

**Entwicklung und Charakterisierung einer portablen  
Biosensorplattform zur markierungsfreien  
Multi-Analyt-Bestimmung**

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
**Melanie Ewald**  
aus Heilbronn

Tübingen  
**2014**

Tag der mündlichen Qualifikation:

26.06.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Udo Weimar

*Meinen Eltern*



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Günter Gauglitz bedanken: Für die Ermöglichung, diese Arbeit unter hervorragenden Bedingungen in seiner Gruppe durchführen zu können, für das große Vertrauen, das er mir stets entgegengebracht hat sowie für die zahlreichen Möglichkeiten meine Arbeit auf nationalen und internationalen Tagungen und Konferenzen vorstellen zu können.

Bei Herrn Professor Dr. Udo Weimar möchte ich mich herzlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken. Frau Professor Dr. Carolin Huhn und Herrn Professor Dr. Klaus Albert danke ich für die Abnahme meiner mündlichen Prüfung.

Im Rahmen des AIF-Projektes „Optische Tierdiagnostik“ möchte ich mich bei allen Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses für ihre Unterstützung bedanken, insbesondere bei Klaus Haberstroh (damals ESE GmbH) für die Überlassung der ESE-Detektoren und für den freundlichen Support von Roman Gruler.

Ein großer Dank gilt der Arbeitsgruppe und Biometrics für die großartige Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. Einigen möchte ich an dieser Stelle besonders danken.

Dr. Goran Markovic und Dr. Peter Fechner danke ich für Ihre andauernde Hilfsbereitschaft im Labor, ihre fachlichen Ratschläge, das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie ihre freundschaftliche Unterstützung in den unterschiedlichsten Lebenslagen. Dr. Günther Proll danke ich für seine Hilfestellung bei der Optimierung des ESE-Detektors. Ihm und Dr. Florian Pröll möchte ich auch für die zahlreichen „Social Events“ für Biometrics und Arbeitskreis danken, die sicherlich ihren Beitrag zu dieser tollen Gemeinschaft leisteten. Dr. Lothar Leidner danke ich für die informative Einführung in die spektrale Ellipsometrie und das gute Zusammenwirken in Projekten. Bei Katrin Krieg bedanke ich mich für die gute Teamarbeit im Projekt WAMAZIN. Kathrin Freudenberger danke ich für die gute Zusammenarbeit im Praktikum und dass ich sie als aufgeschlossene Kollegin kennenlernen durfte. Bei Anja Hartjes möchte ich mich für ihren gerätetechnischen Service während des Praktikumsversuchs „Immunreaktion“ bedanken und darüber hinaus für all ihre Unterstützung als gute Freundin. Jochen Mehne danke ich für die hervorragende technische Betreuung bei allen Praktikumsversuchen und für die gemeinsamen (Wettkampf)läufe. Johannes Riedt möchte ich für seine Verlässlichkeit bei allen formellen Abwicklungen und seine stete Hilfsbereitschaft danken. Oliver Bleher danke ich für seine Unterstützung als Admin und für die Diskussion und Bestärkung meiner „Realseren-Idee“. Bei Felix Kolarov bedanke ich mich für die abwechslungsreiche Zeit und die vielen Eindrücke, die wir beginnend als Kommilitonen bis hierher fast tagtäglich gemeinsam erlebt haben. Barbara Schwarz und Julia Widmaier danke ich für

ihre herzliche, aufmerksame Art und die schöne gemeinsame Zeit im Büro. Meinem ehemaligen Kollegen Dr. Markus Ehni danke ich für die informativen und netten Gespräche im Labor und Ruheraum. Bei meinem ehemaligen Betreuer und Kollegen Dr. Alexander LeBlanc möchte ich mich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit im Projekt „Tierdiagnostik“ und das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Meinen Freundinnen Nadine Nautscher, Corinna Pagels, Christine Steinbrenner, Christine Sutoris und Sarah Turanli danke ich für den Rückhalt, den unsere langjährige Freundschaft mit sich bringt und der mir immer wieder Mut, Kraft und Stärke verliehen hat.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen lieben Eltern, die mich während des gesamten Studiums und der Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben und die immer für mich da waren. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation .....	1
1.2	Zielsetzung .....	4
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>7</b>
2.1	Physikalische Grundlagen .....	7
2.1.1	Optische Grundlagen .....	7
2.1.2	Polarisation des Lichtes .....	8
2.1.3	Reflexion und Transmission von Licht .....	9
2.1.4	Mehrfachreflexion an dünnen Schichten und Interferenz .....	10
2.1.5	Reflektometrische Interferenzspektroskopie .....	12
2.1.6	1-lambda-Reflektometrie .....	14
2.1.7	Spektrale Ellipsometrie .....	15
2.2	Biochemische Grundlagen .....	16
2.2.1	Aminosäuren, Peptide und Proteine .....	16
2.2.2	Antikörper .....	17
2.2.3	Salmonellen .....	20
2.2.4	C-reaktives Protein (CRP) .....	22
2.2.5	Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung .....	22
2.2.6	Assayformate für Affinitätsreaktionen .....	25
2.2.7	Affinitätsreaktionen in heterogener Phase .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>
3.1	Material .....	32
3.1.1	Standardchemikalien .....	32
3.1.2	Biochemikalien .....	33
3.1.3	Lösungen .....	34
3.1.4	Glasträger und andere Substrate .....	34
3.1.5	Geräte .....	35
3.2	Methoden .....	37
3.2.1	Modifikation von Glastypoberflächen und anderen Substraten .....	37

3.2.2	Kontaktwinkelbestimmung.....	43
3.2.3	Ellipsometrie .....	44
3.2.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie .....	45
3.2.5	1-lambda-Reflektometrie .....	48
3.2.6	Datenauswertung von Konzentrationsmessungen.....	53
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>1-lambda-Reflektometrie Messaufbau zur Ein-Analyt-Bestimmung .....</b>	<b>56</b>
4.1.1	Auswahl geeigneter Schichtsysteme und Wellenlängen .....	56
4.1.2	Einfluss der Detektoreinstellung auf das Bindungssignal .....	61
4.1.3	Einfluss des Messaufbaus auf das Bindungssignal.....	64
<b>4.2</b>	<b>Assayentwicklung für den Nachweis von Salmonelleninfektionen .....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Charakterisierung der Chippräparation mittels Kontaktwinkelmessungen .....	66
4.2.2	Charakterisierung der Chippräparation mittels spektraler Ellipsometrie.....	67
4.2.3	Antikörperdetektion mittels 1-lambda-Reflektometrie .....	67
4.2.4	Test des Bindungssignals auf Spezifität .....	69
4.2.5	Kalibrierung des Sensors in Puffer .....	69
4.2.6	Vergleich der 1-lambda-Reflektometrie mit RI-FS anhand von Kalibrierfunktionen.....	71
4.2.7	Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit in Puffer .....	72
4.2.8	Langzeituntersuchung eines Sensorchips .....	73
4.2.9	Kalibrierung des Sensors in Serum .....	74
4.2.10	Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit in Serum.....	77
<b>4.3</b>	<b>Assayentwicklung für den Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP).....</b>	<b>78</b>
4.3.1	Wahl geeigneter Assaybedingungen für den Nachweis von CRP .....	78
4.3.2	Kalibrierung des Sensors.....	80
4.3.3	Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit .....	83
<b>4.4</b>	<b>1-lambda-Reflektometrie Messaufbau zur Multi-Analyt-Bestimmung .....</b>	<b>84</b>
4.4.1	Einfluss des Messaufbaus auf das Bindungssignal.....	84
4.4.2	Einfluss der Flusszelle auf das Bindungssignal .....	85
4.4.3	Untersuchung des Aufbaus bezüglich störender Reflektivitäten .....	88
4.4.4	Test auf Verarmungseffekte entlang des Flusskanals.....	90
<b>4.5</b>	<b>Multi-Analyt-Bestimmung von Salmonellenantikörpern und CRP .....</b>	<b>90</b>
4.5.1	Harmonisierung der Assaybedingungen Biopolymer, Puffer und Regeneration.....	90
4.5.2	Test der sensitiven Schicht auf Spezifität .....	94



---

4.5.3	Multi-Analyt-Kalibrierung des Sensors für Salmonellenantikörper und CRP .....	95
4.5.4	Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit zur Multi-Analyt-Bestimmung .....	99
<b>4.6</b>	<b>Untersuchung von Realseren .....</b>	<b>100</b>
4.6.1	Untersuchung von Hühnerseren .....	100
4.6.2	Untersuchung von Schweineseren .....	104
<b>4.7</b>	<b>Adaptation des Salmonellenassays auf Galliumarsenid .....</b>	<b>106</b>
4.7.1	Charakterisierung der Chippräparation mittels Kontaktwinkelmessungen .....	106
4.7.2	Charakterisierung der Chippräparation mittels spektraler Ellipsometrie .....	107
4.7.3	Messungen mittels RfS an Galliumarsenid .....	108
4.7.4	Test der Wechselwirkung auf Spezifität .....	111
4.7.5	Konzentrationsmessungen auf modifiziertem Galliumarsenid .....	112
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>122</b>
7.1	Abkürzungen .....	122
7.2	Veröffentlichungen .....	123
7.2.1	Publikationen.....	123
7.2.2	Sonstige Publikationen .....	123
7.2.3	Vorträge.....	124
7.2.4	Poster.....	124
7.3	Akademische Lehrer .....	125
7.4	Lebenslauf .....	126



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Motivation

Aus Bereichen der Lebensmittelkontrolle, Umweltanalytik sowie der medizinischen Diagnostik ist die Anwendung von Biosensoren nicht mehr wegzudenken, da sie eine einfache, schnelle und kostengünstige Detektion von Analyten ermöglicht. Häufig kommen dabei immunanalytische Testverfahren zum Einsatz, welche auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen einem Antigen und einem Antikörper beruhen. Sie werden vor allem dann eingesetzt, wenn der Analyt nicht über stoffspezifische Eigenschaften nachgewiesen werden kann oder der Einsatz instrumenteller Analysemethoden die entsprechende Fragestellung nicht ausreichend schnell beantwortet. Die Stärke immunanalytischer Testverfahren liegt dabei vor allem in der hochspezifischen und -affinen Analyterkennung, die es prinzipiell ermöglicht, mehrere Analyte aus einer komplexen Probe qualitativ und quantitativ zu erfassen [Wild, 2005]. Doch erst die Kombination dieser Verfahren mit einer geeigneten Detektionsmethode, vornehmlich die spektroskopische und elektrochemische Detektion, führt zu einem leistungsfähigen Biosensor. In diesem können dann die Vorteile der Selektivität immunanalytischer Verfahren mit den Vorteilen der jeweiligen Detektionsmethode vereint werden.

Im Bereich der Humandiagnostik finden Biosensoren mehr und mehr durch das sogenannte „Point-of-Care-Testing“ (POCT) Anwendung, wodurch Messungen am Ort des Geschehens, z.B. in einer Arztpraxis, auf einer Krankenstation oder sogar in der Wohnung eines Patienten durchgeführt werden können. Die wohl prominentesten Beispiele hierfür sind Schwangerschaftstests [Campbell, et al., 1985] und Blutzuckermessgeräte [Heller und Feldman, 2010]. Aber auch POCT-Geräte zur Bestimmung von Notfallparametern, wie etwa Blutgerinnungswerte, Nierenfunktionswerte oder Herzenzymwerte, sind zunehmend käuflich erwerbbar [Luppa, et al., 2011] und ermöglichen sehr kurze Zeitspannen (Turn-around-Time), bis das entsprechende Ergebnis vorliegt. Allerdings unterliegt dieser Markt sehr strengen Auflagen bezüglich der Zulassung von Produkten, weshalb die Zeit, bis ein Produkt auf dem Markt zugelassen wird (Time-to-Market), mehrere Jahre dauern kann. Dies kann dazu führen, dass bis dahin zahlreiche Mitbewerber ähnliche Produkte anbieten oder das Produkt bereits veraltet ist und daher nur noch zu niedrigen Preisen verkauft werden kann. Aus diesem Grund kann durch eine schrittweise aufgebaute Verwertungsstrategie für POCT-Geräte ein Wettbewerbsvorteil geschaffen werden, indem Produkte zunächst im Bereich der Veterinärdiagnostik auf den Markt gebracht werden, der weniger strengen Zulassungsverfahren und eine kürzere Time-to-Market aufweist. Mit den dabei gewonnenen

Erfahrungen können somit auch die Markteintrittsbarrieren im Bereich der Humandiagnostik leichter überwunden werden.

Doch nicht nur aus strategischer Sicht der Produktentwicklung, sondern auch aufgrund eines vorhandenen Bedarfs sind portable Geräte im Bereich der Veterinär diagnostik interessant. Durch sie kann der Transport von Proben in ein Zentrallabor abgelöst und die Wartezeit bis zur Ausgabe von Analyseergebnissen deutlich reduziert werden, da Messungen vor Ort durchgeführt und interpretiert werden können. Im Falle von Lebensmittelkontrollen, wie etwa bei der Untersuchung von Fleischsaft geschlachteter Tiere, wird durch schnelle Analyseergebnisse ein wichtiger Beitrag für die Lebensmittelsicherheit geleistet, da nicht zum Verzehr geeignetes Fleisch frühzeitig erkannt und aus der Lieferkette entfernt werden kann. Im Falle der Gesundheitsüberwachung von größeren Tierbeständen können schneller Gegenmaßnahmen eingeleitet werden, sodass beispielsweise eine Ausbreitung einer Infektion auf den gesamten Tierbestand und somit größere wirtschaftliche Schäden verhindert werden können.

Ein immunanalytisches Testverfahren, wie es in der Veterinär diagnostik zur Abklärung von Infektionen häufig eingesetzt wird, ist der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [Szabó, et al., 2008]. Im einfachsten Fall wird der Analyt (Antikörper) zunächst von einer Erkennungsstruktur auf einer Oberfläche gebunden und anschließend von einem Sekundäntikörper, der mit einem Enzym-Label versehen ist, erkannt und somit indirekt markiert. Durch Zugabe eines Farbstoffsubstrates wird dieses bei Anwesenheit des Enzyms, und somit indirekt bei Anwesenheit des Analyten, in ein farbiges Produkt überführt, welches photometrisch ausgelesen werden kann. Da zur Analytdetektion Markierungsreagenzien verwendet werden, können mit diesem Verfahren sehr niedrige Nachweisgrenzen erreicht und es kann zudem durch Verwendung einer 96 Well Mikrotiterplatte unter Hochdurchsatz angewandt werden. Allerdings ist die Durchführung eines ELISAs nur durch einen Laboraufbau automatisierbar und mit einem hohen Zeitaufwand verbunden (ca. 3 Stunden), da mehrere Arbeits-, Inkubations- und Waschschr itte erforderlich sind, bis das Ergebnis erhalten wird. Zusätzliche Verbrauchsmaterialien wie etwa Sekundäntikörper, Enzyme und Farbstoffsubstrate verursachen zudem relativ hohe Kosten pro Test [Ewald, et al., 2012].

Um diesen hohen Aufwand zu umgehen, ist die Entwicklung portabler Biosensoren gefragt, welche den Analyt unter geringem Arbeitsaufwand sowie unter einem niedrigen Bedarf an Verbrauchsmaterialien nachweisen können. Eine für dieses Vorhaben geeignete Methode stellt die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) dar. Dabei wird die Anbindung eines Analyten an die sensitive Schicht durch die Verschiebung des für das Schichtsystem charakteristischen

Interferenzspektrums zeitaufgelöst detektiert. Diese Verschiebung ist proportional zur optischen Schichtdicke, welche das Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke der sensitiven Schicht darstellt. Daher werden bei Anwendung der RIFS zur Analytdetektion keine Markierungsreagenzien benötigt. Im Gegensatz zu ELISAs erlaubt die RIFS die Nutzung eines markierungsfreien, direkten Assays, sodass lediglich ein Arbeitsschritt für die Analytbestimmung benötigt wird. Dabei wird der Analyt über die Sensoroberfläche geleitet und das zeitaufgelöste Bindungssignal kann bereits nach wenigen Minuten ausgewertet werden. Als Transducermaterial können prinzipiell alle transparenten Materialien eingesetzt werden, was niedrige Kosten für Verbrauchsmaterialien ermöglicht. Des Weiteren sind auf den Transducern keine Beschichtungen mit Gold oder anderen optischen Strukturen nötig, wie sie bei anderen markierungsfreien Biosensoren, die auf Evaneszenzfeldtechniken basieren auftreten, wie z.B. bei SPR (surface plasmon resonance) [Jönsson, et al., 1991] oder z.B. bei Gitterkopplern [Leidner und Gauglitz, 2011].

Bisher existiert jedoch lediglich ein Laboraufbau der RIFS. Um den RIFS-Aufbau weiter zu vereinfachen, kann unter Auswahl eines geeigneten Schichtsystems auf die spektrale Information verzichtet werden, indem lediglich die Information bei einer Wellenlänge ausgewertet wird. Untersuchungen bezüglich des Informationsgehaltes bei spektralen Messungen sowie bei der Auswertung nur einer Wellenlänge von spektral aufgezeichneten Bindungssignalen wurden bereits in anderen Arbeiten durchgeführt [Frank, 2005; Markovic, 2008]. Bei dem neuesten Verfahren, iRIFS (imaging Reflectometric Interference Sensor), wird eine LED als Lichtquelle verwendet und zur Detektion eine CCD-Kamera eingesetzt [Bleher, et al., 2013; Pröll, 2010]. Dadurch kann auf das Spektrometer vollständig verzichtet werden und zudem ist eine zeitaufgelöste Detektion der biomolekularen Wechselwirkungen an mehreren tausend Spots möglich. Aufgrund des präzisen, optischen Labormessaufbaus ist der Einsatz von iRIFS jedoch ortsgebunden und aufgrund der Detektionseinheit sind die Anschaffungskosten für die Anwendung im Bereich der Veterinärmedizin vergleichsweise hoch.

Für die Realisierung eines portablen und kostengünstigen Messaufbaus ist ein möglicher Forschungsansatz, auf die CCD-Kamera und die parallele Detektion an mehreren Spots zu verzichten und stattdessen eine Photodiode zur Detektion bei einer Wellenlänge einzusetzen. Durch eine geeignete Auswahl optischer Komponenten können dadurch sowohl die Lichtquelle als auch die Detektionseinheit in einem portablen Gerät integriert werden, das aufgrund seiner kostengünstigen Bauteile zu relativ niedrigen Anschaffungskosten führt [Faulstich, et al., 2008]. Soll dennoch eine ortsaufgelöste Detektion an unterschiedlichen Positionen erfolgen, so kann theoretisch auch mit diesem Aufbau, z.B. durch die Verwendung eines x-y-Positioniertisches, die bio-

molekulare Wechselwirkung an mehreren Spots zeitaufgelöst detektiert werden. Dies bietet zum einen die Option, Matrixeffekte, wie sie z.B. bei Serummessungen auftreten können, unter Zuhilfenahme eines Referenzspots zu erkennen und zu eliminieren. Zum anderen besteht durch mehrere Spots die Möglichkeit, mehrere Analyte aus einer Probe gleichzeitig nachzuweisen. Dies kann ein wertvoller Ansatz im Bereich der Diagnostik sein, da die Bestimmung mehrerer, sich ergänzender Parameter zu einem eindeutigeren Krankheitsbild führt.

Insgesamt lassen sich unter Veterinären sowie im Gebiet der Diagnostik tätigen Firmen zwei Zielrichtungen erkennen, in denen ein zunehmender Bedarf an kostengünstigen Schnelltests besteht, der Bereich der Infektiologie bei Nutztieren durch Nachweis von Antikörpern in Blut, Plasma, Serum oder im Fleischsaft und der Bereich von molekular diagnostischen Parametern von Krankheiten wie z.B. akute und chronische Entzündungen. Daher sind zwei interessante Parameter im Bereich der Veterinär diagnostik zum einen Antikörper gegen Salmonellenbakterien, um Salmonelleninfektionen nachzuweisen, und zum anderen das C-reaktive Protein (CRP), welches sowohl im Bereich der Humandiagnostik als auch im Bereich der Veterinär diagnostik standardmäßig im Zentrallabor bestimmt wird und dessen Blutkonzentration im Falle von Entzündungen, bakteriellen und viralen Infektionen unterschiedlich stark ansteigt. Somit kann bei der Quantifizierung von Salmonellenantikörpern im Serum eines erkrankten Tieres die gleichzeitige Bestimmung der CRP Konzentration zusätzliche Informationen über den Status einer bestehenden Salmonelleninfektion enthalten.

Die Entwicklung und Charakterisierung einer portablen Biosensor-Plattform zur markierungsfreien Multi-Analyt-Bestimmung ist somit ein innovatives Vorhaben, welches Veterinären, Produktherstellern und Verbrauchern neue Perspektiven im Bereich der Diagnostik eröffnet.

### 1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war, die Grundlagen für diese Aufgabenstellung zu untersuchen. Entsprechend umfasst diese Arbeit größtenteils Ergebnisse, die im Rahmen des Projektes „Optische Tierdiagnostik“ entstanden sind, welches von der Allianz Industrie Forschung (AIF) gefördert wurde. Im Fokus des Projektes stand dabei, eine portable Biosensorplattform für den Einsatz in der Veterinär diagnostik zu entwickeln, die mehrere Analyte aus einer Probe ohne größeren Zeit- und Kostenaufwand spezifisch erfassen und quantifizieren kann. Dies sollte exemplarisch für den Nachweis von Salmonelleninfektionen sowie des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) erfolgen.

Daher wird in dieser Arbeit zunächst ein neuer Aufbau der 1-lambda-Reflektometrie bezüglich gerätespezifischer Eigenschaften charakterisiert und ein hierfür geeignetes Schichtsystem ausgewählt.

Anschließend werden zunächst einzelne Assays für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Salmonellenantikörpern sowie des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein entwickelt, wobei der Nachweis über ein jeweils direktes Assayformat erfolgen soll. Anhand des Assays zum Nachweis von Salmonellenantikörpern soll untersucht werden, ob spektrale Messungen mittels RfS und Messungen unter Anwendung der 1-lambda-Reflektometrie vergleichbare Informationen liefern. Außerdem wird untersucht, ob die 1-lambda-Reflektometrie auch in komplexen Matrices wie Serum angewandt werden kann und wie sich die biomolekulare Wechselwirkung in dieser Matrix im Vergleich zu Bindungsvorgängen in Puffer ändert. Anhand des Assays zum Nachweis von CRP wird getestet, ob Antikörper durch gezielte Modifikation von Transducern als Erkennungsstrukturen stabil und unter Beibehaltung ihrer Aktivität immobilisiert werden können und ob unter Anwendung der 1-lambda-Reflektometrie auch molekulardiagnostische Parameter von Krankheiten nachgewiesen werden können. Dies soll gleichzeitig die Übertragbarkeit des Aufbaus auf die Humandiagnostik demonstrieren, wo CRP als Blutparameter standardmäßig bestimmt wird.

In einem dritten Schritt wird ein weiterer Aufbau entwickelt und charakterisiert, der unter Verwendung eines 1-lambda-Reflektometrie Detektionsmoduls zusätzlich die orts aufgelöste Detektion erlauben soll und somit zur Multi-Analyt-Bestimmung eingesetzt werden kann. Es wird untersucht, ob die biomolekulare Interaktionsanalyse trotz der mechanischen Verschiebung innerhalb des Aufbaus möglich ist und ob mehrere Analyte aus einer Probe qualitativ und quantitativ erfasst werden können. Hierfür sollen die beiden Assays für den Nachweis von Salmonellenantikörpern und CRP auf einem Sensor vereint werden.

In einem vierten Schritt wird dieser Aufbau zur Untersuchung von Realseren eingesetzt, sodass dessen Eignung für den Einsatz in der Veterinär diagnostik abschließend beantwortet werden kann.

Ausblickend (und im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Funktionelle Nanostrukturen“) wird anhand des etablierten Salmonellenassays untersucht, ob die Präparation der sensitiven Schicht auch auf dem Transducermaterial Galliumarsenid möglich ist. Dieses Transducermaterial soll im Rahmen des Projektes in einem Mach-Zehnder-Interferometer im mittleren Infrarot zum Einsatz kommen, wodurch neben einer Verbesserung der Nachweisgrenzen [Busse, et al., 2001] zusätzlich auch das Erhalten struktureller Informationen des Analyten über „Fingerprints“ angestrebt

wird [Leidner, et al., 2013]. Für Voruntersuchungen zur biomolekularen Wechselwirkung auf Galliumarsenid soll getestet werden, inwiefern die Reflektometrische Interferenzspektroskopie zur Detektion auf diesem nicht transparenten Material eingesetzt werden kann.



## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Physikalische Grundlagen

#### 2.1.1 Optische Grundlagen

Bei elektromagnetischer Strahlung handelt es sich um Transversalwellen, deren elektrischer und magnetischer Feldvektor ( $\vec{E}$  und  $\vec{B}$ ) senkrecht zueinander sowie senkrecht zum Wellenvektor  $\vec{k}$ , der Ausbreitungsrichtung der Welle, schwingen. Die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie wird als Spektroskopie bezeichnet [Goepel und Ziegler, 1994] und verläuft fast ausschließlich über das sich ändernde elektrische Feld.

Tritt Licht aus einem Medium in ein anderes, so kann es reflektiert, transmittiert und/oder absorbiert werden, wobei das Ausmaß der einzelnen Prozesse durch die optischen Konstanten Absorptionskoeffizient  $k$  und Brechungsindex  $n$  der beiden Medien sowie vom Einfallswinkel  $\alpha$  des Lichtes bestimmt wird.

Die optische Dichte eines Mediums oder sein Brechungsindex  $n$  ist nach Gleichung 1 das Verhältnis der Phasengeschwindigkeit  $c_0$  des Lichtes im Vakuum zur Phasengeschwindigkeit  $c_m$  des Lichtes im Medium.

$$n = \frac{c_0}{c_m} \quad \text{Gleichung 1}$$

Die Frequenz  $\nu$  elektromagnetischer Strahlung hängt nach Gleichung 2 sowohl von der Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c$  als auch von der Wellenlänge  $\lambda$  ab:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad \text{Gleichung 2}$$

Beim Durchgang des Lichtes von einem Medium in ein anderes bleibt die Frequenz des Lichtes erhalten, während sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c$  und somit die Wellenlänge  $\lambda$  sowie die Amplitude der Strahlung ändern.

2.1.2 Polarisation des Lichtes

Die Schwingungsrichtung von Transversalwellen lässt sich durch die Polarisation beschreiben. Der Polarisationszustand einer Welle wird durch die Projektion des resultierenden Feldvektors auf einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung beschrieben. Es kann unter anderem in drei Polarisationsarten eingeteilt werden. Bei linearer Polarisation besitzen die resultierenden elektrischen Feldvektoren immer zur selben Zeit ihre Schwingungsknoten, sie sind in Phase. Dabei ändert sich die Auslenkung aus der Ruhelage periodisch in Betrag und Vorzeichen der Amplitude. Bei zirkularer Polarisation besitzen die rechtwinklig zueinander stehenden Komponenten des  $\vec{E}$ -Feldes dieselbe Amplitude, allerdings beträgt ihr Phasenunterschied  $\frac{\pi}{2}$ . Das resultierende  $\vec{E}$ -Feld rotiert dadurch mit konstanter Winkelgeschwindigkeit innerhalb der senkrecht zum Wellenvektor stehenden Ebene, sodass der resultierende  $\vec{E}$ -Vektor einen Kreis beschreibt. Bei elliptischer Polarisation besitzen die senkrecht zueinander stehenden Komponenten des  $\vec{E}$ -Feldes unterschiedliche Amplituden und die Phasendifferenz kann Werte von 0 bis  $\frac{\pi}{2}$  annehmen. Die Auslenkung des resultierenden  $\vec{E}$ -Vektors beschreibt dabei eine Ellipse.

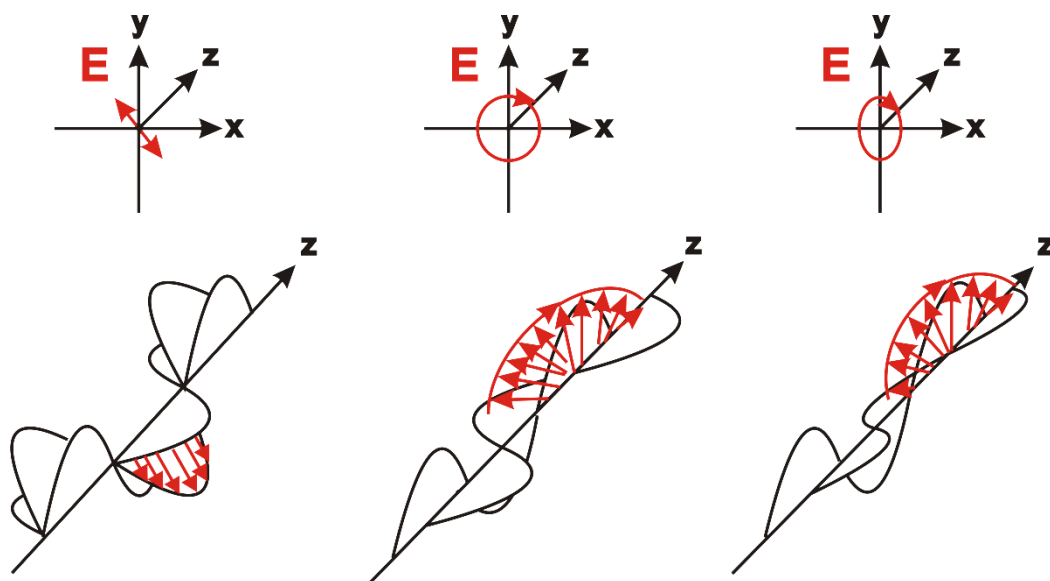
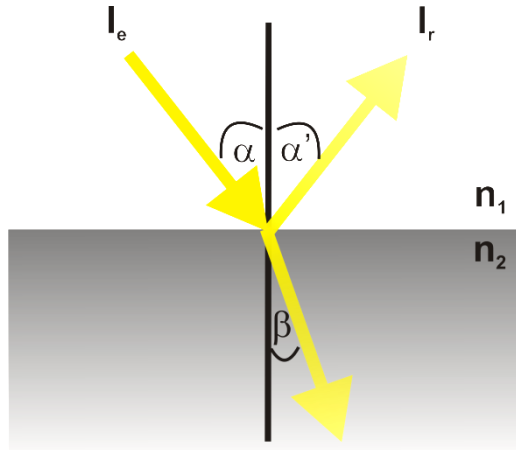


Abbildung 1: Resultierender elektrischer Feldvektor (rot) bei Betrachtung an einem festen Ort (oben) sowie zu einem bestimmten Zeitpunkt (unten) bei linearer (links), zirkularer (mittig) und elliptischer (rechts) Polarisation.

### 2.1.3 Reflexion und Transmission von Licht

Trifft ein Lichtstrahl unter einem Einfallswinkel  $\alpha$  auf eine Phasengrenze zwischen zwei Medien mit Brechungsindices  $n_1$  und  $n_2$  (wobei  $n_1 < n_2$ ), so wird unter Vernachlässigung von Absorption der Lichtstrahl zum Teil reflektiert und zum Teil transmittiert. Dies ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Reflexion und Transmission von Licht an einer Grenzfläche zwischen einem optisch dünneren Medium mit  $n_1$  und einem optisch dichteren Medium mit  $n_2$ .

Der transmittierte Anteil des Lichtes wird dabei unter dem Winkel  $\beta$  zum Lot hin gebrochen. Im anderen Fall, wenn  $n_1 > n_2$  ist, erfolgt die Brechung des Lichtes vom Lot weg. Dieser Zusammenhang wird durch das Snelliussche Brechungsgesetz in Gleichung 3 beschrieben:

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta \quad \text{Gleichung 3}$$

Für den reflektierten Anteil des Lichtes gilt das Reflexionsgesetz und der Einfallswinkel  $\alpha$  ist gleich dem Ausfallswinkel  $\alpha'$ . Das Verhältnis zwischen reflektierter Intensität  $I_r$  und eingestrahelter Intensität  $I_e$  wird nach Gleichung 4 als Reflexionsgrad  $R$  bezeichnet.

$$R = \frac{I_r}{I_e} \quad \text{Gleichung 4}$$

In Zusammenhang mit dem Absorptionsgrad  $A$  und Transmissionsgrad  $T$  gilt:

$$R + A + T = 1 \quad \text{Gleichung 5}$$

Unter der Annahme idealer Dielektrika mit gleicher magnetischer Permeabilität sowie unter Einsatz linear polarisierten Lichtes können die Intensitäten der Teilstrahlen bei auftretender Reflexion und Transmission an einer Phasengrenze über die Fresnelschen Formeln beschrieben werden (Gleichungen 6).  $r_{p,12}$  bzw.  $r_{s,12}$  sind die Reflexionskoeffizienten und  $t_{p,12}$  bzw.  $t_{s,12}$  die Transmissionskoeffizienten. Dabei beschreibt der Index  $p$  die elektrische Komponente des Lichtes.

tes, die parallel zur Einfallsebene polarisiert ist, der Index  $s$  die elektrische Komponente des Lichtes, die senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist und der Index 12 beschreibt die Richtung des Phasenübergangs von Medium 1 in Medium 2.

$$\begin{aligned}
 r_{p,12} &= \frac{n_2 \cdot \cos \alpha - n_1 \cdot \cos \beta}{n_2 \cdot \cos \alpha + n_1 \cdot \cos \beta} \\
 r_{s,12} &= \frac{n_1 \cdot \cos \alpha - n_2 \cdot \cos \beta}{n_1 \cdot \cos \alpha + n_2 \cdot \cos \beta} \\
 t_{p,12} &= \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \alpha}{n_2 \cdot \cos \alpha + n_1 \cdot \cos \beta} \\
 t_{s,12} &= \frac{2 \cdot n_1 \cdot \cos \alpha}{n_1 \cdot \cos \alpha + n_2 \cdot \cos \beta}
 \end{aligned}$$

Gleichungen 6

Wird die Intensität des reflektierten Lichtes unter senkrechtem Lichteinfall betrachtet, d.h.  $\alpha = 0$ , so ergibt sich gemäß Gleichung 7 für den Reflektionsgrad  $R$ :

$$R = r_{s,12}^2 = (-r_{p,12})^2 = \left( \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2$$

Gleichung 7

### 2.1.4 Mehrfachreflexion an dünnen Schichten und Interferenz

Wird Licht auf eine dünne, transparente Schicht eingestrahlt, so wird es an jeder Phasengrenze zum Teil reflektiert und zum Teil transmittiert. Als dünne Schichten werden diejenigen bezeichnet, deren physikalische Schichtdicke  $d$  im Bereich der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes liegt. Liegt das reflektierte Licht im Bereich der Kohärenzlänge, so tritt zwischen den einzelnen reflektierten Teilstrahlen Interferenz auf. Dabei können sich die Teilstrahlen je nach Gangunterschied in ihren Amplituden verstärken (konstruktive Interferenz) oder auslöschen (destruktive Interferenz). Das Ausmaß der Interferenz kann zusätzlich auch durch auftretende Absorption oder Streuung an der Phasengrenze beeinflusst werden.

In Abbildung 3 ist eine dünne Schicht der Dicke  $d_2$  mit dem Brechungsindex  $n_2$  umgeben von zwei unendlich dicken Schichten mit den Brechungsindices  $n_1$  und  $n_3$  dargestellt. Einfallendes Licht trifft zunächst mit der Intensität 1 auf die Phasengrenze zwischen Medium 1 und Medium 2 (Punkt A). Unter senkrechtem Lichteinfall gilt für den reflektierten Teilstrahl A1 gemäß Gleichung 8:

$$r_1 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \quad \text{Gleichung 8}$$

Für den in das Medium 2 transmittierten Teilstrahl ergibt sich gemäß Gleichung 5 eine Amplitude von  $\sqrt{1 - r_1^2}$ . An der Phasengrenze zwischen Medium 2 und Medium 3 wird dieser transmittierte Teilstrahl erneut reflektiert sowie in das Medium 3 transmittiert (Punkt B), wobei für den reflektierten Teilstrahl gilt:

$$r_2 = \frac{n_2 - n_3}{n_2 + n_3} \quad \text{Gleichung 9}$$

Dieser Teilstrahl hat eine Amplitude von  $r_2 \cdot \sqrt{1 - r_1^2}$  und wird an der Phasengrenze zwischen Medium 2 und 1 wieder reflektiert und transmittiert (Punkt C). Der in das Medium 1 transmittierte Teilstrahl A2 wird erneut um den Faktor  $\sqrt{1 - r_1^2}$  geschwächt und besitzt im Medium 1 eine Amplitude von  $r_2 \cdot (1 - r_1^2) \cdot e^{-i\Delta_1}$ .

