFIA in der Nanotiterplatte durchzuführen, wurden die einzelnen Reagenzien mit einem Mikrodosierroboter in die Nanoliterkavitäten appliziert. Ein Programm steuerte den Dosiervorgang. Es wurde ein optimiertes Mikrodosierschema erarbeitet, um in kürzester Zeit bis zu 12 verschiedene Analyt-Konzentrationen und markierte Antikörper in die Nanotiterplatte einzufüllen.

Die Mikrodosierpipette wurde zwischen jedem Mediumwechsel gereinigt, um keine Verunreinigungen mitzuschleppen oder die Konzentrationen an Analyt oder Antikörper zu verfälschen. Die Reinigungsschritte waren sehr zeitintensiv, weswegen sie möglichst minimiert wurden. Dies wurde erreicht, indem mit einer Analytkonzentration in der Nanotiterplatte eine Verdünnungsreihe bis zu einem Verdünnungsfaktor von 1:130 eingestellt wurde. Dazu wurde Puffer in definiertem Volumen vorgelegt und mit Analyt aufgefüllt. Mit diesem Prinzip wurde mit 3 Analytkonzentrationen ein Konzentrationsbereich von 5 Zehnerpotenzen abgedeckt. Man nutzte dabei die Fähigkeit der Mikrodosierpipette, einzelne Tropfen mit einem Volumen von etwa 600 pL zu pipettieren, so dass verschiedene Tropfenmengen in eine Nanoliterkavität dosiert werden konnten. Eine Voraussetzung hierfür war die Abgabe eines konstanten Tropfenvolumens über die Anzahl an Tropfen hinweg. Dazu wurde die Mikrodosierpipette mit Cy5 kalibriert, indem Cy5 Konzentrationen mit 1 bis 50 Tropfen Cy5-Lösung in die Nanoliterkavitäten gefüllt wurden. Abbildung 4.21 zeigt einen linearen Verlauf der Fluoreszenzintensitäten über einen Konzentrationsbereich von mehreren Zehnerpotenzen hinweg.

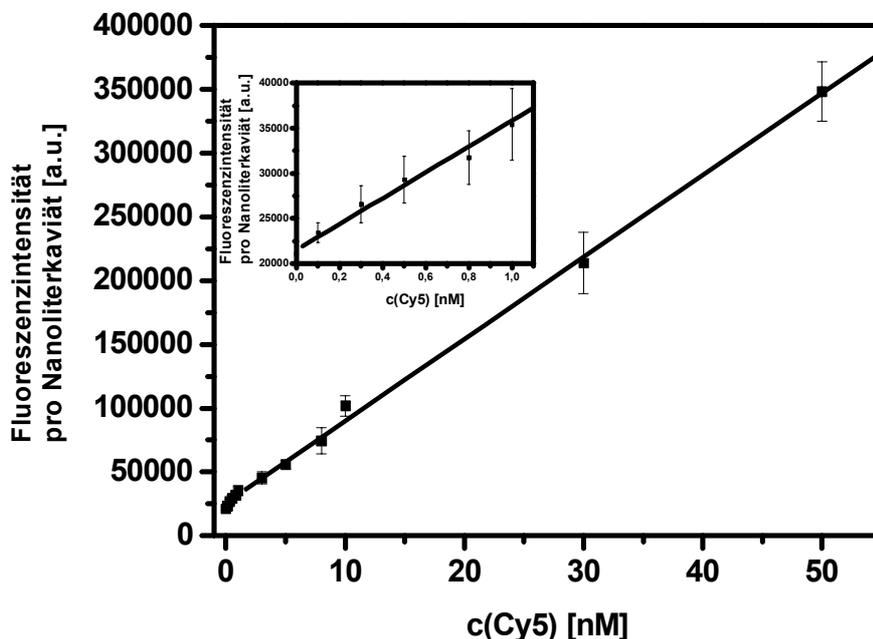


Abbildung 4.21: Kalibrierung des Mikrodosierroboters mit Cy5 in die ABS-NTP (n=20).

Mit dem Bioscan konnte Cy5 in der ABS-NTP bis zu einer Nachweisgrenze von 0,5 nM nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen lagen zwischen 5 und 10 %, wobei die Standardabweichungen bei hohen Konzentrationen (>10 nM) über 10 % lagen.

Diese Kalibrierkurve beweist zudem, dass mit dem Mikrodosierroboter fluoreszenzbasierte Assays durchgeführt werden können, die mit einem Analytvolumen von 600 pL auskommen.

Dies wird insbesondere interessant, wenn man Reagenzien sparen will oder der Analyt nur in geringem Volumen aufgenommen werden kann.

Hinsichtlich der automatisierten Probenabgabe im High-Throughput-Screening spielte die Zeitdauer eines Assays eine große Rolle. Mit dem Mikrodosierroboter wurde ein Programm erstellt, das 12 Analytkonzentrationen mit 10 Replikas, dies waren 110 Proben, innerhalb von 15 Minuten dosierte. Die Fluoreszenzdetektion dauerte zusätzlich 3 Minuten, so dass man eine vollständige Kalibrierung innerhalb von 18 Minuten erhielt (Abb. 4.22).

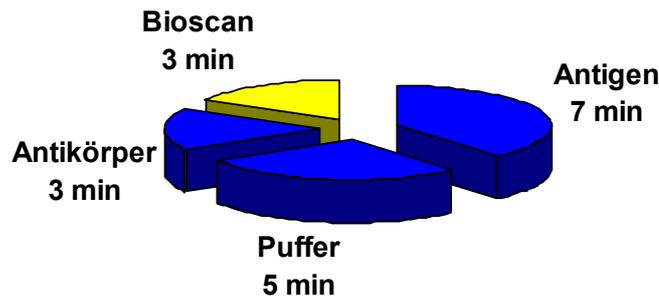


Abbildung 4.22: Dauer des PSFIA unterteilt in automatisierte Befüllungsschritte und Fluoreszenzdetektion

4.2.4 Kalibrierung von Atrazin

Nach der Belegung mit ACA-BSA-Cy5.5 und Blocken der freien Stellen mit 10 mg/ml BSA wurde zur Kalibrierung von Atrazin nach dem Mikrodosierschema von Kapitel die Nanotiterplatte befüllt. Die Abfolge der Dosierschritte war so gewählt, dass der Antikörper am Ende zupipettierte wurde. Dadurch konnten sich beide Gleichgewichte gleichzeitig einstellen, und es kam nicht zu einer Verdrängung eines Gleichgewichts. Als Kontrolle war ein Teil der NTP nur mit BSA belegt, um die Referenz aufzunehmen. Weist diese Fluoreszenzintensität (F_{I_0}) über die Fläche hinweg keine Unterschiede auf, so ist die Nanotiterplatte gleichmäßig ausgeleuchtet. Zudem kann man daraus schließen, dass es nicht zu einer Eintrocknung kommt, weil ansonsten die Fluoreszenz abnimmt. Bei einer Konzentration von 10 nM IgG-Cy5 betrug die Fluoreszenzintensitäten in den Referenzkavitäten $F_{I_R} = 142280 \pm 7770$ (a.u.). Die Standardabweichung liegt im Bereich des Pipettierfehlers der Mikrodosiereinheit.

Abbildung 4.23 zeigt einen Ausschnitt des Fluoreszenzbildes. Die Auswertung des Bildes war aus verschiedener Sicht wichtig. Zu sehen sind Fluoreszenzquadrate mit kleinen dunklen oder hellen Punkten. Da der Bioscan in Reflektion arbeitet, können eingeschlossene Luftblasen das Fluoreszenzbild verfälschen. Diese Fluoreszenzwerte werden vernachlässigt. Ein weiterer Punkt ist die Untersuchung von Flüssigkeitsübertrag in die nicht befüllten Kavitäten. Es ist zu erkennen, dass dieses kaum stattfindet. Es wurde aber beobachtet, dass es dazu kommen kann, wenn Flüssigkeitstropfen sich auf den Stegen der Nanotiterplatte befinden. Zu sehen ist aber auch, dass die Mikrodosierpipette Satellitentropfen erzeugt, die in ungefüllte Kavitäten fliegen, so dass es zu einer Verminderung des Fluoreszenzsignals kommt.

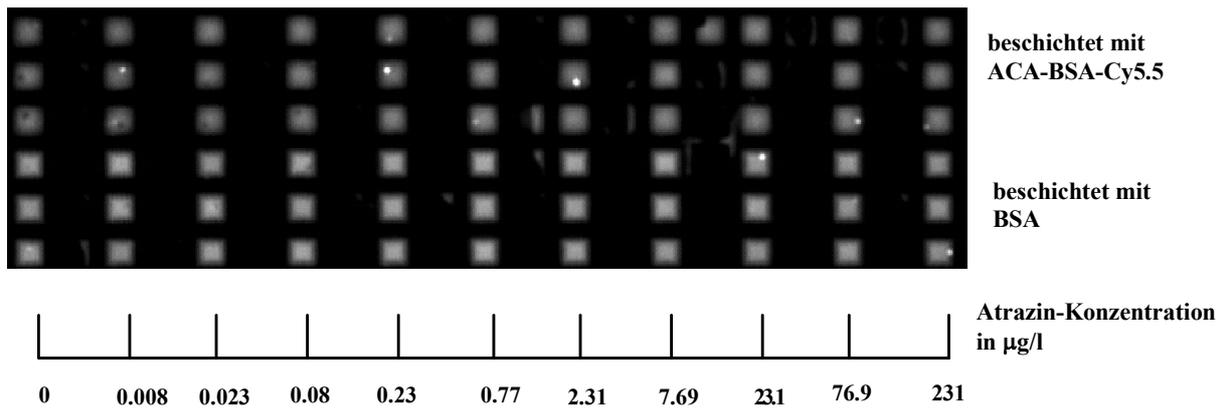


Abbildung 4.23: Fluoreszenzbild der Atrazin-Kalibrierung im PSFIA mit ABS-NTP.

Das Fluoreszenzbild zeigt einen Fluoreszenzanstieg in Abhängigkeit von der Analytkonzentration. Bei einer Konzentration von mehr als 50 $\mu\text{g/l}$ Atrazin sind die Bindestellen des Antikörpers gesättigt, was der maximalen Fluoreszenzintensität FI_{max} entspricht. FI_{max} betrug 140265 ± 4620 (a.u.), das entspricht der Fluoreszenzintensität der Referenz.

Die niedrigste Fluoreszenz wurde bei maximalem Binden an die Oberfläche erreicht. Diesen Nullwert FI_0 erhielt man, indem man nur Puffer und markierten Antikörper zu der ACA-BSA-Cy5.5 belegten Nanoliterkavitäten gab. FI_0 betrug 108000 ± 3300 (a.u.). Die Signaldynamik des PSFIA lag bei 24 %, wenn der Akzeptorfarbstoff Cy5.5 über BSA auf die Nanoliterkavitäten immobilisiert wurde. Abbildung 4.24 zeigt die Fluoreszenzintensitäten aufgetragen gegen die Atrazinkonzentration. Die sigmoidale Kalibrierkurve wurde über eine logistische Funktion bestimmt.

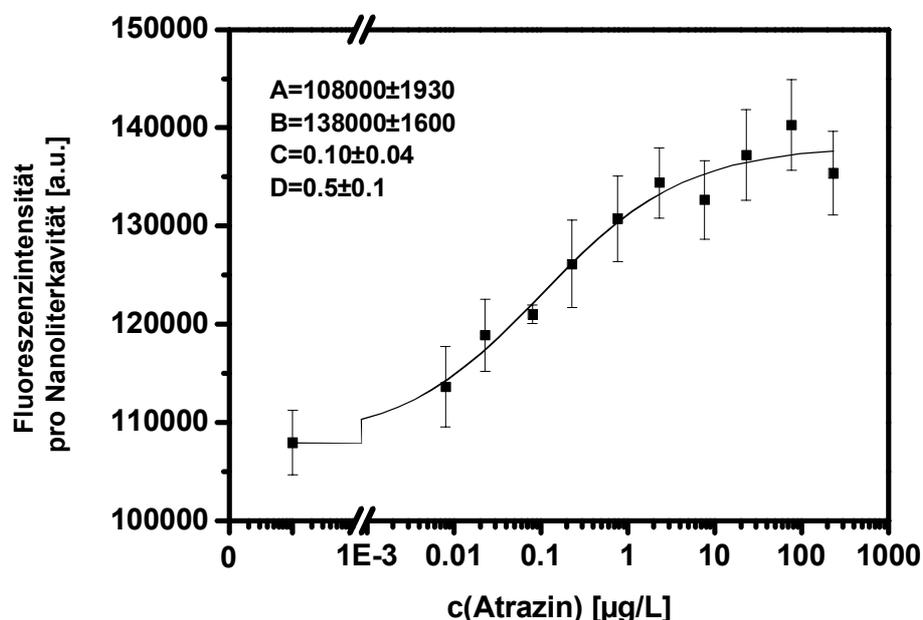


Abbildung 4.24: Auswertung der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Atrazin-Konzentration (n=10).

Die oberen und unteren Grenzen lagen im Bereich der maximalen Fluoreszenzintensität und des Nullwerts. Der Testmittelpunkt wurde bei 0.10 $\mu\text{g/L}$ Atrazin ermittelt. Als Nachweisgrenze von Atrazin im PSFIA in ABS-NTP wurde 0.03 $\mu\text{g/L}$ bestimmt.

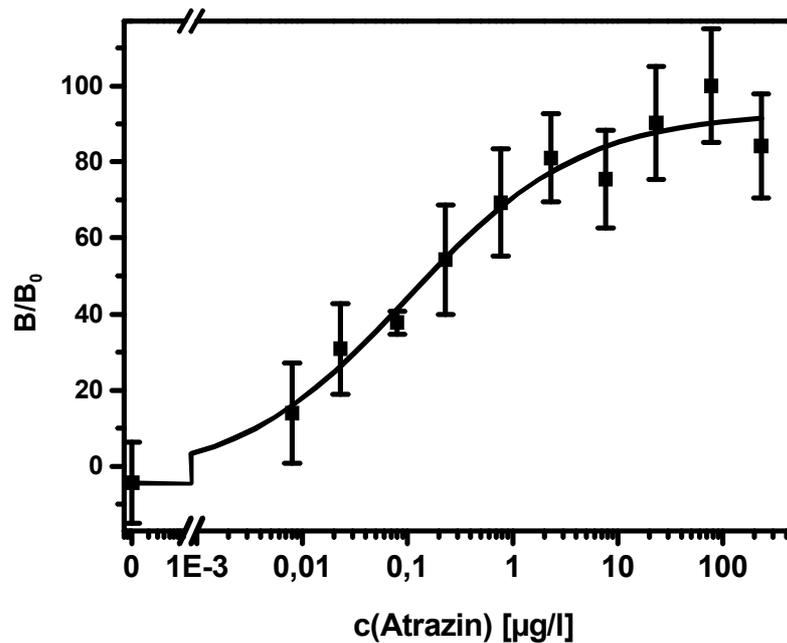


Abbildung 4.25: Normierte Kalibrierkurve von Atrazin im PSFIA (n=10)

Um die Kalibrierkurven mit den anderen Testsystemen vergleichen zu können, wurden die Fluoreszenzintensitäten nach Gleichung 75 normiert. Als Arbeitsbereich wurde der Bereich zwischen 10% und 90% festgelegt. Dies bedeutete, dass Atrazin im PSFIA zwischen den Konzentrationen 7 ng/l bis zu 70 µg/l nachgewiesen werden konnte.

Schlussfolgerungen

- Der Testmittelpunkt im PSFIA wurde bei einer Konzentration von 0.1 ppb bestimmt und lag damit sogar bei einer niedrigeren Konzentration als im ELISA. Kido et al., 1997 publizierten einen ELISA mit einem IC_{50} von 0.4 ppb für Hydroxy-Atrazin.
- Die Nachweisgrenze für Atrazin im PSFIA lag mit 0.03 µg/l im Bereich von ELISA-Tests. Die Nachweisgrenze für Atrazin im ELISA liegt zwischen 0.2 µg/L (Hock et al., 2002) und 0.1 µg/L (Erimin und Samsonova, 1994).
- Die Signaldynamik war mit 24% geringer als im homogenen FRET-Nachweisverfahren in der Nanotiterplatte, die bei 50% lag (Schobel et al., 2001).

4.2.5 Untersuchung der Inkubationszeit

Ein wichtiger Punkt bei heterogenen Testformaten ist die Inkubationsdauer. Das ist die Zeit bis sich ein Gleichgewicht in Lösung bzw. an der Oberfläche einstellt. Die theoretischen Betrachtungen der Miniaturisierung ergaben, dass sich, durch die geringen Ausmaße der Nanoliterkavitäten, die frei beweglichen Moleküle innerhalb der Diffusionsgrenzschicht befinden und die Inkubationszeit für die gesamte Weglänge verkürzt werden kann. Da die Nanoliterkavitäten aus Pyramidenstümpfe bestehen, ist die maximale Wegstrecke von der Befüllungsoberfläche bis zum Kavitätenboden 400 µm und in der Breite maximal 300 µm. Dies bedeutete, dass die Inkubationsphase, in der sich das Gleichgewicht einstellt, innerhalb einer Stunde abgeschlossen sein sollte. Dies sollte experimentell nun untersucht werden. Dazu wurde alle 3 Minuten ein Fluoreszenzbild aufgenommen, so dass insgesamt 9 Atrazin-Kalibrierkurven mit einer Inkubationsdauer von 3 bis 45 Minuten aufgenommen wurden.

Abbildung 4.26 zeigt, dass man schon nach der ersten Messung eine auswertbare Kalibrierkurve von Atrazin erhält.

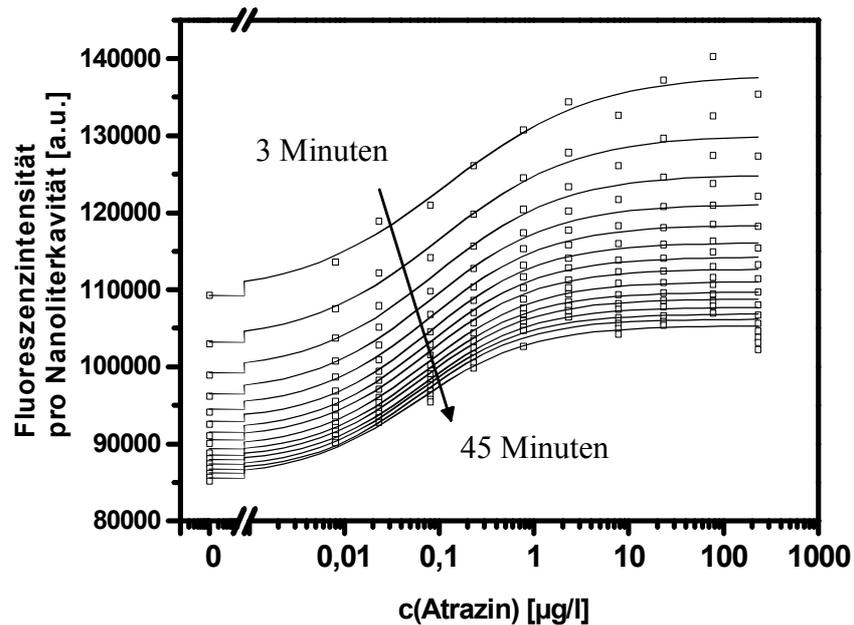


Abbildung 4.26: Auftragung einzelner Atrazin-Kalibrierkurven zu verschiedenen Inkubationszeiten (Inkubationsdauer 3 min bis 45 min; gemessen alle 3 Minuten).

Die nachfolgenden Messungen ergaben eine Verringerung der Fluoreszenz bei jeder Konzentration. Fotobleachingeffekte spielten nur eine geringe Rolle, da in der Referenzkavitäten die Fluoreszenz nur wenig sank.

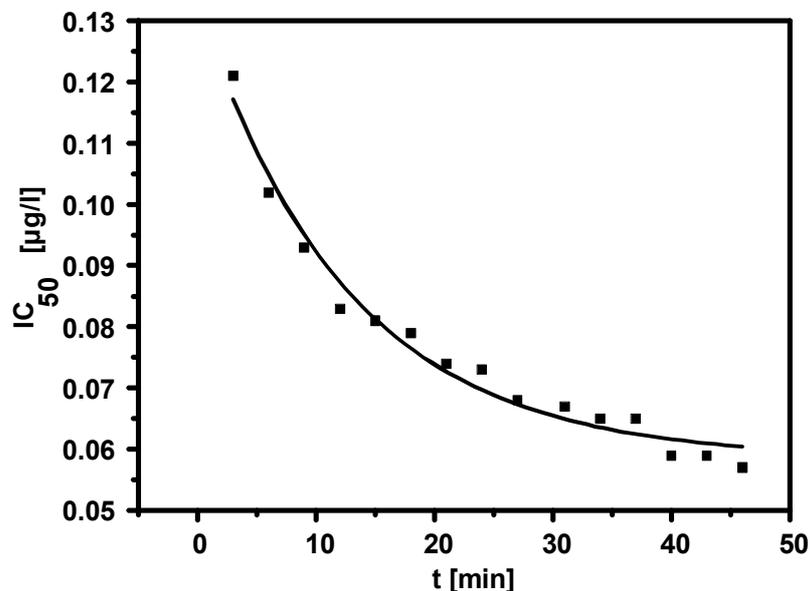


Abbildung 4.27: Auftragung des Testmittelpunktes IC_{50} der Atrazin-Kalibrierkurve im PSFIA gegen die Inkubationszeit.

In Abbildung 4.27 ist der berechnete Testmittelpunkt der Atrazin-Kalibrierkurve in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Der Testmittelpunkt verringerte sich während der

Messung und blieb nach 50 Minuten konstant bei einem Wert von 0.06 µg/L. Im PSFIA in der Nanotiterplatte hatte sich innerhalb von 50 Minuten das Gleichgewicht eingestellt.

Schlussfolgerungen

- Für den PSFIA in den Nanoliterkavitäten war keine Inkubationszeit notwendig.
- Nachbindung des markierten Antikörpers an die Oberfläche senkten die Fluoreszenz unabhängig von der Analytkonzentration.
- Fotobleaching war nicht zu erkennen.
- Das Gleichgewicht zwischen Antikörper und Analyt in Lösung und dem Analytderivat an der Oberfläche stellte sich aber erst innerhalb von 50 Minuten ein.
- Der Testmittelpunkt für die Atrazin-Kalibrierkurve im PSFIA stellte sich im Gleichgewicht bei 0.06 µg/L ein.

4.2.6 Zusammenfassende Diskussion

Ein erster Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay auf Kunststoff-NTPs konnte etabliert werden. Genutzt wurde der strahlungslose Energietransfer an der heterogenen Phase, indem die Cy5 markierten Antikörper spezifisch an die immobilisierten Analytderivate banden. Diese waren an BSA gekoppelt, genauso wie der Akzeptorfarbstoff Cy5.5. Somit führte der Antikörper-Antigen-Komplex über seine angekoppelten Farbstoffe zu einem FRET-Ereignis an der Oberfläche und somit zu einem Absinken der Donorfluoreszenz.

Im PSFIA auf einer ABS-NTP konnte Atrazin bis zu einer Nachweisgrenze von 0.03 µg/L nachgewiesen werden. Hiermit lag man unterhalb der festgelegten Grenzkonzentration von 0.1 µg/L für Pestizide, die man mindestens nachweisen können muss.

Die Kalibrierungskonzentrationen wurden direkt mit dem Mikrodosierroboter in der Nanotiterplatte eingestellt. Ein einzelner Tropfen mit einem Volumen von 600 pL reichte aus, um eine Signalveränderung zu erzeugen. Damit war prinzipiell nachgewiesen, dass Fluoreszenzimmunoassays mit einem Probenvolumen kleiner einem Nanoliter in der Nanotiterplatte nachweisbar waren.

Die automatisierte Mikrodosierung über einen computergesteuerten 3-achsigen Roboter erreichte eine Dosierzeit für den PSFIA von 15 Minuten. In dieser Zeit wurden 11 Analytkonzentrationen mit 10 Replikas, dies waren somit insgesamt 110 Proben, dosiert. Rechnet man die Auslesezeit der Fluoreszenzintensitäten hinzu, kam man für eine vollständige Aufnahme einer Kalibrierkurve auf 18 Minuten. Die Inkubationszeit, die bei heterogenen Assays im 96-er-Mikrotiterplattenformat über 30 Minuten dauert, konnte im PSFIA in der Nanotiterplatte vernachlässigt werden.

Die Miniaturisierung und Parallelisierung hinsichtlich Nanoliterkavitäten macht somit Sinn. Durch die Miniaturisierung des PSFIA wurden die Sensitivität nicht beeinträchtigt, aber die Standzeiten nach der Befüllung drastisch verkürzt. Die Parallelisierung hinsichtlich Erhöhung der Probandichte ist bis hin zu Nanoliterkavitäten möglich. Der PSFIA in der Nanotiterplatte ist ein heterogenes kompetitives Nachweisverfahren. Aufgrund der Anbindung der Analytderivate an die Oberfläche konnte die Nachweisgrenze für Atrazin weiter gesenkt werden, als in einem homogenen FRET-Assay, wie es Schobel et al., 1999a beschrieben.

4.3 Der PSFIA auf goldbeschichteter NTP

4.3.1 Einfluss der Goldschichtdicke auf das Fluoreszenzsignal

Metallische Oberflächen wie Gold, Silber oder ähnliche haben die Eigenschaften eines Spiegels. Wird die Fluoreszenz in Reflektion aufgenommen, wie es bei dem Bioscan der Fall ist, trifft sowohl die direkt abgestrahlte Emission als auch die reflektierte Emission auf den Detektor. Dies führt insgesamt zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals.