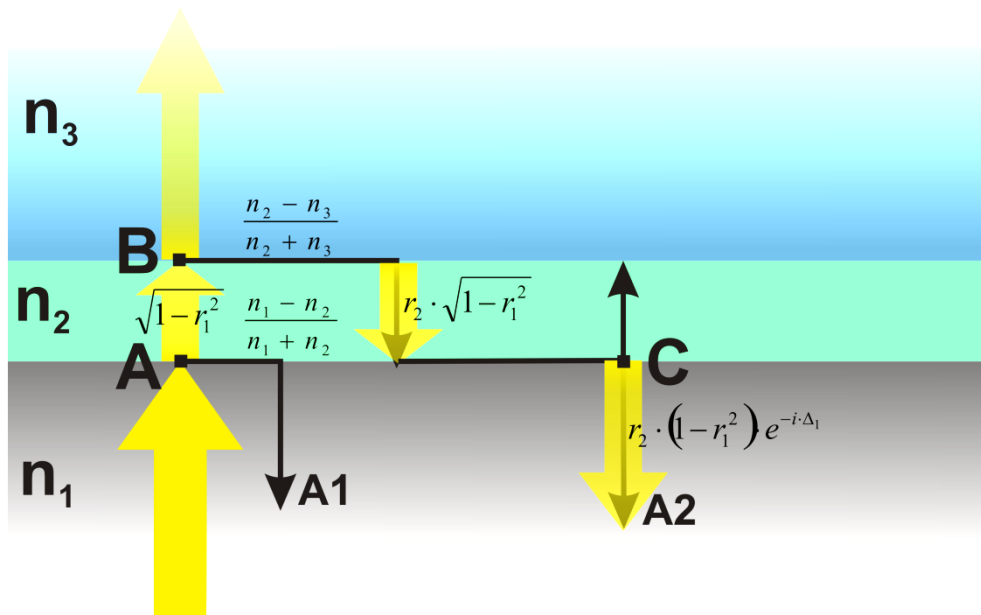


Abbildung 3: Reflexion und Transmission eines Lichtstrahls an einer dünnen Schicht bei senkrechtem Lichteinfall.

Im Vergleich zur reflektierten Teilwelle A1 hat die austretende Teilwelle A2 die optische Schichtdicke  $n_2 \cdot d_2$  zweimal durchlaufen, was zu einem Gangunterschied von  $2 \cdot n_2 \cdot d_2$  führt. Dadurch ergibt sich eine Phasendifferenz  $\Delta_1$  von:

$$\Delta_1 = \frac{4 \cdot \pi}{\lambda} \cdot n_2 \cdot d_2 \quad \text{Gleichung 10}$$

Werden für die Teilwellen A1 und A2 jeweils ihre Amplitude und Phase addiert, so ergibt sich:

$$A_{12} = r_1 + r_2 \cdot (1 - r_1^2) \cdot e^{-i\Delta_1} \quad \text{Gleichung 11}$$

Es erfolgen weitere Reflexionen und Transmissionen an den entsprechenden Grenzflächen, so dass sich die resultierende Welle durch Addition der Amplituden und Phasen einer unendlichen Anzahl von Teilwellen ergibt [Anders und Eichinger, 1965]:

$$r \cdot e^{i\varepsilon} = \frac{r_1 \cdot r_2 \cdot e^{-i \frac{4\pi}{\lambda} n_2 \cdot d_2}}{1 + r_1 \cdot r_2 \cdot e^{-i \frac{4\pi}{\lambda} n_2 \cdot d_2}} \quad \text{Gleichung 12}$$

Die eigentlich messbare Größe ist der Reflektionsgrad  $R$ , der durch Multiplikation von Gleichung 12 mit ihrer komplex Konjugierten erhalten wird:

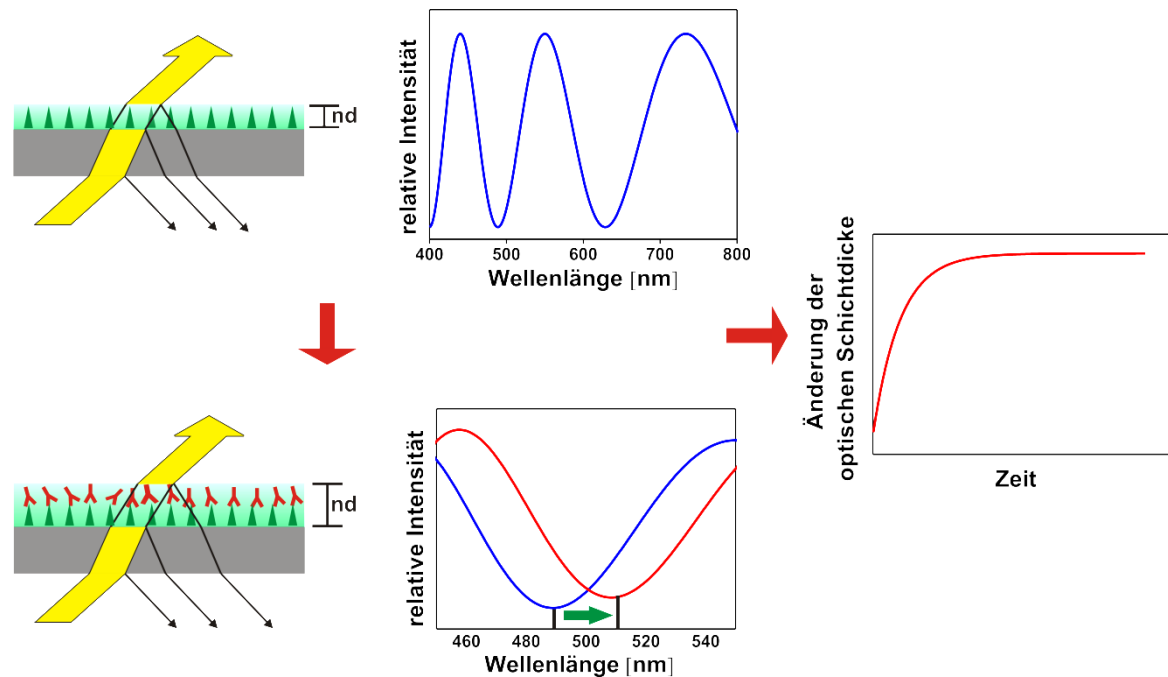
$$R = |r \cdot e^{i\varepsilon}|^2 = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \Delta_1}{1 + r_1^2 + r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \Delta_1} \quad \text{Gleichung 13}$$

### 2.1.5 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) basiert auf der unter Kapitel 2.1.4 beschriebenen Mehrfachreflexion von Weißlicht an dünnen Schichten und dient der markierungsfreien und zeitaufgelösten Beobachtung von Schichtdickenänderungen [Brecht, et al., 1992a]. Dabei wird Weißlicht senkrecht auf die Rückseite eines planaren, transparenten Transducers eingestrahlt und das Licht an jeder Phasengrenze teils reflektiert und teils transmittiert. In Abhängigkeit von Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke der einzelnen Schichten interferieren die reflektierten Teilstrahlen zu einem für das Schichtsystem charakteristischen Interferenzspektrum [Brecht und Gauglitz, 1994]. Dies ist exemplarisch in Abbildung 4 dargestellt.

Lagern sich, z.B. aufgrund molekularer Erkennung, Analytmoleküle an die sensitive Schicht an, so vergrößert sich die optische Schichtdicke, welche das Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke ist [Brecht, et al., 1992b]. Dadurch erfährt das Licht in dieser Schicht eine andere optische Weglänge, was sich in einer Phasenverschiebung der reflektierten Teilstrahlen bemerkbar macht. Dies führt zu einer Intensitätsänderung des reflektierten Lichtes bei allen Wellenlängen, sodass das Interferenzspektrum horizontal zu höheren Wellenlängen hin verschoben wird. Durch Beobachtung eines prominenten Punktes des Interferenzspektrums (z.B.

ein Extremum) mit der Zeit kann auf die Änderung der optischen Schichtdicke zurückgeschlossen werden [Kraus und Gauglitz, 1992].



**Abbildung 4:** Charakteristisches Interferenzspektrum unter Einsatz eines RIFs Transducers (oben), dessen Verschiebung bei Anlagerung von Analytmolekülen an die sensitive Schicht (unten) und das zeitaufgelöste Bindungssignal bei Auftragung der Änderung der optischen Schichtdicke in Abhängigkeit der Zeit (rechts).

Die Auftragung der Änderung der optischen Schichtdicke gegen die Zeit ergibt ein Sensorgramm, welches sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die detektierte Wechselwirkung zulässt. So ist neben Konzentrationsbestimmung durch Kalibrierung der Sensoren auch möglich, kinetische Ratenkonstanten (Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante) zu bestimmen oder biomolekulare Wechselwirkungen durch Ermittlung thermodynamischer Konstanten (Affinitätskonstante) zu charakterisieren [Piehler, et al., 1997]. Ein Vorteil von RIFs ist die Robustheit gegenüber Temperaturschwankungen [Proell, et al., 2005; Proll, et al., 2007], da sich die gegenläufige Temperaturabhängigkeit von Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke in ihrem Produkt, der hier beobachteten Messgröße, nahezu kompensieren.

Unter Vernachlässigung der Mehrfachreflexion lässt sich die relative Intensität des reflektierten Lichtstrahls für eine dünne, sensitive Schicht unter senkrechtem Lichteinfall gemäß Gleichung 14 berechnen nach:

$$\frac{I_R}{I_0} = r_1^2 + r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \Delta_1 \quad \text{Gleichung 14}$$

Mit der Phase  $\Delta_1 = \frac{4 \cdot \pi \cdot (n \cdot d)}{\lambda}$  und unter der Annahme, dass keine Phasensprünge auftreten, sich die Brechungsindices also monoton ändern, folgt für die Intensität des reflektierten Lichtstrahls  $I_R$  in Abhängigkeit von der Wellenlänge:

$$I_R = I_1 + I_2 + 2 \cdot \sqrt{I_1 \cdot I_2} \cdot \cos\left(\frac{4 \cdot \pi \cdot (n \cdot d)}{\lambda}\right) \quad \text{Gleichung 15}$$

wobei  $I_1$  und  $I_2$  die reflektierten Teilstrahlen beschreiben.

Für das Auftreten von Extrema, deren Lage zur Auswertung einer Messung relevant ist, ergibt sich nach Gleichung 15, dass die Phasenverschiebung ein ganzzahliges Vielfaches von  $\pi$  sein muss:

Für das Auftreten von Minima gilt: 
$$\frac{2 \cdot n \cdot d}{\lambda} = \left\{ \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots \right\}$$

Für das Auftreten von Maxima gilt: 
$$\frac{2 \cdot n \cdot d}{\lambda} = \{1, 2, 3, \dots\}$$

Damit aus dem Interferenzspektrum die optische Schichtdicke bestimmt werden kann, muss die Ordnungszahl  $m$  von mindestens einem Extremum bekannt sein. Aus der Lage zweier Extrema  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  sowie der Differenz ihrer Ordnungszahlen  $\Delta m$  kann die Ordnungszahl eines Extrempunktes für dispersionsfreie Systeme [Gauglitz, et al., 1993] wie folgt berechnet werden:

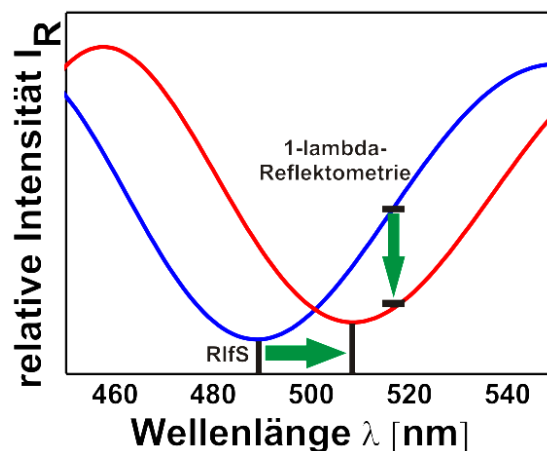
$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \quad \text{Gleichung 16}$$

### 2.1.6 1-lambda-Reflektometrie

Wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben, ändert sich bei Anlagerung bzw. Sorption eines Analyten an/in die sensitive Schicht die Reflektivität in Abhängigkeit der Wellenlänge. Das Ausmaß der Reflektivitätsänderung aufgrund einer Änderung in der optischen Schichtdicke ist sowohl abhängig vom gewählten Schichtsystem als auch vom Einfallswinkel und der betrachteten Wellenlänge des Lichtes. Diese sind so zu wählen, dass eine Änderung der optischen Schichtdicke eine maximale Änderung in der Reflektivität bewirkt [Frank, 2005], sodass eine hohe Sensitivität erreicht wird. Für quantitative Fragestellungen, wie beispielsweise Konzentrations- oder Affinitätsbestimmungen, ist es jedoch von größerer Wichtigkeit, dass sich diese Änderung im betrachteten Messbereich linear verhält [Markovic, 2008]. Wählt man Einfallswinkel, Schichtsystem und Wellenlänge für den nachzuweisenden Analyten geeignet aus, so kann bei Detektion der reflektier-



ten Intensität bei einer Wellenlänge derselbe Informationsgehalt erhalten werden, wie bei der spektralen Auswertemethode. Dies hat den Vorteil, den Aufbau sehr gut miniaturisieren und parallelisieren zu können. Bei der 1-lambda-Reflektometrie wird der Transducer von der Rückseite mit einer monochromatischen Lichtquelle, beispielsweise mit einer LED (light emitting diode), angestrahlt. Zur Detektion dient z.B. eine CCD-Kamera, mit der Mikroarrays im Hochdurchsatz ausgelesen werden können [Bleher, et al., 2013; Pröll, 2010] oder eine Photodiode [Ewald, et al., 2013], die einen vergleichsweise robusten und portablen Messaufbau ermöglicht. Mit diesen Komponenten kann, wie in Abbildung 5 dargestellt, anstelle der Verschiebung des Interferenzspektrums die Änderung der reflektierten Intensität bei einer Wellenlänge beobachtet werden.



**Abbildung 5:** Gegenüberstellung des Detektionsprinzips für RIFS und 1-lambda-Reflektometrie: Beobachtung der Verschiebung des Interferenzspektrums unter Anwendung der RIFS oder Beobachtung der Änderung der reflektierten Intensität bei einer Wellenlänge unter Anwendung der 1-lambda-Reflektometrie.

### 2.1.7 Spektrale Ellipsometrie

Die Ellipsometrie basiert auf der Änderung des Polarisationszustandes von Licht bei Reflexion (oder Transmission) an einer Phasengrenze und dient zur Bestimmung der physikalischen Schichtdicke  $d$  und des Brechungsindex  $n$  dünner Schichten [Azzam und Bashara, 1977].

Das Verhältnis der Reflexionskoeffizienten  $r_p$  und  $r_s$  für parallel und senkrecht zur Einfallsebene polarisiertes Licht gibt den Polarisationszustand  $\rho$  an und kann weiter beschrieben werden durch:

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan \Psi \cdot e^{i(\Delta_p - \Delta_s)} = \tan \Psi \cdot e^{i\Delta} \quad \text{Gleichung 17}$$

Wobei  $\tan \Psi$  dem Betrag von  $\rho$  entspricht und  $\Delta$  den Unterschied der Phasenverschiebung zwischen senkrecht und parallel polarisiertem Licht vor und nach der Reflexion darstellt.

Bei der spektralen Ellipsometrie wird Weißlicht über einen rotierenden Polarisator zunächst linear oder zirkular polarisiert und in einem bestimmten Winkel auf die Probe eingestrahlt. Bei der Reflexion an der Phasengrenze ändert das Licht gemäß Gleichungen 6 seinen Polarisationszustand und wird elliptisch polarisiert. Die ellipsometrischen Winkel lassen sich anschließend im Detektor über die Stellung des Analysators und dem modulierten Signal des rotierenden Polarisators bestimmen.

## 2.2 Biochemische Grundlagen

### 2.2.1 Aminosäuren, Peptide und Proteine

Proteine sind biologische Makromoleküle, welche aus Aminosäuren aufgebaut sind. Im menschlichen Organismus kommen 21 Protein aufbauende (proteinogene) Aminosäuren vor. Für die Proteinbiosynthese wird je eine Aminosäure durch ein Triplet aus Nukleinbasen in der DNA codiert. Alle proteinogenen Aminosäuren sind  $\alpha$ -Aminosäuren, d.h. die Aminogruppe sitzt am selben Kohlenstoffatom, welches mit der Carboxygruppe verbunden ist. Mit Ausnahme von Glycin besitzen alle Aminosäuren mindestens ein asymmetrisches C-Atom und sind somit chiral, wobei unter den Enantiomeren nur die L-Aminosäuren am Proteinbau beteiligt sind. Durch eine Kondensationsreaktion einer Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxygruppe einer anderen Aminosäure können diese unter Ausbildung einer peptidischen Bindung untereinander Aminosäureketten bilden. Je nach Länge dieser Ketten kann zwischen Oligopeptiden (Anzahl der Aminosäuren  $< 10$ ) und Polypeptiden (Anzahl der Aminosäuren  $> 10$ ) unterschieden werden. Die lineare Aminosäuresequenz wird als Primärstruktur eines Proteins bezeichnet und hat Auswirkungen auf die gesamte Proteinfaltung.

Die Lage und Beschaffenheit einzelner Aminosäurereste führt zu einer räumlichen Anordnung der Peptidkette mit Wasserstoffbrücken zwischen den CO- und NH-Gruppen des Peptidrückgrats. Diese Anordnung wird zum einen über den Winkel  $\phi$  charakterisiert, der zwischen der Ebene der Peptidbindung vor einem C-Atom und dem daran befindlichen Aminosäurerest liegt und zum anderen über den Winkel  $\psi$ , der zwischen dem Aminosäurerest und der Ebene der Peptidbindung nach dem C-Atom liegt, was in Abbildung 6 veranschaulicht ist. Die Stellung beider Winkel zueinander wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Häufig auftretende Sekundärstrukturen sind z.B. die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt, die  $\beta$ -Schleife (loop) und die Random Coil Struktur [Raven, et al., 2006; Westphal, et al., 2003].

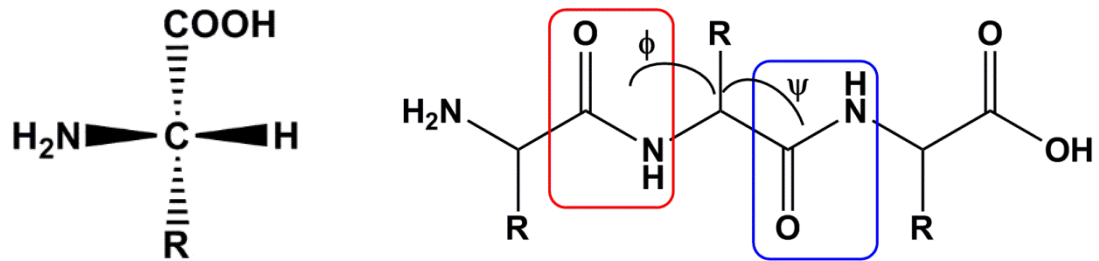


Abbildung 6: Grundstruktur der  $\alpha$ -L-Aminosäuren (links) und Peptidrückgrat mit den Winkeln  $\phi$  und  $\psi$ , welche die Sekundärstruktur des Peptids festlegen (rechts).

Durch Wechselwirkungen oder Bindungen zwischen den Aminosäureresten der Peptidkette wird die Proteinfaltung fortgesetzt und es kommt zur Ausbildung der Tertiärstruktur, einer dreidimensionalen Anordnung der Sekundärstruktur. Dabei können auch Aminosäurereste miteinander wechselwirken, deren Aminosäuren in der Primärstruktur nicht benachbart sind.

Als Quartärstruktur wird die räumliche Anordnung von mehreren Polypeptidketten bzw. von Polypeptidketten mit Kofaktoren bezeichnet, die miteinander wechselwirken und einen Proteinkomplex bilden. Dieser kann sowohl aus unterschiedlichen als auch aus mehreren, identischen Polypeptidketten bzw. Kofaktoren bestehen. Viele Proteine erreichen erst in einem solchen Komplex ihre Funktionalität. Beispiele hierfür sind Hämoglobin (2 Hämoglobin  $\alpha$  und 2 Hämoglobin  $\beta$  Proteine und 4 Kofaktoren) und Antikörper (2 schwere und 2 leichte Proteine) oder das in dieser Arbeit verwendete C-reaktive Protein (5 Proteine und Kofaktoren), das in Abbildung 7 dargestellt ist.

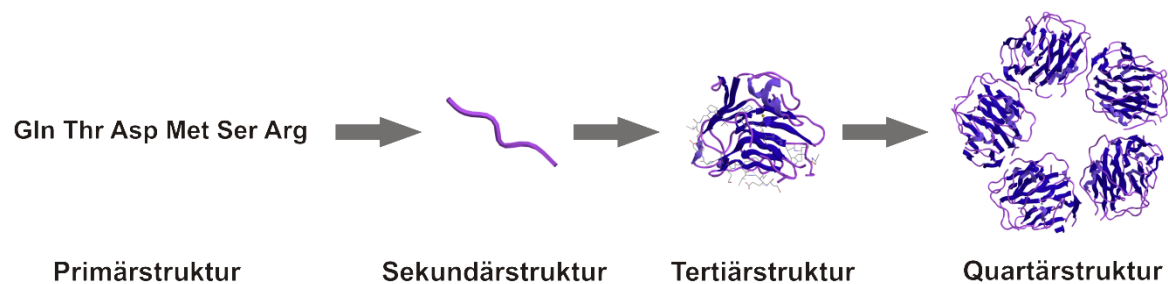


Abbildung 7: Ausschnitt aus der Primärstruktur unter Angabe der Aminosäuresequenz im Dreibuchstabencode, Ausschnitt aus der Sekundärstruktur sowie Cartoon-Darstellung der Tertiär- und Quartärstruktur am Beispiel von C-reaktivem Protein.

### 2.2.2 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind Glycoproteine und bilden die Grundlage der humoralen Immunabwehr bei Vertebraten. Die humorale Immunabwehr findet im Blut oder der extrazellulären Flüssigkeit der Gewebe statt. Dringt ein Fremdstoff in den Organismus ein, wird dieser von B-Lymphozyten gebunden und seine Strukturmerkmale an deren Oberfläche präsentiert. Daraufhin vermehren sich die B-Lymphozyten unter anderem zu Plasmazellen, welche spe-

zifische Antikörper produzieren und diese anschließend in die Körperflüssigkeit abgeben [Fagraeus, 1947]. Diese Antikörper können meist außerordentlich fest an den eingedrungenen Fremdstoff binden und diesen somit für dessen darauf folgende Zerstörung oder Ausscheidung markieren. Moleküle, die eine solche Immunantwort hervorrufen können, werden als Antigene bezeichnet.

Aufgrund seiner Häufigkeit im Organismus stellt das Immunglobulin G (IgG) den wohl bedeutendsten Vertreter unter den fünf Klassen der Antikörper dar (IgG, IgD, IgE, IgA, IgM). Diese unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung, im Zeitpunkt ihrer Bildung, in ihrem Wirkungsort sowie in ihrer Verweildauer im Organismus. Das IgG ist an der sekundären Immunantwort beteiligt, das heißt es wird in einer verzögerten Abwehrphase, nach Sensibilisierung einer B-Lymphozyte mit dem Antigen, aus B-Plasmazellen gebildet und bleibt im Organismus lange erhalten. Deshalb sind Antikörper der IgG-Klasse je nach Titer auf eine gegenwärtige oder frühere Infektion zurückzuführen.

IgG-Antikörper bilden in ihrer Struktur ein 150 kDa schweres Protein aus vier Protein-Untereinheiten: zwei identische leichte Polypeptidketten (L-Ketten oder engl. light chains) und zwei identische schwere Polypeptidketten (H-Ketten oder engl. heavy chains). Jeweils eine leichte und eine schwere Kette sind über nicht kovalente Wechselwirkung und Disulfidbrücken miteinander verbunden, wobei die schweren Ketten untereinander in der „hinge region“ ebenfalls über Disulfidbrücken verbunden sind und dadurch einen Ypsilon-förmigen Komplex formen, wie er schematisch in Abbildung 8 dargestellt ist. Die Kombination aus schwerer und leichter Kette oberhalb der hinge region wird jeweils als Fab-Fragment (antigen-binding fragment) bezeichnet [Cohen und Porter, 1964; Kabat, 1968]. Die Abschnitte der schweren Ketten unterhalb der hinge region bilden gemeinsam das Fc-Fragment (crystallisable fragment). Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen und einer konstanten Domäne ( $V_L$  und  $C_L$ ), die schweren Ketten aus einer variablen und drei konstanten Domänen ( $V_H$  und  $C_H$ ). Während die konstanten Domänen aus hoch konservierten Aminosäuresequenzen bestehen, besitzen die variablen Domänen jeweils drei Bereiche mit hypervariabler Aminosäuresequenz, welche auch als „complementarity determining region“ (CDR) bezeichnet werden und für die große Diversität von mindestens  $10^6$  verschiedenen Antikörperstrukturen im vertebralen Organismus sorgen [Alt, et al., 1987; Schütt, 2011]. Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden am N-terminalen Ende gemeinsam jeweils eine Antigenbindungsstelle, das Paratop. Ein IgG-Antikörper besitzt somit zwei identische Paratope und ist bivalent, d.h. er kann zwei Antigene binden. Die Erkennungsstelle am Antigen ist komplementär zum Paratop des Antikörpers und wird als Epitop oder als antigene Determinante bezeichnet.

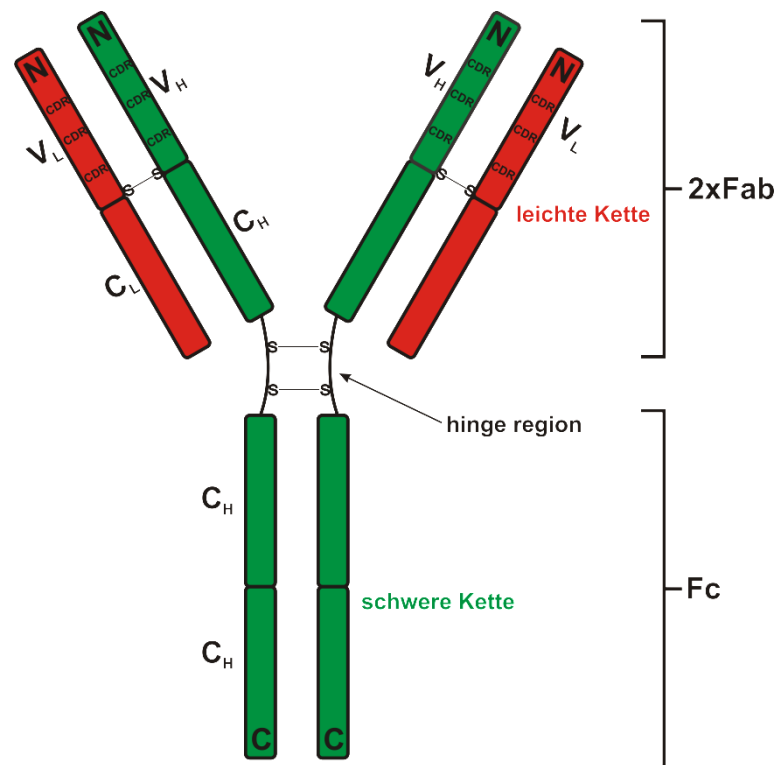


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers.

In Abhängigkeit der Gewinnungsmethode können monoklonale und polyklonale Antikörper erhalten werden. Um polyklonale Antikörper gegen ein spezifisches Antigen herzustellen, wird einem geeigneten Tier (z.B. Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege, Schaf) das entsprechende Antigen wiederholt injiziert, sodass im Organismus eine Immunantwort ausgelöst wird. Da ein Antigen oft mehrere Epitope besitzt, setzen verschiedene B-Plasmazellen unterschiedliche Antikörper frei, die sich in ihrem Paratop unterscheiden und somit das Antigen an unterschiedlichen Stellen spezifisch erkennen und daran binden. Diese Mischung aus sich im Paratop unterscheidenden Antikörpern wird als „polyklonaler Antikörper“ bezeichnet. Um monoklonale Antikörper zu erhalten, die also alle das gleiche Paratop aufweisen und somit gegen ein spezifisches Epitop eines Antigens gerichtet sind, muss die sogenannte Hybridom-Technik [Galfre, et al., 1977; Kohler und Milstein, 1975] angewandt werden. Dabei werden antikörperproduzierende B-Zellen aus der Milz eines immunisierten Tieres entnommen und *in vitro* mit Myelomzellen (Tumorzellen) derselben Tierart versetzt. Durch Zugabe von Polyethylenglycol fusionieren die einzelnen Zellen miteinander, sodass u.a. stabile Hybridomzellen entstehen. Diese erhalten von den B-Zellen die Fähigkeit, spezifische Antikörper zu produzieren und von den Tumorzellen die Fähigkeit, nicht dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu unterliegen und sich beliebig oft zu teilen. Durch

Zellkulturtechnik lassen sich daraus uneingeschränkt viele monoklonale Antikörper mit identischen Paratopen produzieren.

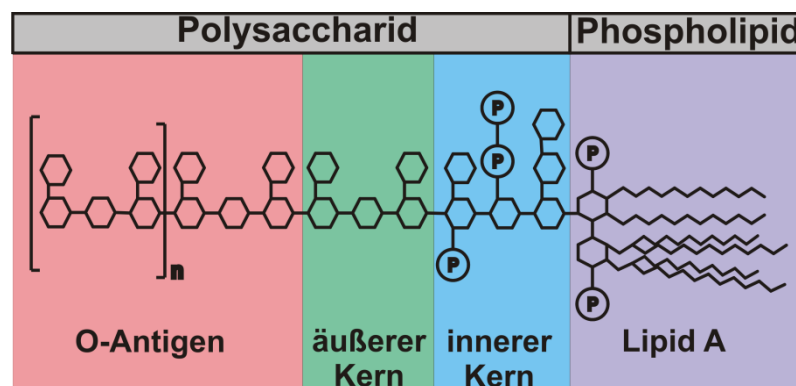
### 2.2.3 Salmonellen

Salmonellen sind stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Bakterien, die unter der Gattung *Salmonella* zusammengefasst werden und zur Familie der Enterobakterien gehören. Sie besitzen einen Durchmesser von etwa 1,1 bis 1,5 µm, eine Länge von etwa 2 bis 6 µm, sind beweglich und zeigen eine negative Gram-Färbung [Darai, 2012]. Es gibt zwei verschiedene Salmonellenarten, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* [Le Minor und Popoff, 1987; Reeves, et al., 1989], wobei *Salmonella enterica* des Weiteren in sechs Subspezies (ssp) unterteilt werden kann, welche in unterschiedlichen Organismen vorkommen. Bei Erkrankungen von Menschen sowie von Warmblütern wie Säugetieren und Vögeln findet sich hauptsächlich ssp. *enterica*. Die verbleibenden fünf Subspezies der Art *Salmonella enterica* (ssp. *salamae*, ssp. *arizonae*, ssp. *diarizonae*, ssp. *houtenae*, ssp. *indica*) sowie die Art *Salmonella bongori* kommen bei Kaltblütern wie Reptilien oder in der Umwelt vor. Innerhalb der Subspezies können die individuellen Isolate gemäß dem White-Kauffmann-Le Minor Schema [Kauffmann, 1941; Le Minor und Popoff, 1987; White, 1926] weiter in mehr als 2500 Serotypen (Serovare) differenziert werden. Dabei werden Salmonellenbakterien aufgrund der Kombination ihrer drei Oberflächenantigene serologisch identifiziert und einem entsprechenden Serovar zugeordnet [Hahn, 2009]. Die drei Oberflächenantigene unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihres Lipopolysaccharids (O-Antigen), in ihren Geißel-Antigenen (H1- und H2-Antigen) und falls vorhanden im Kapsel-Antigen (Vi-Antigen), sodass sich die Antigenformel gemäß O:H1:H2:Vi ergibt. Neu entdeckte Antigenformeln werden im White-Kauffmann-Le Minor-Schema regelmäßig neu erfasst und beschrieben [Grimont und Weill, 2007; Guibourdenche, et al., 2010].

Die Bezeichnung der einzelnen *Salmonella*-Isolate erfolgt durch die aufeinanderfolgende Angabe der Art (z.B. *S. enterica*), der Subspezies (z.B. Subspezies *enterica*) sowie dem Serovar (z.B. Serovar Typhimurium). Da mit Abstand der größte Teil aller bisher bekannten Serovare zu *S. enterica* Subspezies *enterica* gehört und für die Human- und Veterinärmedizin fast ausschließlich diese Subspezies von Bedeutung ist, wird die ausführliche Beschreibung meist nicht verwendet und z.B. das oben angegebene Serovar kurz als *S. Typhimurium* bezeichnet, wobei der Großbuchstabe sowie die nicht kursive Schreibweise für Serovare sich eindeutig von der Schreibweise der Subspezies abgrenzt [Köhler und Ansorg, 2001].

Der größte Teil der ca. 2500 Serovare der Subspezies *enterica* zählt zu den enteritischen Salmonellen, wie z.B. *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, deren O-Antigene (Lipopolysaccharide)

[Rietschel und Brade, 1987] für diese Arbeit als Erkennungsstruktur für die sensitive Schicht des Sensors eingesetzt wurden. Sie gehören zu den häufigsten Erregern infektiöser Gastroenteritis [Leyman, et al., 2011] und können bei immungeschwächten Menschen auch septische Infektionen hervorrufen. Sie werden meist durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel vom Tier auf den Mensch übertragen (Zoonosen) und grenzen sich hinsichtlich infektiologischer und pathogenetischer Eigenschaften stark von den typhösen Salmonellen *S. Typhi* und *S. Paratyphi* ab [Hahn, 2009]. Eine allgemeine chemische Struktur eines Lipopolysaccharids findet sich in Abbildung 9.



**Abbildung 9:** Allgemeine chemische Struktur eines Lipopolysaccharids aus Gram-negativen Enterobakterien modifiziert nach [Alexander und Rietschel, 2001].

Alle bisher bekannten Lipopolysaccharide setzen sich aus einer Polysaccharid-Einheit und einem Lipid A zusammen. Das Lipid A ist in der äußeren Membran des Bakteriums verankert und wirkt als Endotoxin, welches nach Absterben des Bakteriums freigesetzt wird. Die an das Lipid A angrenzende Kernregion kann in einen inneren und äußeren Bereich unterteilt werden. Am äußeren Bereich der Kernregion sitzt das O-Antigen. Dieses besteht aus sich wiederholender Sequenzen aneinandergereihter Oligosaccharideinheiten. Je nach Bakterienart und -stamm unterscheiden sich diese Sequenzen in ihren Komponenten und Funktionalisierungen.

Salmonellosen, d.h. Erkrankungen aufgrund von Salmonellen, sind in Deutschland gemäß §6 und §7 des Infektionsschutzgesetzes meldepflichtig. Im Jahr 2011 wurden in Deutschland rund 25000 Fälle zu Salmonellenerkrankungen gemeldet, 2012 betrug die Zahl gemeldeter Fälle rund 21000. Generell nimmt die Zahl der Salmonellosen seit 2001 (77 107) mit Ausnahme der Jahre 2006 und 2007 in allen Jahren ab, dennoch ist die Salmonellose nach wie vor die zweithäufigste an das Robert Koch-Institut übermittelte bakterielle Krankheit. Die meisten Salmonellosen werden im 3. Quartal übermittelt, was auf die begünstigte Vermehrung von Salmonellen bei steigenden Temperaturen zwischen 4 °C und 50 °C zurückgeführt werden kann [Robert Koch-Institut, 2013].

### 2.2.4 C-reaktives Protein (CRP)

Das C-reaktive Protein (CRP) gehört zur Familie der Pentraxine. Es besteht aus fünf identischen Untereinheiten, welche als Quartärstruktur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein 118 kDa schweres Pentamer bilden. Das CRP ist Teil des Immunsystems und gehört zu den Akute-Phase-Proteinen. Es wird in der Leber aufgrund einer entzündlichen Erkrankung gebildet und gelangt anschließend in den Blutkreislauf. CRP bindet an Phosphocholin und erkennt somit Phospholipidbestandteile, welche in Membrankomponenten von Viren, Bakterien und absterbenden körpereigenen Zellen vorkommen. Das mit Phosphocholin komplexierte CRP aktiviert das Komplementsystem, wodurch unter anderem eine unspezifische humorale Immunantwort ausgelöst wird und dadurch weitere immunologische Abwehrreaktionen folgen [Modrow, 2010].

Der Normwert für eine CRP-Konzentration bei Erwachsenen liegt in der Regel unter 10 mg/L und kann bei leichten oder viralen Infektionen auf bis zu 40 mg/L ansteigen. Bakterielle Infektionen stimulieren die Akute-Phase-Reaktion in einem vergleichsweise hohen Ausmaß, sodass die CRP-Konzentration bei Erwachsenen bei akuten bakteriellen Infektionen auf bis zu 200 mg/L oder darüber hinaus ansteigen kann [Clyne und Olshaker, 1999; Stuart und Whicher, 1988].

Somit kann durch die Bestimmung der CRP Konzentration im Blut auf das Stadium einer entzündlichen Erkrankung zurückgeschlossen werden, weshalb CRP in der medizinischen Diagnostik als unspezifischer Entzündungsmarker herangezogen wird [Hedlund, 1947; Solem, et al., 1995].

### 2.2.5 Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung

Die biomolekulare Erkennung, wie etwa die Antigen-Antikörper-Bindung, ist eine Affinitätsreaktion bei der das Zielmolekül (Ligand) über die Bindungstasche der Erkennungsstruktur (Rezeptor) erkannt und gebunden wird. Dabei wirkt zwischen Ligand und Rezeptor eine Vielzahl nicht kovalenter, attraktiver Wechselwirkungskräfte, welche meist eine Abstandsabhängigkeit aufweisen. Im Allgemeinen kann in elektrostatische Wechselwirkungen (Ion-Ion-WW, Ion-Dipol-WW), Van-der-Waals-Wechselwirkungen (Dipol-Dipol-WW, Dipol-induzierter Dipol-WW, Londonsche Dispersions-WW), Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen eingeteilt werden [Kauzmann, 1959].