Nahe der metallischen Oberfläche wird die Übergangsrate der Fluoreszenz k_F in Abhängigkeit zum Abstand zwischen Oberfläche und Fluorophor stark beeinflusst. Bei Abständen von weniger als 10 nm zur metallischen Oberfläche reduziert sich die Lebensdauer um mehrere Größenordnungen, so dass die Fluoreszenz gelöscht wird.

Zunächst wurde die Fluoreszenzverstärkung an Goldschichten bei den ABS-Nanotiterplatten untersucht. Dazu wurden die NTPs mit Gold bedampft. Die Goldschichten hatten eine Dicke zwischen 30 und 80 nm. Wie in der Abbildung 4.28 zu sehen, erkennt man die Schichtdicken an der Farbe der NTPs. Die Schichtdicke konnte nicht direkt gemessen werden. Aber in der Aufdampfanlage war ein Schichtdickenmessgerät, das die Schichtdicke in Abhängigkeit von der Gewichtszunahme maß. Bei 30 nm Schichtdicke war die NTP noch nicht vollständig mit Gold bedeckt, weswegen sie eher schwarz-gold aussah. Der Bedeckungsgrad erhöhte sich mit der Schichtdicke. Dies war in der Schichtdickenreihe gut zu erkennen, bei der die charakteristische goldene Farbe immer deutlicher wurde.

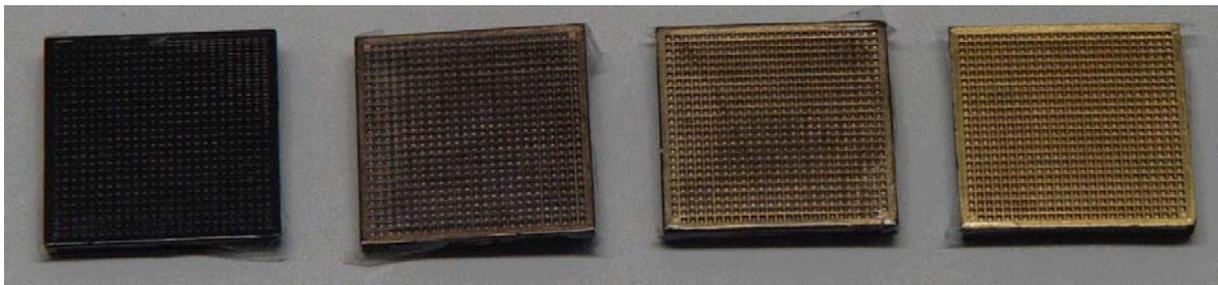


Abbildung 4.28: Bild von unbehandelter ABS-NTP, sowie 30nm, 50nm und 80nm beschichteter Gold-NTPs.

Die NTP ist verhältnismäßig rau, weil sie im Spritzgussverfahren hergestellt wurde. Dazu musste ein Werkzeug gefertigt werden, das die Vertiefungen der NTP durch Pyramidenstümpfe abbildet. Die Fertigung erfolgte über mechanische Werkzeuge, die kleine Furchen an der Oberfläche hinterlassen. Diese Furchen waren dementsprechend auch auf der Oberfläche der NTPs. Gut sichtbar wird dies in einem Mikroskopbild einer 80 nm-Gold-NTP. Abbildung 4.29.a zeigt einen Ausschnitt der Gold-NTP bei einer Vergrößerung von 1:100 und Abbildung 4.29.b sind die Furchen der NTP auf 1:1000 vergrößert. Die Furchen haben eine Tiefe im Mikrometermaßstab. Bei dieser Oberflächenrauigkeit konnte bei einer 30nm-Goldschicht die Oberfläche nicht vollständig mit Gold beschichtet sein.

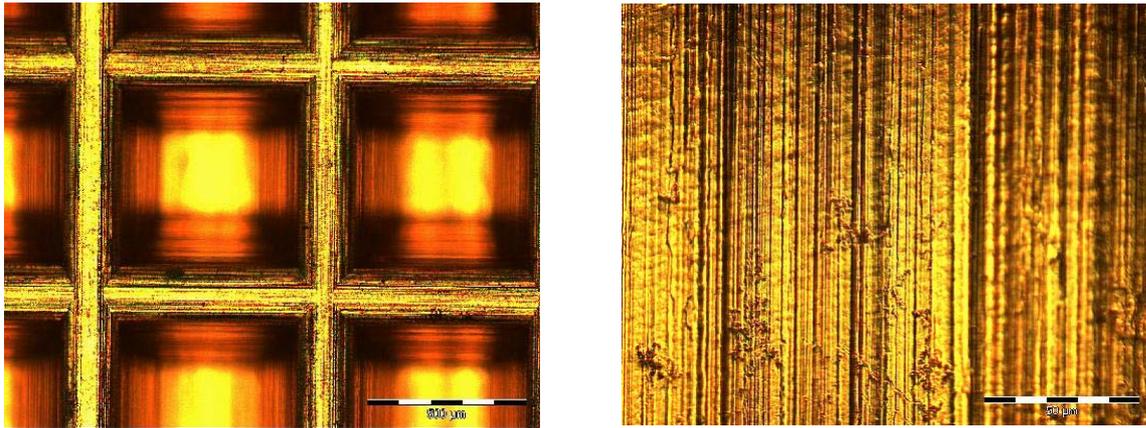


Abbildung 4.29: Mikroskopbild einer Gold-NTP (100x und 1000x Vergrößerung).

Der Bedeckungsgrad beeinflusste direkt die Fluoreszenzintensitäten des Fluorophors Cy5. Zur Untersuchung der Fluoreszenzverstärkung wurde in die goldbeschichteten NTPs und die ABS-NTP eine Konzentrationsreihe von Cy5 über den Mikrodosierroboter pipettiert. In jeder NTP war dieselbe Konzentrationsreihe von Cy5, die zwischen 0.1 nM und 50 nM war. In Abbildung 4.30 ist der Effekt der Goldbeschichtung erkennbar.

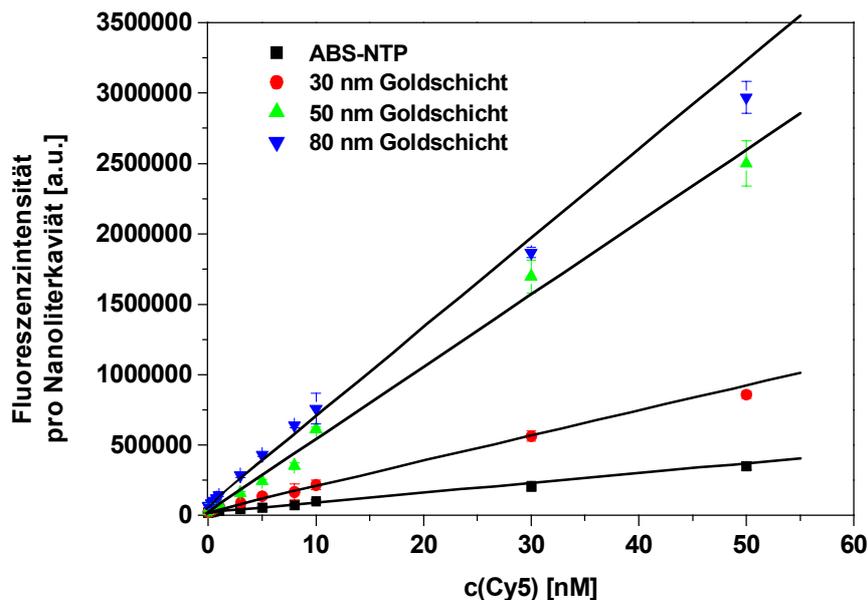


Abbildung 4.30: Cy5-Kalibriergeraden in NTPs mit unterschiedlichen Goldbeschichtung (n=20).

Bei einer gemessenen Schichtdicke von 80 nm Gold verstärkte sich die Fluoreszenz im Vergleich zur unbeschichteten ABS-NTP um das achtfache, wenn man eine Konzentration von 5 nM Cy5 einsetzte. Waren die Kavitäten nicht vollständig mit Gold bedeckt, so wirkte sich die Fluoreszenzverstärkung nicht so deutlich aus. Dementsprechend war bei einer gemessenen Schichtdicke von 30 nm, aber gleicher Konzentration, das Fluoreszenzsignal nur zweimal so hoch (Abb 4.31).

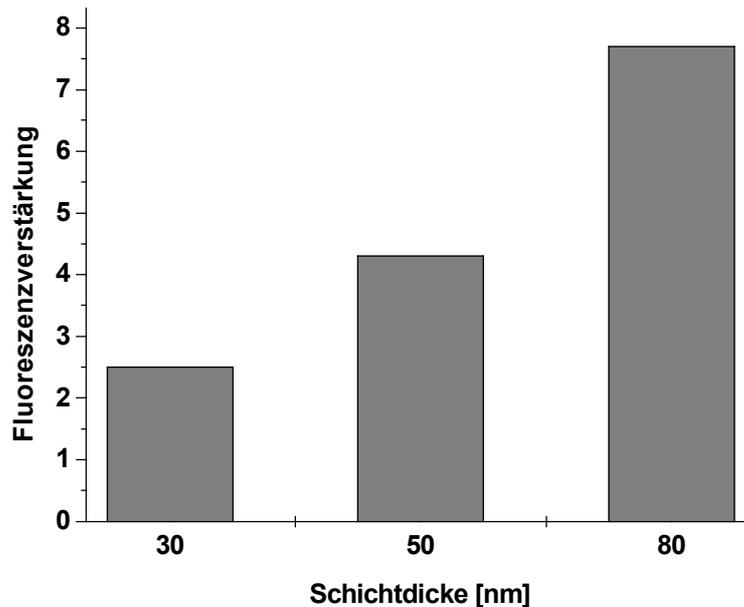


Abbildung 3.31: Fluoreszenzverstärkung bei Detektion in Reflektion in Abhängigkeit von der Goldschichtdicke.

Die Fluoreszenzdetektion erfolgte in Reflektion. Dies bedeutete, dass Streueffekte oder Mehrfachreflektionen das Signal negativ beeinflussen. Dies wurde untersucht, indem das Hintergrundsignal bei verschiedener Goldbeschichtung bestimmt wurde.

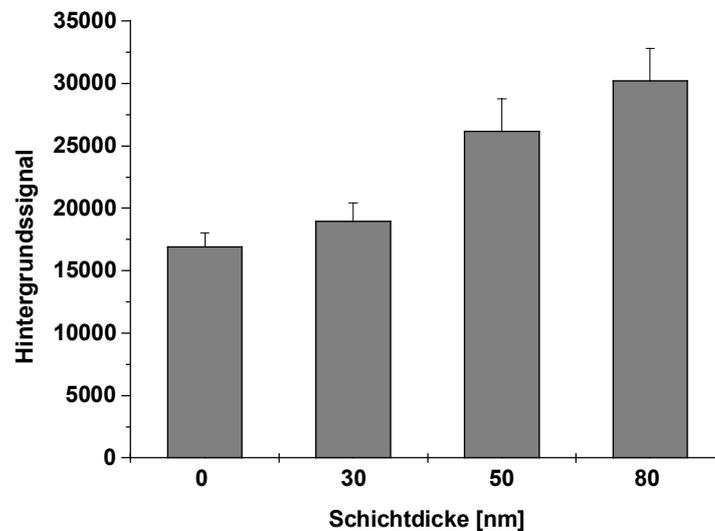


Abbildung 4.32: Hintergrundsignal in Abhängigkeit von der Goldschichtdicke gemessen mit dem Bioscan (n=20).

Das Hintergrundsignal verdoppelt sich bei einer Beschichtung von 80 nm. Dies beeinträchtigt die Nachweisgrenze von Cy5, so dass sich die Nachweisgrenze bei einer goldbeschichteten NTP nur geringfügig senken ließ (Abb. 4.33).

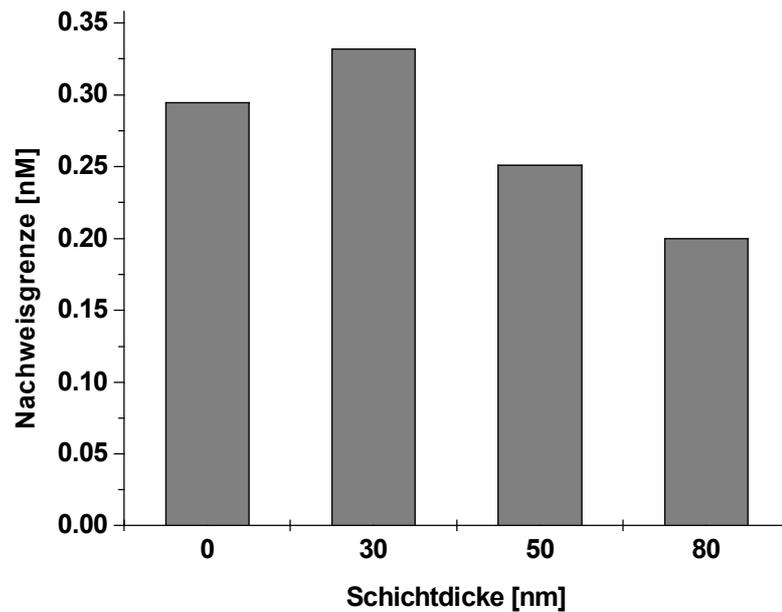


Abbildung 4.33: Nachweisgrenze von Cy5 im Bioscan bei verschiedenen dicken Goldschichten auf den NTPs.

Bei größeren Konzentrationen über 1 nM Cy5 war das Hintergrundsignal gegenüber dem Verstärkungseffekt vernachlässigbar. Es konnte im PSFIA für das gleiche Fluoreszenzsignal eine geringere Konzentration an Cy5-markiertem Antikörper eingesetzt werden.

Bei Abständen kleiner als 10 nm findet ein strahlungsloser Energietransfer von Fluorophoren auf metallische Oberfläche, wie es z.B. die Goldoberfläche ist, statt. In diesen geringen Distanzen reduziert sich die Fluoreszenzlebensdauer um mehrere Größenordnungen.

Dieser Effekt kann für den Aufbau des PSFIAs genutzt werden, indem die Fluoreszenzlöschung an den goldbeschichteten Wänden der Nanoliterkavitäten genutzt wurde. Viele Proteine wie auch das BSA enthalten die Aminosäure Cystein, die als funktionelle Endgruppe Thiole haben. Zur Untersuchung des oberflächennahen strahlungslosen Energietransfers an Goldoberflächen wurden die Nanoliterkavitäten mit ACA-BSA belegt. Bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ M ACA-BSA, die an die Oberfläche immobilisiert wurde, und einer Konzentration von Anti-Atrazin IgG-Cy5 von 4 nM wurde im PSFIA eine Kalibrierkurve von Atrazin aufgenommen. Die Signaldynamik betrug 38 %, bei einer Beschichtung mit 80 nm Gold. Dies bedeutet, dass der Energietransfer von Cy5 an Goldoberflächen effektiver als an immobilisiertem Akzeptorfarbstoff Cy5.5 ist.

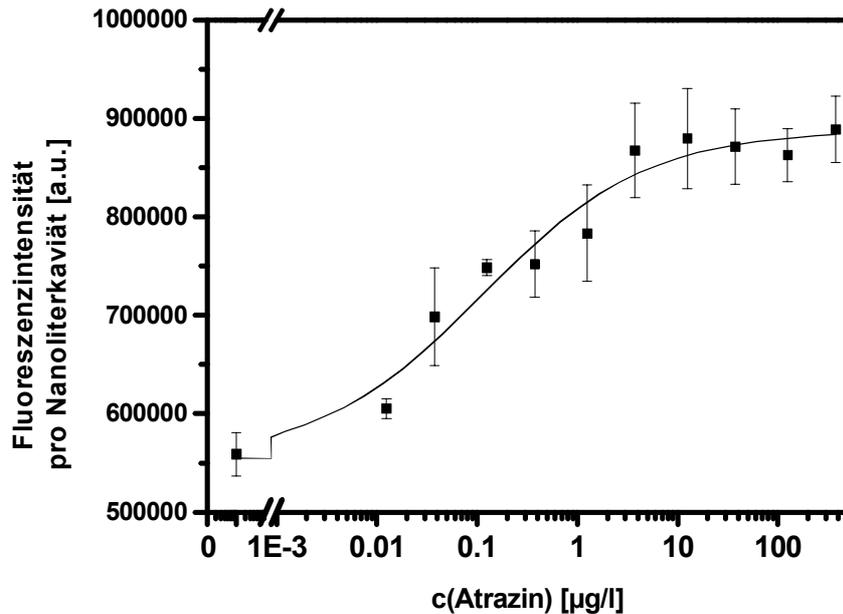


Abbildung 4.34: Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Nanoliterkavitäten in Abhängigkeit von der Atrazinkonzentration im PSFIA auf Gold-NTPs (n=10).

Schlussfolgerungen

- Goldschichten auf NTPs eignen sich beim Einsatz von Fluoreszenz-Nachweisverfahren in der Nanotiterplatte.
- Die Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit vom Bedeckungsgrad an Gold verstärkt.
- Die Nachweisgrenze von Cy5 im Bioscan wurde nur geringfügig beeinflusst, weil das Hintergrundsignal zunahm.
- Die Energie der angeregten Cy5-Moleküle wurde strahlungslos auf Gold übertragen, wenn die Fluorophore sich durch eine Affinitätsbindung der Antikörper mit den immobilisierten Analytderivaten der Goldoberfläche im Bereich zwischen 1 und 10 nm nähern.
- Die Signaldynamik war bei 38 % und damit höher als im PSFIA, bei dem als Akzeptor Cy5.5 immobilisiert wurde.

4.3.2 Abhängigkeit der Analytderivatkonzentration

Nach den theoretischen Betrachtungen des PSFIAs sollte sich der Testmittelpunkt einer Kalibrierkurve zu kleineren Konzentrationen hin verschieben, wenn der Belegungsgrad an Analytderivat an der Oberfläche verringert wird. Diese Abhängigkeit der Lage des Testmittelpunkts von der Analytderivatkonzentration an der Oberfläche sollte experimentell untersucht werden. Es wurde eine NTP mit einer 80 nm-Goldschicht verwendet. Die Nanoliterkavitäten wurden mit 3 verschiedenen Konzentrationen an ACA-BSA gefüllt (Abb 4.35). Nach Inkubation über Nacht war das ACA-BSA auf der Oberfläche immobilisiert. Restliches ACA-BSA wurde gewaschen.

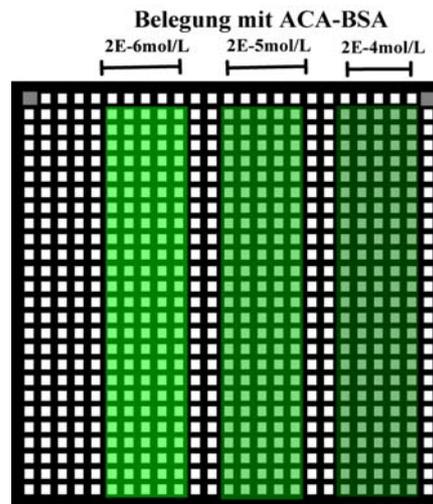
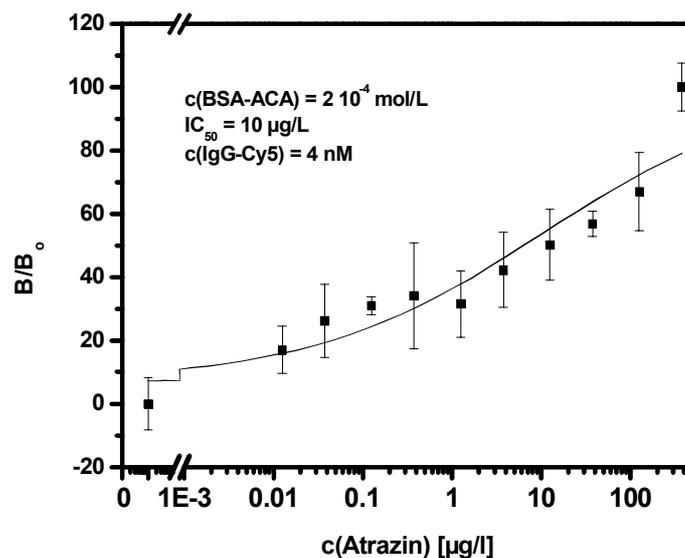


Abbildung 4.35: Belegung einer 80 nm-Gold-NTP mit unterschiedlichen ACA-BSA-Konzentrationen ($c_1=2 \cdot 10^{-4}$ M; $c_2=2 \cdot 10^{-5}$ M, $c_3=2 \cdot 10^{-6}$ M).

Die Atrazin-Konzentrationen und der markierte Antikörper wurden nach dem Mikrodosierschema von Kapitel 3.6 in den einzelnen Nanoliterkavitäten eingestellt. Nach Befüllung und Deckelung wurden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Kavitäten im Bioscan ausgelesen.

Mit einer Konzentration an IgG-Cy5 von 4 nM und einer Belegung von ACA-BSA mit einer Konzentration zwischen $2 \cdot 10^{-4}$ M und $2 \cdot 10^{-6}$ M war eine deutliche Verschiebung des Testmittelpunktes IC_{50} zu erkennen. Lag der Testmittelpunkt bei einer eingesetzten ACA-BSA-Konzentration bei 10 $\mu\text{g/L}$, so lag bei einer 100-fach verdünnten ACA-BSA-Konzentration bei 0.1 $\mu\text{g/L}$. Bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ M ACA-BSA lag der Testmittelpunkt bei 4 $\mu\text{g/L}$. Die Kalibrierkurve lag somit zwischen den beiden anderen Kalibrierkurven mit höherer bzw. niedrigerer Belegungsdichte. Dieses Ergebnis entsprach den theoretischen Annahmen.

In diesem Konzentrationsbereich von ACA-BSA beeinflusste die Belegungsdichte nur geringfügig die Signaldynamik. Sie lag bei der niedrigsten Konzentration bei 38% und erhöhte sich bei höherer Belegungsdichte auf 43 bis 46 %.



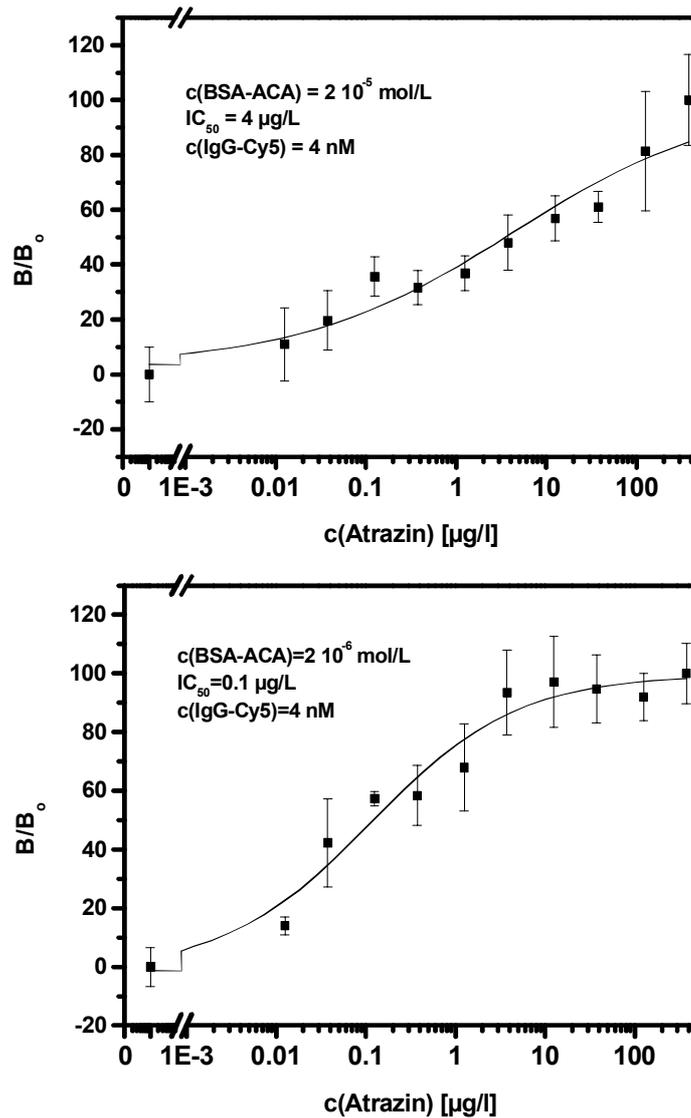


Abbildung 4.36: Atrazin-Kalibrierkurven bei verschiedenen Belegungsdichten von ACA-BSA auf einer Gold-NTP ($c_1=2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $c_2=2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $c_3=2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $n=5$).

In der Umweltanalytik ist die Nachweisgrenze von Pestiziden ein Kriterium für die Auswahl des Nachweisverfahrens, weil gewisse EG-Richtlinien eingehalten werden müssen. Bei Atrazin wurde der Grenzwert, über den die Atrazinkonzentration nicht liegen darf, bei einer Konzentration von $0.1 \mu\text{g/L}$ bzw. 0.1 ppb festgelegt (EEC, 1980). Die Nachweisgrenze des Testverfahrens sollte dementsprechend unter diesem Grenzwert liegen. Mit allen drei Analytderivat-Konzentrationen lag man mit der Nachweisgrenze unter 0.1 ppb .