Die zugrunde liegenden Potentiale der einzelnen Kräfte sind gemeinsam mit typischen Bindungsenergien in Tabelle 1 dargestellt, wobei die dort gemachten Angaben zur Abstandsabhängigkeit der jeweiligen Wechselwirkungskraft  $F$  unter Berücksichtigung der Brownschen Molekularbewegung gemacht wurden.



**Tabelle 1:** Übersicht über typische, der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zugrunde liegenden Kräfte, ihre zugrunde liegenden Potentiale, ihre Abstandsabhängigkeit unter Berücksichtigung der Brownschen Molekularbewegung sowie ihre Wechselwirkungsenergien.

Art der Wechselwirkung	Potentielle Energie $V_r$ für $T_{\text{klein}}$	Abhängigkeit Kraft $F(r)$ für $T_{\text{klein}}/T_{\text{groß}}$	Typische Wechselwirkungsenergie im Vakuum [kJ/mol] [Atkins, 2013]
Ion-Ion	$V_r = -\frac{q_1 \cdot q_2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot r}$	$r^{-2}$	250
Ion-Dipol	$V_r = -\frac{q_1 \cdot \mu_2 \cdot \cos\theta}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot r^2}$	$r^{-3}/r^{-5}$	15
Dipol-Dipol (rotierend)	$V_r = -\frac{2 \cdot \mu_1 \cdot \mu_2}{(4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0) \cdot r^3}$	$r^{-4}/r^{-7}$	0,3
Dipol-induzierter Dipol	$V_r = -\frac{4 \cdot \mu_1^2 \cdot \alpha_2}{(4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0)^2 \cdot r^6}$	$r^{-7}$	ca. 0,8
Induzierter Dipol-induzierter Dipol	$V_r = -\frac{2 \cdot \alpha_1 \cdot \alpha_2 \cdot I_1 \cdot I_2}{3 \cdot (I_1 + I_2) \cdot r^6}$	$r^{-7}$	2
Wasserstoffbrückenbindung	$V_r \sim r^{-6}$	$\sim r^{-7}$	20

$T$ : Temperatur,  $q$ : Ladung,  $r$ : Abstand zwischen wechselwirkenden Partnern,  $\theta$ : Winkel zwischen Ion und Dipol,  $\alpha$ : Polarisierbarkeit,  $I$ : Ionisierungsenergien,  $\epsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante des Vakuums

Für die potentielle Energie bei Wechselwirkungen mit permanenten Dipolen muss gemäß Gleichung 18 die Projektion des Dipols als Mittelwert berücksichtigt werden:

$$\langle \mu \rangle = \frac{\mu^2 \cdot E_r}{3 \cdot k \cdot T} \quad \text{Gleichung 18}$$

$\mu$ : Dipolmoment,  $E_r$ : elektrisches Feld,  $k$ : Boltzmannkonstante,  $T$ : Temperatur

Somit folgt für die potentielle Energie bei Ion-Dipol- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen unter Berücksichtigung der Brownschen Molekularbewegung Gleichung 19:

$$V_r = \langle \mu \cdot E_r \rangle = \frac{-\mu^2 \cdot E_r^2}{3 \cdot k \cdot T} \quad \text{Gleichung 19}$$

Die Wechselwirkung von induzierten Dipolen zu permanenten Dipolen oder zu induzierten Dipolen ist temperaturunabhängig.

Die Wechselwirkungskraft  $F$  berechnet sich aus der potentiellen Energie  $V_r$  der Wechselwirkung gemäß Gleichung 20:

$$F = \frac{dV_r}{dr} \quad \text{Gleichung 20}$$

Wasserstoffbrückenbindungen beruhen im Grunde genommen auch auf elektrostatischer Wechselwirkung und treten zwischen geladenen oder ungeladenen protonenhaltigen Molekülen auf, bei denen sich die Protonen an stark elektronegativen Atomen befinden. Da die Bindung auf einer Überlappung der Orbitale beruht, findet die Wechselwirkung nur statt, wenn sich die Moleküle berühren. Sie wird dann überwiegend über Van-der-Waals-Wechselwirkungen dominiert [Atkins, 2013].

Da biomolekulare Wechselwirkungen meist im wässrigen Medium stattfinden, muss die Dielektrizitätskonstante des Vakuums durch die Permittivität  $\epsilon$  nach Gleichung 21 ersetzt werden:

$$\epsilon = \epsilon_0 \cdot \epsilon_R \quad \text{Gleichung 21}$$

Daraus folgt, dass die Wechselwirkungsenergien aufgrund der hohen relativen Permittivität von Wasser ( $\epsilon_R \approx 80$ , zum Vergleich im Vakuum  $\epsilon_R \approx 1$ ) eher gering sind ( $V_r \sim \epsilon^{-1}$ ). Ein nicht zu vernachlässigender Anteil stellt deshalb neben Wasserstoffbrückenbindungen die hydrophobe Wechselwirkung dar, welche auf dem Entropieeffekt basiert [Fersht, 1987]. Dieser begründet sich darin, dass vor Beginn der Wechselwirkung die in der Bindungstasche befindlichen Wassermoleküle eine bestimmte Anordnung besitzen, welche während der Wechselwirkung mit dem Bindungspartner durch Verdrängung der Wassermoleküle aus der Bindungstasche aufgelöst wird. Zudem wird an Regionen des Bindungspartners, die in die Bindungstasche hineinragen, ein Teil der Solvathülle abgelöst. Da die Wassermoleküle im Volumen außerhalb der Bindungstasche eine größere Anzahl an Freiheitsgraden einnehmen können, steigt während des Bindungsvorgangs die Entropie, was energetisch günstiger ist.

Neben den in Tabelle 1 aufgeführten Wechselwirkungskräften werden auch die Eigenschaften der Bindungspartner von der Temperatur beeinflusst. So können z.B. zu hohe Temperaturen zur Denaturierung der Bindungspartner führen und es existieren optimale Temperaturbereiche, in denen die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung ohne Einschränkung stattfinden kann. Des Weiteren wird die biomolekulare Wechselwirkung vom pH-Wert sowie von der Ionenstärke des wässrigen Mediums maßgebend beeinflusst. Deshalb werden biomolekulare Reaktionen häufig in Pufferlösungen

sungen durchgeführt, da eine Änderung dieser Parameter die Wechselwirkungskräfte zwischen Rezeptor und Ligand und somit die Spezifität der Wechselwirkung stark beeinflussen kann [Wescott und Klibanov, 1994].

Die ursprüngliche Bindungsvorstellung, dass komplementäre Strukturen von Rezeptor und Ligand gemäß des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“ räumlich zueinander passen müssen, damit sie miteinander agieren können [Fischer, 1894], wurde 1958 durch das „Induced-fit-Konzept“ erweitert. Dieses besagt, dass Ligand und Rezeptor bei Annäherung zunächst in Wechselwirkung treten und dabei ihre Konformation dahingehend anpassen, dass sich der Rezeptor-Ligand-Komplex bilden kann [Koshland, 1958]. Diese Vorstellung gilt jedoch nicht uneingeschränkt für alle Bindungspartner, da ihrer Konformationsänderung natürliche Grenzen gesetzt sind. Entsprechend können Unterschiede in der Affinität und Spezifität einzelner Rezeptor-Ligand-Paare beobachtet werden.

### 2.2.6 Assayformate für Affinitätsreaktionen

Affinitätsreaktionen zwischen Rezeptor und Ligand können sowohl in homogener als auch in heterogener Phase stattfinden. Wird der in Lösung befindliche Ligand durch Bindung an einen Rezeptor nachgewiesen, welcher auf einer Oberfläche immobilisiert ist, handelt es sich um eine Reaktion in heterogener Phase, während die Wechselwirkung der Bindungspartner in Lösung als Reaktion in homogener Phase bezeichnet wird. Je nach Vorgehensweise in der Durchführung der Affinitätsreaktion kann des Weiteren unterteilt werden in direkte Assays, Sandwich-Assays und kompetitive Assays [Wild, 2005]. Welches Format für die Durchführung einer Affinitätsreaktion am geeignetsten ist, hängt sowohl von den Eigenschaften des nachzuweisenden Analyten als auch von der verwendeten Detektionsmethode (markierungsfrei oder markierungsbehaftet) ab.

Der Nachweis eines in flüssiger Phase vorliegenden Analyten unter Nutzung der spezifischen Antigen-Antikörper Wechselwirkung wird als Immunassay bezeichnet. Dieser wird üblicherweise im Bereich der Diagnostik genutzt, um Analyte wie etwa Proteine, Hormone, Lipopolysaccharide und Toxine nachzuweisen.

Immunassays werden häufig in heterogener Phase durchgeführt. Bei der Wahl eines direkten Assayformates ist eine Erkennungsstruktur (Antigen oder Antikörper) auf einer Oberfläche immobilisiert und der Analyt (Antikörper oder Antigen) wird dazugegeben. Zur Detektion muss dieser entweder über seine Eigenschaften selbst, wie etwa Brechungsindex oder Eigenfluoreszenz, oder über eine Markierung nachgewiesen werden, die z.B. eine radioaktive Substanz [Wide und Porath, 1966], ein Enzym [Voller, et al., 1978], ein Fluorophor [Bailey, et al., 1987] oder ein

Nanopartikel [Feng, et al., 2003] sein kann. Allerdings kann eine Markierung die biologische Aktivität der markierten Komponente beeinträchtigen und ist meist aufwändig sowie kostenintensiv. Deshalb ist es von Vorteil, markierungsfreie Verfahren zur direkten Analytdetektion einzusetzen, wobei deren Sensitivität für viele Analyte oftmals zu gering ist.

Häufig wird im Bereich der Diagnostik der Sandwich-Assay eingesetzt. Hier wird nach Zugabe des Analyten (Antigen) zur immobilisierten Fänger-Erkennungsstruktur (Fängerantikörper) eine markierte Detektions-Erkennungsstruktur (Detektionsantikörper) gegeben, welche ebenfalls an den Analyten bindet und dessen Anwesenheit somit „markiert“. Der Analyt muss folglich von zwei Erkennungsstrukturen spezifisch erkannt werden, bevor er nachgewiesen werden kann, was vorteilhaft bezüglich der Spezifität der Reaktion ist. Des Weiteren ist der Sandwich-Assay aufgrund der großen Vielfalt an Markierungsreagenzien für viele Detektionsmethoden universell einsetzbar. Allerdings ist seine Anwendung auf den Nachweis von nur solchen Analyten beschränkt, die mindestens zwei verschiedene Erkennungsstellen besitzen und die für die Anbindung der zwei Erkennungsstrukturen eine ausreichende Größe vorweisen. Der wohl prominenteste Vertreter eines Sandwich-Assays im Bereich der Diagnostik ist der ELISA [Engvall und Perlmann, 1971].

Weniger häufig wird der kompetitive Assay eingesetzt. Bei diesem wird die gegenüber Erkennungsstrukturen höhere Affinität von nativen (unmarkierter) Analytmolekülen im Vergleich zur Affinität von zur Erkennung eingesetzten Analytmolekülen genutzt. Kompetitive Assays werden fast ausschließlich unter Einsatz von Markierung verwendet, da zwischen nativen Analytmolekülen und für den Assay eingesetzten Analytmolekülen zur Generierung eines konzentrationsabhängigen Messsignals unterschieden werden muss. Dabei werden zur Analytlösung zusätzlich markierte Analytmoleküle gegeben, die bei gemeinsamer Zugabe über eine mit Erkennungsstrukturen versehene Oberfläche um deren Bindungsplätze konkurrieren. Bei einer anderen Variante, dem Verdrängungsassay, wird eine mit Erkennungsstrukturen versehene Oberfläche zunächst mit markierten Analytmolekülen abgesättigt, welche nach Zugabe der Analytlösung von den nativen Analytmolekülen teilweise verdrängt werden. Da in beiden Fällen das Signal von markierten Analytmolekülen generiert wird, entspricht folglich ein hohes Signal einer niedrigen Analytkonzentration.

Für sehr kleine Analyte (Antigene), die nicht für den Sandwich Assay geeignet sind, kann eine weitere Variante des kompetitiven Assays, der Bindungshemmtest, angewendet werden. In diesem Fall wird das Analytmolekül selbst bzw. ein Derivat auf einer Oberfläche immobilisiert. Um den Analyt in seiner wässrigen Phase nachzuweisen, wird zunächst eine bekannte Menge einer

Erkennungsstruktur (Antikörper) dazu gegeben. Wird diese vorinkubierte Lösung über die präparierte Oberfläche gegeben, so können noch freie Erkennungsstrukturen, welche in Lösung nicht von Analytmolekülen gebunden wurden, an immobilisierte Analytstrukturen der Oberfläche binden und ein Signal generieren (z.B. durch Markierung oder intrinsische Eigenschaften). Der Nachweis des Analyten erfolgt also indirekt über die Erkennungsstrukturen, welche nach der Inkubation mit dem Analyt noch frei vorliegen. Ein hohes Signal bedeutet, dass nach Inkubation mit den Analytmolekülen noch viele freie Erkennungsstrukturen vorliegen und folglich wenige Analytmoleküle vorhanden waren. Ein geringes Signal lässt darauf rückschließen, dass fast alle Erkennungsstrukturen bei Inkubation mit Analytmolekülen von diesen gebunden wurden, daher nicht mehr an die Oberfläche binden können und somit kein bzw. ein geringes Signal generieren.

### 2.2.7 Affinitätsreaktionen in heterogener Phase

Die Interaktion eines in Lösung befindlichen Liganden  $L$  mit einem Rezeptor  $R$ , welcher auf einer Oberfläche immobilisiert ist, lässt sich über folgende Reaktionsgleichung beschreiben:



Durch die Interaktion bildet sich ein Rezeptor-Ligand-Komplex  $RL$ , dessen thermodynamische Stabilität über die Affinitätskonstante  $K_{\text{aff}}$  beschrieben werden kann. Diese lässt sich über das Massenwirkungsgesetz ausdrücken, sowie über das Verhältnis der Assoziationsratenkonstante  $k_a$  zur Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  gemäß Gleichung 23:

$$K_{\text{aff}} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \quad \text{Gleichung 23}$$

$[R]$ ,  $[L]$ ,  $[RL]$ : Konzentrationen der beteiligten Stoffe

Aufgrund der Anbindung von Ligandmolekülen an den Rezeptor nimmt die Ligandkonzentration ausgehend vom Hauptvolumen der Lösung (bulk) in Richtung Oberfläche graduell ab. Der Bereich dieses Konzentrationsgradienten wird als Diffusionsschicht bezeichnet, was in Abbildung 10 veranschaulicht ist.

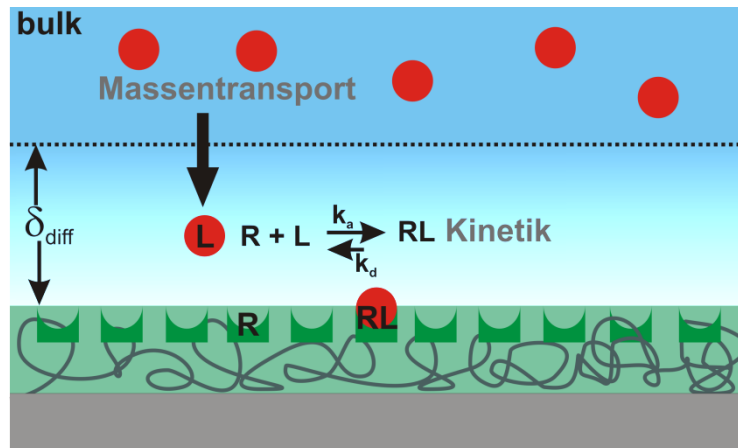


Abbildung 10: Rezeptor-Ligand Wechselwirkung an einer Grenzfläche.

Die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung an einer Grenzfläche setzt sich aus zwei Schritten zusammen, dem Massentransport des Liganden an die Oberfläche und der Wechselwirkungskinetik zwischen Ligand und Rezeptor an der Oberfläche. Es handelt sich somit formal um eine Folge-reaktion und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser beiden Prozesse wird detektiert.

Bei wenigen Rezeptormolekülen an der Oberfläche und einer vergleichsweise hohen Ligandkonzentration in Lösung diffundieren viel mehr Liganden an die Oberfläche, als tatsächlich daran gebunden werden können. Die Diffusion der Liganden an die Oberfläche ist somit deutlich schneller als die Ausbildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes, sodass die Kinetik der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, der an der Oberfläche detektiert wird.

Die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes verläuft nach einem bimolekularen Mechanismus, während der Zerfall des Komplexes nach einem monomolekularen Mechanismus verläuft. Für die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes lässt sich somit folgende Geschwindigkeitsgleichung aufstellen:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a \cdot [L] \cdot [R] - k_d \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 24}$$

Da die Konzentration an immobilisiertem Rezeptor  $[R]$  zum Zeitpunkt  $t$  durch die Differenz aus der Rezeptorkonzentration  $[R]_0$  an der Oberfläche zum Zeitpunkt null und der Konzentration an Rezeptor-Ligand-Komplex  $[RL]$  an der Oberfläche zum Zeitpunkt  $t$  dargestellt werden kann, ergibt sich mit  $[R] = [R]_0 - [RL]$ :

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a \cdot [L] \cdot ([R]_0 - [RL]) - k_d \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 25}$$

Die theoretisch mögliche maximale Beladung  $\Gamma_{\max}$  der Oberfläche ist proportional zur Rezeptorkonzentration  $[R]_0$  an der Oberfläche und die resultierende Beladung  $\Gamma$  der Oberfläche ist proportional zur Konzentration an Rezeptor-Ligand-Komplex  $[RL]$  auf der Oberfläche, woraus folgt:

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_a \cdot [L] \cdot (\Gamma_{\max} - \Gamma) - k_d \cdot \Gamma \quad \text{Gleichung 26}$$

Nach Umformung von Gleichung 26 ergibt sich Gleichung 27 zu:

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_a \cdot [L] \cdot \Gamma_{\max} - (k_a \cdot [L] + k_d) \cdot \Gamma \quad \text{Gleichung 27}$$

Werden kinetische Messungen im Fluss durchgeführt, so kann die Ligandkonzentration nahe der Oberfläche als konstant betrachtet werden und es liegt eine Kinetik pseudo erster Ordnung vor.

Durch Auftragung von  $\frac{d\Gamma}{dt}$  gegen  $\Gamma$  erhält man eine Gerade, deren Steigung die „scheinbare“ Ratenkonstante  $k_s$  enthält, für die sich nach Gleichung 27 ergibt:

$$k_s = k_a \cdot [L] + k_d \quad \text{Gleichung 28}$$

Durch Auftragung der scheinbaren Ratenkonstanten gegen die im bulk eingesetzte Ligandkonzentration kann aus der Steigung die Assoziationsratenkonstante  $k_a$  und aus dem Ordinatenabschnitt die Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  abgelesen werden, wodurch gemäß Gleichung 23 auch die Affinitätskonstante  $K_{\text{aff}}$  berechnet werden kann.

Durch mathematische Umformung und Integration von Gleichung 27 ergibt sich:

$$\Gamma = \Gamma_{GGW} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot t}) \quad \text{Gleichung 29}$$

Die scheinbare Ratenkonstante spiegelt folglich die Krümmung der Exponentialkurve wieder. Die Gleichgewichtsbeladung  $\Gamma_{GGW}$  ist die in Abhängigkeit der Ligandkonzentration maximal erreichbare Oberflächenbeladung und kann unter der Annahme, dass keine Wechselwirkung der Liganden untereinander erfolgt, alle Rezeptorstellen auf der Oberfläche gleichermaßen zur Verfügung stehen und maximal eine Monolage an Ligand adsorbiert wird, durch eine Langmuirsche Adsorptionsisotherme entsprechend Gleichung 30 beschrieben werden:

$$\Gamma_{GGW} = \Gamma_{\max} \cdot \frac{K_{\text{aff}} \cdot [L]}{1 + K_{\text{aff}} \cdot [L]} \quad \text{Gleichung 30}$$

Nach Umformung zu Gleichung 31 kann über einen Scatchard-Plot durch Auftragung von  $\frac{\Gamma_{GGW}}{[L]}$  gegen  $\Gamma_{GGW}$  aus der Steigung ebenso die Affinitätskonstante ermittelt werden:

$$\frac{\Gamma_{GGW}}{[L]} = K_{aff} \cdot \Gamma_{max} - K_{aff} \cdot \Gamma_{GGW} \quad \text{Gleichung 31}$$

Befinden sich viele Rezeptormoleküle an der Oberfläche und ist die Ligandkonzentration in Lösung vergleichsweise gering, so wird jeder Ligand sofort einen freien Rezeptor an der Oberfläche vorfinden und an diesen binden, weshalb die Diffusion des Liganden an die Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, der an der Oberfläche detektiert wird.

Die Diffusion der Liganden an die Oberfläche folgt dem 1. Fickschen Gesetz gemäß

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad \text{Gleichung 32}$$

wobei  $J$  der Fluss,  $D$  der Diffusionskoeffizient und  $\frac{\partial c}{\partial x}$  der Konzentrationsgradient ist.

Unter der Annahme, dass der Konzentrationsgradient des Liganden zwischen bulk und Oberfläche (OF) durch die Diffusionsschicht hinweg linear verläuft und somit die Ligandkonzentration an der Oberfläche gleich 0 ist, ergibt sich für den Konzentrationsgradienten Gleichung 33:

$$\frac{\partial c}{\partial x} = \frac{[L]_{OF} - [L]_{bulk}}{d_{diff}} = -\frac{[L]_{bulk}}{d_{diff}} \quad \text{Gleichung 33}$$

Die Dicke  $d_{diff}$  der Diffusionsschicht setzt sich gemäß Gleichung 34

$$d_{diff} = \sqrt[3]{\frac{D \cdot h^2 \cdot b \cdot l}{F}} \quad \text{Gleichung 34}$$

aus der Höhe  $h$ , der Breite  $b$  und der Länge  $l$  des Flusskanals sowie der Flussgeschwindigkeit  $F$  zusammen.

Die Diffusion der Liganden an die Oberfläche kann somit durch Einsetzen von Gleichung 33 und Gleichung 34 in Gleichung 32 beschrieben werden durch,

$$J = D \cdot \frac{[L]_{bulk}}{d_{diff}} = D \cdot \frac{[L]_{bulk}}{\sqrt[3]{\frac{D \cdot h^2 \cdot b \cdot l}{F}}} = \frac{d[L]_{OF}}{dt} = \frac{d[RL]}{dt} \quad \text{Gleichung 35}$$



und entspricht gleichzeitig der Komplexbildungsgeschwindigkeit. Aus Gleichung 35 folgt, dass die Komplexbildungsgeschwindigkeit  $\frac{d[RL]}{dt}$  proportional zur Konzentration bindungsfähiger Liganden im bulk  $[L]_{bulk}$  ist.

Durch Arbeiten im Fluss kann die Ligandkonzentration im bulk  $[L]_{bulk}$  als konstant angesehen werden, da stets neue Lösung mit gleicher Ligandkonzentration nachgeliefert wird. Da die Rezeptorkonzentration  $[R]$  auf der Oberfläche im Vergleich zur Ligandkonzentration in Lösung  $[L]_{bulk}$  sehr hoch ist, kann diese bis zum Zeitpunkt, an dem vergleichsweise weniger freie Rezeptoren an der Oberfläche als Liganden in Lösung vorliegen, ebenfalls als konstant betrachtet werden, sodass ein lineares Bindungssignal erhalten wird.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Standardchemikalien

Aceton	Aceton, MG: 58,08 g/mol, CAS: 67641, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid Dihydrat, MG: 147,01 g/mol, CAS: 10035-04-8, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid, MG: 126,20 g/mol, CAS: 693-13-0, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMF	N,N-Dimethylformamid, MG: 73,09 g/mol, CAS: 68-12-2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DS	Decansäure, MG: 172,26 g/mol, CAS: 334-48-5, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
GA	Glutarsäureanhydrid, MG: 114,10 g/mol, CAS: 108-55-4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid, MG: 95,53 g/mol, CAS: 50-01-1 Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Glycin	Glycin, MG: 75,1 g/mol, CAS: 56-40-6, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
GOPTS	(3-Glycidylxypropyl)trimethoxysilan, MG: 236,34 g/mol, CAS: 2530-83-8, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 % Wasserstoffperoxidlösung, MG: 34,01 g/mol, CAS: 77-22841, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rauchende Schwefelsäure (95-97 %), MG: 98,08 g/mol, CAS: 7664-93-9, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HCl	Salzsäure (37 %), MG: 36,46 g/mol, CAS: 7647-01-0, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, MG: 238,3 g/mol, CAS: 7365-45-9, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat, MG: 136,09 g/mol, CAS: 7778770, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

KOH	Kaliumhydroxid, MG: 56,11 g/mol, CAS: 1310-58-3, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Natriumchlorid, MG: 58,44 g/mol, CAS: 7647-14-5, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Natriumhydroxid, MG: 40,00 g/mol, CAS: 1310-73-2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NHS	N-Hydroxysuccinimid, MG: 115,09 g/mol, CAS: 6066-82-6, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pepsin	Pepsin, CAS: 9001-75-6, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
SDS	20 % Natriumdodecylsulfatlösung, MG: 288,38 g/mol, CAS: 151-21-3, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

### 3.1.2 Biochemikalien

AMD 10 %	Aminodextran, MW: 100 kDa, 10 % Aminierungsgrad, Innovent e.V., Jena, Deutschland
AMD 50 %	Aminodextran, MW: 100 kDa, 50 % Aminierungsgrad, Innovent e.V., Jena, Deutschland
anti-CRP	Monoklonaler Antikörper (Maus, IgG <sub>2a</sub> ) gegen C-reaktives Protein, C5 Klon, M86005M, Meridian Life Science, Inc., Memphis, USA
anti-LPS	Polyklonaler Antikörper (Kaninchen, IgG) gegen <i>Salmonella</i> O- und H-Antigene, 8209-4006, AbD Serotec, Oxford, UK
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin), CAS: 9048-46-8, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
CRP	C-reaktives Protein, A97201H, Meridian Life Science, Inc., Memphis, USA
FBS	Fötales Rinderserum (fetal bovine serum), F7524, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
LPS Enteritidis	Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella enterica</i> , Serovar Enteritidis, L7770, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
LPS Typhimurium	Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella enterica</i> , Serovar Typhimurium, L6143, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Negativserum Huhn	anti- <i>Salmonella</i> Antikörper negatives Referenzserum aus Huhn, VLDIA030, GD Animal Health Service, Deventer, Niederlande

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

Negativserum Schwein	anti- <i>Salmonella</i> Antikörper negatives Referenzserum aus Schwein, VLDIA227, GD Animal Health Service, Deventer, Niederlande
S. Enteritidis Positivserum Huhn	anti S. Enteritidis Antikörper positives Referenzserum aus Huhn, VLDIA058, GD Animal Health Service, Deventer, Niederlande
S. Typhimurium Positivserum Huhn	anti S. Typhimurium Antikörper positives Referenzserum aus Huhn, VLDIA059, GD Animal Health Service, Deventer, Niederlande
S. Typhimurium Positivserum Schwein	anti S. Typhimurium Antikörper positives Referenzserum aus Schwein, VLDIA076, GD Animal Health Service, Deventer, Niederlande

#### 3.1.3 Lösungen

0,1 % SDS	5 mL einer 20 % SDS-Lösung mit 995 mL bidestilliertem Wasser versetzt, mit HCl auf pH 2 titriert
0,5 % SDS	25 mL einer 20 % SDS-Lösung mit 975 mL bidestilliertem Wasser versetzt, mit HCl auf pH 2 titriert
Glycin	750,7 mg (10 mmol) in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst, mit HCl auf pH 3,2 titriert, frisch hergestellt
Guanidinhydrochlorid	573,18 g (6 mol) in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst, mit HCl auf pH 1,5 titriert
HEPES	2,38 g (10 mmol) HEPES 8,76 g (150 mmol) NaCl 0,29 g (5mM) CaCl <sub>2</sub> in 1 L bidestilliertem Wasser, mit NaOH auf pH 7,4 titriert
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline) 8,76 g (150 mmol) NaCl 1,36 g (10 mmol) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst, mit KOH auf pH 7,4 titriert
Pepsin	100 mg in 5 mL bidestilliertem Wasser gelöst, zu 45 mL PBS pH 2,0 gegeben und auf pH 1,9 titriert
Piranha	60 vol. % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (konz., 96 %ig) 40 vol. % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig), frisch hergestellt

#### 3.1.4 Glasträger und andere Substrate

Galliumarsenid	Galliumarsenidtransducer, (10 x 5 mm) WV 8835/Si, (100) ± 0,1 (n <sub>500</sub> = 4,33) Wafer Technology Ltd, Tongwell, UK
----------------	--

Goetheglas	Dreischichtiger Glastransducer, (10 x 10 mm bzw. 37 x 12 mm) Schichten aufgebaut in der Reihenfolge BK7-Glassubstrat ( $n_{500} = 1,52$ ) 45 nm $Ta_2O_5$ ( $n_{500} = 2,2$ ) 20 nm $SiO_2$ ( $n_{500} = 1,46$ ) Berliner Glas, Berlin, Deutschland
Interferenzglas	Dreischichtiger Glastransducer, (12 x 12 mm) Schichten aufgebaut in der Reihenfolge D263-Glassubstrat ( $n_{500} = 1,52$ ) 10 nm $Ta_2O_5$ ( $n_{500} = 2,2$ ) 330 nm $SiO_2$ ( $n_{500} = 1,46$ ) Oerlikon Balzers AG, Balzers, Liechtenstein
Silizium	Siliziumtransducer, (ca. 12 x 12 mm) ( $n_{500} = 4,30$ ) Wacker-Chemitronic GmbH, Burghausen, Deutschland

### 3.1.5 Geräte

#### 3.1.5.1 RfS-Aufbau

##### *Optische Komponenten*

- Diodenzeilenspektrometer, SPEKOL 1100, modifiziert nach [Kraus, 1993], Analytik Jena, Jena, Deutschland
- Weißlichtquelle (5 V, 10 W Halogenlampe), Oshino Lamps, Nürnberg, Deutschland
- Linsen, Spiegel, Positioneroptik, Spindler & Hoyer, Göttingen, Deutschland
- Lichtleiter auf Polymethylmethacrylat (PMMA)-Basis, 1 mm Faserdurchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler, Boehringer Ingelheim microParts GmbH, Dortmund, Deutschland

##### *Fluidische Komponenten*

- Fließinjektionsanalyse und Autosampler, ASIA, System aus 2 Peristaltikpumpen, Fixpumpenleistung 20 U/min, Variopumpenleistung maximal 50 U/min in 100 Schritten regelbar, 6-Wege-Ventil, Injektionsventil, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
- Flusszelle aus Plexiglas mit 50  $\mu\text{m}$  tief eingefrästem Flusskanal und O-Ring für Messungen auf transparenten Sensorchips
- Flusszelle aus PDMS mit 100  $\mu\text{m}$  tiefem Flusskanal für Messungen auf Galliumarsenid, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Biometrics GmbH, Tübingen, Deutschland

#### 3.1.5.2 1-lambda-Reflektometrie-Aufbau

##### *Optische Komponenten*

- Detektionsmodul für Einzel-Spot-Messungen, ESE-LOG USB (ESM001-MB-1033), mit zwei Hochleistungs-Leuchtdioden der Wellenlängen 470 nm und 520 nm sowie zwei Low Noise Si-Photodioden mit Vorverstärker, System aus integrierten Linsen und Spiegeln in konfokaler Anordnung und Linsentubus mit Fokusslänge 6 mm, integriert in einem

97 x 55 x 15 mm-Aluminiumgehäuse, Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, Deutschland

- Positioneroptik von Spindler & Hoyer, Göttingen, Deutschland
- Detektionsmodul für Multi-Spot-Messungen, ESE-LOG USB (ESM001-MB-1033) integriert in umgebautem Mikrotiterplatten-Reader (ESRE02-MB-0210) mit x-y-Verschiebeeinheit, Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, Deutschland

#### **Fluidische Komponenten**

- Doppelhub-Spritzen-Pumpe, Hamilton dilutor Microlab 540B, Microlab MVP mit 8-Wege-Ventil HVXM 8-5 H36766, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
- Autosampler, CETAC ASX-130, 60 trays, CETAC Technologies, Omaha, USA
- Flusszelle für Einzel-Spot-Messungen aus Plexiglas mit 50 µm tief eingefrästem Flusskanal und O-Ring
- Flusszellen für Multi-Analyt-Messungen aus PDMS, mit 100 µm tiefem Flusskanal, diversen Flusskanalbreiten von 1 mm, 2 mm und 3 mm und einer Flusskanallänge von 27 mm, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Biometrics GmbH, Tübingen, Deutschland

#### **3.1.5.3 Ellipsometer**

- Spektralellipsometer ES4G, Sopra, Paris, Frankreich

#### **3.1.5.4 Kontaktwinkelmessgerät**

- CAM 200, KSV, Helsinki, Finnland

#### **3.1.5.5 Plasmaverascher**

- 100-E Plasma System, Plasmaveraschungen wurden bei 300 W unter 0,8 mbar O<sub>2</sub> über eine Dauer von 10 min durchgeführt, TePla Technics Plasma Europe GmbH, Kirchheim, Deutschland
- Corona Treater, BD-20V, Plasmaveraschungen wurden bei 5-30 Watt (10-45 V, 4,5 MHz) an Luft über eine Dauer von ca. 1 Minute durchgeführt, Electro-Technic Products Inc, Ravenswood Chicago, USA

#### **3.1.5.6 Waagen**

- Präzisionswaage, XS 205 DualRange, d=0,01 mg, Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
- Präzisionswaage, ACCULAB VIC612, d=0,01 g, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

#### **3.1.5.7 pH-Meter**

- pH-Meter CG 843, Schott, Mainz, Deutschland

#### **3.1.5.8 Ultraschallbad**

- Sonorex Super 10 P, Bandelin, Berlin, Deutschland

#### **3.1.5.9 Reinstwasseranlage**

- PURELAB Classic (pl5241), ELGA LabWater, Celle, Deutschland

### 3.1.5.10 Pipetten

- Variable Eppendorf Reference Pipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.1.5.11 Simulationssoftware

- Software Film Wizard TM Version 6.2.3, verwendet zur Simulation optischer Eigenschaften von Dünnschichtsystemen, Materialeigenschaften aus Softwarebibliothek sowie aus speziell erzeugten Datensätzen entnommen [Hehl, 1998], SCI Scientific Computing International, Carlsbad Kalifornien, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Modifikation von Glastypoberflächen und anderen Substraten

Die Modifikation von Transducern zur Immobilisierung von Erkennungsstrukturen spielt bei der Etablierung von Biosensoren eine zentrale Rolle. Durch geeignete Präparationsschritte wird die Erzeugung stabiler, sensitiver Schichten angestrebt, die den entsprechenden Analyten selektiv erkennen und gegenüber unspezifischen Wechselwirkungen abgeschirmt sind. Zudem ist eine Regenerierbarkeit der präparierten Oberflächen von Vorteil, sodass auf einem Sensorchip durch Anwendung einer geeigneten Regenerationslösung mehrere Messungen nacheinander erfolgen können. Unter Berücksichtigung dieser drei Aspekte – Stabilität, Selektivität und Regenerierbarkeit – werden die in dieser Arbeit verwendeten Sensorchips hergestellt.

#### 3.2.1.1 Reinigung und Aktivierung

##### *Glastransducer*

Glastransducer werden ca. eine Minute in 6 M KOH gereinigt, anschließend mit Wasser abgespült und im Ultraschallbad in einer frisch hergestellten Piranha-Lösung 15 Minuten lang inkubiert. Anschließend werden die Transducer mit bidestilliertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Es erfolgt eine zügige Weiterverarbeitung.

##### *Galliumarsenidtransducer*

Transducer aus Galliumarsenid werden ca. eine Minute in 6 M KOH inkubiert, anschließend mit Wasser abgespült und je zehn Minuten lang im Ultraschallbad in Aceton und Isopropanol gereinigt. Danach werden die Transducer mit Ethanol abgespült und im Stickstoffstrom trockengeblasen. Nach der Reinigung der Transducer erfolgt die Aktivierung im Plasma unter Raumatmosphäre bzw. im reinen Sauerstoffplasma.

In diesem Schritt werden auf der Siliziumdioxidschicht Silanolgruppen und auf der oxidierten Galliumarsenidschicht endständige Hydroxygruppen erzeugt und der Transducer wird sehr hyd-

rophil. Durch Reaktionen der Silanol- bzw. Hydroxygruppen untereinander kommt es wieder zur Desaktivierung der Oberfläche, weshalb die Transducer zügig weiterverarbeitet werden sollten.

#### **3.2.1.2 Silanisierung**

Zur Silanisierung wird jeweils ein frisch aktivierter Transducer in eine trockene Glaskammer gelegt, mit einem Volumen von 7,5  $\mu\text{L}$  GOPTS betropft und mit einem weiteren Transducer mit der zu beschichtenden Seite nach unten abgedeckt (Sandwichverfahren). Nach einer Stunde Inkubation in der Glaskammer werden die einzelnen Transducer mit wasserfreiem Aceton abgespült und im Stickstoffstrom trockengeblasen.