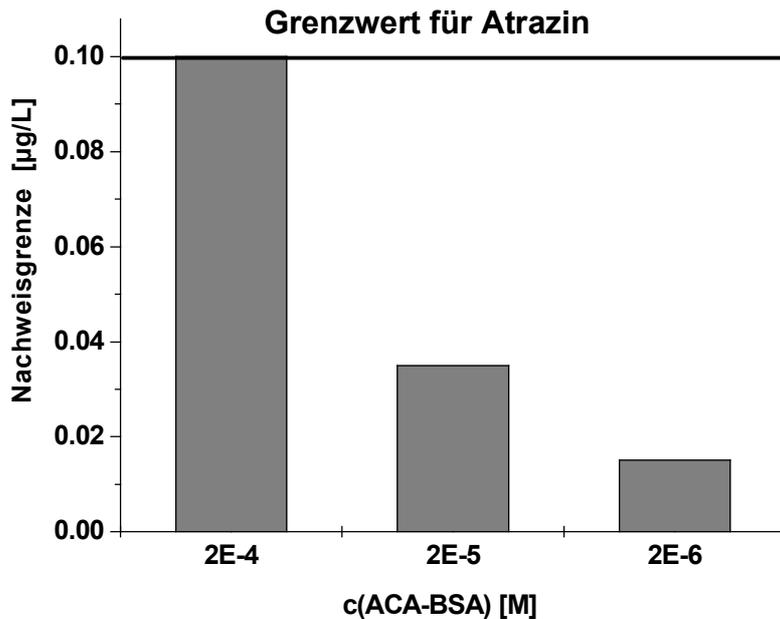


Abbildung 4.37: Nachweisgrenze von Atrazin im PSFIA auf einer Gold-NTP mit verschiedenen Belegungsdichten an ACA-BSA ($c=2 \cdot 10^{-4}$ M; $c=2 \cdot 10^{-5}$ M, $c=2 \cdot 10^{-6}$ M).

Die starke Abhängigkeit von der Zahl an Analytderivat-Molekülen an der Oberfläche hat aber auch eine nachteilige Konsequenz. Für reproduzierbare Kalibrierkurven müssen die Wände der Nanoliterkavitäten alle mit der gleichen Anzahl an Analytderivatmolekülen belegt sein, ansonsten ergeben sich hohe Standardabweichung der Signalwerte.

Schlussfolgerungen

- Die Zahl der Derivate an der Oberfläche beeinflusste im PSFIA die Lage der Kalibrierkurve.
- Je weniger Analytderivate auf der Oberfläche immobilisiert waren, desto stärker wurde der Testmittelpunkt zu niedrigeren Analytkonzentrationen hin verschoben und damit auch die Nachweisgrenzen. Die Ergebnisse entsprachen der Simulation in Kap. 4.2.2.
- Bei zu kleinen Belegungsdichten verringert sich theoretisch die Signaldynamik. In dem Experiment wurde zwischen ACA-BSA zwischen den Konzentrationen 10^{-6} M bis 10^{-4} M inkubiert. In diesem Bereich veränderte sich die Signaldynamik nur geringfügig.
- Proteine wie BSA und Derivate wie ACA-BSA ließen sich auf den goldbeschichteten Nanotiterplatten sehr gut immobilisieren.
- Die Nachweisgrenze von Atrazin im PSFIA auf Gold-NTPs lag unterhalb des festgelegten Grenzwertes von $0.1 \mu\text{g/L}$.

4.3.3 Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration

Ein weiterer Punkt der Charakterisierung eines Assays war, die Antikörperkonzentration zu variieren. Dazu benötigte man mehrere NTPs. Es wurden zwei Gold-NTPs, die jeweils eine Schichtdicke von 80nm hatten, mit $2 \cdot 10^{-6}$ M ACA-BSA belegt. Als Antikörperkonzentrationen wurden einmal 4 nM und das andere mal 2 nM eingesetzt. Dieser Unterschied im Faktor zwei veränderte den Testmittelpunkt IC_{50} stark, wie es in Abbildung 4.38 zu sehen ist. Bei einer Konzentration von 4 nM lag der Testmittelpunkt bei $0.1 \mu\text{g/L}$. Verdünnte man den

Antikörper um die Hälfte, verschob sich der Testmittelpunkt zu höheren Konzentrationen hin (siehe Abbildung 4.38). Der IC_{50} lag bei $1.8 \mu\text{g/l}$. Die Nachweisgrenze erhöhte sich dementsprechend von $0.015 \mu\text{g/L}$ auf $1.3 \mu\text{g/l}$. Dies bedeutete, dass die Kalibrierkurven im PSFIA stark durch die eingesetzte Antikörperkonzentration beeinflusst wurden. Dosierfehler, die bei der Mikrodosierpipette durch Satellitenbildung oder durch ungleichmäßiges Abreißen der Tropfen entstehen, beeinträchtigen die Reproduzierbarkeit des PSFIA.

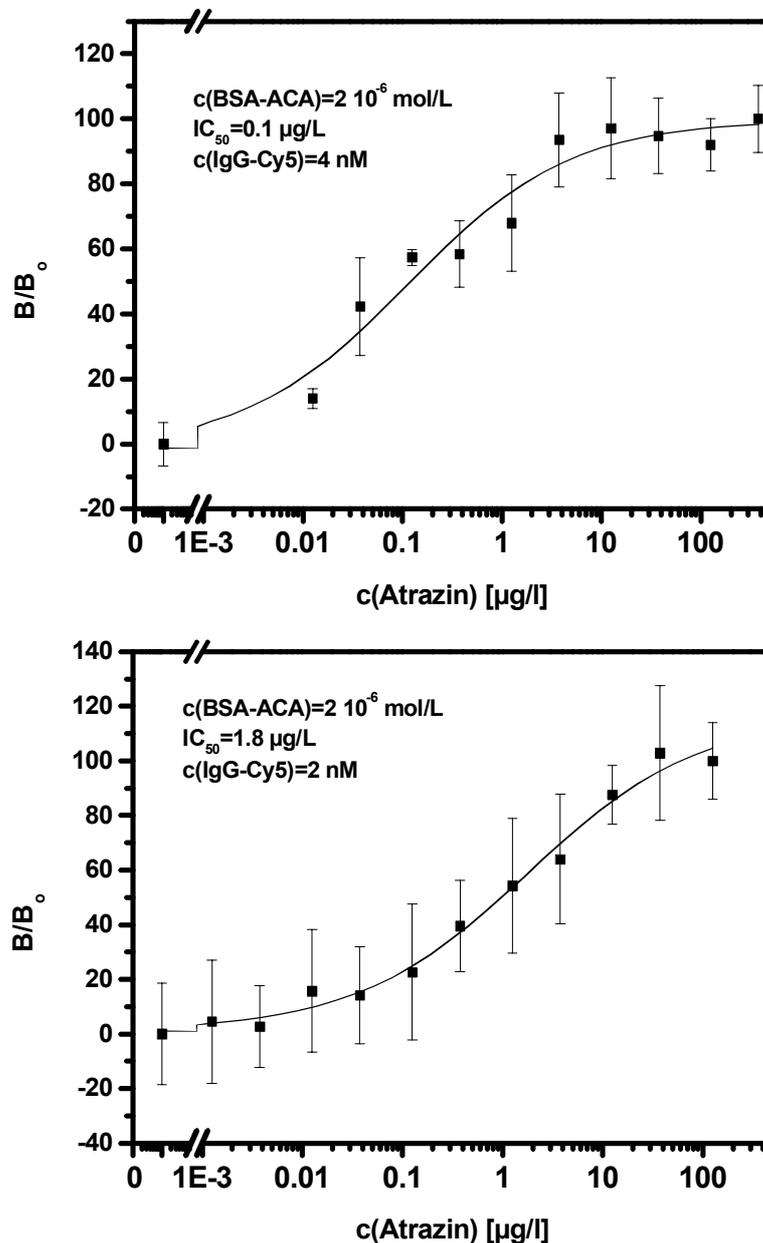


Abbildung 4.38: Kalibrierkurven mit Atrazin im PSFIA auf Gold-NTPs bei unterschiedlicher Antikörperkonzentration ($c_1=2 \text{ nM}$; $c_2=4 \text{ nM}$, $n=5$).

Schlussfolgerungen

- Die Antikörperkonzentration beeinflusst die Lage des Testmittelpunktes
- Bei Verwendung einer höheren Antikörperkonzentration verschiebt sich der Testmittelpunkt zu niedrigeren Analytkonzentrationen
- Eine zu hohe Konzentration des markierten Antikörpers sättigt jedoch den Detektor, so dass man nicht mehr im linearen Bereich arbeitet

4.3.4 Nachweis von Estradiol in einer Gold-NTP

Kleinere Analytderivate wurden über 11-Mercaptoundecansäure (11-MUA) auf den Goldoberflächen. 11-MUA ist ein heterobifunktionelles Molekül, das auf Goldschichten eine *self assembled monolayer* (SAM) gebildet hat, indem seine Thiolgruppe ohne zusätzliche Aktivierungsschritte direkt mit der Goldoberfläche reagierte und eine einlagige gleichmäßig verteilte Schicht ausgebildet wurde. Die Carboxylgruppe eignete sich zur Kopplung von Molekülen, die primäre Aminogruppen enthielten wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben. Viele Analytderivate, wie z.B. das Estronderivat E₁3CME, enthalten aber Carboxylgruppen, die über homobifunktionelle Moleküle, wie z.B. das Diaminopropan, zu endständigen Aminogruppen umfunktionalisiert werden.

Nachweis von Estradiol mit Gold-NTPs

Den Aufbau eines Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay für das Hormon Estradiol sollte die Immobilisierungsstrategie für carboxylierte Analytderivate klären. Die Schwierigkeit daran war, dass es kein kommerziell erhältliches heterobifunktionelles thiolhaltiges Molekül mit einer primären Aminogruppe gab. Die Moleküle Cystein oder Cysteamin haben zwar sowohl eine Thiolgruppe als auch eine Aminogruppe, der Abstand der beiden funktionellen Gruppen beträgt aber nur zwei Kohlenstoffatome. Für die biomolekulare Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen an der Oberfläche sollte ein gewisser Abstand zwischen Oberfläche und Erkennungsmolekül sein, ansonsten ist die Bindung nicht effektiv. Als Abstandhalter (Spacer) werden gängigerweise mindestens 6 Kohlenstoffatomen gewählt. Deswegen wurde die 11-Mercapzoundecansäure für die Ausbildung eines SAM auf Gold genutzt. Die Carboxylgruppen wurden statistisch mit Diaminopropan zu endständigen Aminogruppen umfunktionalisiert. Dazu wurde das immobilisierte 11-MUA mit EDC/NHS aktiviert und 10 mM wässriges Diaminopropan gegeben. Als Analytderivat wurde das Estron-3-Carboxymethylether (E₁3CME) an die umfunktionalisierte 11-MUA gekoppelt. E₁3CME wurde mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclocarbodiimid aktiviert. Die Aktivierung erfolgte in reinem Methanol, weil das Lösungsmittel DMF die NTP anlöste. Dieses etwas komplizierte Protokoll musste erarbeitet werden, weil sich E₁3CME nicht in Wasser lösen ließ und stark hydrophobe organische Lösungsmittel die ABS-NTP angriffen. Die dünne Goldschicht verhinderte nicht das Anlösen durch Lösungsmittel.

Der PSFIA zum Nachweis von Estradiol in Nanolitervolumina wurde in einer NTP mit 70 nm Goldbeschichtung durchgeführt. Als Antikörper wurde der markierte polyklonale Antikörper anti-E1 IgG-Cy5 mit einem Markierungsgrad von 1:7 eingesetzt. Die Puffer, Analytstammlösungen und Antikörper wurden sequentiell zugegeben. Die Endkonzentration an anti-E1 IgG-Cy5 lag bei 2 nM. In Abbildung 4.39 stellt die Kalibrierkurve von Estradiol dar.

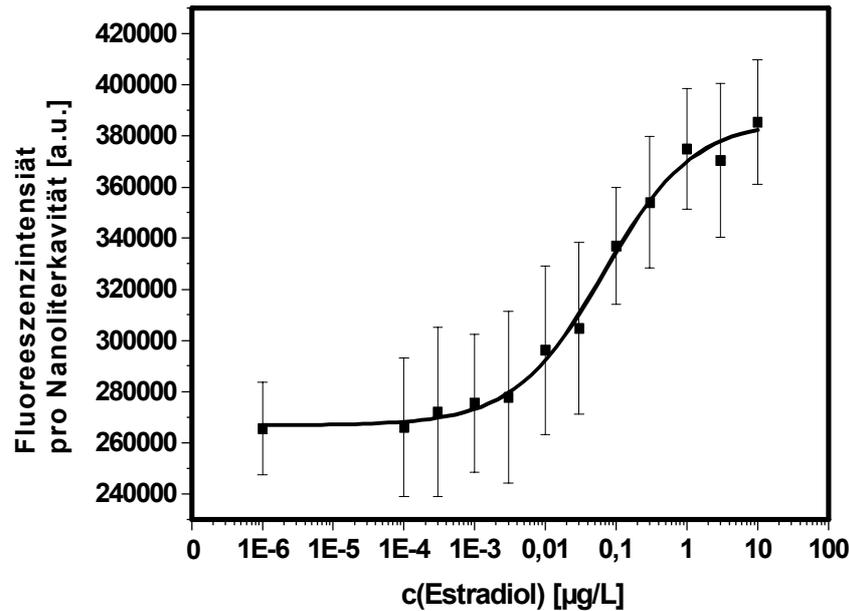


Abbildung 4.39: Kalibrierkurve von Estradiol im PSFIA auf Gold-NTP (n=10)

Der Testmittelpunkt lag bei $IC_{50} = 0.07 \mu\text{g/l}$ und die Nachweisgrenze bei $0.04 \mu\text{g/L}$. Die Nachweisgrenze war im Vergleich zum Testmittelpunkt verhältnismäßig hoch, da die Standardabweichungen der einzelnen Kalibrierpunkte zwischen 7 und 10 % lagen. Der 10%-90%-Bereich für den Nachweis von Estradiol im PSFIA war zwischen $0.003 \mu\text{g/L}$ und $1 \mu\text{g/L}$.

4.3.5 Nachweis von Histamin

In einem Industrieprojekt sollte Histamin als Mediator von allergischen Reaktionen in kleinsten Probenvolumina nachgewiesen werden. Dazu eignete sich der PSFIA in der Nanotiterplatte. Es mussten Voruntersuchungen unternommen werden, bei denen ein spezifischer Antikörper gegen den Analyten ausgewählt, seine Funktionalität, das Inhibitionsvermögen des derivatisierten Histamins und die Immobilisierung von Histamin charakterisiert wurden. Diese Untersuchungen wurden mit RfS durchgeführt.

Anschließend wurde Histamin im PSFIA auf Gold-NTPs durchgeführt. Hiermit wurde der prinzipielle Beweis erbracht, dass das Histamin im Nanolitervolumina nachgewiesen werden konnte.

Antikörperauswahl

Für den PSFIA wurden verschiedene Antikörper untersucht, die gegen das Antigen Histamin gerichtet sind. Ziel war es, einen geeigneten Antikörper zu finden, der ohne großen Aufwand mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert werden konnte. Die Unterschiede der kommerziell erhältlichen Antikörper lagen bei der Zusammensetzung der Lösungen, in denen die Antikörper geliefert wurden (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Auflistung unterschiedlicher kommerziell erhältlicher Anti-Histamin-Antikörper.

| Hersteller | Spezies | Immunogen | Reinigung | Abfüllung | Konzentration |
|-------------------|----------------|--|---------------------|----------------------------|----------------------|
| Sigma | Hase IgG | KLH-Histamin | Affinitäts-gereingt | 1% BSA 0.1% Na-Azid | 0.25 mg/ml |
| Acris | Hase-IgG | BSA-Histamin | IgG-Fällung | PBS-Puffer 0.1% Na-Azid | 1.4 mg/ml |
| Seramun | Schaf-IgG | Ova-Histamin | Affinitäts-gereingt | PBS-Puffer | 1 mg/ml |
| Pharmacia Upjohns | mIgG | 1-(N-(3-thiopropionyl)-2-aminoethyl)-4-(2-aminoethyl)-imidazol-DSA | ? | 1% BSA 0.1% Na-Azid | <1 µg/ml |

Rinderserumalbumin (BSA) musste zum Beispiel vor der Markierung des Antikörpers abgetrennt werden, weswegen eine ProteinA-Reinigung über eine Affinitätschromatographie vor dem Markierungsschritt nötig war, der zeitaufwendig war und nur mit 80% Ausbeute verlief. Aus diesem Grund wurden zur Markierung Antikörper verwendet, die ohne Proteinzusätze geliefert wurden.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Art der Produktion der polyklonalen Antikörper. Da Histamin ein sehr kleines Molekül ist, aktiviert es als Proteinkonjugat die B-Zellen von Vertebraten zur Antikörperbildung. Als Immunogen werden meist Serum-Albumin-Proteine mit dem Analyten konjugiert und damit Vertebraten (z.B. Hase, Schaf, Ziege...) immunisiert (Wortberg et al., 1994). Die Konjugation erfolgt meist durch homobifunktionelle Crosslinker, welche die Aminogruppen der Proteine mit der Aminogruppe des Histamins quervernetzen (Peyret et al., 1986). Entsprechend wird aber die Aminogruppe des Histamins nicht mehr von den Antikörpern erkannt. Diese Antikörper erkennen nur derivatisiertes Histamin, wobei die Bindung zwischen dem Anti-Histamin Antikörper und z.B. OVA-Histamin am höchsten ist (Guesdon et al., 1986). Eine andere Strategie ist, am Heterocyclus des Histamins eine funktionelle Gruppe einzuführen (Hammar et al., 1990). Hiermit kann auch freies Histamin erkannt werden. Dieser Antikörper ist nur von der Firma Pharmacia&Upjohns erhältlich. Hier war jedoch die Konzentration so gering, dass er sich nicht zur Markierung eignete.

Für den Nachweis von Histamin wurde das Anti-Histamin-IgG der Firma Seramun verwendet. Dieser Antikörper wurde ohne Zusatzstoffe wie BSA geliefert und war affinitätsgereingt, so dass er sich für eine Fluoreszenz-Markierung sehr gut eignete. Der Markierungsgrad von Cy5 pro IgG betrug 1.2. Freies Histamin konnte nicht nachgewiesen werden. Seine funktionelle Gruppe, die Aminogruppe, wurde an Ovalbumin gekoppelt. Deswegen wurde ein Histamin-BSA-Konjugat synthetisiert. Der Histamin-Aktivester wurde an die verfügbaren Aminogruppen von BSA gebunden. Ein exakter Markierungsgrad von Histamin an Protein konnte nicht bestimmt werden, da es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 278 nm zu 262 nm trotz intensiver Aufreinigung gekommen war.

RIfS-Untersuchungen

Nach erfolglosen Bindungsstudien auf RIfS-Transducern, die mit Aminodextran belegt waren, wurde ein Protokoll entwickelt, das mit Dicarboxy-PEG-Schichten arbeitete. In DMF gelöstes Histamin wurde an die freien Carboxygruppen gekoppelt, indem diese zuvor mit NHS/DIC aktiviert wurden. Ein weiterer Punkt war die Inhibition des Anti-Histamin Antikörpers mit Histamin. Freies Histamin konnte im RIfS-Verfahren nicht nachgewiesen werden. Dies lag daran, dass Histamin ein sehr kleines Molekül ist und nur sehr wenige Erkennungsstellen für den Antikörper aufweist [Otomo et al., 2000]. Da bei der Antigenerkennung ionische Gruppen eine Rolle spielen, ist die Aminogruppe des Histamins eine wichtige Erkennungsstelle und beeinflusst die Spezifität der Antigen-Antikörper-Erkennung (Hammar et al, 1990). Die Firma Seramun stellte jedoch einen Antikörper her, indem als Immunogen Histamin verwendet wurde, das an Ovalbumin gekoppelt war. Demzufolge war aus der Aminogruppe eine Peptidbindung geworden. Aus diesem Grund musste Histamin, um im RIfS-Versuch die Inhibierung des Anti-Histamin Antikörpers nachzuweisen, derivatisiert werden. Histamin wurde mit Glutarsäureanhydrid umgesetzt, so dass eine freie Carboxylgruppe entstand. Daraus wurde der NHS-Aktivester hergestellt, der direkt an BSA gekoppelt wurde. Dieses Derivat wurde als Analyt eingesetzt.

Abbildung 4.40 zeigt die Bindung von Anti-Histamin an eine PEG-Histamin-Oberfläche. Die Änderung der optische Schichtdicke lag bei 2.0 nm. Der inhibierte Antikörper wurde nur noch mit einer optischen Schichtdickenänderung $\Delta OD = 1.5$ nm an die Oberfläche gebunden.

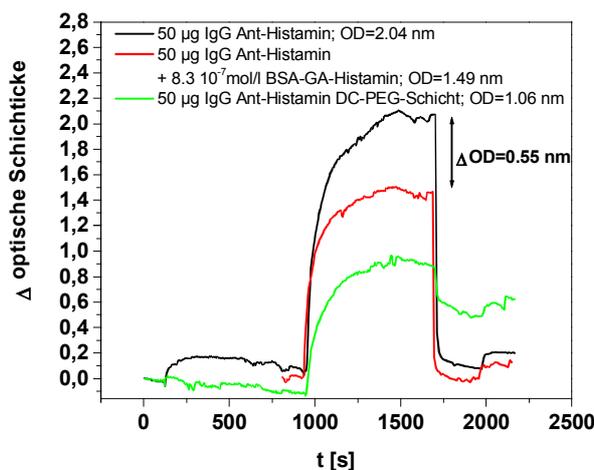


Abbildung 4.40: Charakterisierung des Anti-Histamin-Antikörpers der Fa. Seramun mit RIfS auf einer Histamin-PEG-Oberfläche.

Dies bedeutete entweder, dass BSA-GA-Histamin nicht vollständig den Antikörper inhibiert hat oder eine hohe unspezifische Bindung vorliegt. Reine PEG-Oberflächen wiesen in der Regel minimale unspezifische Bindung von Antikörpern auf. Der Anti-Histamin Antikörper von Seramun wechselwirkte jedoch sehr stark mit einer unbehandelte Dicarboxy-PEG-Oberfläche. Man erhielt eine optische Schichtdickenänderung $\Delta OD = 1.1$ nm. Es konnte daraus geschlossen werden, dass der Antikörper die Carboxylgruppen ebenfalls erkennt.

Bei der Immunisierung wurde ein homobifunktioneller Crosslinker verwendet, der Aminogruppen mit einander verbindet. Ein Teil des Crosslinkers hat aber nur an das Protein gebunden, ohne Histamin zu konjugieren. So können freie Carboxylgruppen entstehen, gegen die ebenfalls polyklonale Antikörper hergestellt werden. Diese sind auch nur schwer von den Antikörpern zu trennen, die gegen Histamin gerichtet sind.

Nachweis von Histamin

Histamin wurde in der Nanotiterplatte über den PSFIA auf Goldoberflächen nachgewiesen. Dazu wurde die Oberfläche durch Ausbildung einer SAM mit 11-Mercaptoundecansäure carboxyliert, über EDC/NHS aktiviert und anschließend Histamin über eine Peptidbindung an die Oberfläche gekoppelt. Für Immobilisierungsschritte in der Kunststoff-NTP mussten Lösungsmittel vermieden werden, weswegen das wasserlösliche Carbodiimid EDC verwendet wurde. Die Inkubationszeit war 10 Minuten. Anschließend wurde die NTP mit Stickstoff getrocknet und direkt mit 10 mM Histamin befüllt.

Untersucht wurden eine 30 nm und eine 80 nm beschichtete Gold-NTP. Es wurden Kalibrierkurven mit 2 nM markierten Anti-Histamin IgG-Cy5 erstellt. Als Analyt wurde wie im Kapitel 3.3.5 beschrieben, das an BSA gekoppelte Histamin verwendet. Es wurde sequentiell Puffer, Analyt dreier Stammlösungen und Antikörper in die Nanoliterkavitäten dosiert. Die einzelnen Analyt-Konzentrationen wurden durch entsprechende Mischungsverhältnisse von Analytstammlösung und Puffer direkt in der Nanotiterplatte eingestellt.

Abbildung 4.41 zeigt die Kalibrierkurve von Histamin-GA-BSA auf einer 30nm-Gold-NTP. Der Testmittelpunkt lag bei 3 nM. Mit dem Nullwert FI_0 , bei dem kein Analyt in Lösung war, wurde die Signaldynamik bestimmt. FI_0 hatte einen Wert von 71100 ± 1200 [a.u.]. Die maximale Fluoreszenz bei Analytsättigung in Lösung lag bei 106500 ± 3100 [a.u.]. Somit hatte der PSFIA für Histamin auf einer 30nm-Gold-NTP eine Signaldynamik von 34%.

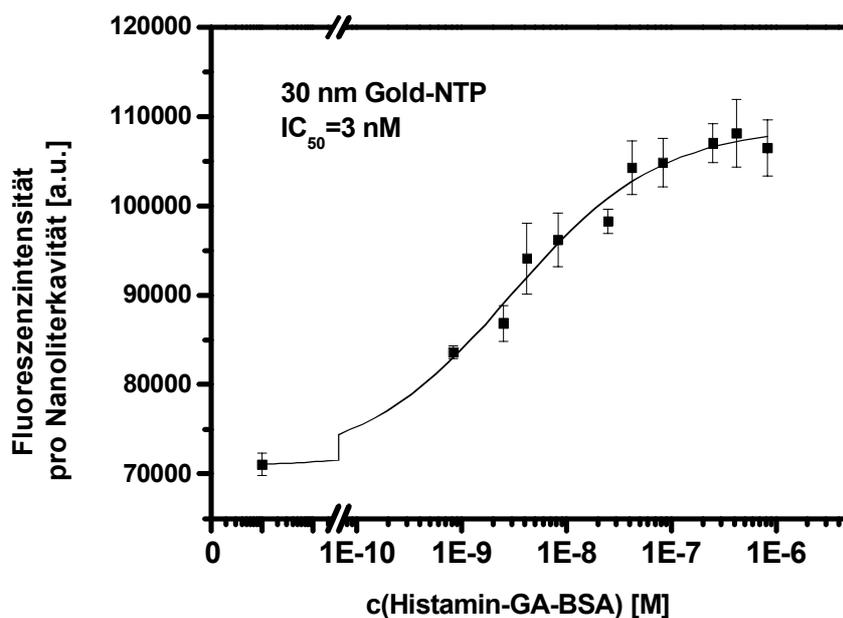


Abbildung 4.41: Kalibrierkurve von Histamin im PSFIA auf 30nm-Gold-NTP (n=10).