Durch diesen Schritt wird ein Linker auf dem Transducer eingeführt, der aufgrund seiner endständigen Epoxidgruppe über eine Reaktion mit funktionellen Gruppen eine stabile, kovalente Anbindung der sensitiven Schicht ermöglicht. Die frisch silanierten Transducer werden aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit dieser Epoxidgruppe zügig weiterverarbeitet.

#### **3.2.1.3 Immobilisierung von AMD**

Zur Immobilisierung des Biopolymers AMD wird auf einen frisch silanierten Transducer 10  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus AMD in bidestilliertem Wasser der Konzentration 0,2 mg/ $\mu\text{L}$  gegeben und mit einem weiteren silanierten Transducer im Sandwichverfahren abgedeckt. Nach ca. 24 Stunden Reaktionszeit in einer mit Wasserdampf gesättigten Glaskammer werden die einzelnen Transducer mit bidestilliertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

In diesem Schritt wird durch die kovalente Anbindung des Biopolymers eine Basis für den weiteren Aufbau der sensitiven Schicht geschaffen, welche zum einen die Eigenschaft aufweist, die Oberfläche gegenüber unspezifischen Wechselwirkungen abzuschirmen und zum anderen vergleichsweise viele endständige Aminogruppen für die darauf folgende Immobilisierung von Erkennungsstrukturen zur Verfügung stellt [Piehler, et al., 1996; Piehler, et al., 1999]. Die präparierten Transducer können mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden, ohne dass bei deren Verwendung eine Veränderung in den Messergebnissen beobachtet werden kann.

Die bei der kovalenten Immobilisierung von Aminodextran auf einem Glastransducer ablaufenden Reaktionsschritte sind in Abbildung 11 dargestellt.



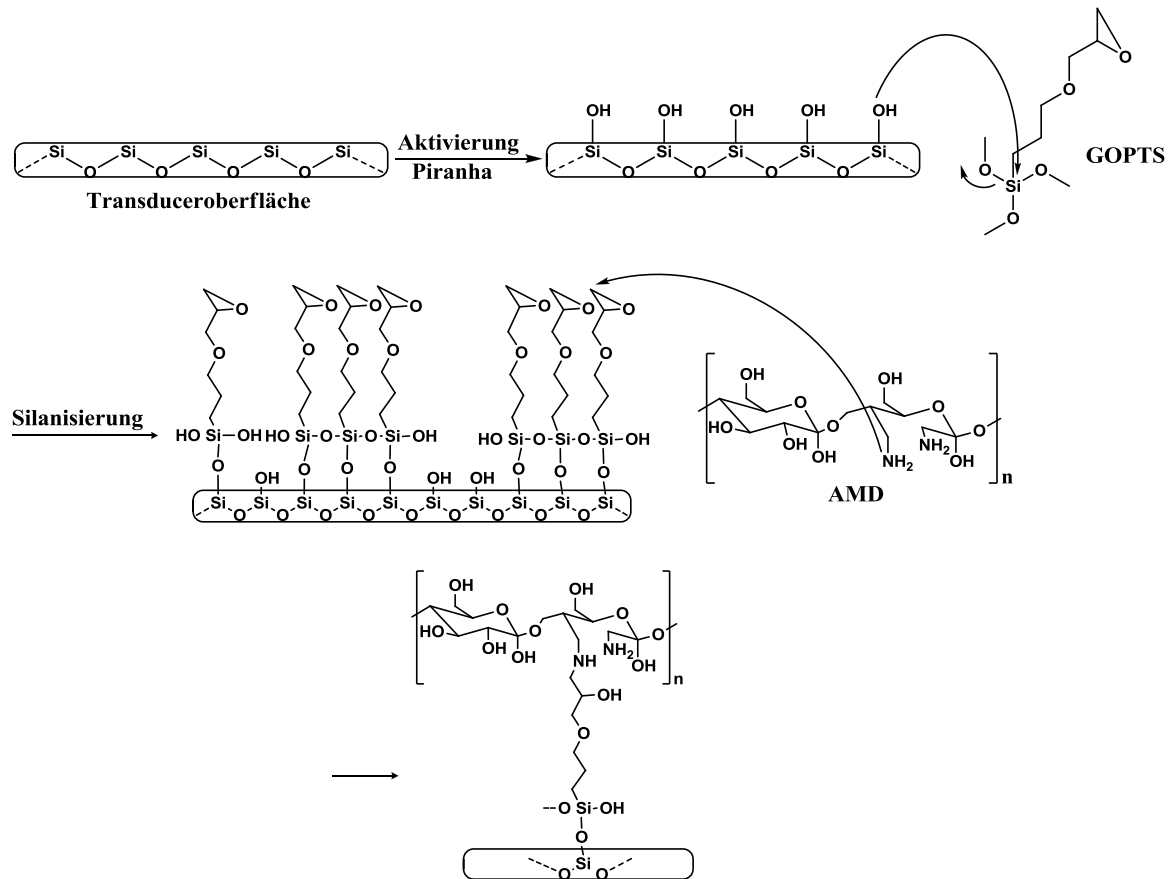


Abbildung 11: Oberflächenmodifikation eines Glastransducers zur Immobilisierung von Aminodextran.

### 3.2.1.4 Immobilisierung von Lipopolysacchariden

#### a) Modifikation mit Decansäure

Zur Immobilisierung von Decansäure wird zu einer Lösung aus 0,5 mg Decansäure in 8  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF ein Volumen von 1,3  $\mu\text{L}$  DIC gegeben. Diese Mischung wird auf einen mit AMD beschichteten Transducer getropft und mit einem zweiten AMD Transducer mit der beschichteten Seite nach unten abgedeckt. Nach einer Reaktionszeit von 6 Stunden in einer mit DMF-Dampf gesättigten Glaskammer werden die einzelnen Transducer zunächst mit DMF und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

In diesem Schritt wird durch Reaktion der Carboxygruppe der Decansäure mit der Aminfunktion des AMD die Oberfläche mit Decanresten modifiziert, was zu einer Erhöhung der Hydrophobizität der Oberfläche führt. Die präparierten Transducer können bei 4 °C über mehrere Wochen hinweg aufbewahrt werden.

#### b) Modifikation mit Lipopolysacchariden

Zur Immobilisierung von Lipopolysacchariden wird ein Volumen von 15  $\mu\text{L}$  einer 1 mg/mL konzentrierten Lipopolysaccharidlösung in PBS auf die Mitte eines mit Decanresten beschichteten Transducers getropft und über eine Dauer von mindestens 24 Stunden in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer inkubiert. Erst vor Einbau der Transducer in den Messaufbau werden diese mit bidestilliertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

In diesem Schritt wird das Lipopolysaccharid durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen seinem Lipid A Rest und der Decanoberfläche nicht-kovalent immobilisiert. Die präparierten Transducer sind bei weiterer Aufbewahrung in der mit Wasserdampf gesättigten Glaskammer über eine Dauer von mehreren Monaten stabil.

Die bei der Immobilisierung von Lipopolysacchariden ablaufenden Reaktionsschritte auf einem mit AMD beschichteten Glastransducer sind in Abbildung 12 dargestellt.

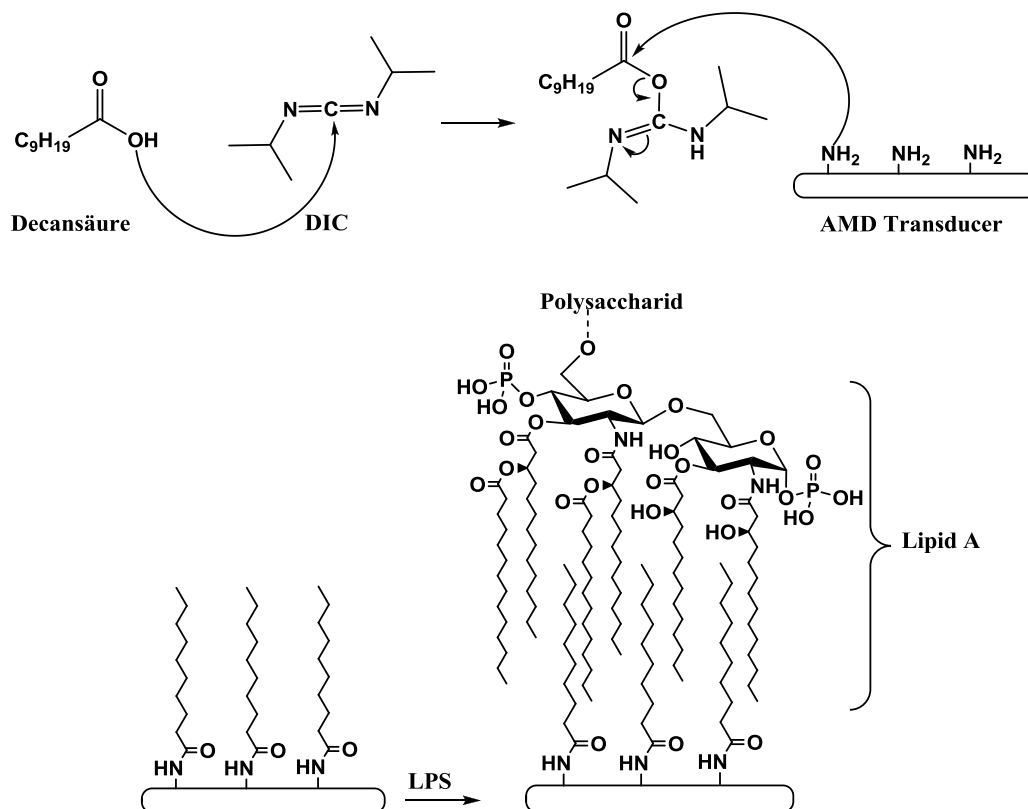


Abbildung 12: Oberflächenmodifikation eines mit AMD beschichteten Transducers zur Immobilisierung von Lipopolysacchariden.

### 3.2.1.5 Immobilisierung von anti-CRP Antikörpern

#### **a) Modifikation von AMD mit Carboxygruppen**

Zur Einführung von Carboxygruppen an AMD beschichteten Transducern werden 7,5  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus 2 mg/ $\mu\text{L}$  Glutarsäureanhydrid in wasserfreiem DMF auf einen AMD beschichteten Transducer gegeben und mit einem zweiten AMD Transducer mit der beschichteten Seite nach unten abgedeckt. Nach sechs Stunden Inkubation in einer mit DMF-Dampf gesättigten Glaskammer werden die Transducer zunächst mit DMF und anschließend mit bidestilliertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

In diesem Schritt werden endständige Carboxygruppen auf AMD erhalten, die es ermöglichen, in folgenden Schritten aminofunktionalisierte Liganden zu immobilisieren. Die erhaltenen Transducer können bei 4 °C über mehrere Wochen hinweg gelagert werden.

#### **b) Aktivierung von Carboxygruppen**

Zur Aktivierung von Carboxygruppen wird eine Lösung aus 5,7 mg NHS in 38  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF hergestellt und mit 12  $\mu\text{L}$  DIC versetzt, diese Mischung auf einen mit Glutarsäure beschichteten Transducer mit einem Volumen von 7,5  $\mu\text{L}$  aufgetropft und mit einem weiteren Transducer im Sandwichverfahren abgedeckt. Nach vier Stunden Reaktionszeit in einer mit DMF-Dampf gesättigten Glaskammer werden die Transducer zunächst mit wasserfreiem DMF und anschließend mit wasserfreiem Aceton abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

In diesem Schritt wird durch Reaktion der Carboxygruppen auf der Oberfläche mit dem NHS ein reaktiver Aktivester gebildet, der die nachfolgende Umsetzung mit aminofunktionalisierten Liganden ermöglicht. Daher sollten die Transducer nach diesem Präparationsschritt sofort weiterverarbeitet werden.

#### **c) Modifikation mit anti-CRP Antikörpern**

Für die Immobilisierung von anti-CRP Antikörpern werden 10  $\mu\text{L}$  einer anti-CRP Antikörperlösung mit einer Konzentration von 0,1 g/L in PBS auf einen mit Aktivester modifizierten Transducer gegeben und mit einem weiteren frisch aktivierten Transducer mit der beschichteten Seite nach unten abgedeckt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit in einer mit Wasserdampf gesättigten Glaskammer bei Raumtemperatur werden die Transducer über Nacht bei 4 °C weiter inkubiert.

In diesem Schritt reagieren Aminofunktionen der Antikörper mit dem Aktivester auf der Oberfläche, sodass die Antikörper kovalent immobilisiert werden. Die Sensorchips können ca. 4 Tage bei 4 °C in der mit Wasserdampf gesättigten Kammer gelagert werden.

Die bei der Immobilisierung von anti-CRP Antikörpern ablaufenden Reaktionsschritte auf einem mit AMD beschichteten Glastransducer sind in Abbildung 13 dargestellt.

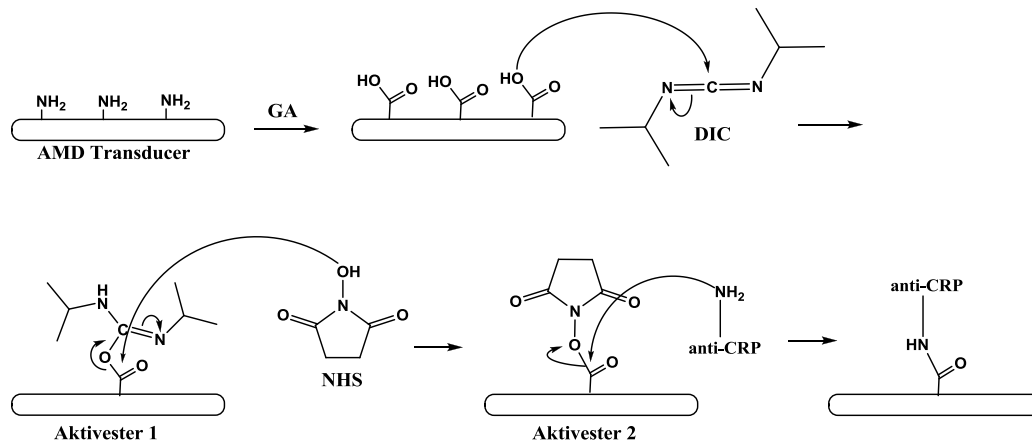


Abbildung 13: Oberflächenmodifikation eines mit AMD beschichteten Transducers zur Immobilisierung von anti-CRP Antikörpern.

#### 3.2.1.6 Immobilisierung von LPS und anti-CRP Antikörpern auf einem Transducer

Die Vorgehensweise zur Transducermodifikation für Zwei-Spot-Messungen unterscheidet sich bis zur Beschichtung der Transducer mit AMD lediglich im eingesetzten Volumen der Reagenzien. Aufgrund der ca. 4,5-mal größeren Fläche bei Transducern für Zwei-Spot-Messungen wird das eingesetzte Volumen um diesen Faktor erhöht. Alle Präparationsschritte werden jeweils in Analogie zur oben beschriebenen Vorgehensweise unter Verwendung gleicher Konzentrationen sowie in den entsprechenden Glaskammern durchgeführt.

Für die parallele Modifikation der AMD Transducer mit Decansäure an einer Position und Glutarsäureanhydrid an einer anderen Position werden jeweils 5 µL der unter Abschnitt 3.2.1.4 und 3.2.1.5 beschriebenen Lösungen an die entsprechenden Positionen aufgetropft und mit einem 18 x 18 mm großen, unbeschichteten Deckglas abgedeckt. Die zwei Positionen werden dabei in einem Abstand zueinander gewählt, dass ein ungewolltes Ineinanderlaufen der unterschiedlichen Lösungen verhindert wird.

Für die Aktivierung der Glutarsäure-Position für die nachfolgende Immobilisierung von anti-CRP Antikörpern werden ebenfalls 5 µL der unter 3.2.1.5 beschriebenen Aktivierlösung unter Verwendung eines Deckglases aufgebracht. Während dieser Inkubationszeit erfolgt an der Decanposition keine Modifizierung.

Bei Umsetzung mit den entsprechenden Erkennungsstrukturen wird an der Decanposition das LPS analog zur unter 3.2.1.4 beschriebenen Vorgehensweise aufgetropft, während an der Aktiv-

esterposition ein Volumen von 5  $\mu\text{L}$  der in Abschnitt 3.2.1.5 beschriebenen anti-CRP Antikörperlösung unter Verwendung eines Deckglases aufgebracht wird.

Die einzelnen Präparationsschritte an beiden Positionen nach der flächigen Beschichtung der Transducer mit AMD sind in Abbildung 14 dargestellt.

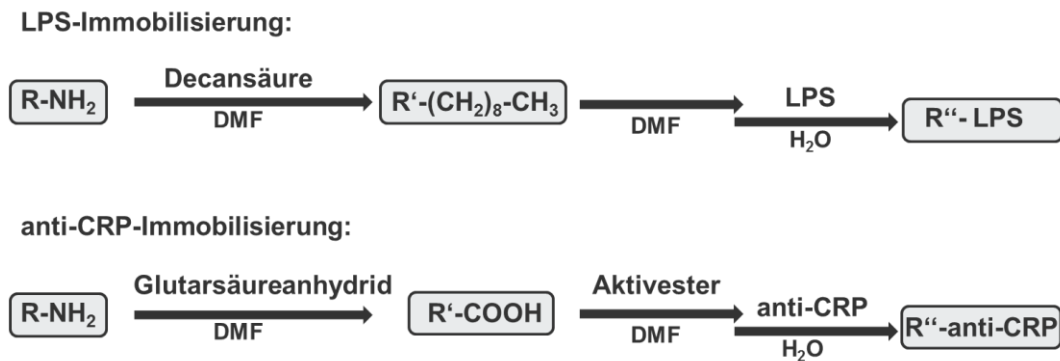


Abbildung 14: Einzelne Präparationsschritte zur parallelen Beschichtung eines AMD beschichteten Transducers an zwei Positionen.

### 3.2.1.7 Immobilisierung von zwei unterschiedlichen LPS auf einem Transducer

Für die Immobilisierung von LPS Erkennungsstrukturen unterschiedlicher Salmonellenserovare werden die Transducer in Analogie zur Vorgehensweise in Abschnitt 3.2.1.4 zunächst flächig, jedoch mit einem 4,5-mal größeren Volumen an Decansäurelösung umgesetzt und anschließend mit den zwei LPS Strukturen an unterschiedlichen Positionen betropft.

### 3.2.2 Kontaktwinkelbestimmung

Zur Charakterisierung der Beschichtungen nach Modifikation der Transducer werden nach einzelnen Modifikationsschritten Kontaktwinkelmessungen mit Wasser durchgeführt. Über die Bestimmung des Kontaktwinkels zwischen dem Transducer und der an den Tropfen links und rechts angelegten Tangenten können so Rückschlüsse auf die Hydrophilie der Oberfläche gezogen werden. Der Aufbau, wie er für Messungen verwendet wird, ist in Abbildung 15 dargestellt.

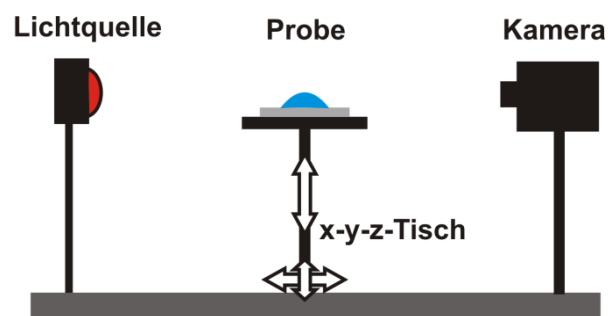


Abbildung 15: Messaufbau zur Bestimmung von Kontaktwinkeln auf Substraten.

Unter Verwendung des oben beschriebenen Aufbaus wird jeweils unter Reinraumbedingungen ein definiertes Volumen an Wasser über eine Spritze als Tropfen auf den Transducer gegeben und über den beweglichen Tisch die Probenlage so eingestellt, dass ein scharfes Bild des liegenden Tropfens von der Kamera erfasst wird. Nach der Aufnahme eines statischen Bildes werden innerhalb der Software die Kontaktwinkel zwischen dem Transducer und der an den Tropfen links und rechts angelegten Tangenten ermittelt.

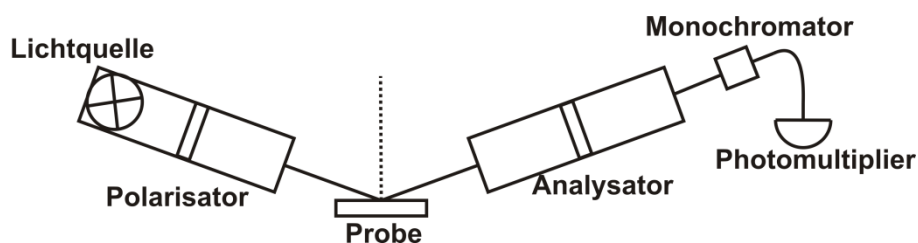
Von der Software ausgegebene Kontaktwinkel für die am linken und rechten Rand des Tropfens angelegte Tangente werden gemittelt. Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Kontaktwinkelmessungen werden durch Verschieben der Probe auf dem x-y-z-Tisch mehrere Positionen auf einem Transducer untersucht. Kontaktwinkel für einen Transducer setzen sich somit durch gemittelte Messwerte von Kontaktwinkelmessungen an zwei bis drei Positionen des Transducers zusammen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse für Kontaktwinkelmessungen basieren stets auf Messungen von mindestens drei Transducern.

#### 3.2.3 Ellipsometrie

##### **Aufbau**

Für die Untersuchung von Schichtdickenänderungen aufgrund chemischer Modifizierung von Oberflächen wird nach einzelnen Präparationsschritten die spektrale Ellipsometrie eingesetzt. Eine detaillierte Beschreibung zur Anwendung dieser Methode für die Untersuchung von (bio)chemischen Schichten findet sich in anderen Arbeiten [Hehl, 1998; Striebel, 1994].

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen werden unter einem Einfallswinkel von  $70^\circ$  und unter Reinraumbedingungen an Luft durchgeführt. Dabei wird der Spektralbereich zwischen 300 nm und 800 nm mit einer Auflösung von 5 nm detektiert. Der verwendete Messaufbau findet sich in Abbildung 16.



**Abbildung 16: Aufbau zur Messung von Substraten mit spektraler Ellipsometrie.**

Bei jeder Wellenlänge wird bis zu einer Photonenzahl von  $10^6$  oder maximal 400 Umdrehungen des Polarisators gemessen. Zur Steuerung der Messungen wird das Programm ELLI452 verwendet, welches die ellipsometrischen Winkel  $\tan \Psi$  und  $\cos \Delta$  ausgibt.

**Auswertung**

Die Auswertung ellipsometrischer Daten wird mit dem Programm Wvase32 durchgeführt. Da Siliziumwafer durch die Behandlung mit Piranha und Galliumarsenidwafer im Sauerstoffplasma eine Oxidschicht ausbilden, wird zur Schichtdickenbestimmung auf oxidierten Wafern eine auf dem Substrat befindliche Schicht SiO<sub>2</sub> bzw. GaAsO im Modell durch Optimierung des Fits mit berücksichtigt. Die nach Oberflächenmodifikation erhaltenen Schichten, ausgehend von Aminodextran, werden mit einem Cauchy-Modell nach [Hehl, 1998] parametrisiert, welches in Gleichung 36 wiedergegeben ist.

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad \text{Gleichung 36}$$

Mit Parameter:

$$A = 1,3405$$

$$B = 3792 \text{ nm}^2$$

$$C = 0 \text{ nm}^4$$

Durch die Verwendung des oben beschriebenen Modells für alle aufeinander folgenden Schichtdickenbestimmungen wird angenommen, dass sich der Brechungsindex  $n$  innerhalb der einzelnen Schichtbereiche (z.B. Polymer, Linker, Erkennungsstruktur, Antikörper) nicht ändert, sondern lediglich die Dicke der Schicht zunimmt. Dies entspricht vermutlich nicht den Realbedingungen. Da bei den hier durchgeführten ellipsometrischen Messungen jedoch lediglich relative Schichtdickenänderungen und keine absoluten Schichtdicken im Fokus stehen, ist die Verwendung eines Cauchy-Modells über die gesamte Auswertung hinweg durchaus legitim. Somit können Änderungen der sensitiven Schicht ausgehend von AMD sehr gut beobachtet werden, da lediglich die Änderung der Messgröße den Fit von Messung zu Messung beeinflusst und nicht etwa geänderte Annahmen im Modell.

**3.2.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie****3.2.4.1 Methode für Messungen auf Interferenzglas****Aufbau**

Bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie wird Weißlicht über eine Y-Faseroptik senkrecht auf die Rückseite eines transparenten Transducers geleitet. Um den Brechungsindexsprung sowie störende Reflektivitäten aufgrund eines kleinen Luftspaltes zwischen Faseroptik und Transducer zu verhindern [Brecht, 1993], wird als Matching-Flüssigkeit ein Tropfen Glycerol dazwischen gegeben. Das reflektierte Licht durchläuft den Weg durch die Faseroptik zurück und

wird an einem Y-Koppler über den zweiten Arm der Faseroptik zu einem Diodenzeilenspektrometer geleitet. Der prinzipielle Messaufbau ist in Abbildung 17 dargestellt.

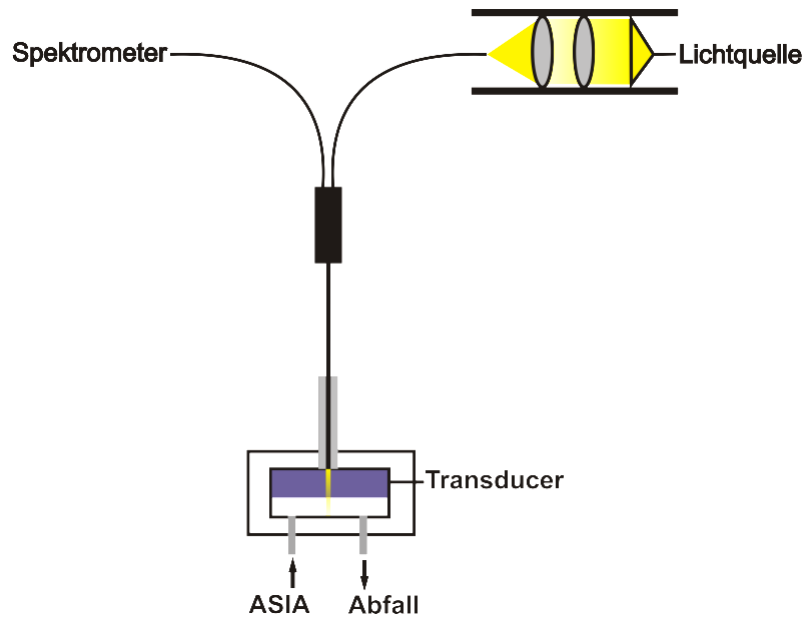


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines RIFS-Aufbaus.

#### Messung

Die Spektren werden mit einer zeitlichen Auflösung von 5 s über das Programm Measure von G. Kraus aufgezeichnet, wobei die Integrationszeit stets so gewählt wird, dass ca. 90 % Sättigung des Detektors erreicht werden. In Abhängigkeit der gewählten Integrationszeit werden so viele Spektren aufsummiert, wie in 90 % des Zeitintervalls möglich sind.

#### Auswertung

Für die Auswertung der aufgezeichneten Spektren wird das Programm IFZ von A. Brecht [Brecht, 1993] und G. Kraus [Kraus, 1993] verwendet. Dadurch ist es möglich, zeitabhängige Änderungen innerhalb der Spektren anhand einer Bindungskurve online zu betrachten. Dabei wird das gemessene Reflektionsspektrum mit dem Referenzspektrum, welches durch Messung auf einem Referenztransducer erhalten wird, sowie dem Dunkelstrom-Spektrum korrigiert, sodass gemäß Gleichung 37 ein korrigiertes Interferenzspektrum berechnet werden kann. An dieses wird an einem ausgewählten Extrempunkt ein Polynom angepasst und die Verschiebung dessen Scheitelpunktes in x-Richtung zur online Verfolgung herangezogen.

$$I_{\text{kor}}(\lambda) = \frac{I(\lambda)_{\text{Messung}} - I(\lambda)_{\text{Dunkel}}}{I(\lambda)_{\text{Referenztransducer}} - I(\lambda)_{\text{Dunkel}}}$$

Gleichung 37



### Probenhandhabung

Ein typischer Messzyklus nach dem Einbau eines beschichteten Sensorchips in die Flusszelle besteht aus der Abfolge Basislinie, Assoziation, Dissoziation, Basislinie, Regeneration und Basislinie und wird vollautomatisch durch Ansteuerung der Fließinjektionsanalyse und des Autosamplers über die Software Measure ausgeführt.

Das Probenvolumen bei RfS-Messungen beträgt stets 1 mL. Zur Durchführung der Konzentrationsmessungen auf Interferenzglas wird beginnend bei der niedrigsten Konzentration eine Dreifachmessung durchgeführt und anschließend zur nächsthöheren Konzentration übergegangen. Als Regenerationslösung wird Guanidinhydrochlorid verwendet und als Laufpuffer PBS.

#### 3.2.4.2 Methode für Messungen auf Galliumarsenid

##### Aufbau

Für Messungen auf Galliumarsenid wird der oben beschriebene Aufbau für RfS leicht modifiziert. Da es sich bei Galliumarsenid um ein nicht transparentes Substrat handelt, kann nicht wie für transparente Materialien üblich, von der Rückseite des Transducers mit Licht eingestrahlt werden. Daher wird die Flusszelle dahingehend modifiziert, dass die Einstrahlung mit Licht durch die transparente PDMS Flusszelle sowie durch die Probe hindurch erfolgt. Aufgrund der flexiblen Materialeigenschaften von PDMS kann durch leichtes Andrücken des am vorderen Ende entmantelten Lichtleiters an die Flusszelle auf die Matching-Flüssigkeit Glycerol verzichtet werden. Eine schematische Skizze des modifizierten Aufbaus findet sich in Abbildung 18.

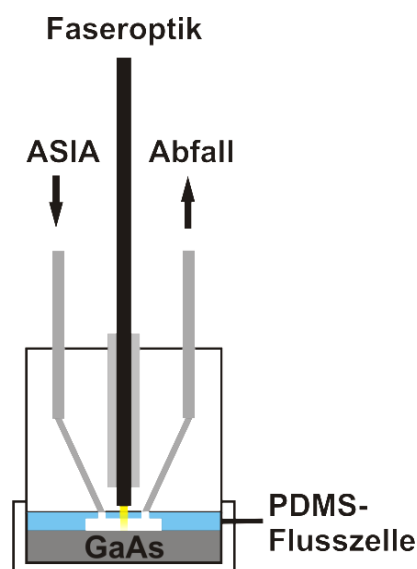


Abbildung 18: Querschnitt einer Flusszelle mit Halterung für reflektometrische Messungen auf Galliumarsenid.

#### **Messung**

Aufgrund der hohen Reflektivität von Galliumarsenid, die ca. 30 % beträgt, wird zwischen der Lichtquelle und der Faseroptik ein 50 % Graufilter eingebaut, sodass analog zu Messungen auf Interferenzglas 90 % Sättigung des Detektors über die Integrationszeit eingestellt werden können.

#### **Auswertung**

Da beim erhaltenen Interferenzspektrum von Galliumarsenid im sichtbaren Spektralbereich keine Modulation innerhalb des Spektrums beobachtet werden kann, können die Messungen nicht über das Programm IFZ online ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgt daher offline durch Normierung der Spektren auf das erste Spektrum im Programm Measure bzw. durch Auftragung der Intensitäten einzelner, aus den Spektren entnommener Wellenlängen in Abhängigkeit der Zeit.

#### **Probenhandhabung**

Die Abfolge eines Messzyklus sowie das Probenvolumen unterscheiden sich gegenüber dem Aufbau für Messungen auf transparenten Transducern nicht. Zur Durchführung der Konzentrationsmessungen auf Galliumarsenid werden Dreifachmessungen einzelner Konzentrationen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt. Als Regenerationslösung dient analog zu Messungen auf Interferenzglas Guanidinhydrochlorid und als Laufpuffer PBS.

### **3.2.5 1-lambda-Reflektometrie**

#### **3.2.5.1 Einzel-Spot-Messungen**

##### **Aufbau**

Für 1-lambda-Reflektometrie-Messungen auf transparenten Glastransducern wird ein Freistrahl-aufbau verwendet. Dabei wird die im Detektionsmodul integrierte konfokale Optik genutzt, um Licht einer LED auf die Rückseite des transparenten Glastransducers zu fokussieren. Das reflektierte Licht wird von einer Photodiode, die ebenfalls im Detektionsmodul integriert ist, aufgezeichnet und via USB an einen Computer ausgegeben. Eine schematische Zeichnung des Aufbaus sowie eine Abbildung des Detektionsmoduls mit Flusszelle finden sich in Abbildung 19.

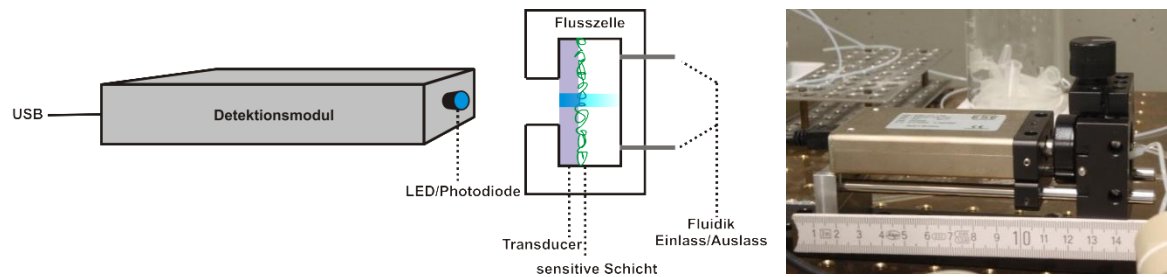


Abbildung 19: Schematische Darstellung des 1-lambda-Reflektometrie-Aufbaus (links) sowie Abbildung des Aufbaus aus Detektionsmodul mit Flusszelle (rechts).

### Messung

Für die Aufnahme einer Messung wird das Programm DSService 1.3.8 der Firma Qiagen Lake Constance GmbH verwendet. Soweit nicht anders angegeben, werden die in Abbildung 20 sichtbaren Einstellungen in der Benutzeroberfläche gewählt, auf die unter Abschnitt 4.1.2 anhand von Experimenten detaillierter eingegangen wird.

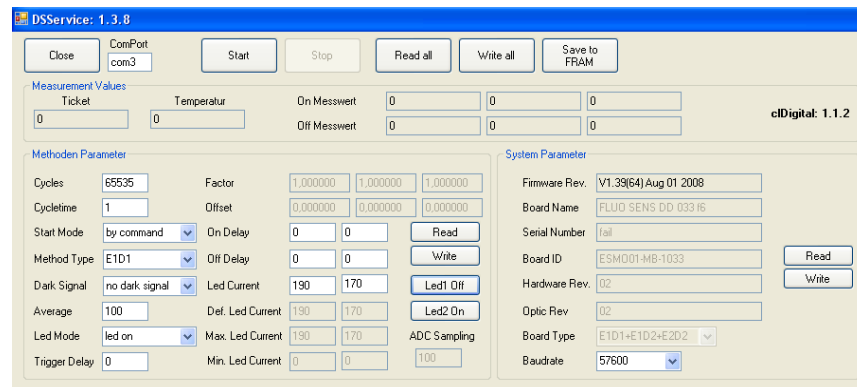


Abbildung 20: Benutzeroberfläche des Programms DSService für Messungen mit dem ESE-LOG USB.

Für die Steuerung der Fluidik sowie des Autosamplers über eine RS232 Schnittstelle wird das Programm Measure eingesetzt. Bei der vollautomatischen Aufnahme mehrerer Messzyklen wird das Programm Autolt v3.3.6.1 von Jonathan Bennett & Team verwendet, um ein automatisches Starten, Stoppen und Speichern im Programm DSService auf die zeitliche Abfolge im Programm Measure abzustimmen.

### Auswertung

Die vom Detektionsmodul aufgezeichneten Messwerte werden während der Messung graphisch wiedergegeben. Dabei werden die detektierten Intensitätswerte in Abhängigkeit der chronologisch erfassten Datenpunkte abgebildet, sodass Bindungsvorgänge online beobachtet werden können. Die über das Detektionsmodul abgespeicherten Messwerte nach einem Messzyklus werden in einer csv-Datei in Abhängigkeit der Datenpunkte tabellarisch wiedergegeben. Da das eingesetzte Detektionsmodul eigentlich für Fluoreszenzmessungen ausgelegt ist, wird in einem

zeitlichen Abstand weniger Millisekunden für jeden Datenpunkt ein On- und Off-Messwert aufgezeichnet. Da in der hier aufgeführten Anwendung des Detektionsmoduls die LED konstant angeschaltet bleibt, beinhalten die zwei vom Detektor ausgegebenen Werte den gleichen Informationsgehalt. Für eine einheitliche Datenauswertung werden pro Datenpunkt zunächst beide Werte gemittelt und die gemittelten Werte zur weiteren Datenauswertung herangezogen.

#### ***Probenhandhabung***

Ein typischer Messzyklus nach dem Einbau eines beschichteten Sensorchips in die Flusszelle besteht aus der Abfolge Basislinie, Assoziation, Dissoziation, Basislinie, Regeneration und Basislinie und wird vollautomatisch durch Ansteuerung der Spritzenpumpe und des Autosamplers über die Software Measure ausgeführt.

Das Probenvolumen beträgt, soweit nicht anders angegeben, für CRP Messungen 250  $\mu\text{L}$  und für Salmonellenantikörper Messungen 500  $\mu\text{L}$ . Messungen mit Referenzseren werden unter Einsatz eines Probenvolumens von 250  $\mu\text{L}$  durchgeführt. Durch Aufsaugen von Luft zur Trennung der Flüssigkeiten in der Probenschleife wird stets ein Teil der aufgesaugten Lösungen verworfen, zusätzlich werden zu Beginn der Probeninjektion 100  $\mu\text{L}$  bis 137  $\mu\text{L}$  in hoher Geschwindigkeit in den Ventilauslass zur Flusszelle gepumpt, sodass sichergestellt werden kann, dass bei Beginn der langsamen Injektionsphase die Flusszelle bereits mit Probenlösung geflutet ist. Somit können Diffusionseffekte mit Puffer, der zuvor in der Flusszelle sowie im Schlauch zwischen Ventil und Flusszelle vorliegt, ausgeschlossen werden. Daher werden tatsächlich 322  $\mu\text{L}$  anstelle von 500  $\mu\text{L}$  Probe sowie 105  $\mu\text{L}$  anstelle von 250  $\mu\text{L}$  Probe mit einer Geschwindigkeit von 0,5  $\mu\text{L}/\text{s}$  über die Flusszelle geleitet.

Die Durchführung der Konzentrationsmessungen für Salmonellenantikörper in Puffer erfolgt in Form von Dreifachmessungen einzelner Konzentrationen in willkürlicher Reihenfolge. In Serum wird beginnend bei der niedrigsten Konzentration eine Dreifachmessung durchgeführt und anschließend zur nächsthöheren Konzentration übergegangen. Als Regenerationslösung dient Guanidinhydrochlorid und als Laufpuffer PBS. Bei Messungen in Serum wird vor der eigentlichen Assoziation noch ein Blockierungsschritt mit negativem Rinderserum eingeführt. Außerdem findet ein zusätzlicher Regenerationsschritt mit Pepsin statt, um das sukzessive Blockieren der Erkennungsstrukturen mit Serum und somit eine Signalabnahme zu verhindern.

Zur Durchführung der Konzentrationsmessungen für CRP werden Dreifachmessungen einzelner Konzentrationen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt. Als Regenerationslösung wird 0,5 % SDS verwendet und als Laufpuffer HEPES.

### 3.2.5.2 Zwei-Spot-Messungen

#### **Aufbau**

Der Aufbau für Zwei-Spot-Messungen besteht aus einem baugleichen Detektionsmodul, wie es für Einzel-Spot-Messungen eingesetzt wird und einem modifizierten Mikrotiterplatten-Reader. In der Kavität, die für eine 96-Well Mikrotiterplatte ausgelegt ist, befindet sich bei dem hier verwendeten Aufbau stattdessen eine Flusszellenhalterung für Transducerdimensionen von ca. 37 mm Länge und 12 mm Breite. Durch Verschieben des x-y-Tisches, der die Kavität mit Flusszelle beinhaltet, können einzelne Messpositionen auf dem Transducer vom darunter befindlichen Detektionsmodul ausgelesen werden. Eine schematische Zeichnung des Aufbaus sowie eine Abbildung des x-y-Tisches mit Flusszelle sowie Detektionsmodul finden sich in Abbildung 21.

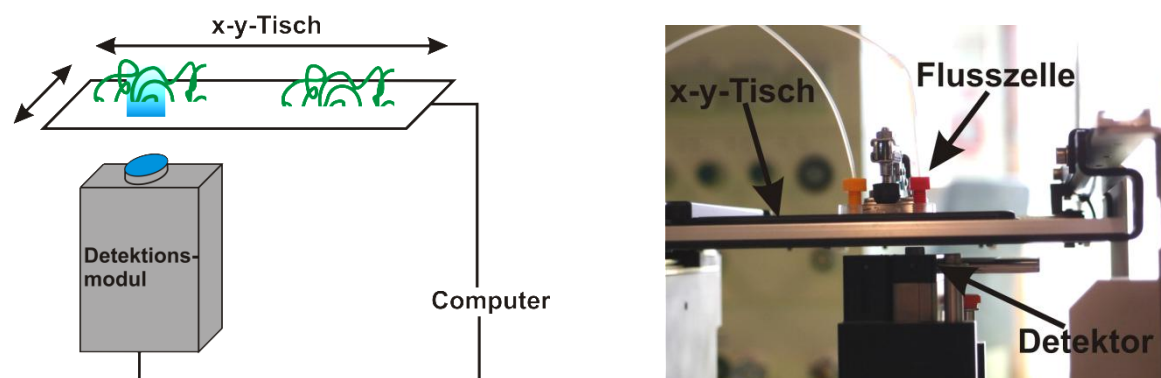
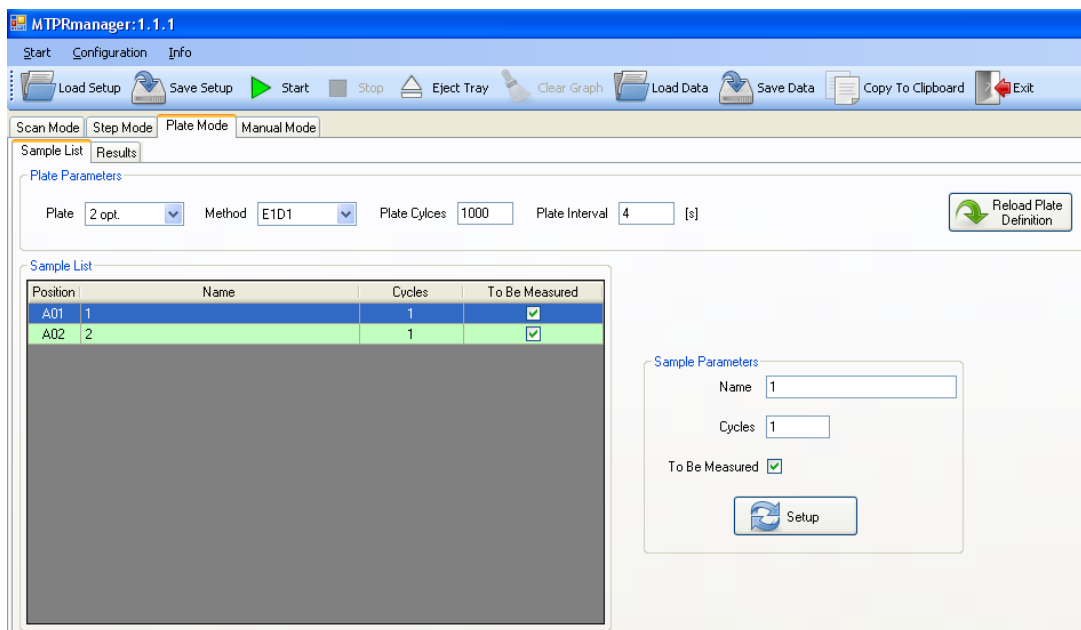


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Zwei-Spot-Messaufbaus (links) sowie Abbildung des Aufbaus aus x-y-Tisch, Flusszelle und Detektionsmodul (rechts).

#### **Messung**

Für die Aufnahme eines Bindungssignals an nur einer Messposition, z.B. für die Charakterisierung unterschiedlicher Flusszelligeometrien, wird analog zu den oben beschriebenen Einzel-Spot-Messungen das Programm DSService verwendet. Für die zeitaufgelöste Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an zwei Messpositionen wird das Programm MTPRmanager 1.1.1 der Firma Qiagen Lake Constance GmbH eingesetzt. In Abbildung 22 ist die Benutzeroberfläche des Programms dargestellt.



**Abbildung 22:** Benutzeroberfläche des Programms MTPRmanager 1.1.1 für Messungen an mehreren Messpositionen.

Für Zwei-Spot-Messungen im „Plate Mode“ werden nach Einbau eines Transducers die x-y-Koordinaten beider Messpositionen durch Import einer txt-Datei in der Kategorie „Plate“ hinterlegt. Über die Anzahl der „Plate Cycles“ wird definiert, wie oft der x-y-Tisch die beiden Positionen nacheinander über dem Detektor ausrichtet. Die Kategorie „Plate Interval“ definiert die Dauer eines Messzyklus entlang des Transducers, allerdings werden nur Intervallwerte berücksichtigt, die länger sind als die Zeit, die aufgrund gerätespezifischer Einstellungen tatsächlich benötigt wird. Unter dem Menüpunkt „Step Mode“ kann zusätzlich der Wert für „average“ eingestellt werden, der für eine noch ausreichende zeitliche Auflösung bei Zwei-Analyt-Messungen auf einen Wert von 50 gesetzt wird, wodurch sich ein „Plate Interval“ von vier Sekunden ergibt.

Für die Steuerung der Fluidik sowie des Autosamplers wird in Analogie zu Einzel-Spot-Messungen das Programm Measure eingesetzt sowie das Programm Autolt verwendet, um ein automatisches Starten, Stoppen und Speichern im Programm MTPRmanager auf die zeitliche Abfolge im Programm Measure abzustimmen.

#### **Auswertung**

Die über das Detektionsmodul abgespeicherten Messwerte werden in einer csv-Datei in Abhängigkeit der Zeit sowie der Messposition tabellarisch wiedergegeben. Durch Auftragung der Werte einer bestimmten Messposition in Abhängigkeit der Zeit, können die zeitaufgelösten Bindungskurven erhalten werden. Somit ist bei Zwei-Spot-Messungen keine graphische online Beobachtung des Bindungsvorganges möglich, sondern können lediglich die Messwerte online eingesehen werden.

### **Probenhandhabung**

Ein typischer Messzyklus läuft analog zu Einzel-Spot Messungen ab. Das Probenvolumen beträgt bei jeder Messung 500  $\mu\text{L}$ , wobei derselbe fluidische Aufbau wie für Einzel-Spot Messungen verwendet wird und daher tatsächlich nur 322  $\mu\text{L}$  Probenvolumen mit einer Fließgeschwindigkeit von, soweit nicht anders angegeben, 0,5  $\mu\text{L/s}$  über den Transducer gelangen.

Zur Durchführung der Konzentrationsmessungen für Salmonellenantikörper und CRP aus einer Probe wird eine bestimmte Kombination aus Konzentrationen für Salmonellenantikörper und CRP dreifach bestimmt und im Anschluss auf eine andere Kombination mit jeweils höheren Konzentrationen übergegangen. Bei Messungen von Referenzseren wird in einer Verdünnung von 1:10 gearbeitet und vor der eigentlichen Messung ein Blockierungsschritt mit negativem Rinderserum in einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt. Als Regenerationslösung wird stets Guanidinhydrochlorid verwendet und als Laufpuffer HEPES.

### **3.2.6 Datenauswertung von Konzentrationsmessungen**

Zur Auswertung der Konzentrationsmessungen werden die Werte aller in dieser Arbeit aufgezeichneten Bindungskurven zunächst auf das jeweilige Absolutsignal normiert, sodass stets die relative Signaländerung betrachtet wird. Das Niveau der Basislinie vor Probeninjektion wird dabei auf 0 % gesetzt.

#### **3.2.6.1 Auswertebereiche**

- Zur Auswertung von Konzentrationsmessungen mit Salmonellenantikörpern bei Einzel- und Zwei-Analyt-Messungen wird die relative Signaländerung in einem definierten Bereich der Basislinie nach der Probeninjektion ermittelt.
- Zur Auswertung von Konzentrationsmessungen mit CRP bei Einzel-Analyt-Messungen wird die relative Signaländerung zum Zeitpunkt  $t = 307 \text{ s}$  und bei Zwei-Analyt-Messungen zum Zeitpunkt  $t = 330 \text{ s}$  (jeweils kurz nach der Krümmung der Bindungskurve der höchst gemessenen Konzentration) als konzentrationsabhängiges Signal ausgewertet.
- Für die Auswertung der relativen Signalanfangssteigung von CRP-Bindungskurven bei Einzel-Analyt-Messungen wird ein linearer Fit im Bereich zwischen 268 s und 290 s durchgeführt und dessen Steigung als konzentrationsabhängiges Signal entnommen.

Alle Konzentrationsmessungen werden dreifach bestimmt und aus den konzentrationsabhängigen Signalen werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichungen berechnet. Auf-

grund der in dieser Arbeit verwendeten Kombination aus Schichtsystem und Wellenlänge führen 1-lambda-Reflektometrie-Messungen im Vergleich zu RfS-Messungen zu negativen Signaländerungen. Daher wird das Vorzeichen der ausgewerteten Mittelwerte von 1-lambda-Reflektometrie-Messungen umgekehrt.

#### 3.2.6.2 Erstellung der Kalibrierkurve

Durch Auftragung der Mittelwerte der ausgewerteten, konzentrationsabhängigen Signale über die logarithmisch skalierte Analytkonzentrationen wird ein Signalverlauf erhalten, der durch die in Gleichung 38 dargestellte 4-Parameter Logistische Funktion gefittet werden kann.

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad \text{Gleichung 38}$$

Die in Gleichung 38 aufgeführte Fitfunktion beschreibt einen sigmoidalen Kurvenverlauf, was für die quantitative Auswertung von Immunassay-Daten weitverbreitet Anwendung findet [Dudley, et al., 1985]. Dabei ist  $A_1$  die untere Asymptote und  $A_2$  die obere Asymptote. Die Differenz aus  $A_2$  und  $A_1$  ist der dynamische Signalbereich. Der Wendepunkt der Kalibrierkurve wird durch die Variable  $x_0$  dargestellt und repräsentiert die Analytkonzentration, bei der eine Signaländerung von 50 % des dynamischen Signalbereichs beobachtet werden kann. Die Steigung der Tangente an diesen Punkt entspricht dem Parameter  $p$ .

Zusätzlich zur Fitfunktion wird mit dem Programm Origin der 95 % Vertrauensbereich (Konfidenzband) ermittelt, der veranschaulicht, wie präzise der geschätzte Wert der Fitfunktion für einzelne Konzentrationswerte ist.

#### 3.2.6.3 Ermittlung von Kenngrößen für die Kalibrierung

Um Konzentrationsbereiche zu ermitteln, in denen die aufgestellten Kalibrierfunktionen auch tatsächlich zur Analytquantifizierung eingesetzt werden können, werden zudem die Werte für die „minimum detectable concentration“ (MDC) und das „reliable detection limit“ (RDL) angegeben [O'Connell, et al., 1993]. Diese Werte können als Analoga zu den nach DIN [DIN-32645, 2008] definierten Begriffen „limit of detection“ (LOD) und „limit of quantification“ (LOQ) aufgefasst werden und werden vermehrt als Kenngrößen zur Evaluierung von Messprozessen im medizinischen Bereich bestimmt. Sie werden graphisch ermittelt, indem eine zur x-Achse parallele Tangente an das obere Konfidenzband am Punkt der niedrigsten Konzentration angelegt wird. Der Schnittpunkt mit der Kalibrierkurve ergibt den MDC-Wert und im Schnittpunkt mit dem unteren Konfidenzband kann der RDL-Wert abgelesen werden. Für einen Vergleich verschiedener



Kalibrierkurven untereinander, wird zudem der Arbeitsbereich ermittelt, der Konzentrationen mit Signaländerungen zwischen 10 % und 90 % des dynamischen Signalbereichs umfasst.

#### 3.2.6.4 Bestimmung von Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung von Wiederfindungsraten werden ebenfalls Dreifachmessungen durchgeführt und die konzentrationsabhängigen Signale in Analogie zur Auswertung der entsprechenden Kalibriermessungen entnommen. Die einzelnen Werte werden als Variable  $y$  in die entsprechende Kalibrierfunktion in Gleichung 38 eingesetzt und diese wird nach der Wiederfindungskonzentration  $x_{WF}$  über Gleichung 40 nach Gleichung 40 aufgelöst:

$$1 + \left( \frac{x_{WF}}{x_0} \right)^p = \frac{(A_1 - A_2)}{y - A_2} \quad \text{Gleichung 39}$$

$$x_{WF} = \sqrt[p]{\left( \frac{A_1 - A_2}{y - A_2} - 1 \right)} \cdot x_0 \quad \text{Gleichung 40}$$

Nach Berechnung der Mittelwerte  $\bar{x}_{WF}$  der dreifach bestimmten Wiederfindungskonzentrationen und unter Berücksichtigung der tatsächlich eingesetzten Konzentration  $x_{real}$  ergeben sich die Wiederfindungsraten WF somit gemäß Gleichung 41 nach:

$$WF = \frac{\bar{x}_{WF}}{x_{real}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 41}$$

Die relative Standardabweichung für Wiederfindungsraten wurde durch Normierung der Varianz bestimmt.

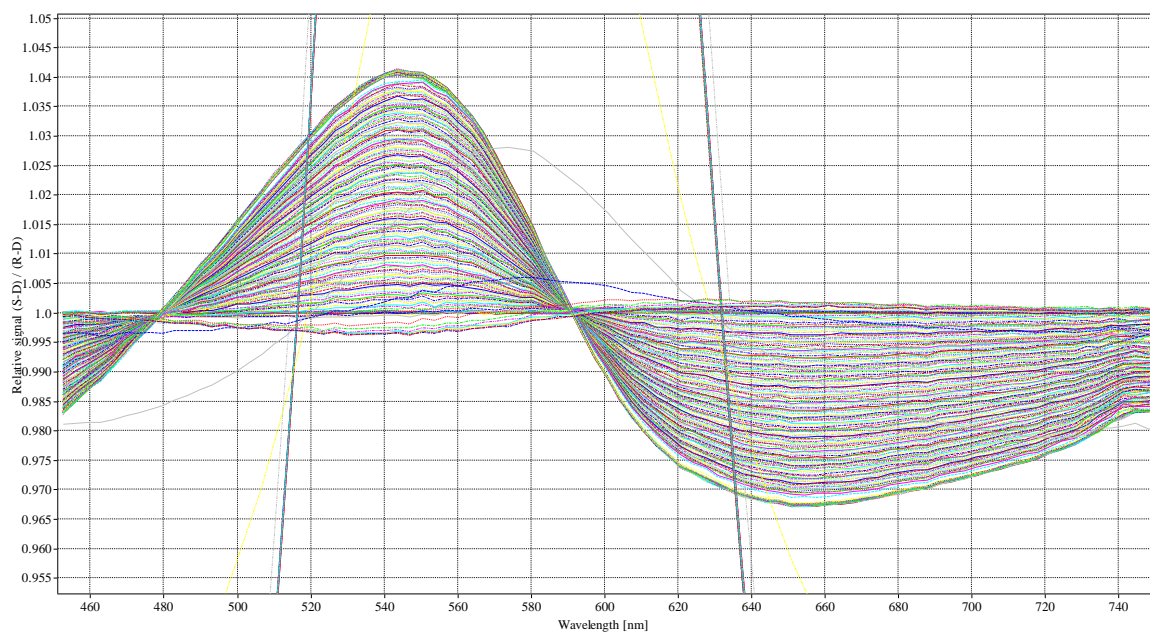
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 1-lambda-Reflektometrie Messaufbau zur Ein-Analyt-Bestimmung

#### 4.1.1 Auswahl geeigneter Schichtsysteme und Wellenlängen

Um durch Anwendung der 1-lambda-Reflektometrie die Quantifizierung von Analyten zu ermöglichen muss gemäß Abschnitt 2.1.6 eine lineare Abhängigkeit zwischen der Messgröße Reflektivität und der Schichtdickenänderung der sensitiven Schicht gegeben sein. Darüber hinaus werden des Weiteren eine möglichst hohe Signalintensität sowie eine möglichst maximale Änderung in der Messgröße angestrebt, um ein geringes Rauschen zu erzielen und maximale Signaländerungen zu generieren.

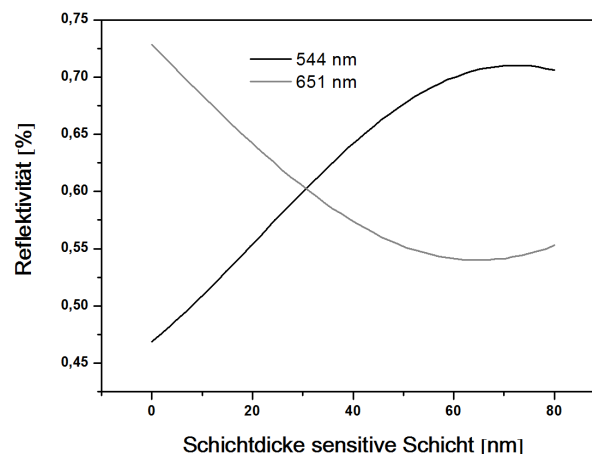
Für die Auswahl einer geeigneten Wellenlänge zur Detektion biomolekularer Interaktionen wurden zunächst mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie erhaltene Spektren bei der Detektion eines Modellantikörpers unter Verwendung von Interferenzglas ausgewertet. In Abbildung 23 sind die bei der Messung erhaltenen relativen Spektren gezeigt, welche auf das erste Spektrum normiert wurden. Hierdurch erhält man die relativen Änderungen der Spektren während des Bindungsprozesses.



**Abbildung 23:** Auf das erste Spektrum normierte Spektren bei Detektion von Modellantikörpern auf Interferenzglas mittels RIFS. Aufgetragen ist die relative Intensitätsänderung gegen die Wellenlänge. Die annähernd vertikal verlaufenden Signale bei ca. 510 nm und 640 nm sind auf einen Brechungsindexsprung während der Regeneration am Ende der Messung zurückzuführen.

Es wird deutlich, dass sich die detektierte Intensität für jede Wellenlänge während der Messung ändert. Maximale Intensitätsänderungen können bei den Wellenlängen 544 nm (positiv) und 651 nm (negativ) beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob bei den entsprechenden Wellenlängen ein linearer Zusammenhang zwischen der Messgröße Reflektivität und der Schichtdickenänderung der sensitiven Schicht gegeben ist, wurden mit dem Programm Film Wizard (vgl. Abschnitt 3.1.5.11) Simulationsrechnungen durchgeführt. In Abbildung 24 ist die Abhängigkeit der Reflektivität von der Schichtdickenänderung der sensitiven Schicht für beide Wellenlängen dargestellt.



**Abbildung 24:** Simulierter Reflektivitätsverlauf der Wellenlängen 544 nm und 651 nm bei Antigen-Antikörper-Wechselwirkung auf Interferenzglas.

Im Bereich von Schichtdickenänderungen zwischen 0 nm und 30 nm verlaufen die Reflektivitätsänderungen in Abhängigkeit der Schichtdicke für beide Wellenlängen linear und betragsmäßig mit ähnlicher Steigung, im Bereich größerer Schichtdicken strebt die Änderung der Reflektivität in Abhängigkeit der Schichtdicke bei der Wellenlänge von 651 nm früher gegen null (Minimum) als bei Verwendung der Wellenlänge von 544 nm (Maximum). Da ein möglichst großer Bereich für Schichtdickenänderungen angestrebt wird, in dem quantifiziert werden kann, ist unter Verwendung von Interferenzglas die Wellenlänge im Bereich von 544 nm für die 1-lambda-Reflektometrie daher von Vorteil.

Als alternatives Schichtsystem für den Transducer wurde in anderen Arbeiten neben Interferenzglas auch Goetheglas verwendet [Frank, 2005; Markovic, 2008; Nopper, 2000]. Dieses liefert aufgrund seiner dickeren Tanatalpentoxid Schicht eine deutlich höhere Reflektivität und führt deshalb in der RfS zu einem besseren Signal-zu-Rausch Verhältnis als Interferenzglas [Markovic, 2008]. In Abbildung 25 ist die Reflektivität in Abhängigkeit der Schichtdicke der sensitiven Schicht für Goetheglas bei unterschiedlichen Wellenlängen dargestellt.

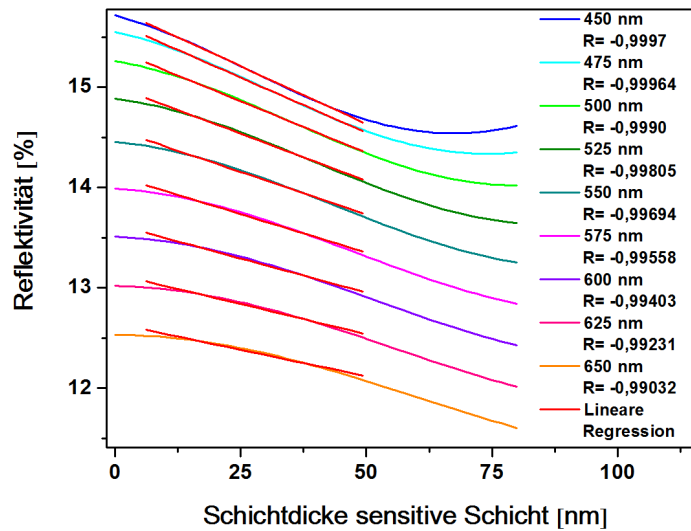


Abbildung 25: Reflektivitätsverlauf in Abhängigkeit der Dicke der sensitiven Schicht auf Goetheglas bei Wellenlängen zwischen 450 nm und 650 nm mit Korrelationskoeffizienten R für eine lineare Regression zwischen 10 nm und 45 nm Schichtdicke.

Es werden Reflektivitäten zwischen 11 % und 16 % erhalten. Ausgehend von der Wellenlänge 450 nm nimmt die Reflektivität mit zunehmender Wellenlänge ab. Des Weiteren kann im Bereich geringer Schichtdicken (0 bis 20 nm) bei zunehmender Wellenlänge ein sich ausbildendes Maximum im Kurvenverlauf beobachtet werden. Bei Schichtdicken im Bereich von ca. 60 nm ist bei der Wellenlänge von 450 nm ein Minimum vorhanden, welches bei größeren Wellenlängen jedoch mehr und mehr in einen linearen Kurvenverlauf übergeht. Zwar wird bei der Wellenlänge von 450 nm die größte Reflektivität erhalten, allerdings kann die ausgeprägte Krümmung ab ca. 45 nm Schichtdicke die Quantifizierung negativ beeinflussen. Daher stellt die Wellenlänge bei 475 nm einen guten Kompromiss dar, um bei möglichst hoher Signalintensität über einen möglichst großen Schichtdickenbereich einen linearen Zusammenhang zwischen Reflektivität und Schichtdicke der sensitiven Schicht zu gewährleisten. Dies kann durch die Korrelationskoeffizienten R bei Ausführung einer linearen Regression zwischen 10 nm und 45 nm bestätigt werden (Abbildung 25).

Basierend auf diesen Simulationsrechnungen wurden zwei LEDs ausgewählt, um erste Testmessungen durchzuführen. Für Messungen auf Interferenzglas wurde eine LED mit einer Emissionswellenlänge von 520 nm eingesetzt, für Messungen auf Goetheglas wurde eine LED mit einer Emissionswellenlänge von 470 nm verwendet. In Abbildung 26 sind die entsprechenden Bindungssignale für jeweils eine definierte Menge an Modellantikörper über eine mit Antigen beschichtete Oberfläche dargestellt.

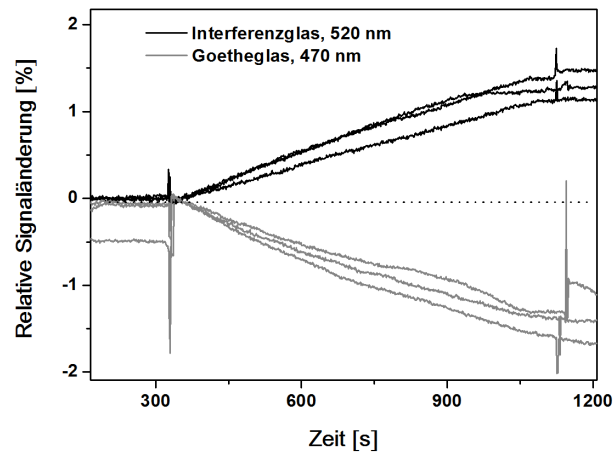


Abbildung 26: Erhaltenes 1-lambda-Reflektometrie Signal bei Wechselwirkung von 10 mg/L Modellantikörper mit auf Interferenzglas immobilisiertem Modellantigen bei einer Wellenlänge von 520 nm sowie mit auf Goetheglas immobilisiertem Modellantigen bei 470 nm.

Entsprechend der vorhergesagten Ergebnisse aus den Simulationsrechnungen, ist bei Verwendung von Interferenzglas und einer Wellenlänge von 520 nm der Signalverlauf bei wachsender Schichtdicke positiv. Bei Einsatz von Goetheglas und Detektion der Wechselwirkung bei 470 nm werden negative Signaländerungen erhalten. Für einen Vergleich der Signale wurde der Betrag der Signalsteigung durch eine lineare Regression im Bereich zwischen 400 s und 600 s entlang des Bindungssignals ermittelt. Für einen Vergleich des Rauschens wurde die Standardabweichung der linearen Regression entlang der Basislinie im Bereich zwischen 200 s und 300 s bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 27 dargestellt.

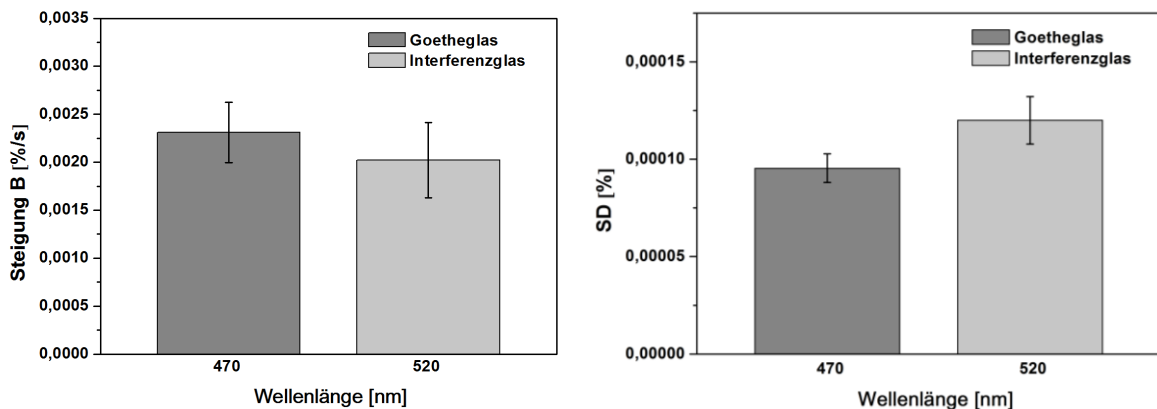
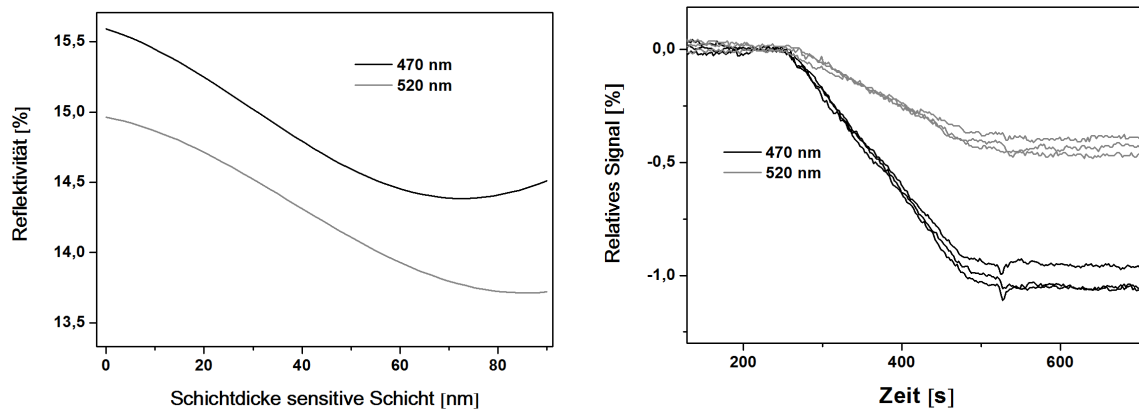


Abbildung 27: Vergleich der Signalsteigungen (links) sowie des Signalrauschens (rechts) von Messungen auf Goetheglas bei einer Wellenlänge von 470 nm und Messungen auf Interferenzglas bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Bei Verwendung von Goetheglas fallen bei 470 nm die Signalsteigung geringfügig größer und das Rauschen geringfügig kleiner aus als unter Einsatz von Interferenzglas bei 520 nm. Dadurch ergeben sich Signal-zu-Rausch Verhältnisse für Messungen auf Interferenzglas von ca.  $17 \text{ s}^{-1}$  und für die Messungen auf Goetheglas von ca.  $24 \text{ s}^{-1}$ . Die beiden Werte liegen sehr nahe beieinander,

sodass kein markanter Unterschied für die hier ermittelten Signal-zu-Rausch Verhältnisse festgestellt werden kann. Dies deutet darauf hin, dass Reflektivitäten von 2-3 % (Interferenzglas) bereits ausreichende Signalintensitäten für die hier verwendete Photodiode generieren, sodass eine Reflektivitätserhöhung auf 11-16 % keinen markanten Einfluss auf das Rauschen hat.

Um den Einfluss der verwendeten LED auf das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu untersuchen, wurden Messungen auf einem Transducer, nämlich Goetheglas, sowohl bei einer Wellenlänge von 470 nm als auch bei einer Wellenlänge von 520 nm durchgeführt. In diesem Zuge wurden zudem die fluidischen Bedingungen für Messungen optimiert, sodass Signalstörungen aufgrund von in die Flusszelle gelangten Luftblasen, wie sie in Abbildung 26 vorhanden sind, eliminiert werden konnten. In Abbildung 28 sind Simulationsrechnungen für den Verlauf der Reflektivität in Abhängigkeit der sensitiven Schicht für beide Wellenlängen dargestellt, sowie die erhaltenen Bindungssignale bei Durchführung der Messungen.



**Abbildung 28:** Simulationsrechnungen für den Verlauf der Reflektivität in Abhängigkeit der Dicke der sensitiven Schicht unter Verwendung von Goetheglas bei Wellenlängen von 470 nm und 520 nm (links) sowie erhaltene Bindungssignale bei Detektion von 10 mg/L Modellantikörper an das Modellantigen auf Goetheglas bei 470 nm und 520 nm.

Bei der Wellenlänge von 470 nm ist eine lineare Abhängigkeit zwischen Reflektivität und Schichtdicke bis zu Schichtdicken von ca. 50 nm gegeben. Wie bereits oben beschrieben, ist bei einer Wellenlänge von 520 nm bei kleinen Schichtdicken im Bereich zwischen 0 nm und 20 nm die Ausbildung eines Maximums im Reflektivitätsverlauf bereits stärker ausgeprägt. In diesem Bereich ändert sich die Reflektivität bei Änderung der Schichtdicke nur geringfügig. Bei Vergleich der erhaltenen Messkurven kann dies in einer geringeren Signalsteigung bei Messungen unter Verwendung der LED mit 520 nm Emissionswellenlänge sehr gut beobachtet werden. In Abbildung 29 sind die Signalsteigung und das Rauschen für beide Wellenlängen aufgeführt.