Das gleiche Experiment wurde auf einer 80nm-Gold-NTP durchgeführt. Der Testmittelpunkt hat sich um eine Zehnerpotenz zu höheren Konzentrationen hin verschoben und lag bei 20 nM. Nullwert FI_0 war bei 208660 ± 4860 (a.u.) und die maximale Fluoreszenzintensität bei $FI_{max} = 347390 \pm 8090$. Die Signaldynamik erhöhte sich auf 40%. Gleichzeitig wurde der Einfluss der Schichtdicke auf die Fluoreszenzintensität deutlich. Das FI_{max} verdreifachte sich bei einer Schichtdicke von 80 nm Gold.

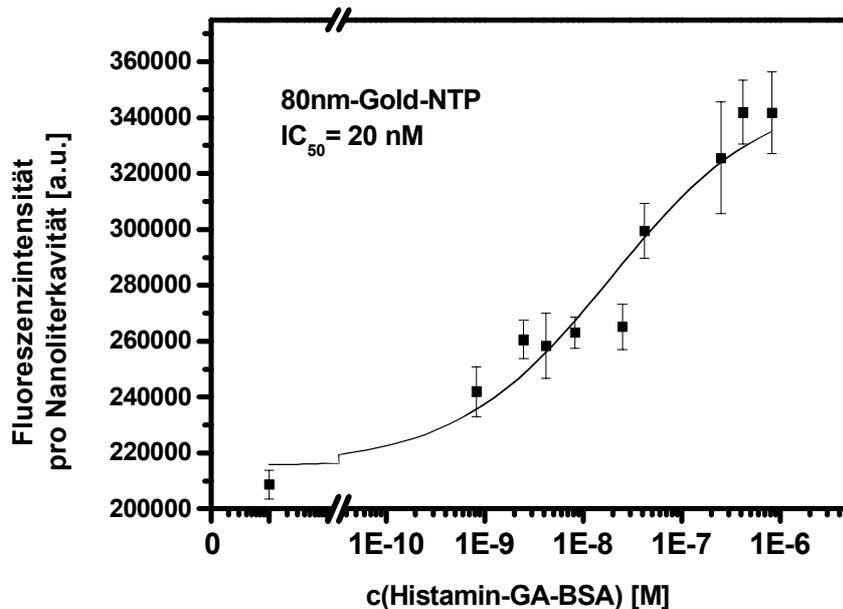


Abbildung 4.42: Kalibrierkurve von Histamin im PSFIA auf 80nm-Gold-NTP (n=10).

Die Verschiebung des Testmittelpunkts lässt sich aus den vorigen Experimenten von Kapitel 4.7.2 eindeutig nachvollziehen. In Kapitel 4.7.1 wurden Voruntersuchungen der Goldbeschichtungen beschrieben. Es war zu erkennen, dass bei einer 30 nm-Goldschicht die NTP noch nicht vollständig mit Gold bedeckt war. Dem zufolge hat das 11-MUA nicht an den freien Kunststoffoberflächen gebunden, sondern nur an den Stellen, an denen sie mit Gold bedeckt waren. Dies hatte zur Folge, dass ein kleinerer Anteil an Histamin auf den Kavitätinnenwänden immobilisiert werden konnte. Wie schon in Kapitel 4.7.2 nachgewiesen, wurde die Lage des Testmittelpunkts durch die Anzahl an immobilisierten Analytderivaten, in diesem Fall war es Histamin selbst, beeinflusst. Man konnte davon ausgehen, dass auf der 80nm-Gold-NTP mehr Histamin immobilisiert werden konnte, und aus diesem Grund verschob sich der Testmittelpunkt zu höheren Konzentrationen.

Die Kalibrierkurven der 30 nm- und 80 nm Gold-NTP wurden vollständig ausgewertet. Bei der 30 nm-Gold-NTP lag der 10%-90%-Bereich zwischen 0,08 nM und 60 nM. Die Nachweisgrenze lag bei 0,07 nM Histamin-GA-BSA. Demgegenüber war die ganze Kalibrierkurve bei der 80nm-Gold-NTP zu höheren Konzentrationen hin verschoben. Der 10%-90%-Bereich erstreckte sich zwischen 2 nM und 500 nM, und die Nachweisgrenze lag bei 0,5 nM.

Schlussfolgerungen

- Zum Nachweis des Histamins musste dieses zunächst über Glutarsäureanhydrid und BSA derivatisiert werden.
- Als immobilisiertes Analytderivat wurde Histamin selbst verwendet.
- Im RfS-Experiment wurde ein Schichtsystem mit PEG verwendet. Der Antikörper hatte nicht auf AMD-Oberflächen gebunden.
- Der Anti-Histamin-Antikörper der Fa. Seramun wies eine hohe Unspezifität gegenüber Carboxyoberflächen auf.
- Self Assembled Monolayers über 11-Mercaptoundecansäure eigneten sich als Kopplungsmoleküle an goldbeschichteten Wänden der Nanoliterkavitäten.

- Die Kavitäten ließen sich über ein einfaches Protokoll carboxylieren und hatten damit funktionelle Eigenschaften, um Analytderivate daran zu koppeln.
- Analytderivate mit primären Aminogruppen ließen sich direkt an 11-MUA koppeln.
- Bei Analytderivate mit Carboxylgruppen musste die Oberfläche zuvor mit Diaminopropan statistisch umfunktionalisiert werden.
- Die Goldschichtdicke beeinflussten die Zahl an Analytderivat-Molekülen, die an die Oberfläche koppeln und verschoben den Testmittelpunkt zu höheren Analytkonzentrationen.
- Histamin als ein Mediator einer Entzündungsreaktion im menschlichen Immunsystem konnte mit einer Nachweisgrenze von 0.07 nM nachgewiesen werden.
- Estradiol als ein menschliches Hormon konnte im PSFIA bis zu einer Nachweisgrenze von 0.25 nM bestimmt werden.

4.3.6 Zusammenfassende Diskussion

Nanotiterplatten, die mit einer 30 bis 80 nm Goldschicht bedampft wurden, eigneten sich für den Aufbau verschiedener PSFIAs. Die Goldbeschichtung wurde anstelle der immobilisierten Akzeptorfarbstoffe für den oberflächennahen strahlungslosen Energietransfer verwendet. Der Vorteil war, dass unmarkierte Analytderivate eingesetzt werden konnten. Ein zusätzlicher Effekt war die Fluoreszenzverstärkung in Lösung. Dies führte zu einer Reduktion der eingesetzten Antikörperkonzentrationen.

Analytderivate konnten direkt über Thiolgruppen auf Gold immobilisiert werden. Cysteinhaltige Proteine konnten auf den Gold-NTPs ohne Kopplung von Farbstoffen an die Wände der Nanoliterkavitäten immobilisiert werden. Dies macht den Weg frei für diagnostische Nachweissysteme, wo oftmals Proteine oder Peptide über einen Immunoassay nachgewiesen werden.

Gezeigt wurde dies modellhaft, indem ACA-BSA auf die goldbeschichteten Nanoliterkavitäten immobilisiert wurde. Im Vergleich zum PSFIA in der ABS-NTP wurde die Nachweisgrenze von 0.03 µg/l auf 0.015 µg/l halbiert. Die Signaldynamik erhöhte sich in diesem Vergleich von 24% auf knapp 40%.

Da der Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay ein kompetitiver Assay ist, beeinflussen die Konzentrationsverhältnisse von Antikörper in Lösung und Analytderivat an der Oberfläche die Lage des Gleichgewichts und damit die Kalibrierkurven. Dies wurde anhand verschiedener Belegungskonzentrationen an ACA-BSA und Antikörperkonzentrationen gezeigt. Dabei verhielten sich die beiden Konzentrationen gegenläufig. Eine geringe Belegungsdichte an der Oberfläche und eine etwas höhere Antikörperkonzentration ergaben eine Verschiebung des Testmittelpunkts zu niedrigeren Analytkonzentrationen und damit zu niedrigeren Nachweisgrenzen. Gleichzeitig wurde aber auch ersichtlich, dass eine nicht gleichmäßige Anzahl an Analytderivat-Moleküle pro Nanoliterkavität die Standardabweichung der einzelnen Kalibrierkonzentrationen erhöhte.

Für kleine Moleküle wie Hormone oder Pestizide gab es die Möglichkeit der Immobilisierung über Self Assembled Monolayers. 11-Mercaptoundecansäure eignete sich hervorragend zur Immobilisierung von Analytderivaten, die entweder primäre Aminogruppen oder Carboxylgruppen enthielten. Als Kopplungschemie wurde die in der Peptidchemie bekannte Aktivierung von Carboxylgruppen über N-Hydroxysuccinimid in Anwesenheit von Carbodiimiden verwendet.

Histamin und Estradiol als Modellanalyte konnten bis in den subnanomolaren Bereich nachgewiesen werden. Mit dem PSFIA konnte gezeigt werden, dass biologische Proben

nachgewiesen werden können, auch wenn sie nur in geringsten Probenmengen vorliegen. Dies ermöglicht einem, im hohen Durchsatz nach verschiedensten Effektoren, die in biologischen Proben nach einer Stimulation auftreten, zu suchen.

4.4 Untersuchung neuer Farbstoffe für die Detektion von FRET-Ereignissen

Der strahlungslose Energietransfer zwischen einem Donor-Fluoreszenzfarbstoff und einem Akzeptorfarbstoff findet statt, wenn beide Moleküle sich in einem Abstand von 1-10 nm befinden und ein optimaler spektraler Überlapp zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors vorliegt. Ein Maß für die Effektivität des Energietransfers ist der Försterradius R_0 , der den Abstand beider Moleküle bei halbmaximaler Energieeffizienz angibt. Die sechste Potenz des Försterradius R_0 ist nach Gleichung 59 proportional zur Quantenausbeute Φ des Donorfarbstoffes, dem Orientierungsfaktor κ^2 und dem Überlappungsintegral J . In dem Überlappungsintegral steckt die normierte Fläche des Fluoreszenzspektrums, das Absorptionsspektrum des Akzeptors und die vierte Potenz des Wellenlängenabschnitts, in dem sich Donor und Akzeptor überlappen. Dies bedeutet, dass für die Wahl eines geeigneten FRET-Paars eine hohe Quantenausbeute des Donors und ein hoher Extinktionskoeffizient des Akzeptors von Bedeutung sind. Wie stark der Einfluss theoretisch ist, wird in Abbildung 4.43 dargestellt.

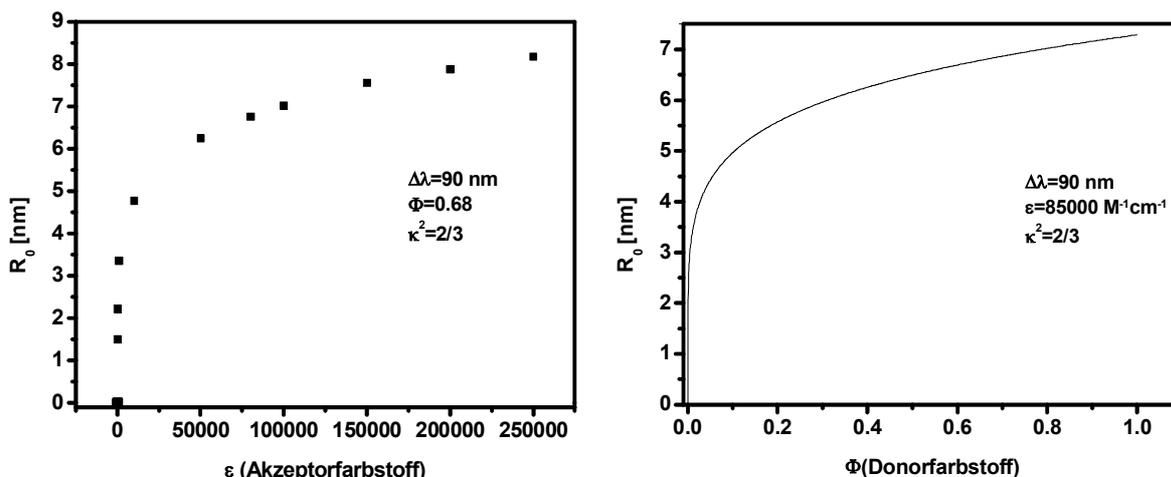


Abbildung 4.43: Theoretische Berechnung des Försterabstands R_0 in Abhängigkeit a.) vom Extinktionskoeffizienten des Akzeptorfarbstoffes und b.) von der Quantenausbeute des Donors.

Als Annahme wurde das Überlappungsintegral gewählt, das dem Donor-Akzeptorpaar Dy630 und DyQ660 entsprach. In Abbildung 4.43.a wurde der Extinktionskoeffizient des Akzeptors variiert und in Abbildung 4.43.b. die Quantenausbeute des Donorfarbstoffes. Es war zu erkennen, dass mit einem hohen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 200.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ die Effektivität des Energietransfers stärker beeinflusst werden kann als mit der Quantenausbeute des Fluoreszenzfarbstoffes. Liegt der Extinktionskoeffizient bei $\epsilon = 100.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, so erhöht sich R_0 nur um 15% gegenüber Farbstoffen mit einem Extinktionskoeffizienten bei $\epsilon = 250.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Energietransfereffizienz wird besonders stark durch den Wellenlängenbereich, in dem es zu einem Überlapp kommt, beeinflusst. Der Wellenlängenbereich geht mit der fünften Potenz bei der Berechnung von R_0 ein. Deswegen sind Akzeptorfarbstoffe wichtig, die ein breites Absorptionsspektrum im Bereich der Donorfluoreszenz aufweisen, um sie

vollständig abdecken zu können. Diese Eigenschaft erfüllte der Farbstoff DyQ660 für Fluoreszenzfarbstoffe, deren Emissionsmaximum zwischen einer Wellenlänge von 630 nm bis 680 nm liegt (Abb. 4.44). Deswegen wurde DyQ660 für weitere Untersuchungen im Einsatz als nichtfluoreszierender Akzeptor verwendet.

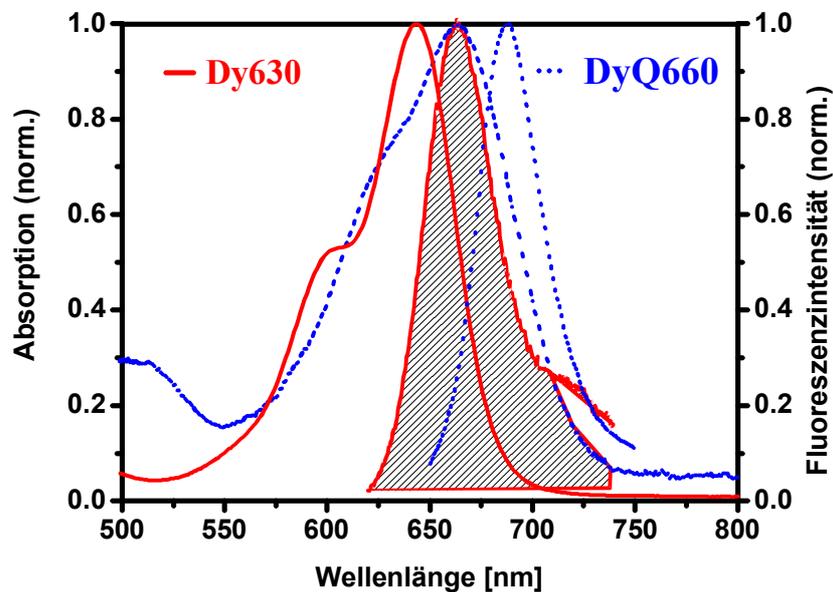


Abbildung 4.44: Optimaler Überlapp zwischen dem Donor-Fluoreszenzfarbstoff Dy630 und dem Akzeptor-Farbstoff DyQ660.

Der Fluoreszenzfarbstoff Dy630 wurde hinsichtlich seiner Eigenschaften als Donorfarbstoff spektroskopisch charakterisiert, und es wurde seine Kopplungsfähigkeit an Biomoleküle untersucht. Dy630 ist ein Hemicyanin-Farbstoff, der im langwelligen Bereich oberhalb von 600 nm anregbar ist. Er liegt als NHS-Aktivester in kristalliner Form vor und eignet sich somit zur Kopplung an Proteine oder Oligonukleotide über ihre primäre Aminogruppe.

Die Ergebnisse sollten für die Entwicklung einer DNA-Sonde eingesetzt werden, die im 3'-Nuklease-Assay (siehe Kap 4.5.) eingesetzt werden kann. Diese DNA-Sonde soll beidseitig markiert sein, an dem 3'-Ende mit Dy630 und am 5'-Ende mit einem Akzeptorfarbstoff. Die Fluoreszenz wird so lange gelöscht, so lange beide Enden nicht von einander getrennt waren (Lee et al., 1999). Die Effektivität der Herabsenkung der Donorfluoreszenz hing demnach davon ab, dass keine störende Fluoreszenz auftrat.

4.4.1 Charakterisierung der Donor- und Akzeptorfarbstoffe Dy630 und DyQ660

Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum

Das Absorptionsspektrum der Chromophoren Dy630 und DyQ660 wurden untersucht. Beide Farbstoffe wurden auf ihre Eigenschaften als FRET-Paar untersucht. Da sie an Biomoleküle gekoppelt wurden, waren die spektroskopischen Daten wie Extinktionskoeffizient, Absorptionsmaximum und der adsorptive Anteil der Extinktion, bei der das Biomolekül und der Farbstoff adsorbieren, von Bedeutung. Die Extinktionskoeffizienten wurden in dem Lösungsmittel bestimmt, bei dem die Farbstoffe sich vollständig auflösten und somit keine Aggregate bildeten. Der Farbstoff Dy630 war nur bedingt in Wasser löslich, weswegen sein Extinktionskoeffizient, wenn er in Wasser gelöst wurde, mit $\epsilon=94000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zu niedrig bestimmt wurde. Für Dy630 war das geeignete Lösungsmittel Dichlormethan und für

DyQ660 war es Ethanol. Für Dy630 wurde in Dichlormethan ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon=180000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda=641 \text{ nm}$ gemessen. DyQ660 hatte in Ethanol einen Extinktionskoeffizienten³ von $\epsilon=85000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda=660 \text{ nm}$.

Für die Berechnung des Markierungsgrades, also die Anzahl an Farbstoffmolekülen pro Protein, waren der Extinktionskoeffizient und der Y-Wert wichtig. Der Y-Wert war das Verhältnis des Extinktionskoeffizienten im Absorptionsmaximum und bei einer Wellenlänge von 278 nm. Bei 278 nm war insbesondere darauf zu achten, dass keine Verunreinigungen des Lösungsmittels störten. Dies war insbesondere bei DMF der Fall, nicht aber bei CH_2Cl_2 . Für Dy630 wurde ein Y-Wert von $Y=0.15$ bestimmt. Der Farbstoff DyQ660 wies einen höheren Y-Wert auf, der bei $Y=0.18$ lag. Die Absorptionsspektren beider Farbstoffe sind in Abbildung 4.45 dargestellt.

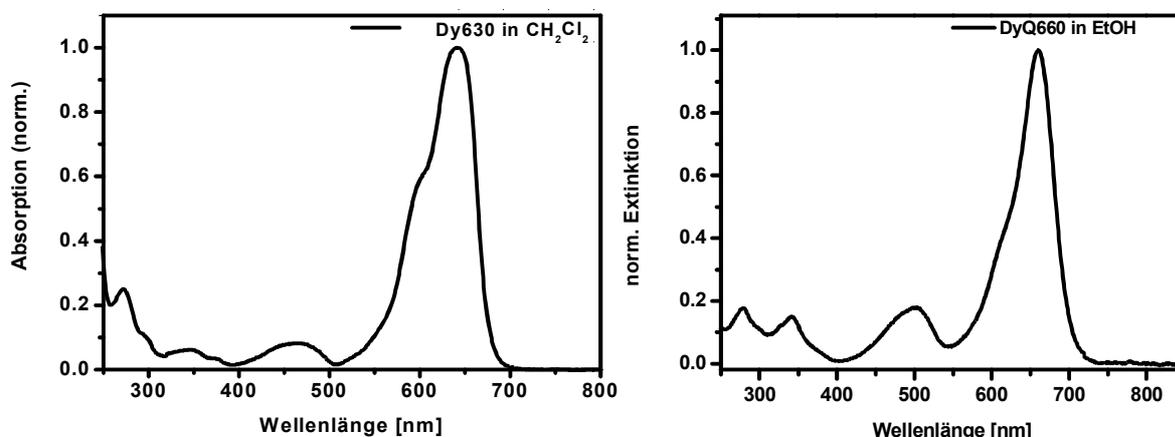


Abbildung 4.45: Absorptionsspektren von Dy630 in Dichlormethan und DyQ660 in Ethanol.

Die Fluoreszenzspektren wurden gemessen, indem die Farbstoffe bei einer Wellenlänge von 600nm angeregt wurden. Der Farbstoff DyQ660 hatte eine geringere Fluoreszenz ($\Phi=0.015^3$), war aber bei höheren Konzentrationen messbar.

Die spektroskopischen Daten der beiden Farbstoffe sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Photophysikalische Daten der Farbstoffe Dy630 und DyQ660.

| | $\lambda_{\max} \text{ (abs)}$ [nm] | $\lambda_{\max} \text{ (em)}$ [nm] | $\epsilon_{\lambda_{\max}}$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$] | $Y = \frac{\epsilon_{\lambda_{\max}}}{\epsilon_{278\text{nm}}}$ |
|---------------|--|---------------------------------------|--|---|
| Dy630 | 641 | 660 | 180000 | 0.15 |
| DyQ660 | 660 | 681 | 85000 | 0.18 |

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren verschoben sich in Abhängigkeit von ihrer Mikroumgebung. Dy630 hatte in Wasser ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 626 nm. Wurde der Farbstoff an einen Antikörper gekoppelt, verschob sich das Absorptionsmaximum um fast 10 nm. Noch stärker war die Verschiebung, wenn der Farbstoff an das Lektin Concanavalin gekoppelt war. Das Absorptionsmaximum lag bei einer Wellenlänge von 641 nm. Wurde jedoch DNA mit Dy630 markiert, wurde die maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 631 nm bestimmt. Diese Verschiebung des

³ Angabe von Dyomics GmbH, Jena

Absorptionsspektrums musste für die Entwicklung eines FRET-Nachweissystems mitberücksichtigt werden, die in die Berechnung des spektralen Überlapps von Donor- und Akzeptorfarbstoff einging und damit den Energietransfer beeinflusste. Zusammenfassend sind die Absorptions- und Emissionsmaxima in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tabelle 4.3: Verschiebung der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima von Dy630 und DyQ660 in Abhängigkeit ihrer Mikroumgebung.

| | λ_{\max} (abs) [nm] | λ_{\max} (em) [nm] |
|--|--------------------------------|-------------------------------|
| Dy630 in H₂O | 626 | 652 |
| Dy630 in CH₂Cl₂ | 641 | 660 |
| Dy630-IgG in PBS | 635 | 651 |
| Dy630-ConA in PBS | 641 | 664 |
| Dy630-DNA in H₂O | 631 | 658 |
| DyQ660 in H₂O | 653 | 678 |
| DyQ660-BSA in PBS | 667 | 688 |

Markierung von Proteinen

Der Fluoreszenzfarbstoff Dy630 wurde auf seine Eigenschaften hinsichtlich der Kopplungsfähigkeit an Proteine untersucht. Als Modellprotein wurde das Pflanzenlektin Concanavalin A gewählt. Es wurde eine verschiedene Anzahl an Farbstoffmolekülen an das Protein gekoppelt. Abbildung 4.46 zeigt das Absorptionsspektrum von ConA-Dy630, wobei auf die Y-Achse der Extinktionskoeffizient pro ConA-Dy630 Molekül aufgetragen war. Der Farbstoff hatte keine Dimere gebildet, wie es für den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 bekannt war (Schobel et al., 1999b). Die Aggregatbildung war erst bei hohen Konzentrationen von Dy630 im Spektrum zu erkennen. Ab einem Markierungsgrad von 4.6 konnte der Farbstoff nicht mehr kovalent an das Protein koppeln, sondern bildete Dimere mit dem gebundenen Farbstoff.

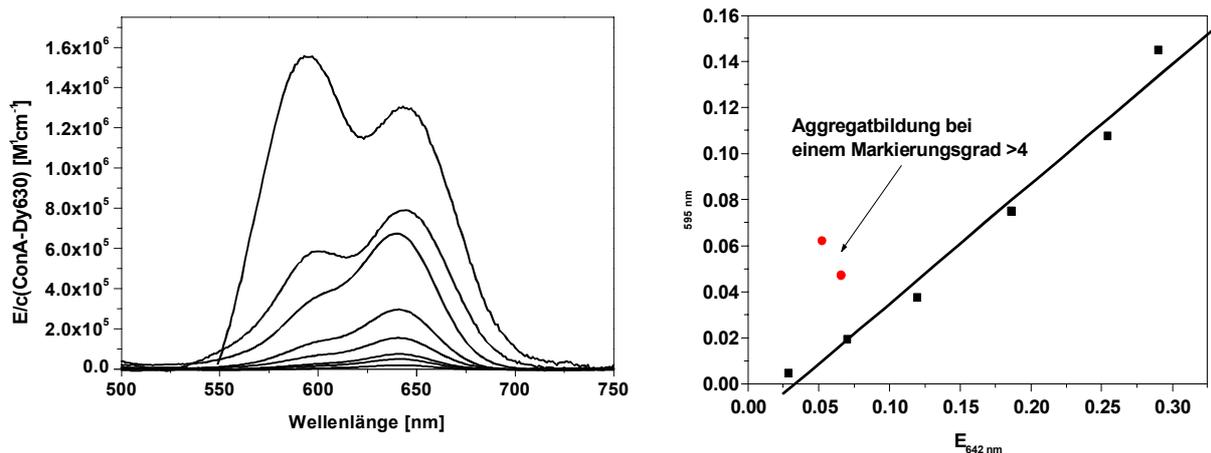


Abbildung 4.46: A.) Absorptionsspektrum von Dy630-ConA in Abhängigkeit vom Markierungsgrad. B.) EE-Diagramm zum Nachweis von Aggregatbildung des Farbstoffs Dy630 an ConA.

Dies veranschaulicht Abbildung 4.46. Es wurde die Extinktionen bei 595 nm gegen die Extinktion bei 642 nm der einzelnen Concanavalin A-Dy630-Konjugate mit verschiedenem

Markierungsgrad aufgetragen. Die beiden Extinktionen standen in einem konstanten Verhältnis zueinander, egal welche Konzentrationen bzw. Markierungsgrade man im UV-Vis-Spektrometer gemessen hatte. Dementsprechend ergab sich ein linearer Verlauf, der dem Lambert-Beerschen-Gesetz entsprach. Bei einem Markierungsgrad über 4 war das Verhältnis zwischen den Extinktionen $E_{595\text{nm}}$ und $E_{642\text{nm}}$ nicht mehr konstant. Damit konnte eine Aggregatbildung nachgewiesen werden, wenn dem Protein Concanavalin A zu hohe Konzentrationen an Dy630 zugegeben wurden.

Mit der Auftragung eines EE-Diagramms wurde eine einfache Methode aufgezeigt, wie die Dimerenbildung von Farbstoff-Protein-Konjugaten untersucht werden kann.

Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer von Dy630

Die Fluoreszenzeigenschaften von Dy630 in freier Lösung waren nicht zu vergleichen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5. Freies Dy630 in CH_2Cl_2 hatte eine Quantenausbeute von 5 %, im Gegensatz dazu lag die Quantenausbeute von Cy5 bei 27%. Die Quantenausbeute von Dy630 wurde auch mit verschiedenen Proteinkonjugaten untersucht. An Concanavalin A gekoppeltes Dy630 hatte eine Quantenausbeute von 12%, dagegen wurde eine höhere mit Antikörpern bestimmt ($\Phi=20\%$). Eine besonders hohe Quantenausbeute wurde gemessen, wenn DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dy630 markiert wurde. Hier war exakt ein Farbstoffmolekül an die DNA gekoppelt. Die Quantenausbeute lag bei 67%. Diese Angaben wurden auch durch Messungen der Fluoreszenzlebensdauer bestätigt. Die Fluoreszenzlebensdauer von Dy630 in Wasser betrug $\tau_{F1}=0.30 \pm 0.03$ ns. Die Abklingzeit verlängerte sich, wenn Dy630 an DNA gekoppelt wurde. Das Abklingverhalten wurde mit einer biexponentiellen Funktion angepasst, was die heterogene Mikroumgebung widerspiegelte. Die DNA war an den Phosphodiesterbrücken partiell negativ geladen und hydrophil, die Nukleobasen sind eher hydrophob. Der Farbstoff dagegen war sehr hydrophob, weswegen er sich eher an die Basen anlagern oder danach streben wird, möglichst weit weg von den Phosphatresten der DNA zu sein. Die bifunktionelle Anpassung brachten diese beiden Zustände zum Ausdruck. Es wurde ein $\tau_{F1}=0.90 \pm 0.06$ ns und $\tau_{F2}=2.81 \pm 0.01$ ns gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Czerney et al. 2001 publiziert.

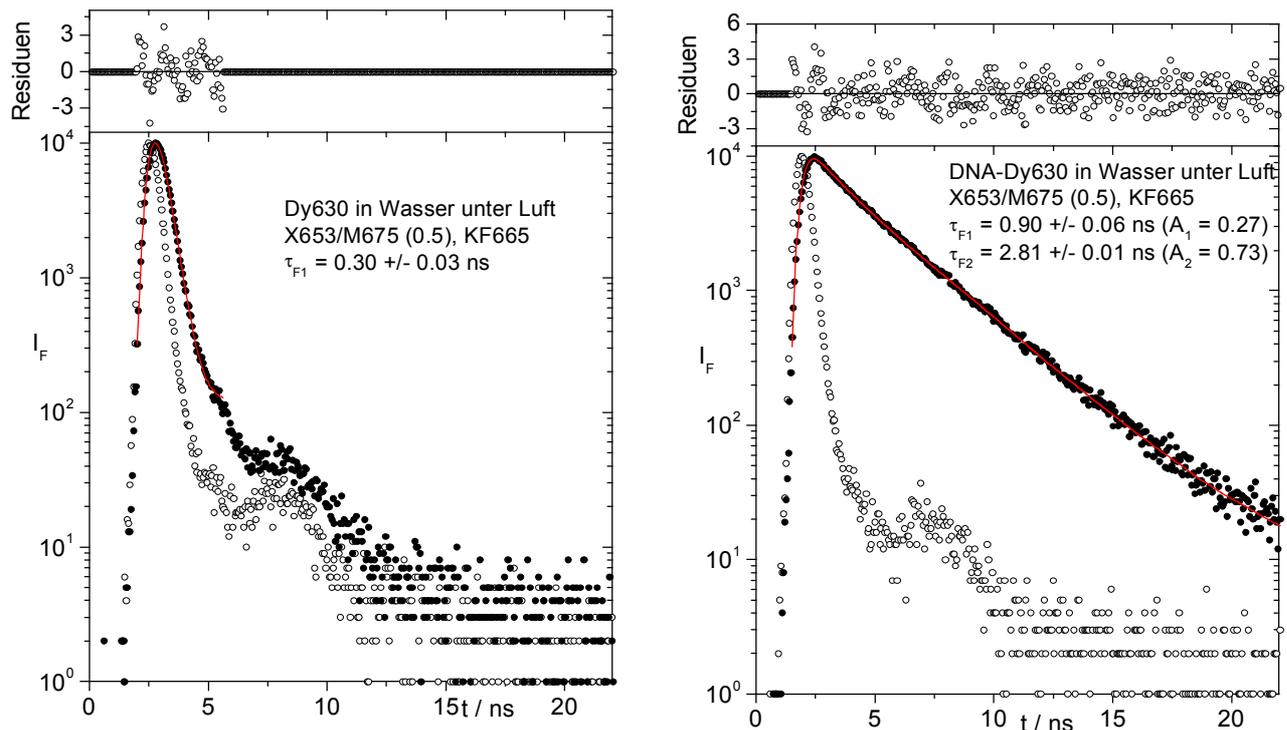


Abbildung 4.47: Fluoreszenzlebensdauermessungen von Dy630 in Wasser und von Dy630 gekoppelt an DNA.

Bestimmung des Försterradius R_0

Für die DNA-Sonde wurde als Donorfarbstoff Dy630 verwendet und DyQ660 als nichtfluoreszierender Akzeptor. Wie in Abbildung 4.44 zu sehen ist, weist dieses Förster Paar einen optimalen spektralen Überlapp zwischen der Donorfluoreszenz und der Absorption des Akzeptors. Das Absorptionsspektrum von DyQ660 deckte das Fluoreszenzspektrum von Dy630 vollständig ab. Die Fluoreszenz von DyQ660 war vernachlässigbar, sollte also beim strahlungslosen Energietransfer die Detektion von Dy630 nicht stören.

Der spektrale Überlapp erstreckte sich zwischen 620 und 710 nm. Der Försterabstand R_0 berechnet sich nach Gleichung 57 mit der Quantenausbeute $\Phi=0.67$, dem Brechungsindex von 1.33, dem angenommenen Orientierungsfaktor $\kappa^2=2/3$ und einem Extinktionskoeffizienten von DyQ660 $\epsilon(\lambda_{\max}=680\text{nm})=85000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zu $R_0=6.8 \text{ nm}$.

Schlussfolgerungen:

- Der langwellige Fluoreszenzfarbstoff Dy630 eignete sich zur Markierung von Biomolekülen.
- Besonders hohe Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer wurden gemessen, wenn Dy630 an DNA-Moleküle gekoppelt wurde.
- Über ein EE-Diagramm ließ sich die Aggregatbildung von Dy630 in Proteinen untersuchen.
- DyQ660 eignete sich als Akzeptorfarbstoff. Der Försterradius R_0 wurde zwischen IgG-Dy630 und BSA-DyQ660 mit 6.8 nm berechnet.

4.4.2 Untersuchung verschiedener FRET-Paarungen

In den Arbeiten von Schobel et al. (1999b) wurde mit FRET-Paar Cy5 und Cy5.5 erfolgreich gearbeitet. In Titrationsexperimenten wurde zu Anti-Atrazin IgG-Cy5.5 so viel ACA-BSA-Cy5.5 zugegeben, bis das Fluoreszenzsignal des Donors maximal gelöscht war. Es war aber auch zu erkennen, dass die Fluoreszenz des Donors und des Akzeptors nicht optimal getrennt waren, wodurch bei Übertitrierung des Akzeptors Cy5.5 das Fluoreszenzsignal wieder anstieg, obwohl eine maximale Fluoreszenzlöschung vorlag. Eine gute Trennung beider Fluoreszenzsignale ist insbesondere in Fluoreszenzreadern von Bedeutung (Bioscan, MTP-Fluoreszenzlesegeräte), bei denen die Fluoreszenz nicht wellenlängenaufgelöst detektiert wird, sondern mittels Filter die Anregungswellenlänge und die Emissionswellenlängen des Akzeptors ausgeblendet werden.

Die Charakterisierungen des Fluoreszenzfarbstoffs Dy630 und des Chomophors DyQ660 zeigten, dass die Farbstoffe das FRET-Paar Cy5 und Cy5.5 ersetzen könnten. Da Dy630 sein Emissionsmaximum bei 650 nm hat, sollte die Fluoreszenz von Donor und Akzeptor besser spektral getrennt werden können. Abbildung 4.48 zeigt eine Titration von Anti-Atrazin IgG-Cy5 und ACA-BSA-Cy5.5. Die Signaldynamik, welche als Verhältnis zwischen der höchsten Fluoreszenzintensität ohne ACA-BSA-Cy5.5 und niedrigster Fluoreszenz bei maximaler Fluoreszenzlöschung angegeben wurde, lag bei 68%.

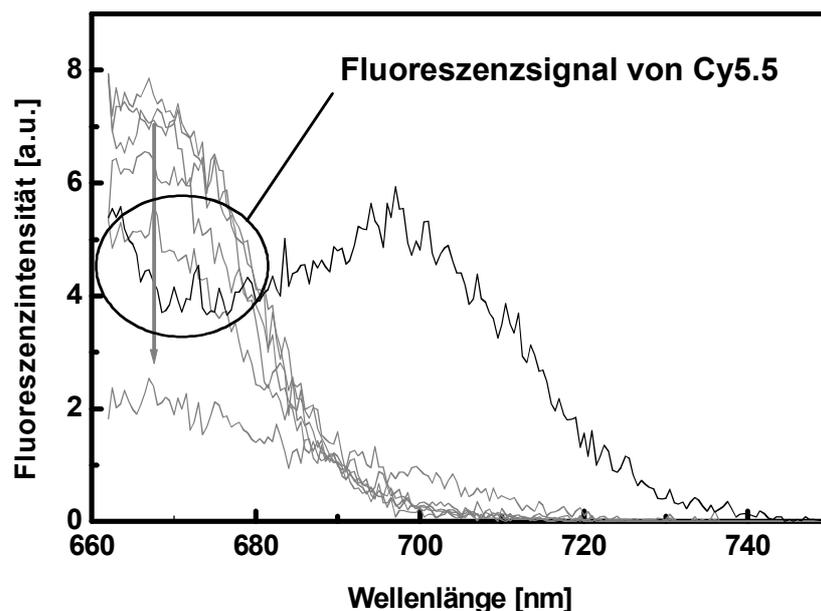


Abbildung 4.48: Titrationskurve von Anti-Atrazin IgG-Cy5 (MG 1:3.7) gegen zunehmende Konzentrationen an ACA-BSA-Cy5.5 (MG 3.6:1:1.6).

Der Fluoreszenzfarbstoff Dy630 könnte als Ersatz für Cy5 dienen, dessen Fluoreszenzspektrum etwas in Richtung kürzerer Wellenlänge verschoben war. Eine andere Möglichkeit war die Verwendung des nichtfluoreszierenden Farbstoffes DyQ660 als Akzeptor, der die Detektion des Donors nicht beeinträchtigte.

Titration von ACA-BSA-Cy5.5 zu IgG-Dy630

Abbildung 4.49 zeigt eine Titration, wobei Dy630 statt Cy5 als Donorfarbstoff eingesetzt wurde. Ansonsten wurden wie oben beschrieben zu einer konstanten Konzentration IgG-Dy630 verschiedene Konzentrationen an ACA-BSA-Cy5.5 hinzu gegeben.

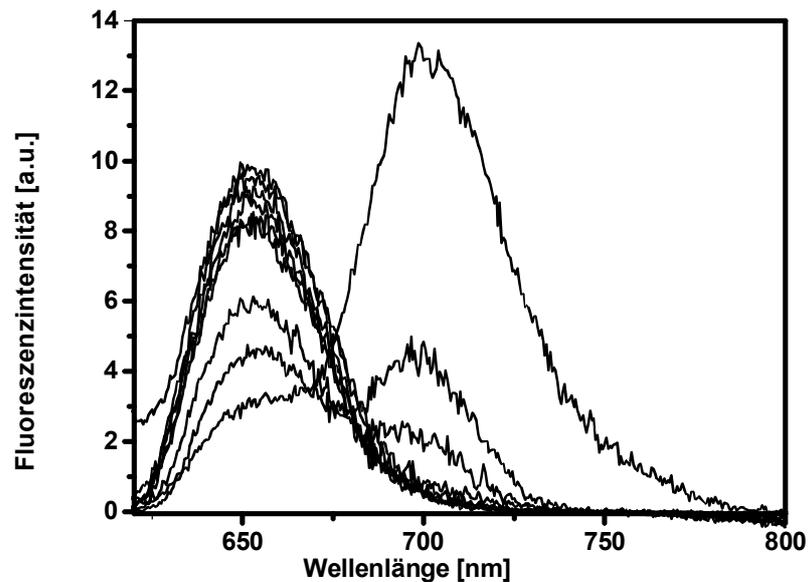


Abbildung 4.49: Titrationskurve von Anti-Atrazin IgG-Dy630 (MG 1:1.3) gegen zunehmende Konzentrationen an ACA-BSA-Cy5.5 (MG 3.6:1:1.6).

Zu erkennen war eine bessere spektrale Trennung der Donor- und der Akzeptorfluoreszenz. Die Signaldynamik betrug 67 %, was bedeutete, dass der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gut durch den Farbstoff Dy630 ausgetauscht werden konnte.

Titration von HA-BSA-DyQ660 zu IgG-Cy5

Wie in Abb. 4.50 zu sehen ist, deckt der Farbstoff DyQ660 das Fluoreszenzspektrum von Cy5 vollständig ab.

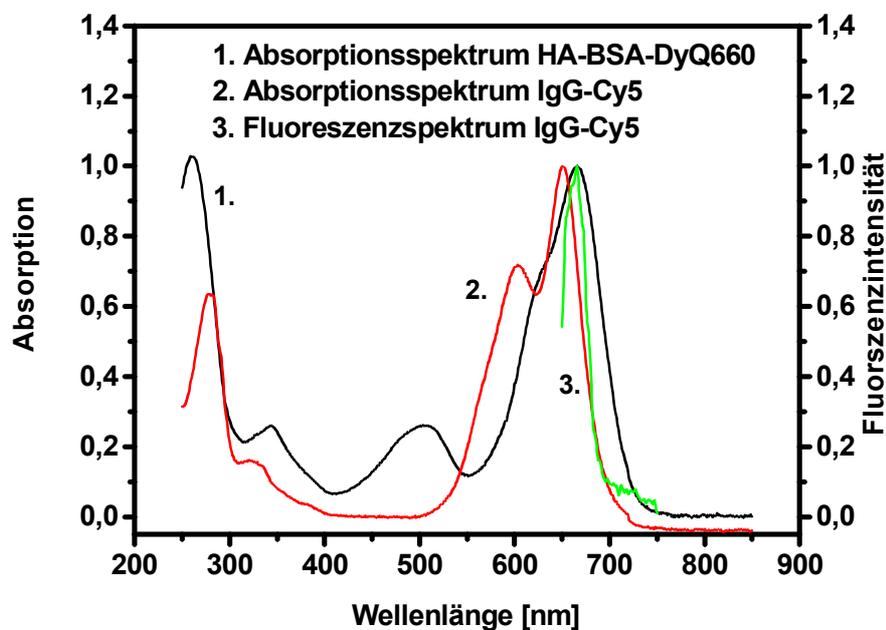


Abbildung 4.50: Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum von Anti-Histamin IgG-Cy5 und Absorptionsspektrum von des Histaminderivats HA-GA-BSA-DyQ660.

Der Extinktionskoeffizient von DyQ660 liegt bei $85000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und ist damit viel niedriger als

Cy5.5. Mit einem Testsystem wurde die Signaldynamik untersucht, wenn statt des Cyaninfarbstoff Cy5.5 ein Farbstoff mit niedrigerem Extinktionskoeffizienten eingesetzt wurde. Als Testsystem wurde ein markierter Anti-Histamin Antikörper IgG-Cy5 verwendet, zu dem der Bindungspartner DyQ660-BSA-GA-Histamin titriert wurde. Die Abstände zwischen Antikörper und dem BSA-Konjugat waren ungefähr dieselben wie im Testsystem IgG-Cy5 und ACA-BSA-Cy5.5. Abbildung 4.51 zeigt die Titrationskurve, bei der der nichtfluoreszierende Akzeptorfarbstoff DyQ660 eingesetzt wurde.

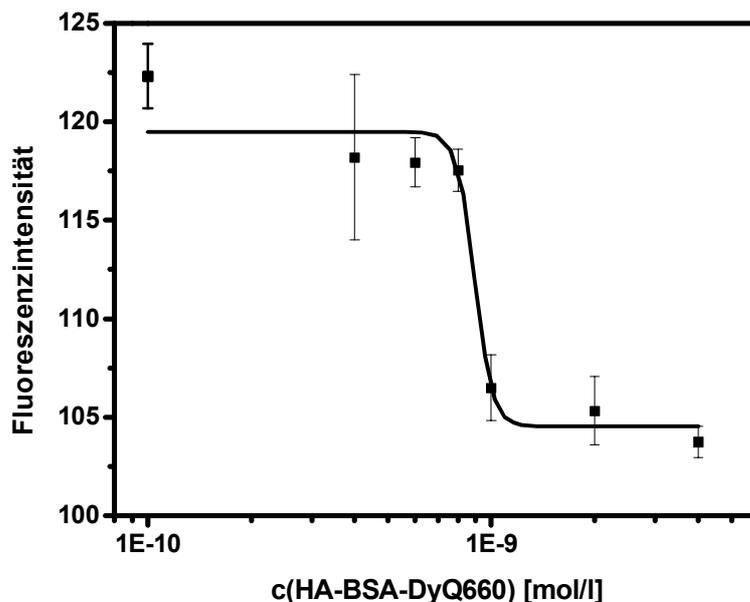


Abbildung 4.51: Titrationskurve von Anti-Histamin IgG-Cy5 (MG 1:3.7) gegen zunehmende Konzentrationen an HA-BSA-DyQ660 (n=3).

Die Signaldynamik lag bei 15%. Dieses Ergebnis zeigte in Übereinstimmung mit den theoretischen Überlegungen, dass für die Wahl eines Akzeptorfarbstoffes der Extinktionskoeffizient eine große Rolle spielt. Bei Übertitrierung von HA-BSA-DyQ660 war das Fluoreszenzsignal konstant.

Titration von IgG-Cy5.5 zu ConA-Dy630

In einem weiteren Experiment wurde ein Bindungspartner ausgetauscht. Es wurde die spezifische Bindung des Lektins Concanavalin A (ConA) an die Mannosereste von Immunglobulin G über FRET nachgewiesen, indem die Signaldynamik eines Titrations-experiments bestimmt wurde.

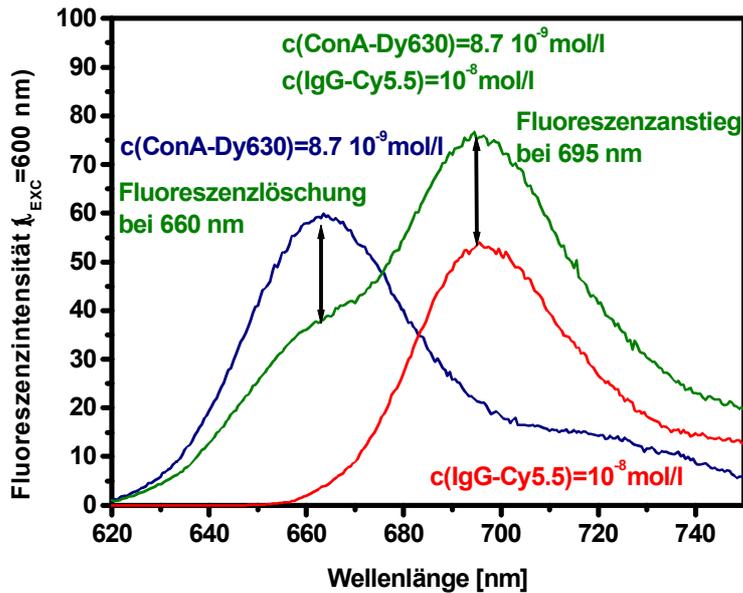


Abbildung 4.52: Nachweis der Mannoseresten an Polyklonalen Antikörper über die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen ConA und IgG im FRET (Donor: Dy630, Akzeptor Cy5.5).

Die maximale Fluoreszenzlöschung wurde für ein Verhältnis zwischen ConA und IgG bei etwa 1:1 erreicht. Die Signaldynamik in diesem Testsystem betrug 37%. ConA lag bei einem pH-Wert von 7.4 als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 104000 Da vor. Damit war das Protein fast doppelt so groß wie BSA. Die Transfereffizienz zwischen Donor und Akzeptor ist stark abstandsabhängig, und demnach war im Vergleich zu dem Testsystem IgG und ACA-BSA die Signaldynamik geringer.

DNA-FRET-Sonde

Für den in Kapitel 4.5. beschriebenen 3'-Exonuklease-Assay wurde eine passende DNA-FRET-Sonde hergestellt. Diese Sonde war bei 635 nm anregbar. Die Fluoreszenz war aber gelöscht, weil das andere Ende der DNA mit einem Akzeptorfarbstoff markiert war. Es wurden verschiedene Akzeptoren über Titrationsexperimente untersucht. Es wurde DNA vorgelegt, die am 5'-Ende mit Dy630 markiert war. Verschiedene Konzentrationen an komplementärer DNA, die am 5'-Ende mit dem Akzeptorfarbstoff markiert war, wurde zugemischt. Wenn die beiden Stränge hybridisierten, kam es zu einem strahlungslosen Energietransfer und damit verbunden zu einer Fluoreszenzlöschung. Als Akzeptorfarbstoff wurde DyQ660 eingesetzt, es war aber wiederum nur eine Fluoreszenzsenkung um 15% zu erkennen. Ein geeigneter Akzeptorfarbstoff war der Fluoreszenzfarbstoff Dy675, der eine Fluoreszenzlöschung von 67% erreichte.

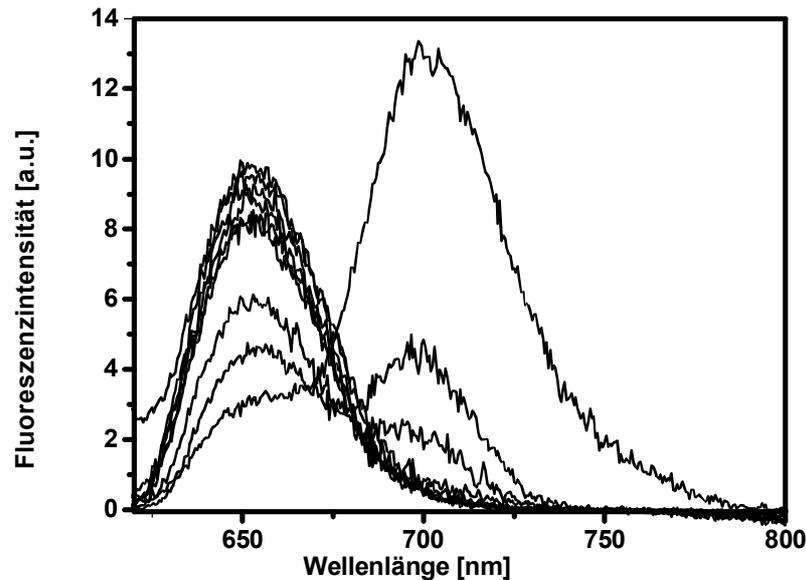


Abbildung 4.53: Titrationskurve von DNA-Dy630 (MG 1:1) gegen zunehmende Konzentrationen an komplementärer DNA-Dy675 (MG 1:1).

Schlussfolgerungen

- In einem FRET Nachweisverfahren mit dem Donorfarbstoff Cy5 und dem Akzeptor Cy5.5 konnte der Donor durch Dy630 ohne Verlust an Signaldynamik ersetzt werden.
- Der geringere Extinktionskoeffizient von DyQ660 führte beim Austausch des Akzeptors zu einer geringeren Signaldynamik. Dafür war keine Fluoreszenz des Akzeptors im Emissionswellenlängenbereich des Donors zu erkennen.
- Mit dem FRET-Paar Dy630 und Dy5.5 konnten Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden.
- Eine geeignete DNA-FRET-Sonde wurde durch Titrationsexperimente gefunden. Eine DNA-FRET-Sonde konnte synthetisiert werden, an die am 3'-Ende ein Amino und am 5-Ende ein Thiollinker synthetisiert wurden. Die Doppelmarkierung erfolgte, indem der Donorfarbstoff (Dy630) über Maleimid und der Akzeptorfarbstoff (Dy675) über den NHS-Aktivester an die DNA gekoppelt werden.