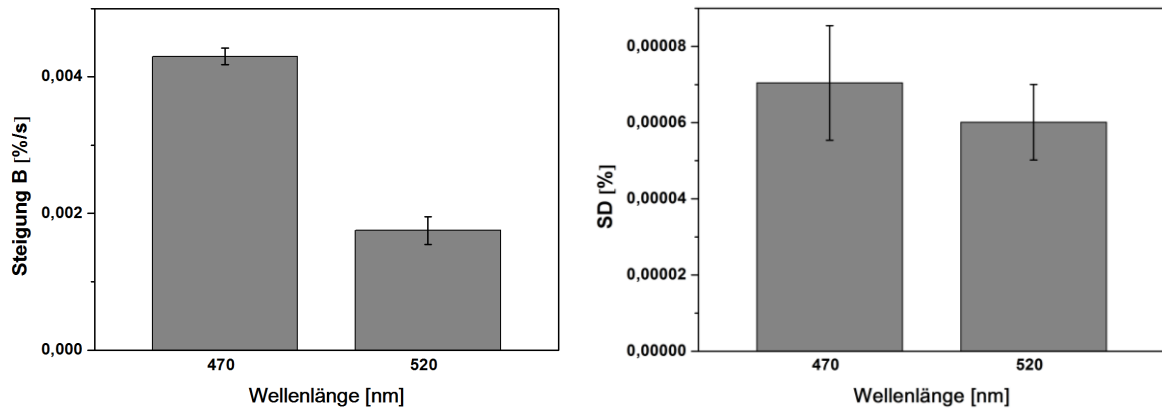
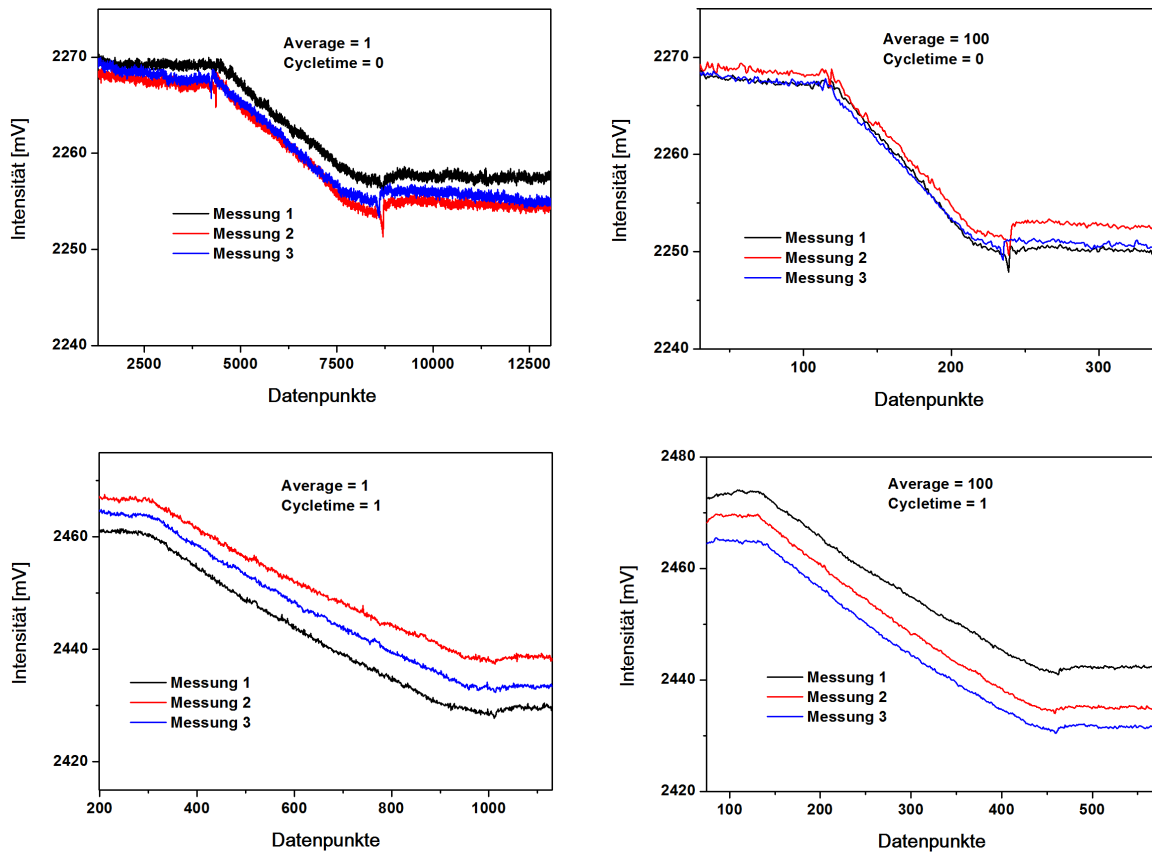


Abbildung 29: Vergleich der Signalsteigungen (links) sowie des Signalrauschens (rechts) von Messungen auf Goetheglas bei einer Wellenlänge von 470 nm und 520 nm.

Bei Vergleich der ausgewerteten Signalsteigungen werden bei Verwendung der Wellenlänge 470 nm ca. 2,5-fach höhere Signale erhalten als bei Einsatz der Wellenlänge von 520 nm. Das Rauschen unterscheidet sich für beide Wellenlängen im Rahmen der Messgenauigkeit nur geringfügig. Daraus ergibt sich ein um einen Faktor von zwei größeres Signal-zu-Rausch Verhältnis für die Wellenlänge von 470 nm, weshalb diese im Folgenden in Kombination mit Goetheglas verwendet wurde.

#### 4.1.2 Einfluss der Detektoreinstellung auf das Bindungssignal

In der zum Detektionsmodul zugehörigen Software kann unter der Option „average“ eingestellt werden, ob das detektierte Signal aufgezeichnet und ausgegeben wird (average = 1) oder ob zwei bis einhundert Messwerte detektiert, dann laut Hersteller zunächst gemittelt und anschließend als Messwert ausgegeben werden (average = 2 - 100). Des Weiteren kann unter der Option „cycletime“ die Dauer eines Messzyklus in Sekunden festgelegt werden, wobei die bei den hier durchgeführten Experimenten tatsächlich beobachtete zeitliche Auflösung nur bei der Kombination der Einstellungen average = 1 und cycletime = 1 mit einer Sekunde übereinstimmt. Exemplarisch wurden in Abbildung 30 mit den Einstellungen average = 1 sowie average = 100 bei einer cycletime von null Sekunden sowie bei einer cycletime von einer Sekunde Antikörpermessungen durchgeführt. Dabei lagen für Messungen bei einer cycletime-Einstellung exakt gleiche Messbedingungen vor und die Messungen für einen average Wert von 1 und 100 wurden abwechselnd nacheinander wiederholt durchgeführt. Das Probenvolumen für Messungen bei einer cycletime von 0 betrug 250 µL, während ein Probenvolumen von 500 µL für Messungen bei einer cycletime von 1 eingesetzt wurde.



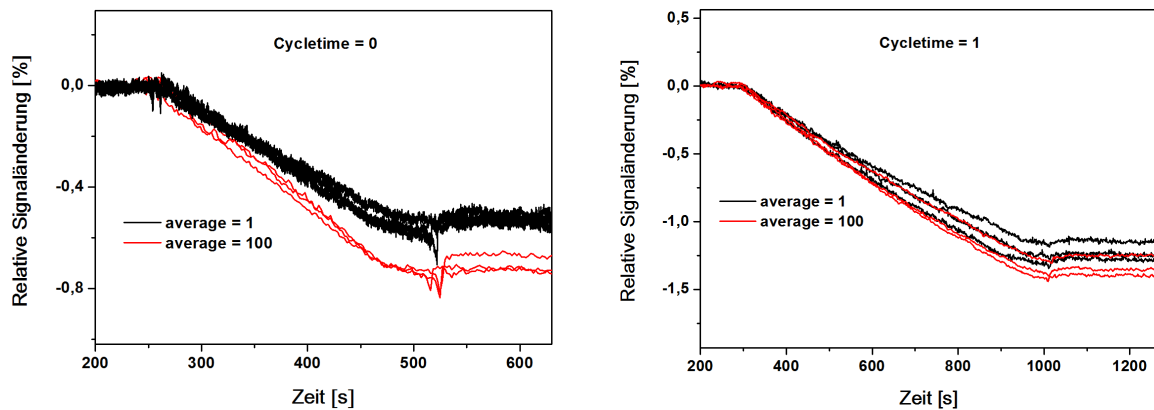
**Abbildung 30:** Detektierte Antikörperbindungssignale bei verschiedenen Kombinationen der Einstellungen Average und Cycletime in der Software des Detektionsmoduls. Messungen bei gleicher Cycletime wurden auf einem Sensorchip bei exakt gleichen Messbedingungen durchgeführt.

Bei einer Einstellung von average = 1 und cycletime = 0 werden die meisten Datenpunkte während einer Messung aufgezeichnet. Für Bindungsvorgänge mit schnellen Bindungskinetiken, die eine hohe zeitliche Auflösung erfordern, könnte diese Einstellung daher vorteilhaft sein. Auf der anderen Seite wird dabei eine große Menge an Daten produziert und das Signalrauschen ist für das Auge deutlich größer wahrnehmbar, als bei einer Einstellung des average Wertes von 100. Statistisch betrachtet fällt das Signalrauschen jedoch kleiner aus. Auch bei der Einstellung einer cycletime von 1 kann ein kleineres Rauschen bei einem average Wert von 100 beobachtet werden, als es bei der Einstellung average = 1 auftritt. Auch in diesem Fall reduziert sich dabei gleichzeitig die Menge aufgezeichneter Datenpunkte und die zeitliche Auflösung wird hierdurch um einen Faktor von ca. 2 schlechter.

Die vom Detektionsmodul ausgegebenen Signale in Abhängigkeit der aufgezeichneten Datenpunkte wurden auf eine gemeinsame Zeitskala durch Multiplikation der Datenpunkte mit den entsprechenden Faktoren umgerechnet, sodass die Bindungskurven für unterschiedliche Average-Einstellungen bei gleicher Cycletime in einem Graph verglichen werden konnten. Bei der Einstellung eines average-Wertes von 100 beträgt die Messzeit pro Datenpunkt unabhängig von der



Einstellung der cycletime 2,19 s. Bei einer cycletime von null Sekunden werden so viele Datenpunkte wie möglich vom Detektionsmodul aufgezeichnet und es ergibt sich pro Datenpunkt eine Messzeit von ca. 60 ms. Die zeitaufgelösten Bindungssignale sind in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31:** Zeitaufgelöste Bindungssignale bei Einstellung unterschiedlicher average-Werte und konstanter cycletime in der Software des Detektionsmoduls, dargestellt für eine cycletime von 0 (links) sowie 1 (rechts).

Trotz gleicher Messbedingungen, fällt die Steigung des Bindungssignals bei einer cycletime von 0 für Messungen mit average = 1 jeweils deutlich geringer aus als bei Messungen mit der Einstellung average = 100. Dieser Effekt kann, wenn auch in deutlich geringerer Ausprägung, bei einer cycletime von 1 ebenfalls beobachtet werden.

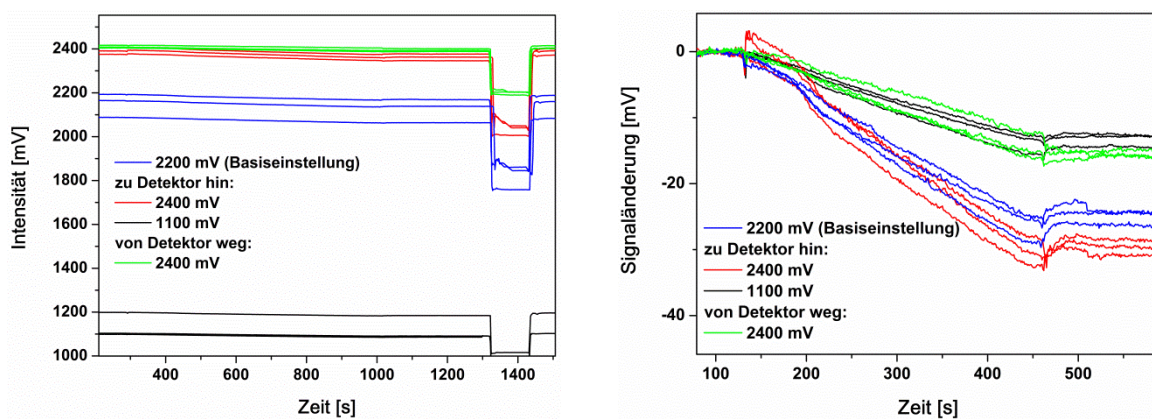
Dieser Effekt kann nicht vollständig erklärt werden. Ein Temperatureffekt innerhalb des Detektors, z.B. eine bei höheren Temperaturen weniger empfindliche Photodiode, aufgrund der großen Datenmenge bei einer cycletime von 0 und einem average Wert von 1, konnte ausgeschlossen werden.

Da der Effekt unterschiedlich ausfallender Signalsteigungen bei einer cycletime von 1 im Rahmen der Messgenauigkeit nicht merklich ausgebildet ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Verarbeitung der großen Datenmenge bei einer cycletime von 0 eine mögliche Ursache für die Signalabweichung darstellen kann. Dies konnte abschließend jedoch nicht vollständig erklärt werden.

Aufgrund der deutlich geringeren Datenmenge für die Einstellung cycletime = 1 und der höheren Signalsteigung bei geringerem Rauschen unter der Einstellung average = 100 wurden alle Messungen in dieser Arbeit mit diesen Detektoreinstellungen durchgeführt. Die zeitliche Auflösung für die Detektion biomolekulare Bindungsvorgänge war unter diesen Einstellungen ausreichend hoch.

### 4.1.3 Einfluss des Messaufbaus auf das Bindungssignal

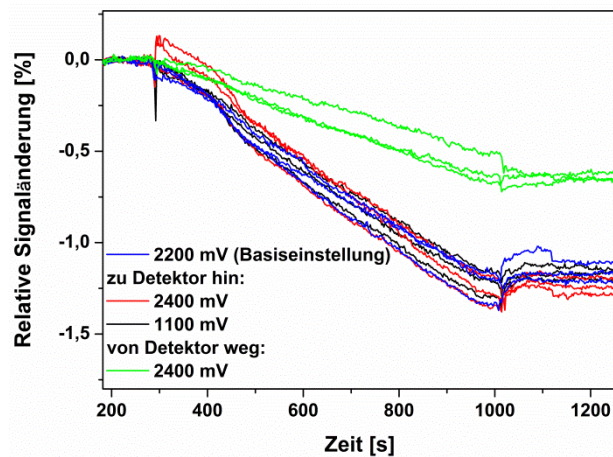
Um bei dem unter Abschnitt 3.2.5.1 beschriebenen Messaufbau für die 1-lambda-Reflektometrie zu überprüfen, inwiefern sich der Abstand zwischen Transducer und Detektor auf das Signal auswirkt, wurden einheitliche Dreifachmessungen mit Modellantikörper unter Variation des Abstandes durchgeführt. Ausgehend von einer für das Auge als scharf wahrgenommenen, punktförmigen Abbildung der Lichtquelle auf der Transducerrückseite („Basiseinstellung“), wurde der Transducer sowohl zum Detektor hin als auch vom Detektor weg verschoben. Die vom Detektor ausgegebenen Intensitäten sowie die absoluten Signaländerungen sind in Abbildung 32 dargestellt.



**Abbildung 32:** Absolute Signalintensitäten einzelner Messzyklen bei Verschiebung des Transducers ausgehend von der Basiseinstellung (links) sowie erhaltene absolute Intensitätsänderungen aufgrund biomolekularer Wechselwirkung für unterschiedliche Abstände zwischen Transducer und Detektor (rechts).

Ausgehend von der Basiseinstellung erhöht sich bei minimaler Verschiebung des Transducers zum Detektor hin die Intensität. Vermutlich wird dabei eine andere Grenzfläche des Transducers fokussiert, wie etwa die hochbrechende Tantalpentoxidschicht, sodass die Signalintensität zunächst ansteigt (2400 mV, rot). Bei weiterer Verschiebung des Transducers in die Richtung des Detektors kann eine stetige Abnahme der Intensität beobachtet werden und der auf dem Transducer abgebildete Fokus der Lichtquelle wird größer und unscharf (1100 mV). Wird der Transducer ausgehend von der Basiseinstellung vom Detektor weg verschoben, so werden ähnlich hohe Signalintensitäten erhalten, wie bei minimaler Verschiebung des Transducers in Richtung des Detektors (2400 mV, grün). Werden jedoch die entsprechenden Signaländerungen bei Detektion der Antikörperanbindung betrachtet, so fallen diese in Abhängigkeit des Abstandes sehr unterschiedlich aus. Ausgehend von der Basiseinstellung nimmt die absolute Signaländerung mit steigender Intensität zu (2400 mV, rot) und mit fallender Intensität ab (1100 mV), sofern eine Verschiebung des Transducers in Richtung des Detektors erfolgt. Bei einer Verschiebung des Transducers in die entgegengesetzte Richtung, kann ein vergleichsweise sehr geringes

Signal trotz hoher Intensität beobachtet werden (2400 mV, grün). Da sich die Signalintensität auf die Signaländerung während der biomolekularen Wechselwirkung auswirkt, wurden die erhaltenen Signalintensitäten auf ihre Anfangswerte normiert. Die relativen Signaländerungen während der biomolekularen Wechselwirkung sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** Relative Signaländerung aufgrund biomolekularer Wechselwirkung für unterschiedliche Abstände zwischen Transducer und Detektor.

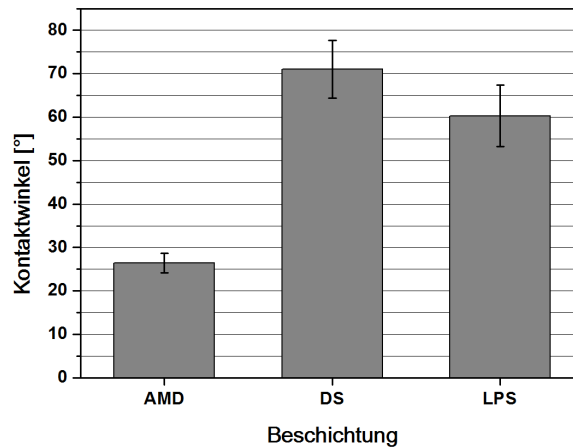
In dieser Auftragung ist gut sichtbar, dass bei Verschiebung des Transducers ausgehend von der Basiseinstellung hin zum Detektor, unabhängig vom justierten Abstand sehr reproduzierbare, relative Signaländerungen erhalten werden. Eine Verschiebung des Transducers ausgehend von der Basiseinstellung vom Detektor weg führt zu deutlich geringeren relativen Signaländerungen. Daher ist es bei der Justierung des Transducers im Messaufbau erforderlich, dass Messungen stets in der Basiseinstellung bzw. in einem geringeren Abstand zwischen Transducer und Detektor durchgeführt werden. Wird dies berücksichtigt, liegt ein einfach justierbarer Messaufbau vor, der gegenüber Schwankungen im Abstand zwischen Transducer und Detektor, wie sie z.B. beim Ein- und Ausbau des Transducers in die Flusszelle vorkommen, sehr robust ist.

## 4.2 Assayentwicklung für den Nachweis von Salmonelleninfektionen

Geeignete sensitive Schichten für den Nachweis von Salmonelleninfektionen wurden auf Interferenzglas bereits entwickelt [Ewald, 2009]. Da bei Interferenzglas eine 330 nm dicke Siliziumdioxidschicht aufgedampft ist, welche bei Goetheglas nur 20 nm beträgt, kann es unter Umständen trotz gleicher Präparation zu Abweichungen im Aufbau der sensitiven Schicht und dadurch im Signal der biomolekularen Wechselwirkung kommen [Kumpf, 2005; Markovic, 2008]. Da in dieser Arbeit Goetheglas als Transducermaterial eingesetzt wurde, musste die auf Interferenzglas entwickelte Oberflächenchemie zunächst auf dieses Glassubstrat übertragen werden.

#### 4.2.1 Charakterisierung der Chippräparation mittels Kontaktwinkelmessungen

Zur Charakterisierung der erzeugten Schichten nach den einzelnen Präparationsschritten wurde deren Benetzung mit Wasser durch Kontaktwinkelmessungen untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.



**Abbildung 34:** Kontaktwinkelmessungen nach Modifizierung der Sensorchips mit Aminodextran (AMD), Decansäure (DS) und Lipopolysaccharid (LPS).

Bei frisch aktivierten, mit Piranha behandelten Transducern konnte eine vollständige Benetzung der Oberfläche mit Wasser beobachtet werden, sodass die Bestimmung des Kontaktwinkels messtechnisch nicht möglich war. Die sehr hydrophile Transduceroberfläche mit einem hypothetischen Kontaktwinkel von  $0^\circ$  ist jedoch ein Indiz, dass die Aktivierung der Oberfläche, d.h. die Ausbildung von Hydroxylfunktionen, erfolgreich war. Nach Modifikation der Oberfläche mit Aminodextran (AMD) konnten Kontaktwinkel von  $26^\circ$  beobachtet werden, was gut mit Werten aus der Literatur für aminofunktionalisierte Oberflächen übereinstimmt [Piehler, et al., 2000]. Durch die kovalente Kopplung der Decansäure (DS) wird die Oberfläche deutlich hydrophober und es werden Kontaktwinkel von  $71^\circ$  erhalten. Dies deutet auf eine erfolgreiche Immobilisierung der Decansäure über ihre Carboxylfunktion hin. Die auf der Oberfläche befindlichen Decanreste bieten somit eine gute Basis für die angestrebte Immobilisierung des Antigens Lipopolysaccharid (LPS) über hydrophobe Wechselwirkung. Nach Auftropfen des Antigens verringert sich der Kontaktwinkel auf einen Wert von  $60^\circ$ , was gut mit den endständigen Zuckerresten des LPS auf der Oberfläche in Einklang gebracht werden kann. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine gerichtete Immobilisierung des LPS erreicht wurde, bei dem der hydrophobe Lipid A Rest den Decanresten auf der Oberfläche zugewandt ist und das O-Antigen für den Antikörper gut zugänglich von der Oberfläche weg steht (vgl. Abbildung 12).

#### 4.2.2 Charakterisierung der Chippräparation mittels spektraler Ellipsometrie

Zur Charakterisierung der erhaltenen Schichtdicken nach Durchführung der einzelnen Präparationsschritte wurden mittels spektraler Ellipsometrie Messungen unter einem Winkel von  $70^\circ$  aufgezeichnet. Hierzu wurde die Präparation der sensitiven Schicht auf Siliziumwafern analog zur Präparation auf Goetheglas durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse für die Schichtdicken nach Auswertung der Spektren gemäß Abschnitt 3.2.3 sind in Abbildung 35 dargestellt.

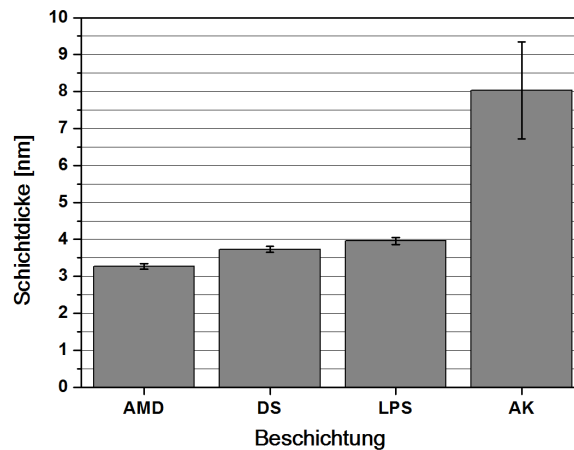


Abbildung 35: Messungen mit spektraler Ellipsometrie nach Modifikation der Sensorchips mit Aminodextran (AMD), Decansäure (DS), Lipopolysaccharid (LPS) und Antikörper (AK).

Die einzelnen Schichtdicken sind bis zum letzten Präparationsschritt, der Aufbringung des LPS, sehr gut reproduzierbar und es kann während der Präparation von Schicht zu Schicht eine Schichtdickenzunahme beobachtet werden. Auch der Antikörper (AK) bindet an die präparierte Oberfläche, jedoch konnten größere Schwankungen bei den erhaltenen Schichtdicken festgestellt werden. Dies lässt sich darin begründen, dass die Messungen nicht im wässrigen Medium, sondern an Luft durchgeführt wurden und dies nicht den natürlichen Gegebenheiten eines Antikörpers entspricht.

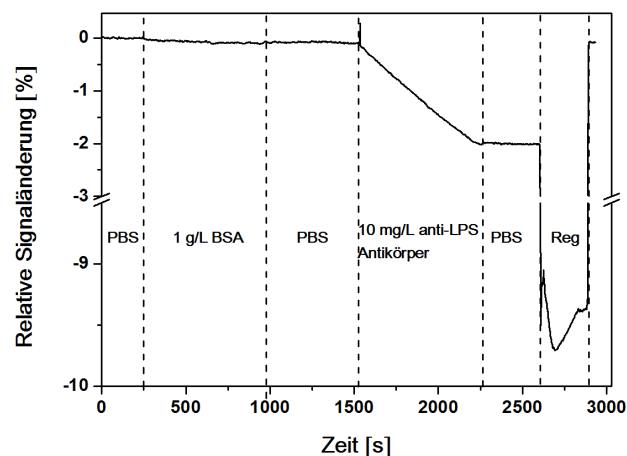
Tendenziell werden größere Schichtdicken während Messungen mittels 1-lambda-Reflektometrie erwartet, da ein Quelleffekt des AMDs im wässrigen Medium beobachtet werden kann [Mutschler, 2004] und zum anderen der Antikörper in diesem Medium in einem nativeren Zustand als an Luft vorliegt und demnach vermutlich eine höhere Aktivität aufweist. Dennoch bestätigt die Zunahme der Schichtdicke während der Präparation, dass die Herstellung der sensitiven Schicht erfolgreich war und der Antikörper an das Antigen bindet.

#### 4.2.3 Antikörperdetektion mittels 1-lambda-Reflektometrie

Für die zeitaufgelöste Detektion der biomolekularen Interaktion zwischen Antikörper und LPS mittels 1-lambda-Reflektometrie ist es zwingend erforderlich, dass präparierte sensitive Schicht-

ten gut gegenüber unspezifischer Wechselwirkung mit Matrixbestandteilen aus der Analytlösung bzw. mit analytähnlichen Bestandteilen abgeschirmt sind. Des Weiteren ist es wünschenswert, mehrere Messungen auf einem Transducer durchführen zu können.

Daher wird zunächst durch Zugabe einer hoch konzentrierten Proteinlösung (1 g/L Rinderserumalbumin, BSA) über die Oberfläche überprüft, ob zwischen der präparierten Oberfläche und Proteinen unspezifische Wechselwirkung auftritt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 mg/L Antikörperlösung über die sensitive Schicht sowie ein Regenerationsschritt. Das zeitaufgelöste Bindungssignal ist in Abbildung 36 dargestellt.



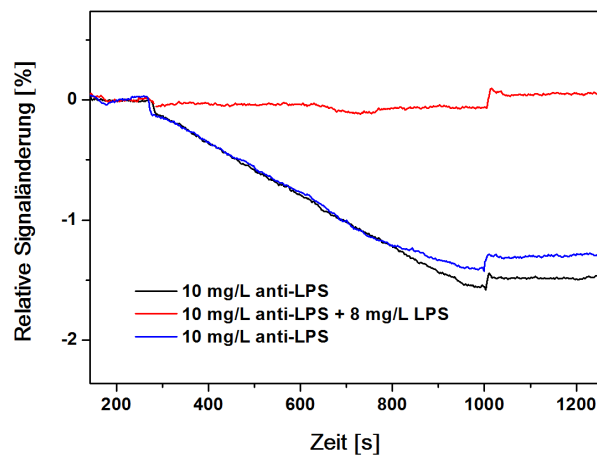
**Abbildung 36:** 1-lambda-Reflektometrie Bindungssignal für 1 g/L Rinderserumalbumin (BSA) und 10 mg/L anti-LPS Antikörper mit nachfolgender Regeneration der Sensoroberfläche.

Bei Injektion der Salmonellenantikörper-Lösung über die LPS beschichtete Oberfläche kann, in Analogie zu den ellipsometrischen Messungen, eine Signaländerung beobachtet werden, d.h. der Antikörper bindet an die sensitive Schicht. Das erhaltene Bindungssignal bei Zugabe von BSA bleibt im Vergleich zum Antikörper Bindungssignal aus, obwohl die verwendete BSA Konzentration um einen Faktor von 100 höher ist. Daher scheint die Oberfläche sehr gut gegenüber unspezifischer Wechselwirkung mit Proteinen abgeschirmt zu sein. Das Antikörper Bindungssignal verläuft linear, was für eine massentransportkontrollierte Reaktion an der sensitiven Schicht und somit für eine hohe Oberflächenbeladung mit LPS spricht [Eddowes, 1987]. An der sensitiven Schicht stehen folglich viele LPS Bindungsstellen zur Verfügung, sodass jeder Antikörper nach Diffusion an die Oberfläche unmittelbar an ein freies LPS Epitop binden kann. Als Regenerationsmittel wurde eine 6 molare Guanidinhydrochloridlösung mit einem pH Wert von 1,5 eingesetzt. Durch seine chaotrope Wirkung kommt es zur Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit zur Denaturierung der auf der Oberfläche gebundenen Antikörper, sodass diese in einem nachfolgenden Spülschritt mit Puffer von der Oberfläche entfernt werden können. Nachfolgende Messungen mit Antikörper führen erneut zum ursprünglich erhaltenen Bin-

dungssignal und bestätigen, dass die Oberfläche durch die verwendete Regenerationslösung nicht beschädigt wird (vgl. Abschnitt 4.2.4).

#### 4.2.4 Test des Bindungssignals auf Spezifität

Um zu überprüfen, ob das erhaltene Antikörperbindungssignal auf der spezifischen Wechselwirkung der Antikörperparatope mit den Epitopen der Antigene basiert, wurde ein Bindungshemmtest durchgeführt. Dazu wurde ein 3-fach molarer Überschuss an LPS zur Antikörperlösung gegeben und diese vorinkubierte Mischung über die Sensoroberfläche geleitet. In diesem Fall sollten alle Paratope der Antikörper mit den LPS Epitopen in Lösung abgesättigt sein, sodass bei Zugabe der Mischung über den Sensor kein Antikörper mehr mit seinem Paratop an das auf der Oberfläche immobilisierte LPS binden kann. Die erhaltenen Bindungskurven für den Bindungshemmtest sowie Kontrollmessungen sind in Abbildung 37 dargestellt.



**Abbildung 37:** Inhibition des anti-LPS-Antikörper Bindungssignals durch Zugabe eines molaren Überschusses an LPS zur Antikörperlösung mit zuvor und danach durchgeführten Antikörper Kontrollmessungen.

Bei Inhibition der Wechselwirkung hebt sich das entsprechend ausbleibende Bindungssignal (keine Signalabnahme) gut sichtbar vom zuvor erhaltenen Antikörperbindungssignal ab. Eine anschließende Wiederholung der Messung mit 10 mg/L Antikörperlösung bestätigt, dass es sich beim zuvor ausbleibenden Bindungssignal um eine Inhibition und nicht etwa um einen Aktivitätsverlust der Oberfläche handelt. Somit kann die Spezifität der Wechselwirkung bestätigt werden.

#### 4.2.5 Kalibrierung des Sensors in Puffer

Basierend auf den erlangten Erkenntnissen bezüglich Messaufbau, Oberflächenpräparation und Assayentwicklung, konnte die neue Sensorplattform in Puffer kalibriert werden. Zur Kalibrierung wurden Konzentrationen an Salmonellenantikörpern zwischen 0 und 200 mg/L verwendet und



diese gemäß Abschnitt 3.2.5.1 gemessen und entsprechend Abschnitt 3.2.6 ausgewertet. Die erhaltenen Signale für jede Konzentration sowie die aus den Dreifachmessungen erhaltene Kalibrierkurve sind in Abbildung 38 dargestellt. Die Werte der Kalibrierfunktion, die ermittelte Nachweis- (MDC) und Bestimmungsgrenze (RDL) sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 2 aufgeführt.

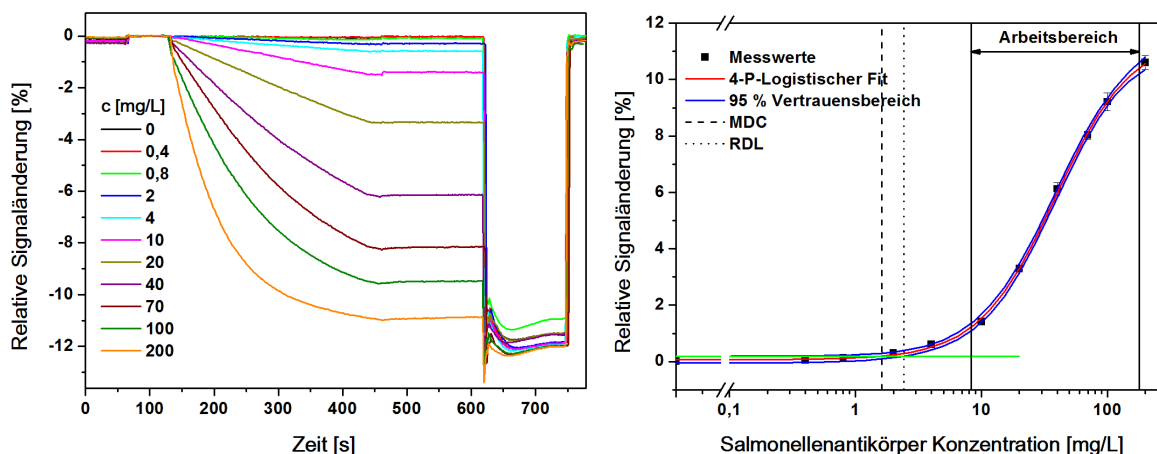


Abbildung 38: Zeitlicher Signalverlauf in Abhängigkeit der eingesetzten Salmonellenantikörper Konzentration (links) sowie die aus den Konzentrationsmessungen in Puffer erhaltene Kalibrierkurve mit den eingezeichneten Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich (rechts).

Tabelle 2: Parameter der Kalibrierfunktion (links) und daraus ermittelte Kenngrößen (rechts) für die Kalibrierung in Puffer.

	Wert	Standardfehler		[mg/L]
R	0,9994		MDC	1,62
A <sub>1</sub>	0,0007	0,000519	RDL	2,43
A <sub>2</sub>	0,1156	0,00203	Arbeitsbereich	8,26-179,34
x <sub>0</sub>	38,5	1,31941		
p	1,43	0,05239		

Bei den erhaltenen Bindungskurven für unterschiedliche Konzentrationen an Salmonellenantikörpern verläuft das Signal bei Konzentrationen bis zu 20 mg/L linear. In diesem Konzentrationsbereich liegt folglich eine massentransport-kontrollierte Reaktion vor, d.h. es sind vergleichsweise viele LPS Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche, sodass jeder Antikörper dort unverzüglich einen Bindungspartner vorfindet. In diesem Fall ist somit die Diffusion der Antikörper zur Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der detektiert wird. Bei höheren Konzentrationen an Salmonellenantikörpern kann eine Krümmung im Signalverlauf beobachtet werden, die mit steigender Konzentration mehr und mehr in eine Signalsättigung übergeht. In diesem Fall liegt teilweise bereits eine kinetisch kontrollierte Reaktion vor, sodass sich im Laufe des Bindungsprozesses weniger LPS Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche als



Salmonellenantikörper in Lösung befinden. Daher ist nicht mehr die Diffusion der Antikörper zur Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sondern die Bindungskinetik an der Oberfläche. Da jedoch Signale ab 20 mg/L Antikörperkonzentration nur leicht gekrümmt sind und erst ab 200 mg/L stärker in eine Gleichgewichtsbeladung übergehen, sind die beobachteten Signale in diesem Konzentrationsbereich wahrscheinlich von beiden beschriebenen Bindungsprozessen überlagert.

Auch in der Kalibrierkurve ist eine Annäherung an die obere Asymptote der sigmoidalen Fitkurve bei hohen Konzentrationen im Bereich von 200 mg/L gut erkennbar, jedoch noch keine vollständige Signalsättigung. Daher basiert der erhaltene Wert für die obere Asymptote  $A_2$  auf einer Extrapolation des Fits über den eigentlichen Messbereich hinaus. Da die Fitfunktion sowie der Vertrauensbereich sehr gut mit den gemessenen Werten übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass auch die extrapolierten Werte den tatsächlichen Signalverlauf gut wiedergeben. Es ergibt sich somit ein Arbeitsbereich zwischen 8,26 mg/L und 179,34 mg/L, welcher innerhalb des zur Kalibrierung verwendeten Konzentrationsbereichs liegt und auch für hohe Salmonellenantikörper Konzentrationen eine Quantifizierung zulässt.

#### 4.2.6 Vergleich der 1-lambda-Reflektometrie mit RfS anhand von Kalibrierfunktionen

Für einen Vergleich von 1-lambda-Reflektometrie- und RfS-Messungen wurden mittels RfS durchgeführte Konzentrationsmessungen [Ewald, 2009] analog zu 1-lambda-Reflektometrie-Messungen bezüglich ihrer relativen Signaländerung ausgewertet. Die erhaltene Kalibrierfunktion ist in Abbildung 39 dargestellt und wird in Tabelle 3 bezüglich ihrer Fitparameter sowie ihrer Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich mit den erhaltenen Werten der 1-lambda-Reflektometrie Kalibrierung verglichen.

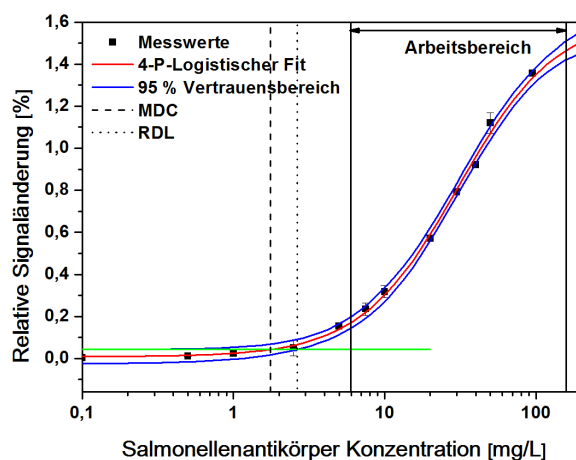


Abbildung 39: Mittels RfS erhaltene Kalibrierfunktion bei Auswertung der relativen Signaländerung mit den eingezeichneten Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich.

Tabelle 3: Vergleich der mittels 1-lambda-Reflektometrie und RfS erhaltenen Kenngrößen der Kalibrierungen.

Methode	Testmittelpunkt $x_0$ [mg/L]	Steigung p [% · L/mg]	MDC [mg/L]	RDL [mg/L]	Arbeitsbereich [mg/L]
1-lambda-Reflektometrie	38,50	1,43	1,62	2,43	8,26 - 179,34
RfS	30,74	1,34	1,75	2,63	5,97 – 158,16

Die mittels 1-lambda-Reflektometrie und RfS ermittelten Kenngrößen der Kalibrierungen sind sich sehr ähnlich. Bei der Kalibrierung mittels 1-lambda-Reflektometrie wird eine etwas höhere Empfindlichkeit (Steigung p der Kalibrierfunktion) erreicht sowie ein etwas größerer Arbeitsbereich und ein entsprechend zu höheren Konzentrationen hin verschobener Testmittelpunkt  $x_0$ . Die MDC und RDL Werte unterscheiden sich kaum. Somit können unter Verwendung der 1-lambda-Reflektometrie bei Wahl eines geeigneten Schichtsystems sowie einer geeigneten Wellenlänge durchaus vergleichbare bzw. sogar bessere Ergebnisse erzielt werden, wie sie unter Anwendung der RfS beobachtet werden können.