4.4.3 Zusammenfassende Diskussion

Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff Dy630 charakterisiert. Dieser Farbstoff konnte im langwelligen Bereich oberhalb 600 nm angeregt werden und war somit für HeNe-Laser oder Halbleiterdiodenlaser, die Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm erzeugen, kompatibel. Er eignet sich zur Kopplung an Biomoleküle wie Proteine oder DNA. Eine besonders hohe Quantenausbeute wurde bei DNA-Molekülen festgestellt. Sie lag mit $\Phi=68\%$ sogar höher als beim Fluoreszenzfarbstoff Cy5. Es wurde in verschiedenen Titrationsstudien die Signaldynamik von FRET-Ereignissen durch biomolekulare Wechselwirkungen untersucht. Der Donorfarbstoff Cy5 konnte im FRET System Cy5/Cy5.5 durch den Fluoreszenzfarbstoff Dy630 ersetzt werden. Bei bestimmten Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie das Modellsystem Concanavalin A-Mannose-IgG, konnte nur ein strahlungsloser Energietransfer nachgewiesen werden, wenn Dy630 als Donorfarbstoff eingesetzt wurde. An eine Stelle in der Bindungstasche von ConA wurde Cy5 gekoppelt, so dass die Mannosereste nicht mehr erkannt wurden.

Der Wechsel zu einem nichtfluoreszierenden Akzeptorfarbstoff erwies sich als ineffektiv im Vergleich zu dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5. Ein Grund war der geringe Extinktionskoeffizient von DyQ660.

Als geeigneten Ersatz für Cy5.5 wurde der Akzeptorfarbstoff Dy675 gefunden, der in Titrationsexperimenten die Fluoreszenz von Dy630-DNA um 67% senkte. Somit wurde eine geeignete FRET-DNA-Sonde gefunden, die am 3'-Ende mit Dy630 und am 5'-Ende mit Dy675 markiert werden kann.

4.5 Der 3'-Exonuklease-Assay

Der 3'-Nuklease-Assay ist ein nicht-kompetitives heterogenes Fluoreszenz-Nachweisverfahren in Nanotiterkavitäten zur Detektion unmarkierter DNA. Das Fluoreszenzsignal wird erzeugt, indem enzymatisch eine immobilisierte FRET-DNA-Sonde geschnitten wird, wenn zuvor eine spezifische Hybridisierungsreaktion erfolgt ist (Lu et al., 2002). Es wurde die Exonuklease III eingesetzt, die doppelstrangspezifisch ist und am 3'-Ende glatte oder am 5'-Ende überhängende Enden besitzt. Im ungeschnittenen Zustand ist die Fluoreszenz der DNA-Sonde durch den strahlungslosen Energietransfer gelöscht, wenn der Akzeptor im geeigneten Abstand zum fluoreszierenden Donorfarbstoff an die DNA-Sonde gekoppelt ist. Als Akzeptor können sowohl Farbstoffe als auch Edelmetalloberflächen wie z.B. Gold dienen. Durch die enzymatische Nuklease-Reaktion an der Oberfläche wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, indem es zu einer räumlichen Trennung von Donor und Akzeptor kommt (siehe Abb.4.54):

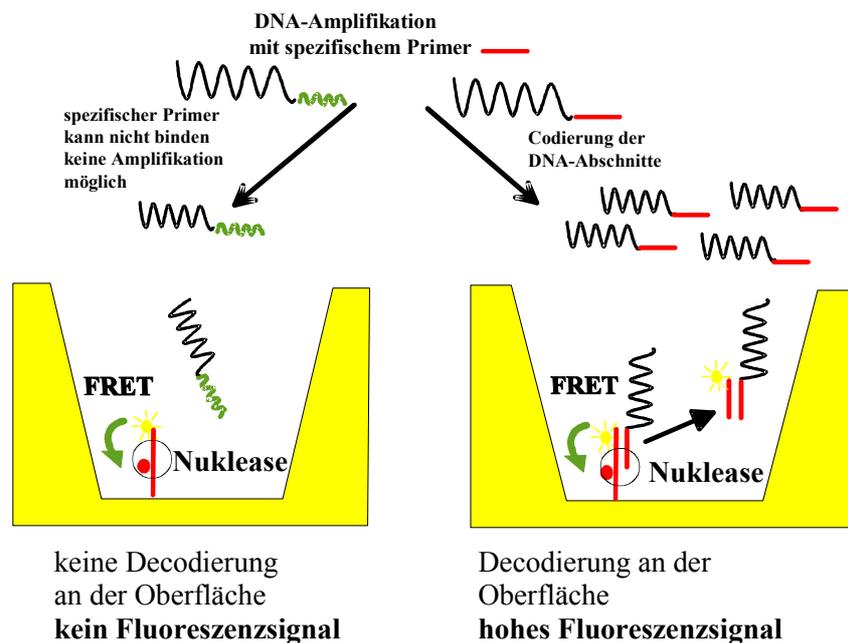


Abbildung 4.54: Prinzip des 3'-Exonuklease-Assays in der Nanotiterplatte. Unmarkierte mit PCR amplifizierte DNA kann über eine immobilisierte FRET-Sonde nachgewiesen werden, indem der spezifische Doppelstrang von einer 3'-Exonuklease erkannt wird und dadurch den Energietransfer an der Oberfläche aufhebt.

Der Nuklease-Assay eignet sich zur Quantifizierung von DNA-Fragmente, die zuvor mittels einer PCR-Reaktion amplifiziert wurden. Über spezifische Primer werden die DNA-Analyte

codiert. Nach dem Transfer in die Nanotiterplatte erfolgt die Decodierung an den komplementären DNA-Sonden.

4.5.1 Untersuchung des Exonuklease-Assays in MTP-Format

Der quantitative Nachweis unmarkierter DNA über eine enzymatische Reaktion an der Oberfläche wurde als erstes im Mikrotiterplattenformat untersucht. Dazu wurde Cy5 markierte DNA über Biotin an die Kavitätenoberfläche immobilisiert, die mit Streptavidin belegt war. Es wurden Streptavidin-MTPs mit einer Belegungsdichte von 20 pmol/Kavität DNA verwendet. Die Immobilisierung erfolgte durch eine Affinitätsreaktion zwischen Biotin und Streptavidin, deren Affinitätskonstante mit 10^{15} l/mol so hoch war, dass man fast von einer kovalenten Bindung sprechen konnte. Die DNA-Sonde war am 5'-Ende biotinyliert und das 3'-Ende mit Cy5 markiert. Nach einem Inkubationsschritt wurden die überschüssige DNA entfernt und die Kavitäten mehrmals gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der komplementäre DNA-Strang mit zunehmender Konzentration zugegeben. Nach einem Inkubationsschritt wurden die Kavitäten erneut intensiv gewaschen und anschließend wurde die Exonuklease Exo III in alle Kavitäten zugegeben. Die Fluoreszenzintensitäten wurden nach einer halben Stunde aufgenommen, indem der Überstand in eine Fluoreszenz-MTP transferiert wurde.

Abbildung 4.55a zeigt eine Kalibrierkurve des Exonuklease-Assays in der MTP. Im Puffer waren Magnesium-Ionen enthalten, die für die Enzymaktivität von Bedeutung waren. In Abbildung 4.55b sieht man eine Kalibrierkurve, bei der alle Schritte identisch mit Abb. 4.55a waren, außer beim Nuklease-Puffer, der keine Magnesium-Ionen enthielt.

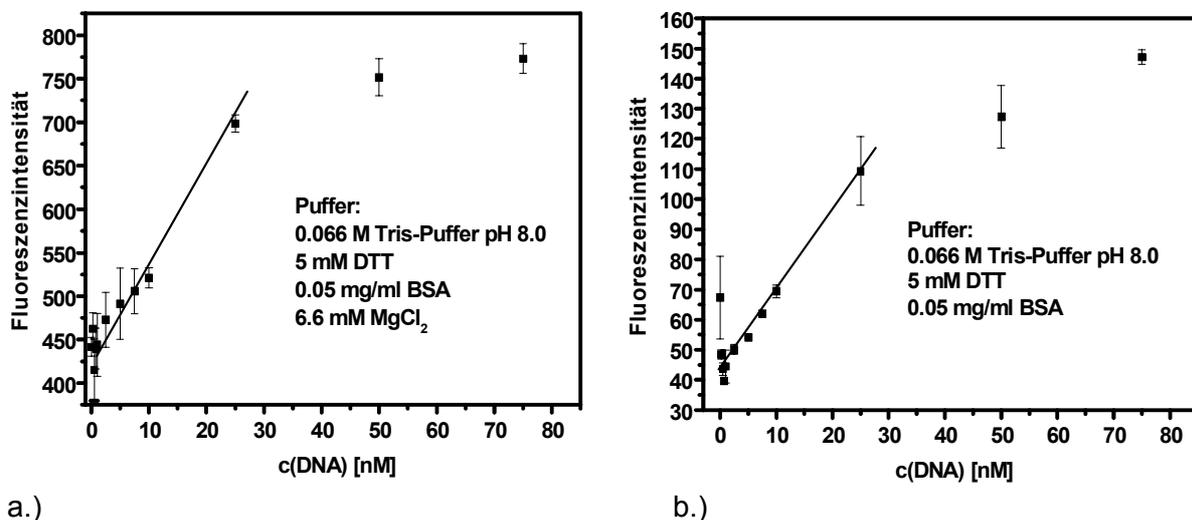


Abbildung 4.55: 3'-Exonuklease-Assay in der MTP a.) mit MgCl₂ im Puffer b.) ohne MgCl₂ (n=3).

Eine unmarkierte komplementäre DNA wurde im Nuklease-Assay quantitativ nachgewiesen. Zu erkennen war ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenz. In dem nicht-kompetitiven Assayformat verlief die enzymatische Reaktion bei geringer Substratkonzentration direkt proportional zur eingesetzten DNA-Konzentration. Bei hohen Konzentrationen kommt es zu einem Sättigungsverhalten, weil die Belegungsdichte der immobilisierten Sonden-DNA die Substratkonzentration an der Oberfläche limitierte. Das viel geringere Fluoreszenzsignal bei gleicher Substratkonzentration im Nuklease-Puffer ohne

Magnesium-Ionen, zeigte dass die Magnesium-Ionen die Aktivität der Exo III signifikant beeinflussten. Die Nachweisgrenze im Exonuklease-Assay lag bei einer DNA Konzentration von 5 nM, wenn man den Exonuklease-Puffer mit Magnesium

In beide Kalibrierkurven konnte keine Abhängigkeit nach Langmuir festgestellt werden. Dies lag an der Kavitätshöhe. Der Massentransport der Nuklease an die Oberfläche ist der Enzymkinetik an der Oberfläche überlagert, so dass das Sättigungsverhalten bei geringen Fluoreszenzintensitäten auftrat.

-Ionen verwendet. Die Standardabweichungen waren mit 10 % verhältnismäßig hoch. Die Standardabweichungen für den Nuklease-Assay mit einem Puffer ohne Magnesium-Ionen waren sehr viel geringer. Die lagen bei 3 %, so dass die Nachweisgrenze für die unmarkierte DNA bei 1 nM lag.

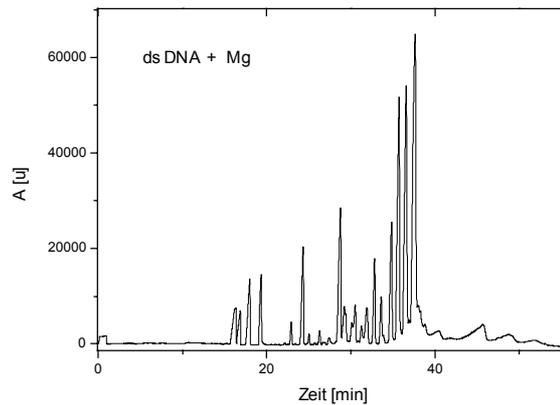
Schlussfolgerungen

- Im MTP-Format wurde DNA über die Streptavidin-Biotin-Bindung immobilisiert.
- Die physikalische Trennung zwischen fragmentierter fluoreszenzhaltiger DNA und oberflächengebundener DNA durch Transfer der homogenen Phase in eine Fluoreszenz-MTP war eine effektive Methode für den Nuklease-Assay im MTP-Format.
- Mit der Exonuklease III konnte unmarkierte DNA konzentrationsabhängig nachgewiesen werden.
- Der Fluoreszenzfarbstoff an der DNA-Sonde störte die Exonuklease III nicht, so dass das Enzym für den heterogenen Exonuklease-Assay eingesetzt werden konnte.
- Magnesium-Ionen waren wichtig für die Aktivität des Enzyms.
- Die Fluoreszenz der Nullprobe, bei der nur Einzelstränge vorlagen, lag höher als bei den Proben mit einer sehr niedrigen DNA-Konzentration (0.5 nM DNA).

4.5.2 Untersuchung der enzymatischen Reaktion im CGE-Experiment

Zur genaueren Charakterisierung der Fragmentierung von einzel- und doppelsträngiger DNA mit der Exonuklease III wurden die DNA-Fragmente mit einer Kapillargelelektrophorese untersucht. Dazu ließ man das Enzym sowohl mit doppelsträngiger als auch mit einzelsträngiger DNA in einem 1mL-Reaktionsgefäß reagieren. Die Reaktion wurde mit EDTA abgestoppt, das die Magnesium-Ionen komplexierte. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit der Kapillargelelektrophorese längenabhängig aufgetrennt. Abbildung 4.56a zeigt, dass die Exonuklease III spezifisch den Doppelstrang in verschieden lange Fragmente zerschneidet. In Abbildung 4.56b ist zu erkennen, dass die Exo III eine Base der DNA entfernt, wenn ein Einzelstrang vorlag. Dieses Resultat entsprach der Kalibrierkurve im Exonuklease-Assay in Abbildung 4.55 bei sehr geringer Substratkonzentration. Die Nullprobe ohne Substrat lieferte ein größeres Fluoreszenzsignal als bei einer DNA-Konzentration von 0.5 nM. Es konnte angenommen werden, dass die Exonuklease III das 3'-Ende eines DNA-Strangs zunächst erkennt und daran bindet, ohne zwischen Einzel- und Doppelstrang unterscheiden zu können. Bei diesem Erkennungsschritt kann das Enzym einzelne Basen hydrolytisch entfernen, dissoziiert aber auch wieder sehr schnell vom Einzelstrang.

A.)



B.)

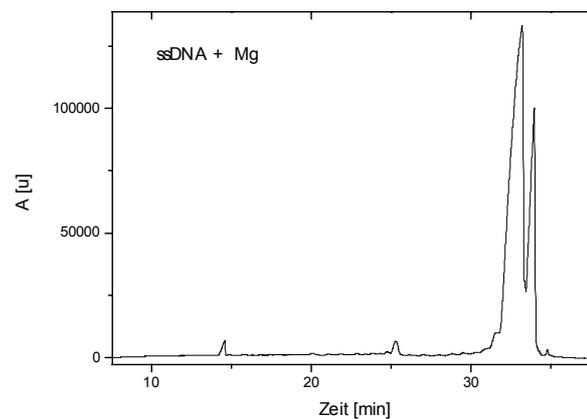
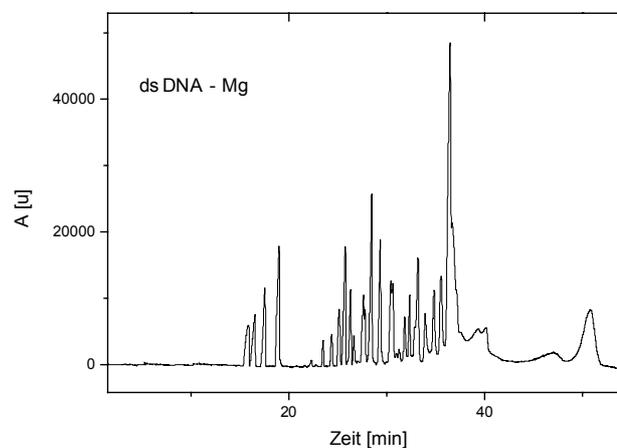


Abbildung 4.56: Durch Exonuklease III fragmentierte DNA im CGE-Experimente a.) Doppelstrang b.) Einzelstrang.

In einem zweiten Experiment wurde die Enzymreaktion in einem Puffer ohne Magnesium-Ionen (-Mg) durchgeführt. Ansonsten wurden dieselben Bedingungen gewählt. In Abbildung 4.57 ist zu sehen, dass die Magnesium-Ionen auf die Enzymaktivität Einfluss nehmen, indem pro Zeiteinheit mehr Substrat umgesetzt wurde. Ein kleiner Teil der doppelsträngigen DNA war noch nicht umgesetzt.

A.)



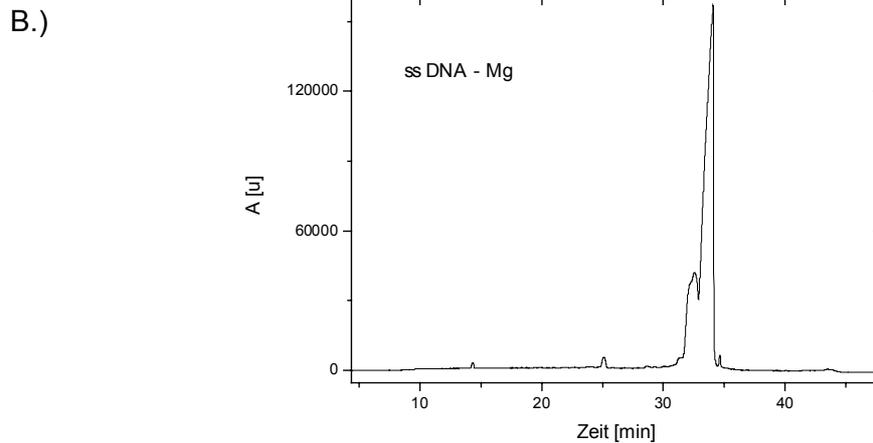


Abbildung 4.57: Durch Exonuklease III (ExoIII-Puffer ohne Mg^{2+}) fragmentierte DNA im CGE-Experimente a.) Doppelstrang b.) Einzelstrang.

Im Einzelstrang-Experiment waren zwei Peaks zu erkennen, wobei der kleinere Peak das DNA-Fragment war, bei dem eine Base enzymatisch entfernt war. Die Magnesium-Ionen beeinflussten die Affinitätsbindung zwischen 3'-Ende und der Exonuklease. Die Bindung der Nuklease am Einzelstrang verläuft nur kurzzeitig, so dass der hydrolytische Schritt nur bei wenigen Molekülen auftrat.

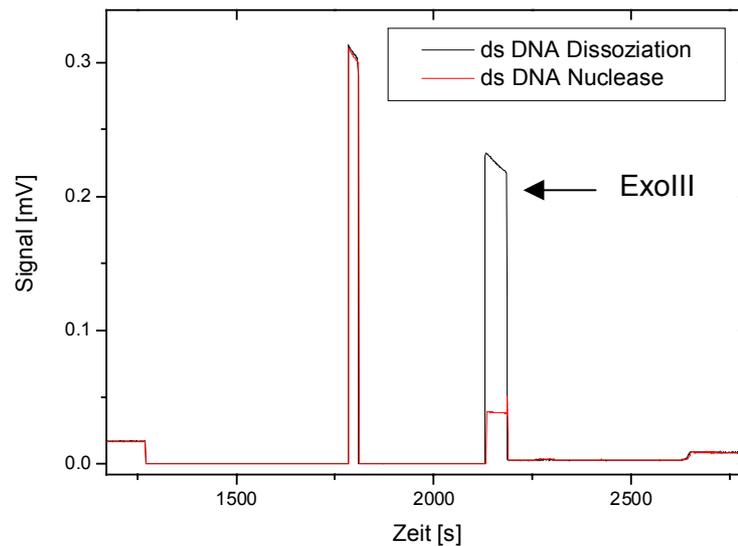
Schlussfolgerungen

- Die Exonuklease III hat spezifisch doppelsträngige DNA geschnitten.
- Bei Einzelsträngen wurde die erste Base enzymatisch hydrolysiert.
- Durch Verwendung eines magnesiumfreien Puffers konnte die Hydrolyse einzelner Nucleobasen im Einzelstrang minimiert werden.

4.5.3 Untersuchung der Exonuklease III auf einem Biosensor

Das hydrolytische Schneiden der Exonuklease III an einer Oberfläche, an der doppelsträngige DNA immobilisiert war, wurde mit einem Biosensor untersucht. Es wurde eine RfS-TIRF-Kopplung vorgenommen, indem ein Laser in einen TIRF-Transducer eingekoppelt wurde und an einer freien Stelle des Transducer ein Interferenzspektrum aufgenommen wurden (Reder, 2003). Auf den Transducer wurde zunächst PNA immobilisiert, an die überlappend ein DNA-Strang (rranti8449) hybridisierte. In einem weiteren Schritt wurde ein komplementärer DNA-Strang (antiras8449) über die Oberfläche geleitet, der am 3'-Ende mit Cy5.5 markiert war. Würde nur DNA auf die Oberfläche immobilisiert, so müsste man für jedes Nuklease-Experiment einen neuen Transducer verwenden. Es wurde mit dem PNA-System eine regenerierbare Oberfläche erzeugt, bei der die DNA-Oligonukleotide wieder entfernt werden konnten (Kröger, 2003). Mit der RfS-TIRF-Kopplung wurde sowohl die Abnahme der Fluoreszenzintensität an der Oberfläche detektiert, wenn die Exonuklease III einen Doppelstrang an der Oberfläche erkannt hat, als auch das zeitaufgelöste Binde- und Schneideereignis mit RfS. Abbildung 4.58 zeigt das RfS-TIRF-Ergebnis.

A.) TIRF:



B.) RfS:

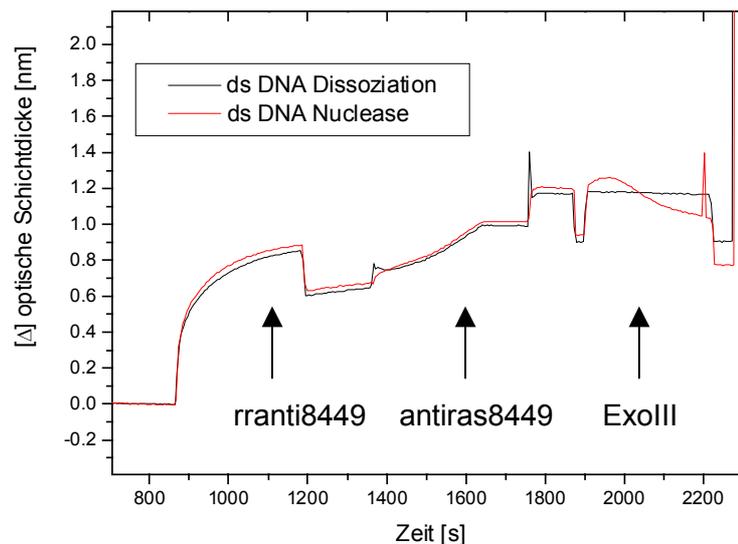


Abbildung 4.58: Parallele Untersuchung der Exonuklease-Aktivität der doppelsträngigen DNA an der Oberfläche mit der RfS-TIRF-Kopplung. Als Kontrollexperiment wurde über die Oberfläche Puffer geleitet (ds DNA-Dissoziation) A.) Abnahme des Fluoreszenzsignals im TIRF-Experiment. B.) Abnahme der optische Schichtdickenänderung bei Zugabe von Exo III im RfS-Experiment.

Nach der immobilisierung der komplementären DNA auf die Oberfläche, wurden hintereinander zwei Experimente auf dem Biosensor durchgeführt. Zuerst wurde nur Puffer über die Oberfläche geleitet, um die Dissoziation zu beobachten. Nachfolgend wurde die Exonuklease III verwendet.

Im TIRF-Experiment war eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen, wenn die Nuklease über die Oberfläche geleitet wurde. Pro Experiment sind zwei Signale zu erkennen. Das erste Signal entsprach der Hybridisierung der markierten DNA, danach folgte

die Zugabe der Nuklease und somit die Fragmentierung des Doppelstrangs. In den Abbildungen 4.58a und b sind jeweils zwei Kurven zu sehen. Die obere Kurve (dsDNA Dissoziation) war eine Referenzmessung, bei der keine Nuklease zugegeben wurde. Im TIRF-Experiment war zu erkennen, dass ein Teil der DNA wieder abdissoziierte, weswegen es zu einem Absinken der Fluoreszenz kam. Das Signal war aber dennoch viel höher als bei der unteren Kurve. Hier wurde die Nuklease zugegeben, wodurch die Fluoreszenz auf 20 % des Fluoreszenzsignals absank.

Im RlFS-Experiment konnte durch die Beobachtung der zeitaufgelösten optischen Schichtdickenänderung das Experiment Schritt für Schritt verfolgt werden. Als erstes wurde die Anlagerung der DNA (rranti8449), die als Verbindungsstück zwischen PNA und fluoreszenzmarkierter DNA eingesetzt wurde, detektiert und danach das Hybridisieren der zweiten komplementären DNA (antiras8449). Nach Zugabe der Exonuklease III nahm die optische Schichtdicke zunächst zu. Es konnte somit die Anlagerung der Exo III an die Oberfläche beobachtet werden. Im Folgenden nahm die optische Schichtdickenänderung wieder ab, da die enzymatische Fragmentierung der doppelsträngigen DNA eine Reduktion der Schichtdicke bewirkte.