### 4.2.7 Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit in Puffer

Zur Validierung der mittels 1-lambda-Reflektometrie erhaltenen Kalibrierfunktion wurde die Wiederfindung von drei Antikörperkonzentrationen auf Sensorchips dreier verschiedener Batches untersucht. Die erhaltenen Wiederfindungen wurden gemäß Abschnitt 3.2.6.4 bestimmt und sind in Abbildung 40 dargestellt.

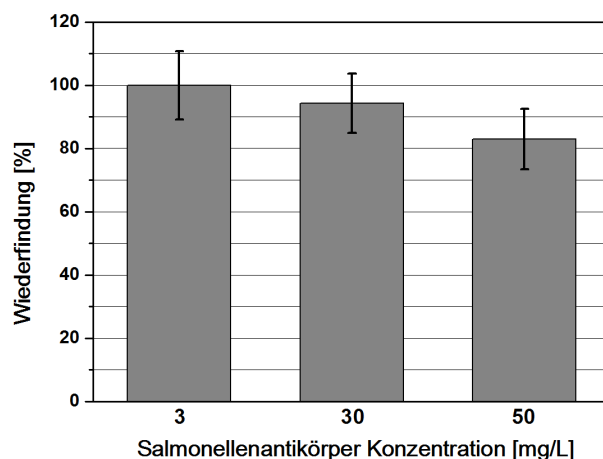


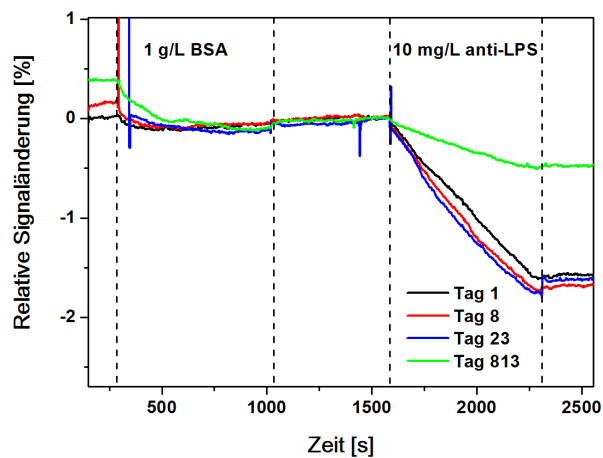
Abbildung 40: Ermittelte Wiederfindungsraten für drei Antikörperkonzentrationen auf Sensorchips dreier verschiedener Batches in Puffer.

Die ermittelten Wiederfindungsraten liegen im Mittel zwischen 83 % und 100 % und bestätigen somit die Gültigkeit der Kalibrierfunktion für analog präparierte Sensorchips. Generell lässt sich ein Trend erkennen, dass die Wiederfindung hin zu größeren Antikörperkonzentrationen ab-

nimmt. Möglicherweise wies der zur Kalibrierung verwendete Sensorchip eine vergleichsweise höhere Beladung mit LPS auf, sodass der kinetisch kontrollierte Signalverlauf für hohe Konzentrationen tendenziell weniger stark ausgeprägt war bzw. erst bei höheren Konzentrationen einsetzte. Generell liegen alle ermittelten Wiederfindungen jedoch im allgemein gültigen Bereich zwischen 70 % und 130 % und demonstrieren somit eine sehr gute inter-Chip Reproduzierbarkeit.

#### 4.2.8 Langzeituntersuchung eines Sensorchips

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität präparierter Sensorchips für den Nachweis von Salmonelleninfektionen wurde ein Chip in trockenem Zustand bei Raumtemperatur gelagert und über eine Gesamtdauer von mehreren Wochen hinweg stichprobenartig mittels 1-lambda-Reflektometrie untersucht. Dabei wurden sowohl die unspezifische Wechselwirkung der Oberfläche mit BSA als auch die spezifische Wechselwirkung mit Salmonellenantikörpern betrachtet. Nach einer Dauer von 813 Tagen wurde der Sensorchip ein weiteres Mal bezüglich dieser Wechselwirkungen untersucht. Die erhaltenen Signale zu vier verschiedenen Zeitpunkten sind in Abbildung 41 dargestellt.



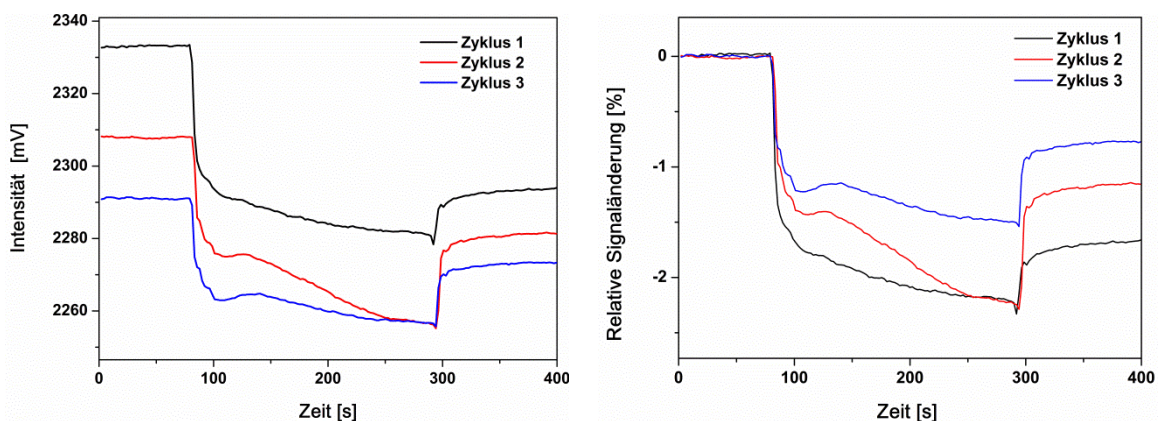
**Abbildung 41:** Untersuchung eines Sensorchips zum Nachweis von Salmonelleninfektionen über eine Zeitdauer von 813 Tagen bezüglich unspezifischer Wechselwirkung mit BSA sowie der spezifischen Wechselwirkung mit anti-LPS Antikörpern.

Über eine Dauer von 23 Tagen sind in den Signalen für die Wechselwirkung der Oberfläche mit BSA sowie mit Salmonellenantikörpern keine markanten Abweichungen sichtbar. Dies spricht für eine sehr stabile Sensoroberfläche, die ohne größeren Aufwand wie etwa Kühlung, Lichtausschluss oder Aufrechterhaltung von Feuchtigkeit gelagert werden kann. Sogar nach einer Lagerung unter diesen Bedingungen über eine Dauer von mehr als zwei Jahren kann noch ein Antikörpersignal detektiert werden, wenn auch mit einem Signalverlust von 70 % sowie einer höheren unspezifischen Wechselwirkung mit BSA. Dennoch verläuft dieses Signal linear, was für eine

nach wie vor vorhandene hohe Anzahl an LPS Erkennungsstrukturen auf der Sensoroberfläche spricht. Möglicherweise könnte die Langzeitstabilität des Sensors bei Lagerung unter konstanten Bedingungen bezüglich Temperatur und Luftfeuchte sogar weiter gesteigert werden, sodass auch über größere Zeiträume hinweg das Bindungssignal für Salmonellenantikörper konstant bleibt.

### 4.2.9 Kalibrierung des Sensors in Serum

Für den Einsatz des Sensors in der Realmatrix Serum ist es erforderlich, den Sensor in dieser Matrix zu kalibrieren. Als Modellmatrix für Realseren wurde Rinderserum (*fetal bovine serum*, *FBS*) verwendet. Zunächst wurde untersucht, inwiefern Matrixbestandteile zu Störungen im Sensorsignal führen. Hierfür wurde FBS in drei aufeinanderfolgenden Zyklen als Probe injiziert und die unspezifische Wechselwirkung von FBS mit der Sensoroberfläche untersucht. Die erhaltenen Signale sind in Abbildung 42 dargestellt.

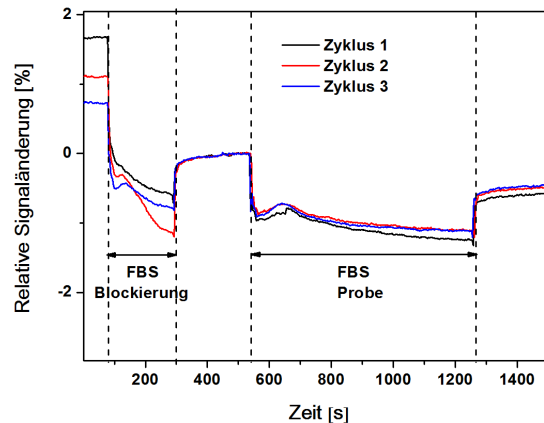


**Abbildung 42:** Unspezifische Wechselwirkung von Serum (FBS) mit der Sensoroberfläche bei drei aufeinanderfolgenden Messzyklen. Dargestellt sind die Abnahme der absoluten Intensität im Niveau der Basislinie nach jedem Zyklus (Regeneration nicht im Bildausschnitt) (links) sowie die entsprechende relative Signaländerung mit überlagerten Matrixeffekten im Kurvenverlauf aufgrund von unspezifischer Wechselwirkung mit Serum (rechts).

Bei Injektion von Serum als Probe, kann ein ausgeprägtes unspezifisches Bindungssignal beobachtet werden, welches aufgrund der Matrixbestandteile des Serums einen gestörten Signalverlauf aufweist. Von Zyklus zu Zyklus setzt sich die Sensoroberfläche nach und nach mit Serum zu, was an der Abnahme der absoluten Intensität im Niveau der Basislinie beobachtet werden kann. Da die Belegung mit Serum von Zyklus zu Zyklus unterschiedlich hoch ausfällt, ist die Quantifizierung eines Analyten durch Auswertung dieses Signalbereichs somit nicht möglich.

Daher wurde ein Blockierungsschritt mit Serum vor der eigentlichen Probeninjektion eingeführt, um den nicht reproduzierbaren Matrixeffekt des Serums im Probensignal zu eliminieren. In Abbildung 43 sind drei aufeinanderfolgende Zyklen jeweils bestehend aus einem Blockierungs-

schritt mit Serum sowie der Probeninjektion in Serum dargestellt, wobei in dieser Voruntersuchung die Probe nur die Matrix Serum beinhaltet und keinen Analyten.



**Abbildung 43:** Eliminierung der Signalstörung von Serum im Probensignal durch Einführung eines Blockierungsschrittes mit Serum. Das Niveau der Basislinie vor der Probeninjektion wurde auf 0 % gesetzt. Die Änderung des Signalverlaufs nach ca. 650 s ist auf eine Druckschwankung in der Flusszelle aufgrund von ungelösten Serumbestandteilen innerhalb des Flusskanals zurückzuführen.

Durch die Einführung des Blockierungsschrittes mit Serum sind die darauf folgenden Probensignale bei erneuter Seruminjektion reproduzierbarer. Innerhalb des ersten Messzyklus auf einem Sensorchip kann im Probensignal noch eine weitere Belegung mit Serum beobachtet werden, da zu diesem Zeitpunkt vermutlich noch nicht alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Oberfläche mit Serum abgesättigt sind. Die Probensignale in Messzyklus zwei und drei liegen jedoch bereits sehr reproduzierbar übereinander, sodass in diesem Bereich die Quantifizierung des Analyten nun möglich ist.

Basierend auf diesen Voruntersuchungen wurde der Sensor in Serum kalibriert. Zur Kalibrierung wurden Konzentrationen an Salmonellenantikörpern zwischen 0 und 70 mg/L verwendet und diese gemäß Abschnitt 3.2.5.1 gemessen und entsprechend Abschnitt 3.2.6 ausgewertet. Die erhaltenen Signale für jede Konzentration sowie die aus den Dreifachmessungen erhaltene Kalibrierkurve sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Werte der Kalibrierfunktion, die ermittelte Nachweis- (MDC) und Bestimmungsgrenze (RDL) sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 4 aufgeführt.

#### 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

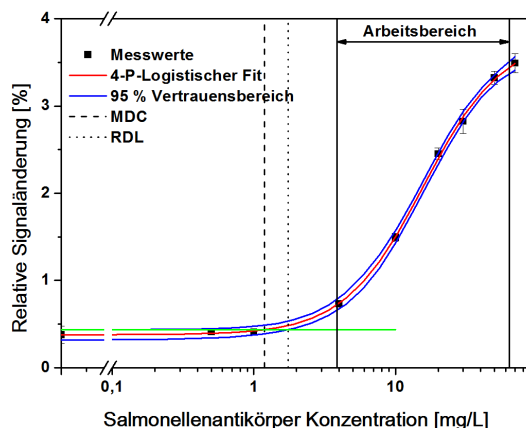


Abbildung 44: Aus den Konzentrationsmessungen in Serum erhaltene Kalibrierkurve mit den eingezeichneten Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich.

Tabelle 4: Parameter der Kalibrierfunktion (links) und daraus ermittelte Kenngrößen (rechts) für die Kalibrierung in Serum.

	Wert	Standardfehler		[mg/L]
R	0,9992		MDC	1,18
A <sub>1</sub>	0,0038	0,000226839	RDL	1,74
A <sub>2</sub>	0,0378	0,000726828	Arbeitsbereich	3,87 - 63,60
x <sub>0</sub>	15,7	0,59598		
p	1,57	0,07914		

Die verwendete 4-Parameter Logistische Fitfunktion bildet die gemessenen Werte sehr gut ab, sodass angenommen werden kann, dass der über die Messwerte hinaus extrapolierte Verlauf der Kurve hin zur oberen Asymptote A<sub>2</sub> die Signale für hohe Antikörperkonzentrationen ebenfalls gut wiedergibt. Daraus ergibt sich ein Arbeitsbereich von 3,87 mg/L bis 63,60 mg/L, der innerhalb des zur Kalibrierung verwendeten Messbereichs liegt.

Für einen Vergleich der Kenngrößen für die Kalibrierung des Sensors in Puffer und Serum, wurden die entsprechenden Werte in Tabelle 5 gegenübergestellt.

Tabelle 5: Vergleich der erhaltenen Kenngrößen der Kalibrierungen in Puffer und Serum.

Matrix	Testmittelpunkt x <sub>0</sub> [mg/L]	Steigung p [% · L/mg]	MDC [mg/L]	RDL [mg/L]	Arbeitsbereich [mg/L]
PBS	38,50	1,43	1,62	2,43	8,26 - 179,34
FBS	15,69	1,57	1,18	1,74	3,87 - 63,60

Die ermittelten Werte für MDC und RDL liegen bei der Kalibrierkurve in Serum bei leicht niedrigeren Konzentrationen. Das bedeutet, dass die Kalibrierkurve für Serummessungen bei kleineren Konzentrationen in den dynamischen Signalbereich übergeht als die Kalibrierkurve für Puffer-

messungen. Folglich fallen bei Messungen im Serum die Antikörpersignale bei kleinen Konzentrationen vergleichsweise höher aus als in Puffer. Doch auch bei höheren Konzentrationen setzt sich dieser Trend fort, was an der größeren Steigung der Kalibrierkurve für Messungen in Serum beobachtet werden kann. Dieser Effekt kann bei der Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen sehr häufig beobachtet werden. Generell stellt Serum für Antikörper eine native Matrix dar, in der vielerlei Bestandteile wie etwa Proteine enthalten sind, die den Antikörper in seiner Aktivität und Stabilität positiv beeinflussen. Daher werden in Serum häufig vergleichsweise höhere Antikörpersignale als in Puffer beobachtet.

Ein sehr deutlicher Unterschied zwischen den Kenngrößen der Kalibrierungen in Puffer und Serum findet sich im ermittelten Arbeitsbereich. Dieser fällt für Messungen in Serum kleiner aus, was vor allem an der früher einsetzenden Signalsättigung für Serummessungen im Bereich hoher Konzentrationen beobachtet werden kann. Aufgrund des Blockierungsschrittes mit Serum, werden vermutlich einige LPS Bindungsplätze auf der Sensoroberfläche von Serum belegt. Dies bedeutet, dass effektiv weniger LPS Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche sind, sodass sich bereits bei niedrigeren Antikörperkonzentrationen verhältnismäßig mehr Antikörper in Lösung als LPS Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche vorfinden und daher überwiegend kinetisch kontrollierte Signalverläufe beobachtet werden können.

### 4.2.10 Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit in Serum

Zur Validierung der erhaltenen Kalibrierfunktion für Konzentrationsmessungen in Serum wurde die Wiederfindung von je einer Antikörperkonzentration auf einem von drei Sensorchips verschiedener Batches untersucht. Die erhaltenen Wiederfindungen wurden gemäß Abschnitt 3.2.6.4 ermittelt und sind in Abbildung 45 dargestellt.

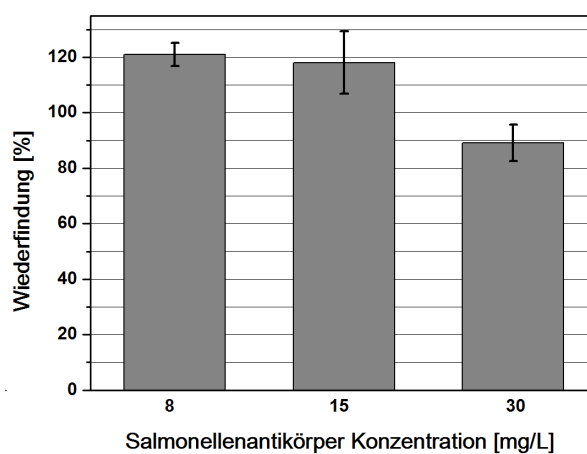


Abbildung 45: Ermittelte Wiederfindungsraten für drei Antikörperkonzentrationen auf Sensorchips dreier verschiedener Batches in Serum.

Die ermittelten Wiederfindungsraten liegen im Mittel zwischen 89 % und 121 % und bestätigen somit die Gültigkeit der Kalibrierfunktion für Serummessungen auf analog präparierten Sensorchips. Die Wiederfindungen für Antikörperkonzentrationen von 8 mg/L und 15 mg/L fallen tendenziell zu hoch aus. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass die zur Bestimmung der Wiederfindung verwendeten Sensorchips im Vorfeld mit deutlich weniger FBS in Kontakt waren, als der Sensorchip, der zur Kalibrierung verwendet wurde. Entsprechend könnten weniger LPS Erkennungsstellen mit Serum blockiert sein, was die höheren Signale erklären würde. Dagegen spricht jedoch, dass die Wiederfindung für Antikörperkonzentrationen von 30 mg/L unterhalb von 100 % liegt. Generell liegen alle ermittelten Wiederfindungen jedoch im allgemein gültigen Bereich zwischen 70 % und 130 % und demonstrieren somit eine gute inter-Chip Reproduzierbarkeit.

### 4.3 Assayentwicklung für den Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP)

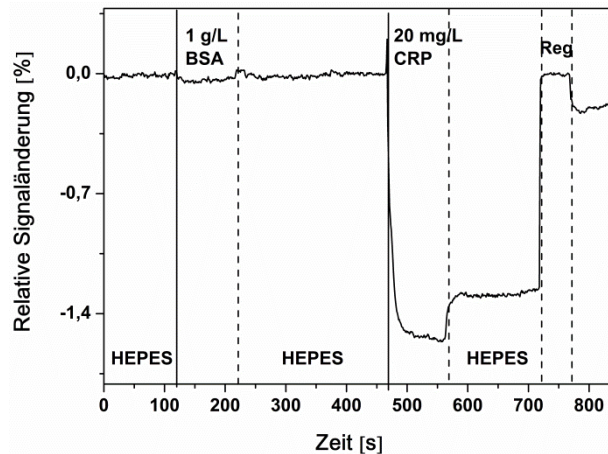
#### 4.3.1 Wahl geeigneter Assaybedingungen für den Nachweis von CRP

Für den Nachweis von CRP ist es erforderlich, anti-CRP Antikörper als Erkennungselemente auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren. Basierend auf der unter Abschnitt 3.2.1.5 beschriebenen Immobilisierungsstrategie für anti-CRP Antikörper wurde zunächst getestet, ob die präparierte sensitive Schicht gegenüber unspezifischer Wechselwirkung mit Proteinen abgeschirmt und ob eine Detektion von CRP mittels 1-lambda-Reflektometrie möglich ist. Für den Nachweis von CRP wurde als Puffer HEPES mit  $\text{CaCl}_2$  verwendet, da CRP unter Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen ein 118 kDa schweres Pentamer ausbildet. Für die Detektion mittels 1-lambda-Reflektometrie ist dies vorteilhaft, da durch die Ausbildung des Pentamers größere Analytmoleküle vorliegen, die zu größeren Signaländerungen führen und damit die Sensitivität des Sensors erhöhen.

Die erhaltenen Bindungssignale bei Zugabe einer hoch konzentrierten Proteinlösung (1 g/L Rinderserumalbumin, BSA) mit anschließender Zugabe einer 20 mg/L konzentrierten CRP-Lösung über die sensitive Schicht sind in Abbildung 46 dargestellt.

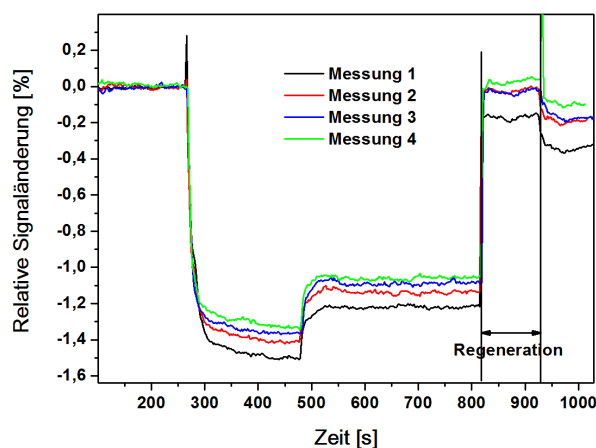
Bei Injektion der CRP Lösung über die anti-CRP Antikörper beschichtete Oberfläche kann eine Signaländerung beobachtet werden, d.h. CRP bindet an die sensitive Schicht. Das erhaltene Bindungssignal bei Zugabe von BSA bleibt im Vergleich zum CRP Bindungssignal aus, obwohl die verwendete BSA Konzentration um einen Faktor von 50 höher ist. Daher scheint die Oberfläche sehr gut gegenüber unspezifischer Wechselwirkung mit Proteinen abgeschirmt zu sein.





**Abbildung 46:** 1-lambda-Reflektometrie Bindungssignal für 1 g/L Rinderserumalbumin (BSA) und 20 mg/L CRP mit nachfolgender Regeneration der Sensoroberfläche.

Das CRP Bindungssignal läuft in eine Signalsättigung, was für eine kinetisch kontrollierte Reaktion an der sensitiven Schicht und somit für eine niedrige Oberflächenbeladung mit anti-CRP Antikörpern spricht. An der sensitiven Schicht stehen folglich wenige Bindungsstellen für Antikörper zur Verfügung, sodass die Kinetik der Wechselwirkung an der Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, der detektiert wird. Als Regenerationsmittel wurde eine 10 mM Glycinlösung mit einem pH Wert von 2,3 eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine relativ milde Regenerationslösung, die zwar die Wechselwirkung zwischen CRP und anti-CRP Antikörper aufheben, dabei jedoch die auf der Oberfläche befindlichen Antikörper nicht beschädigen soll. Um genauer zu überprüfen, inwiefern die Regenerationslösung nachfolgende Messungen beeinflusst, wurden mehrere Messzyklen auf einem Sensorchip durchgeführt. Die erhaltenen Bindungskurven sind in Abbildung 47 dargestellt.

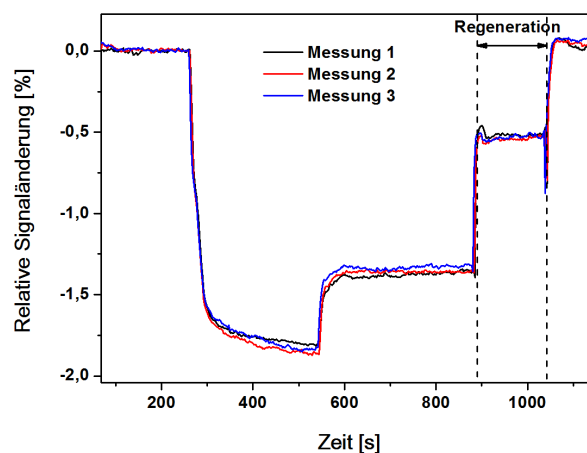


**Abbildung 47:** Vier aufeinanderfolgende Messzyklen mit je 20 mg/L CRP unter Verwendung einer 10 mM Glycinlösung bei einem pH-Wert von 2,3.

Bereits nach dem ersten Messzyklus kann gut erkannt werden, dass die nach der Regeneration erhaltene Basislinie unterhalb des Ausgangsniveaus liegt. Dies deutet auf eine unvollständige

Regeneration der Oberfläche hin, sodass ein Teil des gebundenen CRPs trotz Regeneration auf der Oberfläche bleibt. Für Folgemessungen bedeutet dies, dass weniger CRP aus der Probe an die sensitive Schicht binden kann. Dieser Effekt kann über die vier dargestellten Messzyklen hinweg sehr gut beobachtet werden; die CRP Bindungskurve geht von Zyklus zu Zyklus früher in eine Signalsättigung über. Für die Durchführung von mehreren reproduzierbaren Messungen auf einem Sensorchip ist diese Regenerationslösung daher ungeeignet.

Daher wurde als alternative Regenerationslösung eine 0,5 % SDS Lösung bei einem pH-Wert von 2 über drei Messzyklen hinweg getestet. Die erhaltenen Bindungskurven sind in Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 48:** Drei aufeinanderfolgende Messzyklen mit je 20 mg/L CRP unter Verwendung einer 0,5 % SDS-Lösung bei einem pH-Wert von 2,0.

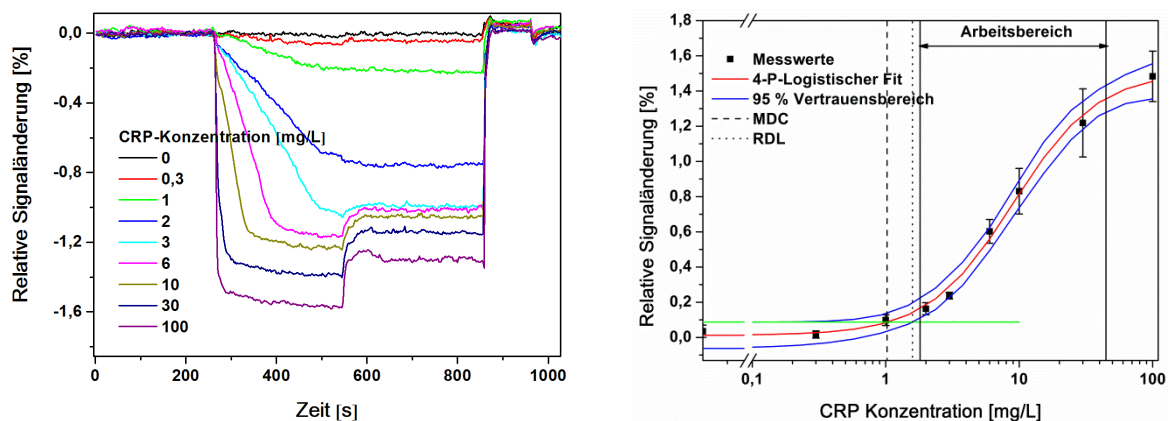
Die erhaltenen Bindungskurven der drei aufeinander folgenden Messungen sind im Vergleich zu den in Abbildung 47 dargestellten Bindungskurven deutlich reproduzierbarer. Auch das Niveau der Basislinie nach der Regeneration liegt ungefähr auf dem Niveau der Basislinie zu Beginn der Messung. Somit ist die Regenerationslösung SDS gut geeignet, um CRP von der Sensoroberfläche zu entfernen, ohne dabei die immobilisierten anti-CRP Antikörper zu beschädigen. Daher wurde im Folgenden SDS als Regenerationslösung eingesetzt.

### 4.3.2 Kalibrierung des Sensors

Zur Kalibrierung des Sensors für den Nachweis von CRP in Puffer wurden CRP Konzentrationen zwischen 0 und 100 mg/L verwendet und diese gemäß Abschnitt 3.2.5.1 gemessen und gemäß Abschnitt 3.2.6 ausgewertet. Die erhaltenen Signale für jede Konzentration sowie die aus den Dreifachmessungen erhaltene Kalibrierkurve sind in Abbildung 49 dargestellt. Die Werte der Kalibrierfunktion, die ermittelte Nachweis- (MDC) und Bestimmungsgrenze (RDL) sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 6 aufgeführt.

### 4.3 Assayentwicklung für den Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP)

Bei Betrachtung des zeitlichen Signalverlaufs für unterschiedliche CRP Konzentrationen fällt auf, dass die Dissoziation von CRP bei Spülen der Oberfläche mit Puffer nach der Probeninjektion sehr unterschiedlich ausfällt. Obwohl die Signale für Konzentrationen ab ca. 6 mg/L in eine Sättigung übergehen, stellt sich bei Spülen mit Puffer keine einheitliche Beladung der Oberfläche mit CRP ein. Je höher die CRP Konzentration gewählt wird, desto höher fällt das Bindungssignal aus aber desto stärker ist auch die Dissoziation ausgeprägt. Allerdings verhalten sich diese Effekte nicht linear zueinander, sodass bei 3 mg/L, 6 mg/L und 10 mg/L das Niveau der Basislinie nach Probeninjektion in eine Sättigung überzugehen scheint, jedoch für die Konzentrationen 30 mg/L und 100 mg/L erneut deutlich ansteigt.



**Abbildung 49:** Zeitlicher Signalverlauf in Abhängigkeit der eingesetzten CRP Konzentration (links) sowie die aus den Konzentrationsmessungen in Puffer erhaltene Kalibrierkurve mit den eingezeichneten Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich (rechts).

**Tabelle 6:** Parameter der Kalibrierfunktion für CRP (links) und daraus ermittelte Kenngrößen (rechts) für die Kalibrierung in Puffer.

	Wert	Standardfehler		[mg/L]
R	0,99412		MDC	1,02
A <sub>1</sub>	0,00013	0,000291	RDL	1,59
A <sub>2</sub>	0,01509	0,000568	Arbeitsbereich	1,81 – 44,66
x <sub>0</sub>	9,0	0,83369		
p	1,30	0,15246		

Dieses Bindungsverhalten ist wahrscheinlich auf das Vorliegen des CRPs als Pentamer zurückzuführen, sodass aufgrund der fünf bindungsfähigen Untereinheiten eine abweichende Bindungskinetik vorliegt. Daher wurde zur Auswertung der Signale die relative Signaländerung zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t = 307$  s (unmittelbar nach der Signalkrümmung der höchst eingesetzten Konzentration) ermittelt. Die daraus erhaltene Kalibrierkurve weist einen Arbeitsbereich für CRP Konzentrationen zwischen 1,81 mg/L und 44,66 mg/L auf mit einer Nachweisgrenze (MDC) von

1,02 mg/L CRP und einer Bestimmungsgrenze (RDL) von 1,59 mg/L CRP. Diese Werte erlauben prinzipiell eine Unterscheidung des Status von gesunden (CRP Konzentrationen < 10 mg/L) und kranken Menschen bzw. Tieren (CRP Konzentrationen > 10 mg/L, vgl. Abschnitt 2.2.4), wobei hohe CRP Konzentrationen, wie sie im Falle von bakteriellen Infektionen auftreten können, vermutlich außerhalb des Arbeitsbereiches liegen. Daher wurde als alternative Auswertestrategie zur Erstellung der Kalibrierkurve die Auswertung der Signalanfangssteigung betrachtet, da sich diese in Abbildung 49 auch bei hohen CRP Konzentrationen noch dynamisch ändert. Die dadurch erhaltene Kalibrierkurve ist in Abbildung 50 dargestellt. Die gemäß Abschnitt 3.2.6 erhaltenen Werte der Kalibrierfunktion, die ermittelte Nachweis- (MDC) und Bestimmungsgrenze (RDL) sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 7 aufgeführt.

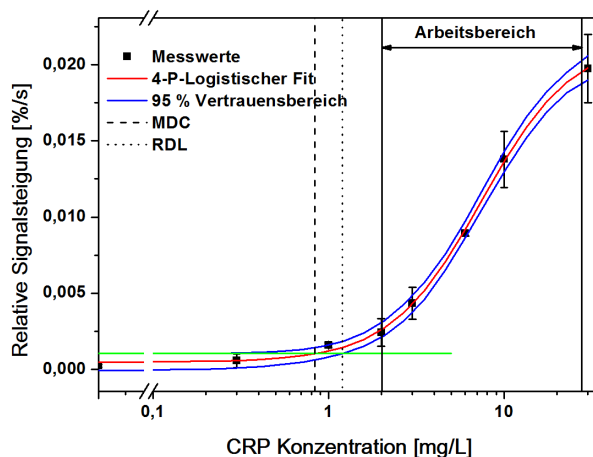


Abbildung 50: Aus den Konzentrationsmessungen in Puffer erhaltene Kalibrierkurve mit den eingezeichneten Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich bei Auswertung der Signalanfangssteigung.

Tabelle 7: Parameter der Kalibrierfunktion für CRP (links) und daraus ermittelte Kenngrößen (rechts) für die Kalibrierung in Puffer bei Auswertung der Signalanfangssteigung.

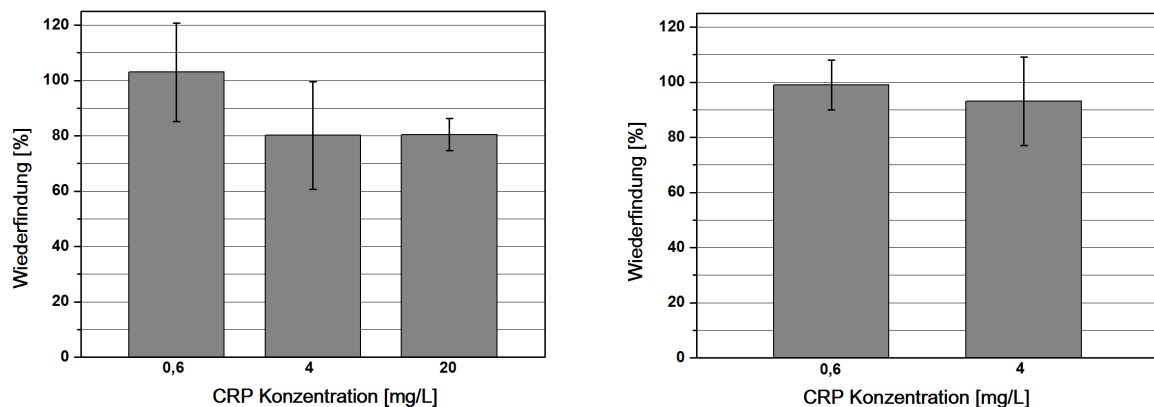
	Wert	Standardfehler		[mg/L]
R	0,99833		MDC	0,84
A <sub>1</sub>	0,00001	0,00000431	RDL	1,20
A <sub>2</sub>	0,00048	0,0000131	Arbeitsbereich	2,02 - 27,65
x <sub>0</sub>	7,5	0,3545		
p	1,7	0,10811		

Die durch die Auswertung der Signalsteigung erhaltene Kalibrierfunktion weist eine etwas höhere Empfindlichkeit auf (Steigung p) sowie niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (MDC, RDL). Tendenziell ist der Arbeitsbereich der Kalibrierkurve aufgrund der Konzentration von 30 mg/L CRP verfälscht, da für alle Konzentrationen ein einheitlicher Fitbereich verwendet wurde und dieser beim Signal für 30 mg/L CRP nicht nur den linearen Signalverlauf, sondern bereits

teilweise die Krümmung der Messkurve beinhaltet. Für die CRP Konzentration von 100 mg/L war daher keine sinnvolle Auswertung mehr möglich. Generell müsste eine bessere zeitliche Auflösung im Detektionsmodul gewählt werden, damit mehr Messpunkte im anfangs linearen Signalverlauf für einen korrekten linearen Fit zur Verfügung stehen. In diesem Fall könnten dann auch die Messwerte für 100 mg/L CRP berücksichtigt werden und gemäß der Signalsteigungen für verschiedene CRP Konzentrationen in Abbildung 49 würde der Arbeitsbereich vermutlich über höhere CRP-Konzentrationen hinweg verlaufen. Somit stellt die Auswertung der relativen Signalsteigung gerade im Bereich höherer CRP Konzentrationen eine gute Ergänzung zur Auswertung der relativen Signaländerung dar.

#### 4.3.3 Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit

Zur Validierung der erhaltenen Kalibrierfunktionen für die zwei vorgestellten Auswertestrategien für Konzentrationsmessungen mit CRP, wurde die Wiederfindung von je einer CRP Konzentration auf einem von drei Sensorchips verschiedener Batches untersucht. Die gemäß Abschnitt 3.2.6.4 erhaltenen Wiederfindungen sind in Abbildung 51 dargestellt.



**Abbildung 51:** Wiederfindungsraten unter Auswertung der Signaländerung (links) sowie der Signalanfangssteigung (rechts) zur Bestimmung von drei CRP Konzentrationen auf Sensorchips dreier verschiedener Batches.