Schlussfolgerungen

- Die RlFS-TIRF-Kopplung eignete sich zur direkten Beobachtungen des Schneideverhaltens der Exonuklease III an der Oberfläche.
- Mit TIRF ergab sich eine einzige starke Signaländerung, wo hingegen mit RlFS alle drei Reaktionsschritte verfolgt werden konnte.
- PNA-Oberflächen ermöglichen regenerierbare Transducer zur Untersuchung enzymatischer Hydrolysereaktionen von Oligonukleotiden.

4.5.4 3'-Exonuklease-Assay auf Gold-NTPs

Nachdem mit den Experimenten gezeigt wurde, dass die Exonuklease III spezifisch doppelsträngige DNA an der Oberfläche schneidet, wurde der heterogene 3'-Exonuklease-Assay auf die Nanotiterplatte übertragen. Im MTP-Format oder auch auf einem Biosensor wurden die geschnittenen DNA-Fragmente mechanisch durch Spülen oder durch eine Fluidik von der ungeschnittenen DNA getrennt. Diese Trennung erfolgte in der Nanotiterplatte physikochemisch, indem eine Goldoberfläche eingesetzt wurde, welche die Fluoreszenz über den strahlungslosen Energietransfer an der Oberfläche löscht. Auf die goldbeschichteten NTPs wurde eine DNA-Sonde immobilisiert, die am 3'-Ende mit Cy5 markiert war und am 5'-Ende einen Thiolinker hatte. In einem Inkubationsschritt reagierte die DNA, die in PBS-Puffer gelöst war, mit der Goldoberfläche und wurde immobilisiert. Die komplementäre DNA wurde mit zunehmender Konzentration mit Hilfe eines Mikrodosierroboters zudosiert. Nach einem 10 minütigen Inkubationsschritt wurde restliche DNA abgewaschen und anschließend die Exonuklease III zugegeben.

Abbildung 4.59 zeigt den konzentrationsabhängigen Fluoreszenzanstieg, wenn in den Nanoliterkavitäten doppelsträngige DNA von der Exonuklease III fragmentiert wird. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf die Nullprobe normiert und gegen die DNA-Konzentration aufgetragen.

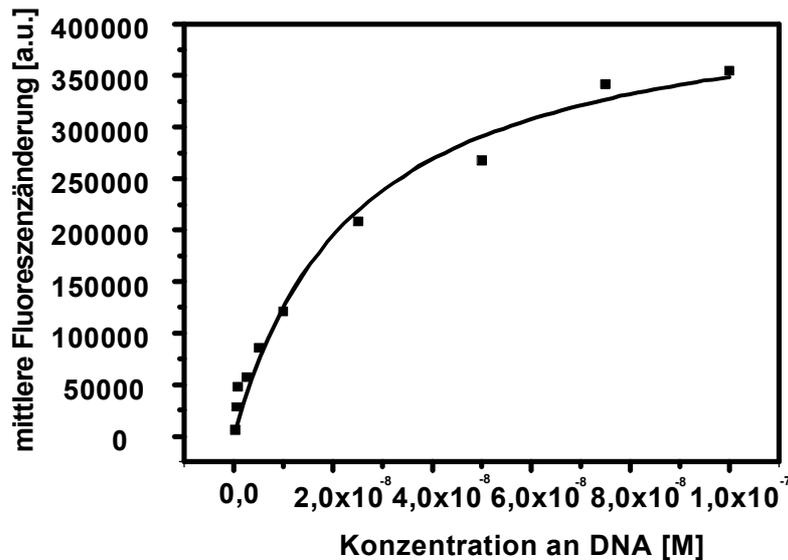


Abbildung 4.59: Nachweis unmarkierter DNA im 3'-Exonuklease-Assay auf Gold-NTPs.

Im Gegensatz zu den Experimenten in der MTP ist hier ein Kurvenverlauf nach Langmuir zu erkennen. Dies bestätigt die Massentransportsimulationen aus Kapitel 4.2.2, die voraussagten, dass in den Nanoliterkavitäten die Reaktion an der Oberfläche aufgrund der geringeren Diffusionswege zur Kavitätenoberfläche vollständig ablaufen kann. Die Konstante, welche die DNA-Konzentration bei halbmaximaler Signaländerung angab, wurde mit $K=2.5 \cdot 10^{-8}$ M bestimmt. Bei niedrigen Konzentrationen zwischen 0.25 nM und 10 nM DNA war ein linearer Verlauf zu erkennen. Oberhalb dieser Konzentration verlief die Kurve in die Sättigung, weil die Substratkonzentration an der Oberfläche limitiert war.

Es wurden keine Standardabweichungen angegeben, weil das Waschen nicht ausreichte, um die ungebundenen fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden in den einzelnen Kavitäten gleichmäßig zu entfernen. Mit diesem Experiment wurde prinzipiell gezeigt, dass der 3'-Nuklease-Assay in Nanoliterkavitäten abläuft. Es ist aber sinnvoll, ein mikrofluidisches System, wie es im Projekt nanoMAP geplant ist, einzusetzen, um die überschüssigen DNA-Sonden zu entfernen.

Schlussfolgerungen

- Der Exonuklease-Assay wurde in Nanoliterkavitäten durchgeführt.
- DNA wurde über einen Thiolinkler auf Gold-Oberflächen immobilisiert.
- Im nichtkompetitiven Assayformat erhielt man eine viel größere Signaldynamik als bei dem kompetitiven PSFIA.

4.5.5 Zusammenfassende Diskussion

Der heterogene nicht-kompetitive Nuklease-Assay wurde zunächst auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt und anschließend auf die Nanotiterplatte übertragen. Im Nuklease-Assay wurde nicht wie bei DNA-Microarrays üblich das Bindeereignis detektiert, sondern in einem zweiten Schritt die enzymatische Reaktion einer doppelstrangspezifischen Exonuklease. Die Exonuklease III entsprach den Anforderungen, Doppelstränge zu fragmentieren und dabei das fluoreszenzmarkierte Ende von der Oberfläche zu trennen. Dabei störte der Fluoreszenzfarbstoff nicht die Enzymreaktion. Einzelne Nukleobasen einzelsträngiger DNA

wurden mit einer geringen Aktivität hydrolysiert, weswegen das Nullsignal verhältnismäßig hoch war. Die Trennung zwischen gebundener und fragmentierter DNA erfolgte in der MTP durch Transfer der homogenen Phase in eine Fluoreszenz-MTP. In der Nanotiterplatte wurde die physikochemische Trennung über den strahlungslosen Energietransfer auf Goldoberflächen genutzt. Die Immobilisierungsstrategie war ähnlich wie im PSFIA. Die DNA wurde über Thiolinker auf die Goldoberfläche immobilisiert. Es wurden Kalibrierkurven mit unmarkierter DNA aufgenommen. Damit war bewiesen, dass der Nuklease-Assay in Nanoliterkavitäten durchgeführt werden kann. Natürlich sind die einzelnen Waschschriffe nach der Immobilisierung der DNA und der Hybridisierung in der Nanotiterplatte für geringe Nachweisgrenzen hinderlich. Deswegen sind Nanoliterkavitäten mit mikrofluidischen Strukturen, die im Projekt nanoMAP erarbeitet werden, für den Nuklease-Assay in Nanolitervolumina die geeignete Plattform.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei heterogene Assays basierend auf FRET entwickelt und auf dem Nanotiterplattenformat miniaturisiert. Es wurde gezeigt, dass der Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassay (PSFIA) als sensitives Nachweissystem für Analyte im Umwelt-, Screening- und Diagnostikbereich eingesetzt werden kann. Der 3'-Exonuklease-Assay wurde für die DNA-Analytik in Nanoliterkavitäten etabliert. Beide Assay-Formate sollten Erkenntnisse für die miniaturisierten heterogenen Assays in der Hochdurchsatzanalytik liefern. Grundlegend waren die Erkenntnisse für die Oberflächenchemie auf mikrostrukturierten Kunststoffoberflächen und das Prinzip des FRET an der heterogenen Phase.

Im PSFIA wurde gezeigt, dass ein kompetitiver heterogener Fluoreszenzimmunoassay in Probenträgern mit einem Fassungsvermögen von 75 nL pro Kavität durchführbar war, indem man den strahlungslosen Energietransfer an der heterogenen Phase als physikochemisches Trennprinzip zwischen gebundenem und freiem fluoreszenzmarkiertem Antikörper einsetzte. Ein wichtiger Punkt des heterogenen Nachweisformates bestand darin, Protokolle für die Oberflächenchemie auf mikrostrukturierten Kunststoffträgern zu etablieren. Die Oberfläche musste ganz allgemein die Beschaffenheit haben, über biomolekulare Wechselwirkungen die Bindung eines Rezeptors in Lösung mit dem immobilisierten Liganden zu ermöglichen und gleichzeitig Fluoreszenzlöschung über einen strahlungslosen Energietransfer an der Oberfläche zu erzeugen. Die einfachste Methode bestand darin, die Nanoliterkavitäten mit einem Protein adsorptiv zu belegen. Dazu wurde beispielhaft Rinderserumalbumin immobilisiert, an welches sowohl das Analytderivat Atrazincapronsäure als auch der Akzeptorfarbstoff Cy5.5 gekoppelt war. Im PSFIA wurde als Rezeptor Cy5-markierter Anti-Atrazin Antikörper eingesetzt, um dessen Bindungstaschen der Analyt in Lösung und das immobilisierte Analytderivat konkurrierten.

Mit dieser Immobilisierungsstrategie konnte im PSFIA Atrazin mit einer Nachweisgrenze von 0.03 µg/L nachgewiesen werden. Der Nachweis von Atrazin konnte in diesem miniaturisierten heterogenen Nachweissystem mit dem üblichen heterogenen ELISA konkurrieren, bei dem die Nachweisgrenzen zwischen 0.01 und 0.2 µg/L lagen.

Die Nachweisgrenze konnte noch weiter herabgesetzt werden, indem man mit Gold-NTPs arbeitete. Dazu wurde die Kunststoffnanotiterplatte mit einem dünnen Goldfilm bedampft. Gold hatte für den PSFIA mehrere positive Eigenschaften. Die Goldbeschichtung verursachte eine Intensivierung der Fluoreszenz in Lösung, wenn man die Fluoreszenz in Reflektion aufnahm. Zudem hatte Gold nahe der Oberfläche fluoreszenzlöschende Eigenschaften. Dieser Effekt wurde im PSFIA auf Gold-NTPs erfolgreich eingesetzt. Die Signaldynamik zwischen maximaler Fluoreszenzlöschung und maximaler Fluoreszenzintensität lag bei den Gold-NTPs bei etwa 40% und war damit doppelt so hoch wie bei den ABS-NTPs. Für Atrazin wurde eine Nachweisgrenze im PSFIA mit Gold-NTPs von 0.015 µg/L bestimmt.

Mit der Gold-NTP wurde der PSFIA hinsichtlich der Konzentrationsverhältnisse von Analytderivat und Antikörper charakterisiert, indem Atrazin-Kalibrierkurven erstellt wurden. Es wurde festgestellt, dass der Testmittelpunkt sich in Abhängigkeit von der Belegungsdichte an Analytderivaten und von der Antikörper-Konzentration verschieben ließ. Der Testmittelpunkt lag bei niedrigeren Konzentrationen, wenn die Belegungsdichte verringert wurde, und erhöhte sich, wenn mehr Antikörper eingesetzt wurde. Dies bedeutete aber auch, dass die Standardabweichungen der Kalibrierkurve stark von einer konstanten Konzentration von

Antikörpern in Lösung und Analytderivaten an der Oberfläche abhing. Geringe Unterschiede in den Konzentrationsverhältnissen der einzelnen Kavitäten konnte das Fluoreszenzsignal beeinflussen. Dies war eine Begründung für die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen im PSFIA.

Die Gold-NTP hatte den Vorteil, dass das Analytderivat selbst nicht markiert werden musste, so dass die Handhabbarkeit des PSFIA weiter vereinfacht wurde. Cysteinhaltige Proteine wie z.B. das BSA konnten direkt auf Goldoberflächen immobilisiert werden. Dies ermöglicht eine Vielzahl von Assays, welche bei Screeningverfahren eingesetzt werden, zu miniaturisieren.

Auf den Gold-NTPs wurden aber auch Nachweisverfahren für kleinere Moleküle, wie der Allergiemediator Histamin oder das Hormon Estradiol, entwickelt. Diese Analytderivate konnten nicht direkt immobilisiert werden, so dass Immobilisierungsprotokolle etabliert wurden, indem ein kopplungsfähiges Schichtsystem über SAMs aufgebaut wurde. Die goldbedampften Kavitätenwände wurden mit dem Thiol 11-Mercaptoundecansäure beschichtet, an das über Peptidchemie die Analytderivate gekoppelt wurden. Mit dieser Oberflächenchemie ließen sich sowohl Histamin als auch Estradiol bis in den subnanomolaren Bereich nachweisen.

Die computergesteuerte Mikrodosierung ermöglichte, die einzelnen Reagenzien automatisiert in die Nanoliterkavitäten zu applizieren, indem ein dreiachsiger Roboter mit einer Mikrodosierpumpe verwendet wurde, welche über ein Ink-Jet-Verfahren einzelne Tropfen mit einem Volumen von etwa 600 pL erzeugte. Insgesamt wurde gezeigt, dass innerhalb von 18 Minuten je NTP 120 Reaktionslösungen zusammengemischt und ausgelesen werden konnten.

Insgesamt gesehen, konnte mit dem PSFIA auf NTPs gezeigt werden, dass in Nanoliterkavitäten heterogene fluoreszenzbasierte Nachweissysteme etabliert werden konnten. Die Sensitivität war sogar vergleichbar mit dem ELISA. Gleichzeitig waren die Inkubationszeiten im PSFIA in Nanoliterkavitäten aufgrund der geringeren Diffusionswege zur Oberfläche im Vergleich zu MTP-Kavitäten stark verkürzt. Der FRET an der heterogenen Phase benötigte keine zusätzlichen Waschschrte. Innerhalb von 3 Minuten konnte eine ganze NTP ausgewertet werden. Die Verdichtung von 96 Kavitäten einer Standard-MTP auf 623 Kavitäten bei einer Fläche von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ermöglichte die Fluoreszenzdetektion in einem scannenden Verfahren durchzuführen, was weniger Zeit in Anspruch nahm, als einen sequentiell arbeitenden Fluoreszenzreader einzusetzen.

Der zweite Teil der Doktorarbeit befasste sich damit, ein heterogenes Nachweissystem für die DNA-Analytik in Nanoliterkavitäten zu entwickeln. Hierfür wurde der 3'-Exonuklease-Assay auf der NTP etabliert. Dieser Assay wies unmarkierte DNA nach, indem diese an eine immobilisierte FRET-DNA-Sonde hybridisierte und eine doppelstrangspezifische Exonuklease den Doppelstrang erkannte und fragmentierte. Bei diesem Nuklease-Schritt wurde das FRET-Ereignis unterbrochen, wobei die Fluoreszenzintensität anstieg. Für die Entwicklung des Exonuklease-Assays musste eine doppelstrangspezifische Nuklease gefunden und charakterisiert, so wie die Oberflächenchemie für die Immobilisierung von DNA-Sonden auf Kunststoffoberflächen und die FRET-DNA-Sonde selbst entwickelt werden. Die photochemische Immobilisierung der DNA, an das das photoaktivierbare Benzophenonderivat 4-Benzoylbenzoesäure gekoppelt wurde, erwies sich als eine effektive Methode, Oligonukleotide direkt auf Kunststoffe binden. Dazu wurde zunächst grundlegend die Oberflächenchemie mit 4-Benzoylbenzoesäure untersucht, indem ein Kunststoffschichtsystem auf Glasoberflächen aufgebaut und mit der Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) charakterisiert wurde. Es wurde Atrazin photochemisch

immobilisiert und deren Bindung auf die Kunststoffoberfläche über Affinitätsmessungen mit einem Anti-Atrazin Antikörper nachgewiesen. Die Immobilisierungsstrategie wurde für Microarrays auf Kunststoffoberflächen verwendet, indem DNA-Sonden aufgetragen, belichtet und die Bindung über fluoreszenzmarkierte DNA nachgewiesen wurde, welche an die Sonden hybridisierten. Eine weitere Anwendung ist hinsichtlich der Immobilisierung der FRET-DNA-Sonde zu sehen. Für die prinzipiellen Untersuchungen des Nuklease-Assays wurden DNA-Sonden mit Thiolinkern verwendet, die kovalent an die Nanoliterkavitäten der Gold-NTP banden.

Als geeignete Nuklease wurde die Exonuklease III aus *Escherichia coli* gefunden. Sie hydrolysierte die Nukleobasen doppelsträngiger DNA vom 3'-Ende ausgehend. Ihr enzymatisches Verhalten wurde sowohl mit der Kapillargelelektrophorese (CGE) als auch auf einem optischen Biosensor, der RfS-TIRF-Kopplung, und in einem Phasenseparationsassay im Mikrotiterplattenformat untersucht. Mit dem CGE-Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die Exonuklease III doppelsträngige DNA fragmentierte, und wenn nur Einzelstränge vorlagen, nur die erste Base entfernte. In der RfS-TIRF-Kopplung wurde nachgewiesen, dass diese Nuklease die DNA an der heterogenen Phase schneiden konnte. Der Nuklease-Assay in der MTP zeigte, dass komplementäre DNA konzentrationsabhängig ein Fluoreszenzsignal erzeugte. Die Exonuklease III war für den Nuklease-Assay das geeignete Enzym, um doppelsträngige DNA an der Oberfläche nachzuweisen.

Als Nächstes wurde die Miniaturisierung des Assays in Nanoliterkavitäten untersucht. Dazu wurden die Gold-NTPs eingesetzt, auf die fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden über Thiol-Linker immobilisiert wurden. Es wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzlöschung an der Oberfläche über FRET ein geeignetes Nachweisprinzip für den Nuklease-Assay in Nanoliterkavitäten darstellte. Es wurde zudem deutlich, dass durch die Verringerung der Diffusionswege im Vergleich zu MTP-Kavitäten, geringere Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Ein Nachteil des Nuklease-Assays auf Gold-NTPs bestand darin, dass nach dem Immobilisierungsschritt die ungebundene fluoreszenzmarkierte DNA abgewaschen werden musste. Dies wurde in den kleinen Kavitäten erschwert, so dass Kavitäten mit mikrofluidischen Kanälen sinnvoller wären.

Desweiteren wurde eine FRET-DNA-Sonde entwickelt, welche an den beiden Enden jeweils mit einem Donorfarbstoff und Akzeptorfarbstoff markiert wurde. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff Dy630 untersucht, welcher an DNA eine besonders hohe Quantenausbeute von 68% aufwies. Er war im langwelligen Bereich mit einem He-Ne-Laser anregbar, so dass er den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 ersetzen konnte. Für die FRET-DNA-Sonde wurde der Fluoreszenzfarbstoff Dy675 und der nichtfluoreszente Farbstoff DyQ660 als Akzeptor gefunden.

Mit dieser Arbeit wurden für den Nuklease-Assay in Nanoliterkavitäten die dazugehörigen Komponenten Nuklease, FRET-DNA-Sonden und Protokolle für die Oberflächenchemie entwickelt und charakterisiert. Somit ist der Weg frei, diesen Assay für Genexpressionsanalysen oder die SNP-Analytik einzusetzen.

Ein wichtiger Punkt bei der Miniaturisierung von Nachweisverfahren ist die Anbindung der Mikrowelt (z.B. Nanoliterkavitäten) an die Makrowelt (Mikrotiterplatte). Dies wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines Mikrodosierroboters erreicht, wobei es sich zeigte, dass die Dosierung einer Vielzahl von Proben sehr zeitaufwendig war. Der zeitintensivste Schritt bestand im

Mediumwechsel, bei welchem die Mikrodosierspitze intensiv gespült werden musste, um Kontaminationen alter Analyte zu verhindern.

Aus diesem Grund wäre für die Zukunft der Einsatz von parallelen Mikrodosiersystemen sinnvoll, bei welchen der Mediumwechsel vermieden werden kann. Ein paralleles Mikrodosierverfahren stellt zum Beispiel der TopSpot[®] dar. Dieser besteht aus einem Mikrodüsenarray, aus welchem parallel bis zu 96 Tröpfchen mit einem Volumen von 1-2 nL über einen Druckpuls dosiert werden können.

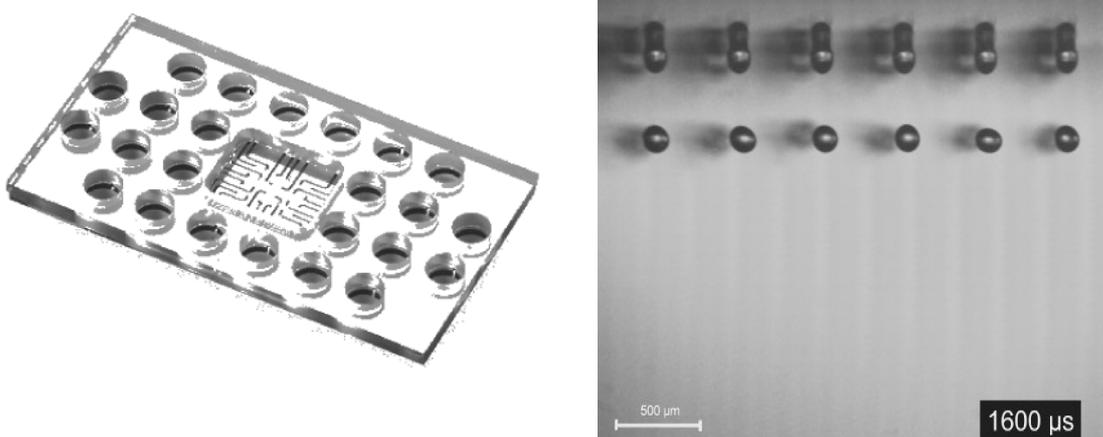


Abbildung 5.1: Parallele Mikrodosierung mit dem TopSpot[®] vom HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen.

Für den PSFIA könnten die Reservoirs des Druckkopfes eingesetzt werden, um gleichzeitig definierte Konzentrationen an Analyten als Kalibrierkonzentration und unbekannte Proben eingefüllt werden. Dieses Prinzip eignet sich auch zum parallelen Nachweis verschiedener Substanzen in einer Probe. In einer natürlichen Probe ist meistens eine Vielzahl von Analyten enthalten. Möchte man zum Beispiel eine allergische Reaktion untersuchen, so spielen verschiedene Mediatoren wie Histamin, Prostaglandine, Interleukine u.v.m. eine Rolle. Diese könnten in einem PSFIA in der Nanotiterplatte gleichzeitig nachgewiesen werden.

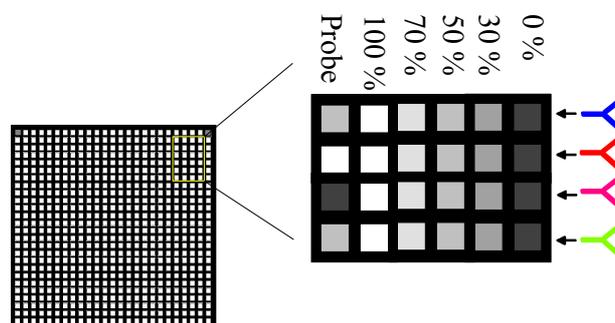


Abbildung 5.2: Screening nach mehreren bioaktiven Substanzen auf einer NTP.

Ein weiterer Vorteil des TopSpots ist im Zusammenhang mit dem HTS zu sehen. Im HTS-Bereich ist die Analytmenge limitierend, so dass große Totvolumina bei der Mikrodosierung zu vermeiden sind. Totvolumina entstehen, indem der Analyt erst z.B. in einer MTP vorgelegt werden muss, ein Teil in die Mikrodosierpipette aufgesaugt und der Rest wieder

zurückgegeben werden. Dabei geht immer eine Teilmenge an Analyten verloren. Beim TopSpot® sind die Befüllung und die nachfolgende Dosierung integriert, so dass bei dem Transfer in verschiedene NTPs kein Verlust an Analyten entstehen sollte.

6 Literatur

- Auer M., Moore K.J., Meyer-Almes F.J., Günther R., Pope A.J., Stöckli K.U. (1998) Fluorescence correlation spectroscopy: lead discovery by miniaturized HTS. *Drug Disc. Today* 3, 457-465.
- Atkins (1988) *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim.
- Bangs Laboratories (1999) Adsorption to microspheres. *TechNote* 204.
- Bragg P.D. and Hou, C. (1975) Subunit composition, function, and spatial arrangement in the Ca^{2+} - and Mg^{2+} -activated adenosine triphosphates of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 311-321.
- Bräuchle C., Burland D.M., Bjorklund G.C. (1981) Hydrogen abstraction by benzophenone studied by holographic photochemistry. *J. Physical Chem.* 85, 123-127.
- Brecht, E. (1988) Quantum counting by laser dyes in a broad spectral range including the near-infrared region. *Anal. Chem.* 58, 384-387.
- Broach J.R., Thorner J. (1996) High-throughput screening for drug discovery. *Nature* 384 suppl., 14-16.
- Brunner J. (1993) New photolabeling and crosslinking methods. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 483-514.
- Burbaum J.J., Sigal, N.H. (1997) New technologies for high-throughput screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1: 72-78.
- Burbaum J.J. (1998) Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon? *Drug. Disc. Today* 3, 313-322.
- Cammann K. (Hrsg.) (2001) *Instrumentelle analytische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Cao Y.C., Jin R., Mirkin C.A. (2002) Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science* 297, 1536-1540.
- Chance R.R., Miller A.H., Prock A., Silbey R. (1975) Fluorescence and energy transfer near interfaces: The complete and quantitative description of the Eu^{3+} /mirror system. *J. Chem. Physics* 63, 1589-1595.
- Chance R.R., Prock A., Silbey R. (1978) Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces. *Adv. Chem. Phys.* (1978) 37, 1-65.
- Chang, S.-C., Chao I., Tao Y.-T. (1994) Structure of self-assembled monolayers of aromatic -derivatized thiols on evaporated gold and silver surfaces: implication on packing mechanism *J. Am. Chem. Soc.* 116, 6792-6805.
- Cheek B.J., Steel A.B., Torres, M.P., Yu Y.-Y., Yang H. (2001) Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip. *Anal. Chem.* 73, 5777-5783.
- Chen X., Livak K.J., Kwok P.Y. (1998) A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome Research* 8, 549-556.

- Crossen G., Drabe K.E., Wiersma D.A. (1993) Fluorescence properties of submonolayers of rhodamine 6G in front of a mirror. *J. Chem. Phys.* 98, 5276-5280.
- Cohn E.J., Hughes Jr. W.L., Weare H.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.
- Crank J. (1975) *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press, Oxford.
- Cush R., Cronin J.M., Stewart W.J., Maule C.H., Molloy J., Goddard N. (1993) The resonant mirror: novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosens. Bioelectron.* 8, 347-354.
- Czerney P., Lehmann F., Wenzel M., Buschmann V., Dietrich A., Mohr G.J. (2001) Tailor-made dyes for fluorescence correlation spectroscopy. *Biol. Chem.* 382, 495-498.
- Dankbar D. (2002) Parallele photoinduzierte Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf Kunststoffträgern zur Herstellung von DNA-Mikroarrays. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- Delamar E., Sundarababu G., Biebuyck H., Michel B., Gerber Ch., Sigrist H., Wolf H., Ringsdorf H., Xanthopoulos N., Mathieu H.J. (1996) Immobilization of antibodies on a photoreactive self-assembled monolayer on gold. *Langmuir* 12, 1997-2006.
- Demas J.N., Crosby G.A. (1971) The measurement of photoluminescence quantum yields. *J. Physical Chem.* 75, 991-1024.
- Descotes J., Choquet-Kastylevsky G. (2001) Gell and Coombs's classification : it is still valid ? *Toxicology* 158, 43-49.
- Divers M. (1999) What is the future of high throughput screening? *J. Biomol. Screening* 4, 177-178.
- Döring M. (1991) Flüssigkeiten mikrofein dosieren. *Feinwerktechnik & Meßtechnik* 99, 459-463.
- Dorman G., Prestwich G.D. (1994) Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* 33, 5661-5673.
- Ducree J., Gruhler H., Hey N., Müller M., Bekesi S., Freygang M., Sandmaier H., Zengerle R. (2000) TopSpot- a new method for the fabrication of microarrays. *Annual Int. Conf. Micro Electro Mechanical Systems, Proceedings*, 13th, Miyazaki, Japan, Jan 23-27, 2000 317-322.
- 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.
- Eddowes M.J. (1987/88) Direct immunochemical sensing: basic chemical principles and fundamental limitations. *Biosensors* 3, 1-15.
- Eggers M. and Ehrlich D. (1995) A review of microfabricated devices for gene-based diagnostics. *Hematologic Pathology* 9, 1-15.

- Engvall E., Perlman P. (1971) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay immunoglobulin-G, *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Erimin, S.A., Samsonova J.V. (1994) Development of polarization fluoroimmunoassay for the detection of s-triazine herbicides. *Anal. Letters* 27, 3013-3025.
- Falbe J., Regitz M., (Hrsg.) *Römpf Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Aufl. (1995)
- Fernandes P.B. (1998) Technological advances in high-throughput screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 597-603.
- Ferretti S., Paynter S. Russell D.A., Sapsford K.E., Richardson D.J. (2000) Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of biosurfaces. *TRAC* 19, 530-539.
- Förster Th. (1946) Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwiss.* 6, 166-175.
- Förster Th. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik* 2, 55-75.
- Fors L., Lieder K.W., Vavra S.H., Kwiatkowski R.W. (2000) Large-scale SNP scoring from unamplified genomic DNA. *Pharmacogenomics* 1, 219-229.
- Fox S., Farr-Jones S., Yund M.A. (1999). *J. Biomol. Screening* 4, 183-186.
- Friedrich J.F., Geng S., Unger W., Lippitz A., Erdmann, J., Gorsler H.V., Woell C., Schertel A., Bierbaum K. (1995) Plasma functionalization and reorientation of macromolecules at polymer surfaces. *Surface and Coatings Techn.* 74-75, 664-669.
- Gaiglitz G. (1996) Opto-chemical and opto-immuno sensors. *Sensors Update Vol. 1*; VCH, Weinheim.
- Gaiglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W. (1993) Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers. *Sens. Actuators B*, 11, 21-27.
- Glaser R.W. (1993) Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Anal. Biochem.* 213, 152-161.
- Glazer A.N. and Mathies R.A. (1997) Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Curr. Opin. Biotechn.* 8, 94-102.
- GlaxoWellcome (1996) Redesigning drug discovery. *Nature* 384 suppl., 1-5.
- Gravesen P., Branbjerg J., Jensen O.S. (1993) Microfluidics – a review. 4th European Workshop on micromechanics; MME 93, 7-8. *Se^{pt.}* 1993, Neuchatel, Switzerland 1993, 168-182.
- Guesdon J.L., Chevrier D., Mazie J.C., David B., Avrameas S. (1986) Monoclonal anti-histamine antibody. *J. of Immunol. Methods* 87, 69-78.
- Von Hahn H.P. (1979) *Das biologische Altern*. Kurzmonographien Sandoz 24, Nürnberg.
- Hammar E., Berglund A., Hedin A., Norman K., Rustas U., Ytterström U., Akerblom E. (1990) An immunoassay for histamine based on monoclonal antibodies. *J. of Immunol. Methods* 128, 51-58.
- Harrington C.A., Rosenow C., Retief J. (2000) Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 285-291.

- Heitz J.R., Anderson C.D., Anderson B.M., (1968) Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylamides. *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 627.
- Heller R. A., Shena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T., Gilmore J., Woolley D.E. and Davis R. W. (1997) Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2150-2155.
- Hemmila I. (1999) LANCE™: Homogeneous assay platform for HTS. *J. Biomolec. Screening* 4, 303-307.
- Hermanson G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego/Cal.
- Hertzberg R.P. and Pope A.J. (2000) High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 445-451.
- Heybrock E., Eickenbusch H., Bujok O. (2000) *Lasergestützte Verfahren für das Hochdurchsatzscreening*. VDI-Technologiezentrum.
- Hock B., Seifert M., Kramer K. (2002) Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosens. Bioelectronics.* 17, 239-249.
- Houston JG, Banks M (1997) The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technology. *Curr. Opin. Biotechn.* 8, 734-740.
- Huang E., Zhou F., Deng L. (2000) Studies of surface coverage and orientation of DNA molecules immobilized onto preformed alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir* 16, 3272-3280.
- Iannone M.A., Taylor J.D., Chen J., Li M.-S., Rivers P., Slentz-Kesler K.A., Weiner M.P. (2000) Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry* 39, 131-140.
- Jensen K.K., Orum H., Nielsen P.E., Norden B. (1997) Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochemistry* 36, 5072-507.
- Khan M.M, Mekmon K.L., Marr-Leisy D., Verlander M.S., Egli M., Lock S., Goodman M. (1987) Congener derivatives and conjugates of histamine: synthesis and tissue and receptor selectivity of derivatives. *J. Med. Chem.* 30, 2115-2120.
- Kido H., Goodrow M.V., Griffith V., Lucas A.D., Gee S.J., Hammock B.D. (1997) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of hydroxytriazines. *J. Agric. Food Chem.* 45, 414-424.
- Klotz A., Brecht A., Barten C., Gauglitz G., Harris G.R. Quigley G.R., Wilkenson J.S., Abuknesha A. (1998) *Sens. Actuators B* 51, 181-187.
- Koch T., Jacobsen N., Fensholdt J., Boas U., Fenger M., Jakobsen M.H. (2000) Photochemical immobilization of anthraquinone conjugated oligonucleotides and PCR amplicons on solid surfaces. *Bioconjugate Chem.* 11, 474-483.
- Koenig U., Nitschke M., Menning A., Eberth G., Pilz M., Arnhold, C., Simon F., Adam G., Werner G. (2002) Durable surface modification of poly(tetrafluoroethylene) by low pressure H₂O plasma treatment followed by acrylic acid graft polymerisation. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 24, 63-71.

- Kröger, K., (2002) A flexible immobilisation strategy based on PNA-surface for quantification of endocrine disruptors. *Anal. Chim. Acta* 469, 37-48.
- Kröger K. (2003) Dissertation in Vorbereitung, Universität Tübingen.
- Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L. (1988) A Ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241, 1077-1080.
- Landegren U., Nilsson M., Kwok P.-Y. (1998) Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Research* 8, 769-776.
- Lee L.G., Livak K.J., Mullah B., Graham R.J., Vinayak R.S., and Woudenberg T.M. (1999) Seven color, homogeneous detection of six PCR products. *Biotechniques* 27, 342-349.
- Leushner J., Chiu N.H. (2000) Automated mass spectroscopy: a revolutionary technology for clinical diagnostics. *Molec. Diagnosis* 5, 341-348.
- Li Q.-G., Liang J.-X., Luan G.-Y., Zhang Y., Wang K. (2000) Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases. *Anal. Sciences* 16, 245-248.
- Li Z., Mehdi S., Patel O., Kaooya J., Judkins M., Zhang W., Diener K., Lzada A., Dunnington D. (2000) An ultra-high throughput screening approach for an adenine transferase using fluorescence polarization. *J. Biomol. Screen.* 5, 31-38.
- Lichtenstein, L.M. (2001) *Das Immunsystem Spektrum der Wissenschaft Spezial* 2.
- Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation. *PCR Methods Applic.* 4, 357-362.
- Lu M., Hall J.G., Shortreed M.R., Wang L., Berggren W.T., Stevens P.W., Kelso D.M., Lyamichev V., Neri B., Skinner J.L., Smith L.M. (2002) Structure-specific DNA cleavage on surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7924-7931.
- Lyamichev V., Mast A.L., Kaiser M.W., Takova T., Kwiatkowski R.W., Sander T.J., deArruda M., Arco D.A., Neri B.P., Brow M.A.D. (1999) Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat. Biotechnol.* 17, 292-296.
- Ma H., Davis R.H., Bowman C.N. (2000) A novel sequential photoinduced living graft polymerization. *Macromolecules* 33, 331-335.
- Marshall A. and Hodgson J. (1998) DNA chips: an array of possibilities. *Nat. Biotechnol.* 16, 27-31.
- Mendoza L.G., McQuary P., Mangan A., Gangadharan R., Brignac S. and Eggers M. (1999) High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Biotechniques* 27, 778-788.
- Mere L., Bennett T., Coassin P., England P., Hamman B., Rink T., Zimmermann S. and Negulescu P. (1999) Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components for ultra-high-throughput screening. *Drug Disc. Today* 4, 8, 363-369.
- Miraglia S, Swartzman E.E., Mellentin-Michelotti J., Evangelista L., Smith C., Gunawan I., Lohman K., Goldberg E.M., Manian B., Yuan P.-M. (1999) Homogenous cell- and bead-

- based assays for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology. *J. Biomol. Screening* 4, 193-204.
- Morin P.A., Saiz R., Monjazez A. (1999) High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping by fluorescent 5' exonuclease assay. *Biotechniques* 27, 538-552.
- Müllner S. (2002) *Transkript* 7, 35-37.
- Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis C.J., Waggoner A.S. (1993) Cyanine-labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* 4, 105-111.
- Mujumdar S.R., Mujumdar R.B., Grant C.M., Waggoner A.S. (1996) Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* 7, 356-362.
- Mullah B., Livak K., Andrus A., Kenney P. (1998) Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay. *Nucl. Acids Research* 26, 1026-1031.
- Naumann C.A., Prucker O., Lehmann T., Rühle J., Knoll W., Frank C.W. (2002) The polymer-supported phospholipid bilayer: tethering as a new approach to substrate-membrane stabilisation. *Biomacromolecules* 3, 27-35.
- Nickerson D.A., Taylor S.L., Fullerton S.M., Weiss K.M., Clark A.G., Stengard J.H., Salomaa V., Boerwinkle E., Sing C.F. (2000) Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Research* 10, 1532-1545.
- Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-1500.
- Okamoto T., Suzuki T. and Yamamoto N. (2000) Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using Bubble Jet technology. *Nat. Biotechn.* 8, 438-441.
- Otomo J., Takeshita T., Fukuzono S., Sakamoto T., Nukada T. (2000) Expression of the histamine receptor in xenopus oocyte and its application to the histamine sensor. *Sens. Actuators B* 66, 19-21.
- Padlan E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology* 31, 169-217.
- Parks C.A., Crippen G.M., Topliss J.G. The measurement of molecular diversity by receptor site interaction simulation. *J. Comp. Aided Molec. Design* (1998) 12, 441-449.
- Patel N., Davies M.C., Hartshorne M., Heaton R.J., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. (1997) Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* 13, 6485-6490.
- Patel N., Davies M.C., Heaton R.J., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. (1998) A scanning probe microscopy study of the physisorption and chemisorption of protein molecules onto carboxylate terminated self-assembled monolayers. *Appl. Phys. A* 66, S569-S574.
- Patzer J. (1996) Numerische Methoden zur Mikrodosierung von Flüssigkeiten mit thermischen Aktoren. Dissertation, Universität Ulm.
- Perez-Luna V.H., Yang S., Rabinovich E.M., Buranda T., Sklar L.A., Hampton P.D., Lopez G.P. (2002) Fluorescence biosensing strategy based on energy transfer between fluorescently labelled receptors and metallic surface. *Biosens. Bioelectron.* 17, 71-78.

- Peyret L.M., Moreau P., Dulluc J., Geffard M. (1986) Antibodies to histamine specificity studies and radioimmunological assay. *J. Immunol. Methods* 90, 39-45.
- Pirquet C. The history of allergy. (1927) *Wiener med. Wochenschr.* 7, 745-748.
- Pirrung M.C., Connors R.V., Odenbaugh A.L., Montague-Smith M.P., Walcott N.G., and Tollett J.J. (2000) The arrayed primer extension method for DNA microchip analysis. *Molecular computation of satisfaction problems. J. Am. Chem. Soc.* 122, 1873-1882.
- Podhrasky D., Drobonica L., Kristian P. (1979) Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione, coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. *Experientia* 35, 154.
- Pope A.J., Haupts U. M. and Moore K. J. (1999) Homogenous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening: theory and practice. *Drug Disc. Today* 4, 8, 350-362.
- Prix L., Uciechowski P., Böckmann B., Giesing M., Schuetz A.J. (2002) Diagnostic biochip array for fast and sensitive detection of K-ras Mutations in stool. *Clinical Chemistry* 48, 428-435.
- Ramm P. (1999) Imaging systems in assay screening. *Drug Disc. Today* 4, 8, 401-410.
- Ramsay G. (1998) DNA-chips: state-of-the art. *Nature Biotechnol.* 16, 40-44.
- Reder S. (2003) Dissertation in Vorbereitung, Universität Tübingen.
- Reiter, G., Siam M., Falkenhagen D., Gollneritsch W., Baurecht D., Fringeli U.P. (2002) Interaction of bacterial endotoxin with different surfaces investigated by in situ fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Langmuir* 18, 5761-5771.
- Rinck C. (1999) DNA-Chiptechnologie. *Chem. Lab. Praxis* 50, 147-149.
- Ritchie G., Burstein E. (1981) Luminescence of dye molecules adsorbed at a Ag surface. *Physic. Review B* 24, 4843-4846.
- Rose S. D. (1998) Application of a novel microarraying system in genomics research and drug discovery. *J. Assoc. Laborat. Automation* 3, 52-56.
- Rose D. (1999) Microdispensing technologies in drug discovery. *Drug Disc. Today* 4, 411-419.
- Roses A.D. (2000) Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 405, 857-865-
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J. Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Schena M., Heller R. A., Theriault T.P., Konrad K., Lachenmeier E., Davis R.W. (1998) Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *TIBTECH* 1, 301-306.
- Schobel (1999a) Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines homogenen Fluoreszenzimmunoassays für die Affinitätsanalytik in Nanolitervolumina. Dissertation, Universität Tübingen.
- Schobel U., Egelhaaf H.J., Brecht A., Oelkrug D., Gauglitz G. (1999b) New donor-acceptor pair for fluorescent immunoassay by energy transfer. *Bioconjugate Chem.* 10, 1107-1114

- Schobel U, Coille I., Brecht A., Steinwand M., Gauglitz G. (2001) Miniaturisation of a homogeneous fluorescence immunoassay based on energy transfer using nanotiter plates as high-density sample carrier. *Anal. Chem.* 73, 5172-5179.
- Schober A., Günther R., Schienhorst A., Döring M., Linemann B.F. (1993) *BioTechniques* 15, 324.
- Schütz A. (2000) Einsatz der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) zur markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening. Dissertation Universität Tübingen.
- Shalon D., Smith S.J., Brown P.O. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridisation. *Genome Research* 6, 639-645.
- Sigrist H., Collioud A., Clemence J.F., Gao H. Luginbuehl R., Saenger M., Sundarababu (1995) Surface immobilisation of biomolecules by light. *Opt. Eng.* 34, 2339-2348.
- Sirkar K., Revzin A., Pishko M.V. (2000) Glucose and lactate biosensors based on redox polymer/oxidoreductase nanocomposite thin films. *Anal. Chem.* 72, 2930-2936.
- Sittampalam G.S., Kahl S.D., Janzen W.P. (1997) High-throughput screening; advances in assay technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 384-391.
- Smoluchowski M.V. (1917) Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. *Z. Phys. Chem.* 92, 129-168.
- Stemmler I. (1999) Miniaturisierte Affinitätsanalytik – orts aufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion. Dissertation, Universität Tübingen.
- Stevens P.W., Hansberry M.R., Kelso D.M., (1995) Assessment of adsorption and adhesion of proteins to polystyrene microwells by sequential enzyme-linked immunosorbent assay analysis. *Anal. Biochem.* 225: 197-205
- Striebel Ch., Brecht A., Gauglitz G. (1994) Characterization of biomembranes by spectral ellipsometry, surface plasmon resonance and interferometry with regard to biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* 9, 139-146.
- Sundberg S.A. (2000) High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr. Opin. Biotechn.* 11, 47-53.
- Tijssen P. (1992) Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Tobe V.O., Tyler S.L., Nickerson D.A. (1996) Single-well genotyping of diallelic sequence variations by a two-color ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Nucleic Acids Res.* 24, 3728-3732.
- Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R. (1998) Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechn.* 16, 49-53.
- Ulman A. (1991) An introduction to ultrathin organic films. Academic Press, Boston, MA.
- Ulman A. (1997) Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* 96, 1533-1554.

- Van der Meer B.W., Coker III G., Chen S.-Y.S. (Eds) (1994) Resonance energy transfer – theory and data. VCH Publishers, Inc., New York.
- Vanderah, D.J., Pham C.G., Springer S.K., Silin V., Meuse, C.W. (2000) Characterization of series of self-assembled monolayers of alkylated 1-thiaoligo(ethylene oxides)₄₋₈ on gold. *Langmuir* 16, 6527-6532.
- Vijayendran R.A., and Leckband D.E. (2001) A quantitative assessment of heterogeneity for surface-immobilized proteins. *Anal. Chem.* 73, 471-480.
- Vo-Dinh T. (1998) Development of a DNA biochip: principles and applications. *Sensors and Actuators B* 51, 52-59.
- Wallace R.W. (1997) DNA on a chip: serving up the genome for diagnostics and research. *Molec. Medicine Today* 9, 384-389.
- Walter G., Büssow K., Cahill D., Lueking A., Lehrach H. (2000) Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 298-302.
- Watson A., Mazumder A., Stewart M., Balasubramanian S. (1998) Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 609-614.
- Wells W., Pearce S. (1965) The dimeric state of cyanine dyes. *J. Phys. Chem.* 69, 1894-1903.
- Whitcombe D., Newton C. R., Little S. (1998) Advances in approaches to DNA-based diagnostics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 602-608.
- Whitney L.W., Becker K.G. (2001) Radioactive ³³P probes in hybridization to glass cDNA microarrays using neural tissues. *J. Neuroscience Methods* 106, 9-13.
- Winkler T., Kettling U., Koltermann A. and Eigen M. (1999) Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96, 1375-1378.
- Winter R. und Noll F. (1998) Methoden der Biophysikalischen Chemie. Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart.
- Wirde M., Gelius U., Nyholm L. (1999) Self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine on gold studied by XPS and voltametry. *Langmuir* 15, 6370-6378.
- Wittmann C., Hock B. (1989) Improved enzyme immunoassay for the analysis of s-triazines in water samples. *Food Agric. Immunol.* 1, 211-224.
- Wölfel S. (2000) Biochip-Technologien. *Laborwelt* 3, 12-20.
- Wortberg M., Cammann K., Strupat K., Hillenkamp F. (1994) A new non-enzymatic tracer for time-resolved fluoroimmunoassay of triazine herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 240-245.
- Yang Z., Engquist I., Wirde M., Kauffmann J.-M., Gelius U., Liedberg B. (1997) Preparation and characterization of mixed monolayer assemblies composed of thiol analogues of cholesterol and fatty acid. *Langmuir* 13, 3210-3218.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| ABDMS | 4-Aminobutyldimethylmethoxysilan |
| ABS | Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer |
| ACA | Atrazincapronsäure |
| AFM | Rasterkraftmikroskopie |
| Ag | Antigen |
| AK | Antikörper |
| AMD | Aminodextran |
| ATR | Abgeschwächte Totalreflektion |
| BBS | 4-Benzoylbenzoesäure |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CGE | Kapillargelelektrophorese |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DIC | N,N'-Diisopropylcarbodiimid |
| DMF | Dimethylformamid |
| DNA | Didesoxynukleinsäure |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid |
| EIA | Enzymimmunoassay |
| ELISA | <i>engl. Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay</i> |
| Exo III | Exonuklease III |
| FIA | Fließinjektionsanlage |
| FCS | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie |
| FRET | Fluoreszenz Resonanter Energietransfer |
| GA | Glutarsäureanhydrid |
| GOPTS | 3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan |
| HEPES | [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure |
| HPLC | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie |
| HTS | <i>engl. high throughput screening</i> |
| IA | Immunoassay |
| IC ₅₀ | Testmittelpunkt |
| Ig | Immunglobulin |
| IS | Immunsensor |
| K | Affinitätskonstante |
| M | Molar |
| MG | Markierungsgrad |
| mIgG | monoklonaler Antikörper der Klasse Immunglobulin G |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| MUA | 11-Mercaptoundecansäure |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| NTP | Nanotiterplatte |
| NWG | Nachweisgrenze |
| OVA | Ovalbumin |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |

| | |
|-------|---|
| PCR | engl. polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion) |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PMT | <i>engl. photomultiplier tube</i> |
| PNA | Peptidische Nukleinsäure |
| PSFIA | Phasenseparation Fluoreszenzimmunoassaay |
| RET | Resonanter Energietransfer |
| RIA | Radioaktivitäts Immunoassay |
| RIfS | Reflektometrische Interferenzspektroskopie |
| SAM | <i>engl. self assembled monolayers</i> |
| SPA | <i>engl. scintillation proximity assay</i> |
| SPR | <i>engl. surface plasmon resonance</i> |
| TIRF | Totale Interne Reflektion Fluoreszenz |
| UV | Ultraviolett |

7.2 Publikationen

Seidel M., Gauglitz G. (2002) Miniaturised fluorescence immunoassay based on energy transfer at immobilised acceptor dye at the surface of nanowells, TRAC, in Vorbereitung

Kröger K., Seidel M., Gauglitz G. (2002) Optical spectroscopy in high throughput screening. High Throughput Analysis: A tool for combinatorial materials science. (Potyrailo R.A., Ed.) Kluwer Academic, New York, im Druck.

Seidel M. (2002) Parallelized fluorescence assays. Analytical Biochemistry and Chemistry, im Druck.

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren :

K. Albert, E. Bayer[†], F. Brümmer, H. Brunner, G. Diekert, G. Gauglitz, H.-D. Görtz, P. Gräber, P. Grathwohl, D. Hülser, V. Hoffmann, H. Jeske, G. Jung, H.-J. Knackmuss, B. Koppenhöfer, K.-A. Kovar, P. Kunze, U. Kull, H. Liebich, R. Mattes, K. Pfizenmaier, M. Reuß, H. Oberhammer, P. Scheurich, R.D. Schmid, V. Schurig, S. Seybold, Ch. Syldatk, D. H. Wolf.

7.4 Lebenslauf

Name : Michael Seidel
Geburtstag : 7. August 1973
Geburtsort : Waiblingen
Familienstand : ledig
Schulbildung : 1980-1984 Grundschule Friedensschule Waiblingen Neustadt
1984-1993 Gymnasium Staufer-Gymnasium Waiblingen
1993 Abitur
Zivildienst: 1993-1994 Klinikum Großhadern, München
Studium: 1994-1999 Studium der Technischen Biologie, Universität Stuttgart
Studienarbeit: September 1997 – Juli 1998 unter Anleitung von Prof. Dr. R.D. Schmid, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart.
Titel „Entwicklung eines Affinitätsteststreifens zur Detektion von Cholinesterase-Inhibitoren“
Diplomprüfung: Februar 1999
Diplomarbeit: Februar 1999 – Oktober 1999 unter der Anleitung von Herrn H. Lindner, Institut für Produktionstechnik und Automatisierung, Fraunhofer Gesellschaft.
Erster Gutachter Prof. Dr. R.D. Schmid, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart; zweiter Gutachter Prof. Dr. Ch. Syldatk, Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart.
Titel „Herstellung von Biochips mit einem Mikrodosierroboter“
Promotion: Oktober 1999 – Dezember 2002 unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen.
Titel: „Entwicklung und Miniaturisierung heterogener Fluoreszenz-Bioassays basierend auf FRET in Nanoliterkavitäten aus Kunststoff“