Während die Wiederfindungen bei Auswertung der relativen Signaländerung im Mittel zwischen 80 % und 103 % betragen, werden bei Auswertung der relativen Signalsteigung Wiederfindungen im Mittel zwischen 93 % und 99 % erhalten. Allerdings kann bei der Auswertung der Signalsteigung von Signalen für eine Konzentration von 20 mg/L CRP kein sinnvoller Wert angegeben werden, da im Mittel eine Wiederfindung von 66 % mit einer Standardabweichung von 58 % erhalten wurde. Dies verdeutlicht den oben beschriebenen Sachverhalt, dass der lineare Fit des Signals bei hohen Konzentrationen durch eine Krümmung in der Kurve verfälscht wird und für eine korrekte Auswertung zu wenige Messpunkte für einen für alle Konzentrationen einheitlichen linearen Fitbereich zur Verfügung stehen. Bis auf die CRP Konzentration von 4 mg/L bei Auswer-

tung der relativen Signaländerung, liegen jedoch alle ermittelten Wiederfindungen in Abbildung 51 im allgemein gültigen Bereich zwischen 70 % und 130 % und belegen somit die allgemeine Gültigkeit der Kalibrierfunktion zur Auswertung der relativen Signaländerung bei der Quantifizierung von CRP unter Verwendung von Sensorchips anderer Batches.

### 4.4 1-lambda-Reflektometrie Messaufbau zur Multi-Analyt-Bestimmung

#### 4.4.1 Einfluss des Messaufbaus auf das Bindungssignal

Gemäß des im Abschnitt 3.2.5.2 beschriebenen Messaufbaus wird der Transducer nach der Aufzeichnung eines Messpunktes stets bewegt, damit sowohl eine zeitliche als auch eine räumliche Auflösung im Messsignal erhalten werden kann. Da die Halterung des Transducers gegebenenfalls nicht exakt planar ist bzw. eine Bewegung zu einer Variation im Abstand zwischen Transducer und Detektor führen kann, ist es umso wichtiger, dass diese Bewegung keinen störenden Effekt auf das erhaltene Bindungssignal ausübt. Daher wurde zunächst untersucht, ob das hier verwendete Detektionsmodul analog zum im Abschnitt 4.1.3 untersuchten Detektionsmodul bei Auswertung der relativen Signaländerung gegenüber einer Variation im Abstand zwischen Transducer und Detektor robust ist. Die absoluten Signalintensitäten während einer Messung und die absoluten Signaländerungen bei Injektion von 10 mg/L Salmonellenantikörper sind jeweils in Abhängigkeit dreier unterschiedlicher Abstände zwischen Transducer und Detektor in Abbildung 53 dargestellt. Dabei wurde der Detektor ausgehend von der Basiseinstellung (maximale Intensität) zum Transducer hin verschoben (Intensitätsabnahme) während die Messposition auf dem Transducer konstant gehalten wurde.

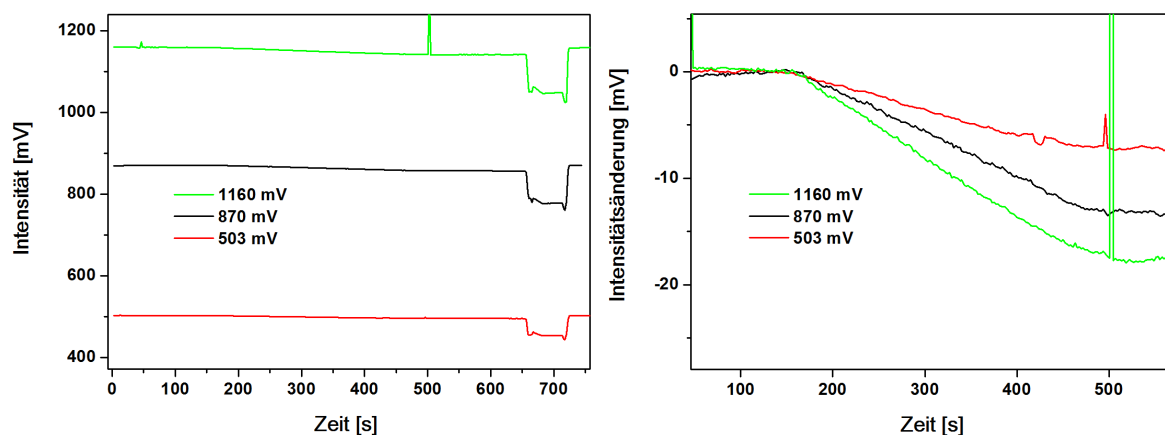


Abbildung 52: Absoluter Intensitätsverlauf eines Messzyklus (links) und absolute Signaländerung (rechts) bei Injektion von 10 mg/L anti-LPS Antikörper in Abhängigkeit des eingestellten Abstandes zwischen Transducer und Detektor.

Je kleiner der Abstand zwischen Transducer und Detektor gewählt wird, desto niedriger sind die reflektierten Signalintensitäten sowie die absoluten Signaländerungen bei Antikörperinjektion. Bei Betrachtung der relativen Signaländerungen in Abhängigkeit des Abstandes in Abbildung 53 liegen die Bindungskurven für die Antikörperanbindung jedoch sehr reproduzierbar übereinander, sodass der hier vorliegende Messaufbau zur Multi-Analyt-Bestimmung ebenfalls robust gegenüber einer Variation im Abstand zwischen Transducer und Detektor ist.

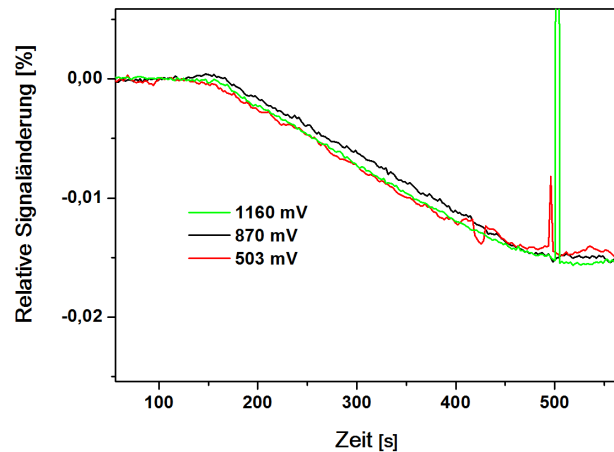


Abbildung 53: Relative Signaländerung bei Injektion von 10 mg/L anti-LPS Antikörper in Abhängigkeit des eingestellten Abstandes zwischen Transducer und Detektor.

#### 4.4.2 Einfluss der Flusszelle auf das Bindungssignal

Zur Auswahl einer geeigneten Flusszelle wurden die unter Abschnitt 3.1.5.2 beschriebenen Flusszellen getestet und dabei die drei verschiedenen Flusskanalbreiten von 1 mm, 2 mm und 3 mm in Kombination mit je drei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten untersucht. Dabei stand neben dem Einfluss der Flusskanalbreite auf das Bindungssignal auch die Handhabung der entsprechenden Flusszelle im Fokus, z.B. ob sie bei den unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten abdichtet oder z.B. ob sich Luftblasen im Flusskanal festsetzen. Die Signalverläufe bei Injektion von 10 mg/L Salmonellenantikörper mit unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten für eine Flusszellenbreite von 2 mm sind exemplarisch in Abbildung 54 dargestellt. Für diese Untersuchung wurden die Signale an einer definierten Messposition aufgezeichnet, ohne dabei den Transducer zu verschieben.



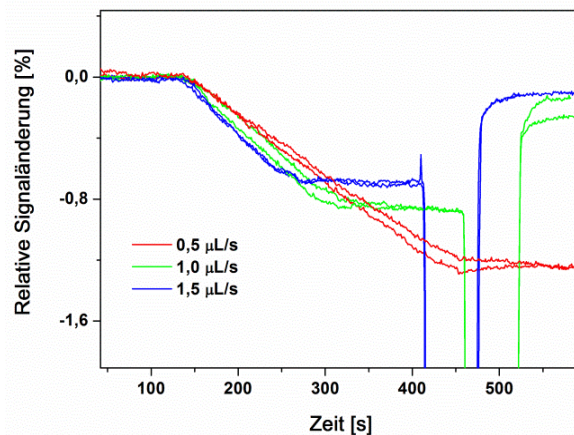


Abbildung 54: Bindungssignale bei Injektion von 10 mg/L anti-LPS Antikörper über eine mit LPS beschichtete Oberfläche mit Fließgeschwindigkeiten von 0,5 µL/s, 1 µL/s und 1,5 µL/s und einer Flusskanalbreite von 2 mm.

Bei höherer Fließgeschwindigkeit wird die Signalsteigung größer, da die Diffusionsschicht, die der Analyt bis zur Oberfläche durchlaufen muss, in diesem Fall kleiner wird. Dadurch können mehr Analytmoleküle pro Zeiteinheit an Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche binden, was sich in einer größeren Steigung des Bindungssignals bemerkbar macht. Da jedoch stets das gleiche Probenvolumen verwendet wurde, kann zusätzlich zu diesem Effekt beobachtet werden, dass bei höheren Fließgeschwindigkeiten die Probe schneller über die Sensoroberfläche läuft und somit früher aufgebraucht ist. Deshalb nimmt die relative Signaländerung bezogen auf das Niveau der Basislinie vor Probeninjektion bis zum Niveau der Basislinie nach Probeninjektion insgesamt mit steigender Fließgeschwindigkeit ab.

Diese Effekte konnten für alle drei Flusszellen beobachtet werden und die entsprechenden Ergebnisse sind für Dreifachmessungen bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten für die drei verschiedenen Flusskanalbreiten in Abbildung 55 dargestellt. Dabei wurden die Signale jeweils auf die Signale für die Fließgeschwindigkeit 0,5 µL/s normiert.

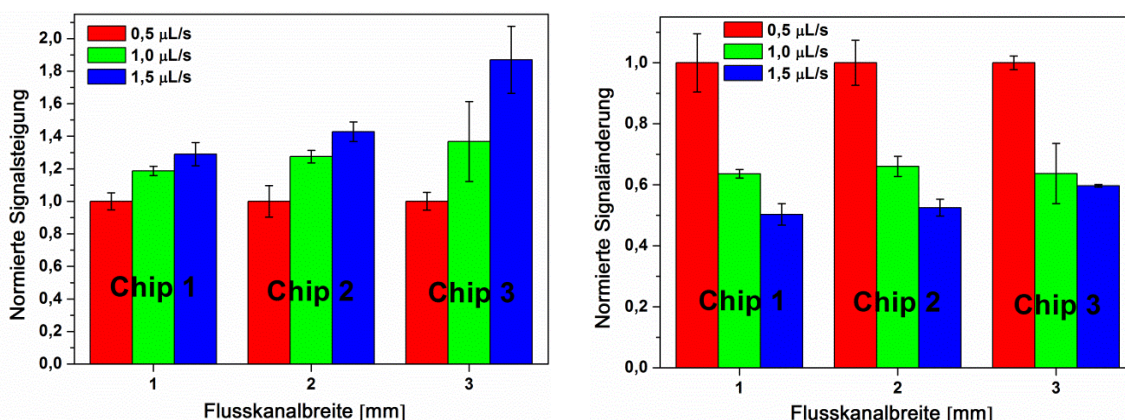


Abbildung 55: Normierte Signalsteigungen (links) sowie normierte Signaländerungen (rechts) für Messungen mit 10 mg/L Salmonellenantikörperlösung bei drei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten unter Verwendung von drei unterschiedlichen Flusskanalbreiten sowie Sensorchips.

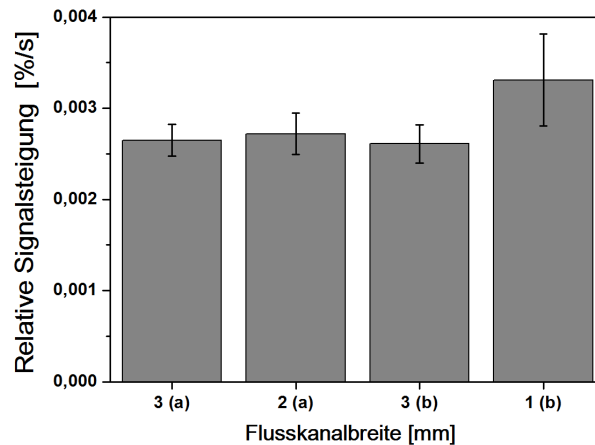


Die normierten Signale für die Flusskanalbreiten von 1 mm und 2 mm stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit gut überein. Mehrfachmessungen unter Verwendung einer Flusskanalbreite von 3 mm sind im Allgemeinen weniger gut reproduzierbar. Dies kann bereits während der Durchführung der Messungen festgestellt werden, da in den Flusskanal gelangte Luftblasen sich häufig an den Randbereichen des Kanals festsetzen und somit die tatsächliche Kanalbreite und Geometrie verfälschen.

Die beobachteten Signalsteigungen ändern sich alle in vergleichbarem Ausmaß mit der Fließgeschwindigkeit, während sich die Signaländerung für die Fließgeschwindigkeit von 0,5  $\mu\text{L/s}$  deutlich von den Signaländerungen für 1  $\mu\text{L/s}$  und 1,5  $\mu\text{L/s}$  abhebt. Vermutlich werden bei Fließgeschwindigkeiten über 0,5  $\mu\text{L/s}$  mehr Antikörper an der Sensoroberfläche vorbei gespült, ohne dabei an Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche binden zu können, was den nicht linearen Zusammenhang zwischen der Fließgeschwindigkeit und der Signaländerung erklären würde.

Generell werden bei der Auswertung der Signalsteigung für das Erlangen großer Signalsteigungen hohe Fließgeschwindigkeiten angestrebt. Dies bedeutet jedoch gleichzeitig, dass bei Einsatz eines bestimmten Probenvolumens die Signaländerung bei hohen Fließgeschwindigkeiten sehr klein ausfallen wird. Um hohe Signaländerungen und hohe Signalsteigungen gleichzeitig zu erlangen, kann durch Verkleinerung der Flusszelligeometrie die tatsächliche Fließgeschwindigkeit erhöht werden, sodass höhere Signalsteigungen erreicht werden, ohne dass die Probe dabei früher aufgebraucht ist.

Da eine Fließgeschwindigkeit von 0,5  $\mu\text{L/s}$  in Abbildung 55 zu vergleichsweise hohen Signaländerungen geführt hat, wurde unter Verwendung dieser Geschwindigkeit der zuvor beschriebene Effekt des Einflusses der Flusszelligeometrie auf die Signalsteigung genauer untersucht. Hierfür wurde zunächst ein Sensorchip (Chip a) unter Verwendung der Flusszelle mit einem 3 mm breiten Flusskanal und anschließend unter Verwendung der Flusszelle mit einem 2mm breiten Flusskanal bezüglich seiner Signalsteigung bei Wechselwirkung mit Salmonellenantikörperlösung untersucht. Da ein mehrmaliger Ein- und Ausbau eines Sensorchips zur Abnahme der Signalintensität führen kann, wurde der Chip nach diesen Experimenten verworfen. Auf einem neuen Sensorchip (Chip b) wurde dasselbe Experiment durchgeführt, wobei statt der Flusszelle mit einem 2 mm breiten Flusskanal in diesem Fall die Flusszelle mit einem 1 mm breiten Flusskanal verwendet wurde. Die erhaltenen Signalsteigungen für Mehrfachmessungen unter Verwendung unterschiedlicher Flusskanalbreiten bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5  $\mu\text{L/s}$  sind in Abbildung 56 dargestellt.



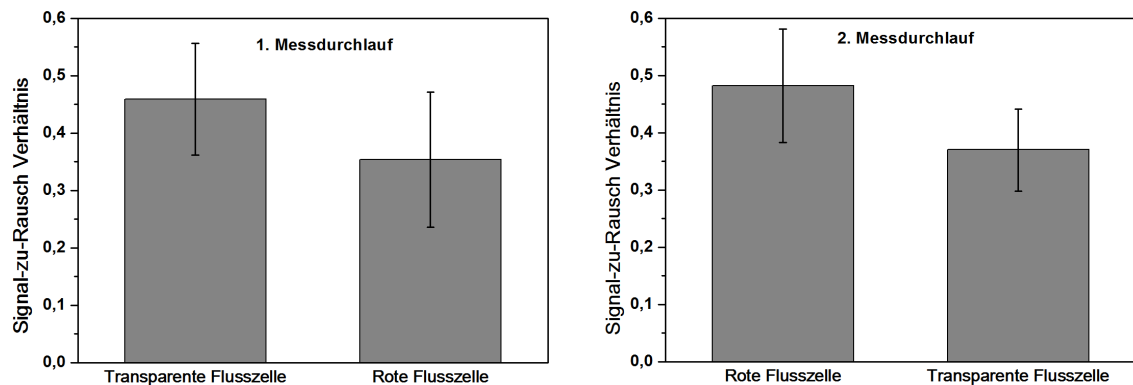
**Abbildung 56: Beobachtete relative Signalsteigung bei Detektion der Wechselwirkung von 10 mg/L Salmonellenantikörperlösung unter Verwendung unterschiedlicher Flusskanalbreiten von 3 mm und 2 mm mit Sensorchip a sowie 3 mm und 1 mm mit Sensorchip b.**

Die Signalsteigungen für eine Flusskanalbreite von 3 mm auf den Sensorchips a und b sind sehr gut reproduzierbar und erlauben somit einen Vergleich der Signalsteigungen aller Flusskanalbreiten untereinander. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist zwischen den Signalsteigungen für Flusskanalbreiten von 3 mm und 2 mm auf Sensorchip a kein merklicher Unterschied feststellbar, wobei der Mittelwert für die Signalsteigung für die Flusskanalbreite von 2 mm minimal höher liegt. Die höchste Signalsteigung kann unter Einsatz einer Flusskanalbreite von 1 mm beobachtet werden. Aufgrund der etwas größeren Standardabweichung bei Messungen unter Verwendung des 1 mm breiten Flusskanals ist eine Aussage über das Ausmaß einer größeren Signalsteigung in Abhängigkeit der Flusskanalbreite nicht möglich. Generell lässt sich jedoch anhand der beobachteten Signalsteigungen der Trend erkennen, dass die tatsächliche Fließgeschwindigkeit innerhalb der Flusszelle durch kleinere Flusskanalbreiten zunimmt. Somit wurden im Folgenden alle Messungen unter Verwendung der Flusskanalbreite von 1 mm durchgeführt.

### 4.4.3 Untersuchung des Aufbaus bezüglich störender Reflektivitäten

Da der verwendete Messaufbau zur Multi-Analyt-Bestimmung gemäß Abschnitt 3.2.5.2 so konstruiert ist, dass sich das Detektionsmodul und somit die Lichtquelle unterhalb des transparenten Transducers befinden, wurde die Überlegung angestellt, ob die Verwendung einer transparenten Flusszelle sowie einer transparenten Flusszellenhalterung zur Detektion von ungewünschter Fehlstrahlung führt. Daher wurde basierend auf den Erkenntnissen des vorangegangenen Abschnittes eine rote Flusszelle mit einer Flusskanalbreite von 1 mm hergestellt und unter Durchführung einheitlicher Messungen die ermittelten Signal-zu-Rausch Verhältnisse bei Einsatz der roten sowie transparenten Flusszelle verglichen. Hierfür wurden zwei Messdurchläufe auf zwei Sensorchips unter Verwendung beider Flusszellen mit Mehrfachmessungen durchgeführt,

wobei die Reihenfolge des Flusszellentaushes auf einem Chip bei den zwei Messdurchläufen variiert wurde. Für die Berechnung der Signal-zu-Rausch Verhältnisse wurde als Signal der Betrag der Signalsteigung durch eine lineare Regression über einen definierten Bereich entlang des Bindungssignals ermittelt. Für das Rauschen wurde die Standardabweichung der linearen Regression über diesen Bereich bestimmt. Die erhaltenen Signal-zu-Rausch Verhältnisse durch Bildung der Quotienten aus beiden Größen sind in Abbildung 57 dargestellt.

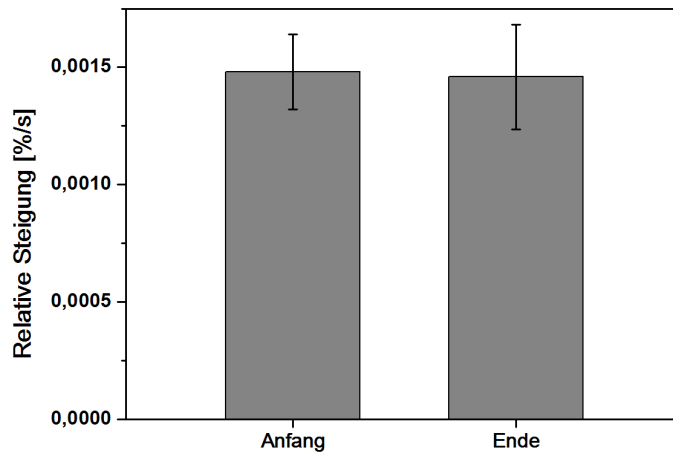


**Abbildung 57:** Signal-zu-Rausch Verhältnisse bei Detektion von 10 mg/L Salmonellenantikörper an einer Messposition unter Verwendung einer transparenten und anschließend roten Flusszelle (links) und Wiederholung der Messungen auf einem neuen Sensorchip unter Verwendung einer roten und anschließend transparenten Flusszelle (rechts).

Bei Vergleich beider Flusszellen führen die Signal-zu-Rausch Verhältnisse für die transparente Flusszelle beim ersten Messdurchlauf zu leicht höheren Werten. Um auszuschließen, dass das niedrigere Signal-zu-Rausch Verhältnis unter Verwendung der roten Flusszelle auf den Aus- und Wiedereinbau des Sensorchips zur Auswechslung der Flusszelle zurückzuführen ist, wurde die Reihenfolge der Flusszellenverwendung in einem zweiten Messdurchlauf getauscht. Es ist gut erkennbar, dass beim zweiten Messdurchlauf die Signal-zu-Rausch Verhältnisse vor dem Austausch der Flusszelle ebenfalls höher liegen, als die Signal-zu-Rausch Verhältnisse, die nach dem Aus- und Wiedereinbau des Sensorchips beobachtet werden können. Somit kann der beobachtete Effekt unterschiedlich hoher Signal-zu-Rausch Verhältnisse bei Verwendung der transparenten und roten Flusszelle eindeutig auf die Signalabnahme des Sensorchips durch den Aus- und Wiedereinbau bei einem Flusszellentausch zurückgeführt werden. Eine Störung der Messsignale durch einen Falschlichtanteil bei Verwendung der transparenten Flusszelle kann somit ausgeschlossen werden. Da die Handhabung der transparenten Flusszelle einige Vorteile mit sich bringt, wie etwa die Sichtbarkeit von Luftblasen im Flusskanal aufgrund der Transparenz oder das bessere Abdichten der Flusszelle aufgrund einer anderen Materialzusammensetzung, wurde im Folgenden die transparente Flusszelle weiter verwendet.

### 4.4.4 Test auf Verarmungseffekte entlang des Flusskanals

Um zu überprüfen, inwiefern Verarmungseffekte entlang des Flusskanals das Bindungssignal an unterschiedlichen Messpositionen beeinflussen, wurde ein Sensorchip flächig mit LPS beschichtet und die Antikörperanbindung an zwei Messpositionen zeitaufgelöst detektiert. Dabei wurde die Signalsteigung des Bindungssignals an einer Messposition nahe dem Flusskanalanfang sowie nahe dem Flusskanalende ausgewertet. Die erhaltenen Werte für Mehrfachmessungen sind in Abbildung 58 dargestellt.



**Abbildung 58:** Detektierte relative Signalsteigung an Messpositionen nahe dem Flusskanalanfang sowie nahe dem Flusskanalende bei Wechselwirkung von 10 mg/L Salmonellenantikörperlösung mit einem mit LPS flächig beschichteten Sensorchip.

Trotz der hier vorliegenden, extremen Bedingungen indem eine flächige Beschichtung des Sensorchips mit LPS gewählt wurde, kann im Rahmen der Messgenauigkeit kein Unterschied zwischen den Signalsteigungen der erhaltenen Bindungssignale am Flusskanalanfang und Flusskanalende beobachtet werden. Da im Folgenden lediglich eine orts aufgelöste Beschichtung des Transducers mit Erkennungsstrukturen vorgenommen wurde, können Verarmungseffekte entlang des Flusskanals somit ausgeschlossen werden und ermöglichen den Einsatz dieser Flusszelle für Multi-Analyt-Messungen durch orts aufgelöste Immobilisierung verschiedener Erkennungsstrukturen entlang des Flusskanals.

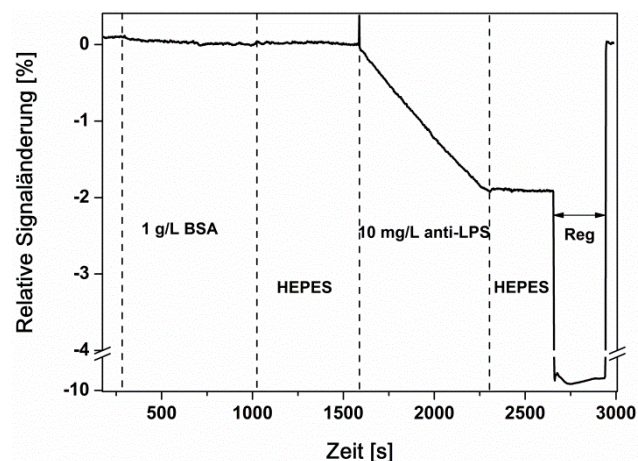
## 4.5 Multi-Analyt-Bestimmung von Salmonellenantikörpern und CRP

### 4.5.1 Harmonisierung der Assaybedingungen Biopolymer, Puffer und Regeneration

Für die Präparation der Sensorchips zur Durchführung von Multi-Analyt-Messungen ist es erforderlich, die für die Einzelassays verwendeten Modifizierungsschritte zur Präparation der sensitiven Schichten auf einem Transducer zu vereinen. Dabei ist es vorteilhaft, so einheitliche Präpa-

rationsschritte wie nur möglich anzuwenden, da dies die Handhabung der Chippräparation wesentlich vereinfacht. Idealerweise ist die flächige Beschichtung von Sensorchips die Methode der Wahl, da dabei die Präparationslösung auf einen Chip aufgetropft und mit einem weiteren Chip zu einem sogenannten Sandwich gedeckelt werden kann. Dies führt meist zu sehr reproduzierbaren Sensorchips. Im Fall von mehreren, unterschiedlich beschaffenen Erkennungsstrukturen auf einem Transducer, wie sie bei anti-CRP Antikörpern und Lipopolysacchariden vorliegen, kann diese Sandwichmethode jedoch nicht bis zum letzten Präparationsschritt angewendet werden. Zum einen sollen die Erkennungsstrukturen für eine bestimmte Messposition orts aufgelöst aufgebracht werden, zum anderen erfolgt deren Immobilisierung über unterschiedliche funktionelle Gruppen und es sind dabei oftmals unterschiedlich viele Schritte sowie verschiedene Lösungsmittel zur Modifizierung der Oberfläche erforderlich.

Als gemeinsame Basis zur Immobilisierung der Erkennungsstrukturen für den Nachweis von Salmonellenantikörpern und CRP wurde eine flächige Beschichtung der Transducer mit Aminodextran gewählt. Da im CRP-Einzelassay ein Aminierungsgrad von 10 % verwendet wurde, sollte zunächst getestet werden, ob der Salmonellenassay bei einem Aminierungsgrad von 10 % anstelle von 50 % ebenfalls reproduzierbare Ergebnisse liefert. Des Weiteren wurde, gemäß der unter Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Assaybedingungen für den CRP-Einzelassay, als gemeinsamer Puffer zur Durchführung der Messungen HEPES + CaCl<sub>2</sub> eingesetzt, da ein Ca<sup>2+</sup>-Ionen haltiger Puffer für den Nachweis von CRP vorteilhaft ist. Die Bindungssignale für die Wechselwirkung der sensitiven Schicht mit BSA und Salmonellenantikörpern unter den oben beschriebenen, adaptierten Assaybedingungen sind in Abbildung 59 dargestellt.

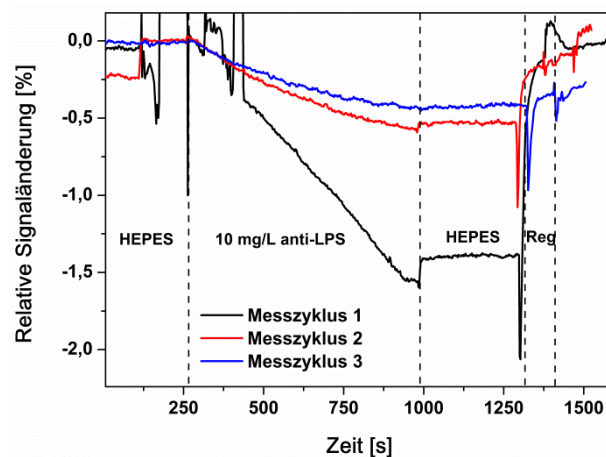


**Abbildung 59:** Bindungssignal für 1 g/L Rinderserumalbumin (BSA) und 10 mg/L anti-LPS Antikörper mit nachfolgender Regeneration der Sensoroberfläche nach Anpassung der Assaybedingungen bezüglich Biopolymer und Puffer.

Analog zum Bindungssignal in Abbildung 36 tritt bei Injektion von 10 mg/L anti-LPS Antikörper eine relative Signaländerung von ca. 2 % auf, während trotz hoher Proteinkonzentration, eine

unspezifische Wechselwirkung mit BSA ausbleibt. Daher scheinen die adaptierten Assaybedingungen bezüglich Biopolymer und Puffer keinen negativen Einfluss auf das Bindungssignal im Salmonellenassay zu haben.

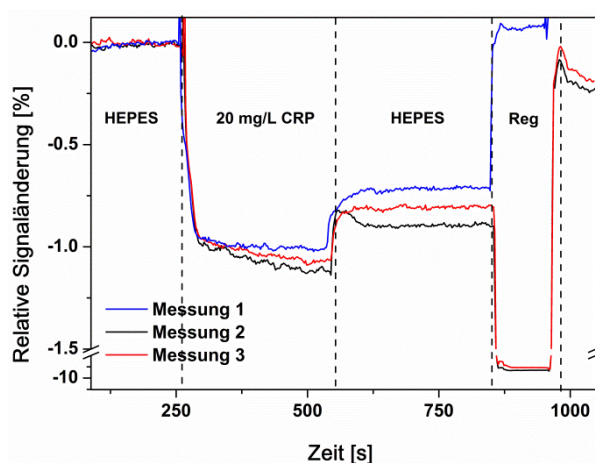
Für eine Regeneration der Sensoroberfläche an beiden Erkennungsstrukturen muss überprüft werden, ob die innerhalb der Einzelassays verwendeten Regenerationslösungen weiterhin auf die neue Sensoroberfläche angewendet werden können. Daher wurde zunächst die für den CRP Einzelassay verwendete Regenerationslösung SDS für eine Regeneration von Salmonellenantikörpern an LPS eingesetzt. Das vor der Regeneration erhaltene Bindungssignal und zwei auf die Regeneration der Oberfläche folgende weitere Messzyklen sind in Abbildung 60 dargestellt.



**Abbildung 60:** Drei aufeinander folgende Messzyklen bestehend aus Injektion einer 10 mg/L Salmonellenantikörperlösung über eine mit LPS beschichtete Oberfläche sowie nachfolgender Regeneration der Oberfläche mit einer 0,1 % SDS Lösung bei einem pH Wert von 2,3.

Nach Regeneration der LPS Oberfläche mit SDS werden bei den darauf folgenden Messzyklen deutlich kleinere relative Signaländerungen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die sensitive Schicht bei Kontakt mit SDS Lösung vermutlich zerstört wird. Da die LPS Erkennungsstrukturen über hydrophobe Wechselwirkung zwischen Decansäureresten auf der Oberfläche und dem Lipid A des LPS immobilisiert sind, kann ein Tensid wie etwa SDS diese Wechselwirkung aufheben und dazu führen, dass LPS Moleküle von der Oberfläche abgetragen werden. Dieser Effekt muss nicht zwingend in einem veränderten Niveau der Basislinie nach der Regeneration sichtbar sein, da mittels Ellipsometrie ermittelte Schichtdicken für LPS in Abschnitt 4.2.2 sich nicht markant von Schichtdicken mit endständigem Decan unterscheiden. Zudem liegt es nahe, dass sich SDS Moleküle nach Entfernung der LPS Erkennungsstrukturen an die freien Decanreste der sensitiven Schicht anlagern, d.h. eine Art Umlagerung auf der Oberfläche stattfindet. Somit ist diese Regenerationslösung ungeeignet, um Sensoroberflächen, welche als Erkennungsstruktur sowohl anti-CRP Antikörper als auch LPS beinhalten, zu regenerieren.

Als alternatives Regenerationsmittel steht Guanidinhydrochlorid zur Verfügung, welches beim Einzelaassay für den Nachweis von Salmonelleninfektionen eingesetzt wurde (vgl. Abschnitt 4.2.3). Daher wurde überprüft, ob mit dieser Regenerationslösung CRP von einer anti-CRP Antikörper Oberfläche entfernt werden kann, ohne dabei die Erkennungsstrukturen nachhaltig zu beeinflussen. Hierfür wurde zunächst ein Messzyklus unter Verwendung der bei CRP Einzel-Spot Messungen eingesetzten Regenerationslösung SDS durchgeführt und daraufhin zwei weitere Messzyklen mit der Regenerationslösung Guanidinhydrochlorid. Die erhaltenen Bindungssignale sind in Abbildung 61 dargestellt.



**Abbildung 61:** Drei aufeinander folgende Messzyklen bestehend aus Injektion einer 20 mg/L CRP Lösung über eine mit anti-CRP Antikörper beschichtete Oberfläche sowie nachfolgender Regeneration der Oberfläche mit einer 0,1 % SDS Lösung bei einem pH Wert von 2,3 nach Messung 1 und einer 6 M Guanidinhydrochloridlösung bei einem pH Wert von 1,5 nach Messungen 2 und 3.

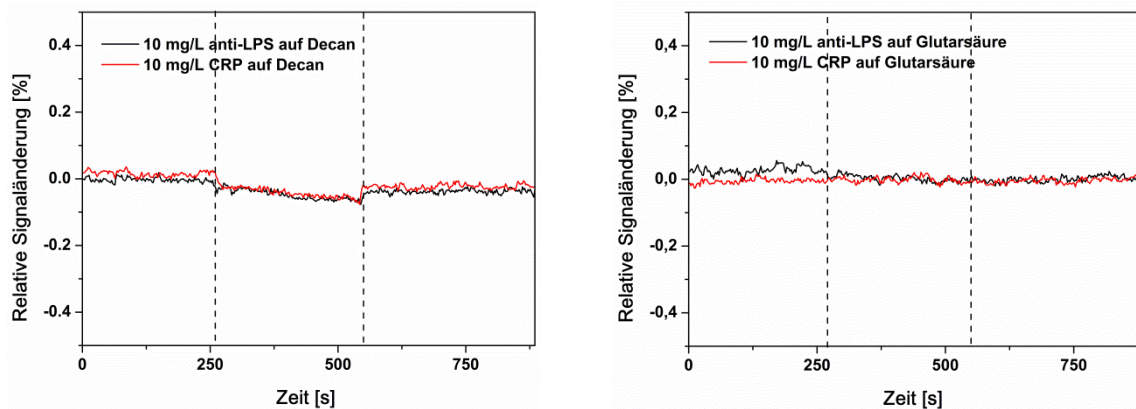
Bei Vergleich der drei Bindungssignale für CRP kann kein signifikanter Unterschied in der relativen Signaländerung beobachtet werden. Tendenziell liegen die CRP Bindungssignale sowie die Basislinien nach CRP Injektion nicht exakt übereinander, was für eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Messungen spricht, wie sie etwa in Abbildung 48 beobachtet werden konnte. Allerdings ist kein Trend einer Signalabnahme von Messung 1 bis Messung 3 beobachtbar und das leicht höhere Niveau der Basislinie nach Probeninjektion bei Messung 2 wahrscheinlich durch einen fluidischen Effekt bei einem Zeitpunkt von etwa 560 s verfälscht, sodass die weniger gute Reproduzierbarkeit eher auf die allgemeine Durchführung der Messungen als auf eine ungeeignete Regenerationslösung zurückgeführt werden kann.

Somit stellt die Verwendung von Guanidinhydrochlorid eine gute Option dar, durch Einsatz nur einer Regenerationslösung gleichzeitig zwei verschiedene Analyte von ihren Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche zu entfernen. Dies erspart einen zusätzlichen Regenerationsschritt innerhalb eines Messzyklus, wodurch sowohl die Messzeit verkürzt wird als auch der Bedarf einer weiteren Regenerationslösung entfällt.



### 4.5.2 Test der sensitiven Schicht auf Spezifität

Aufgrund der unter Abschnitt 3.2.1.7 beschriebenen unterschiedlichen orts aufgelösten Modifizierung der Sensoroberfläche durch Auftropfen der entsprechenden Erkennungsstrukturen nach der flächigen Beschichtung mit Aminodextran, kann es zu Randbereichen auf dem Sensorchip kommen, welche nicht vollständig mit Erkennungsstrukturen bedeckt sind. Daher wurde untersucht, ob unspezifische Wechselwirkung der Analytmoleküle mit den unter den Erkennungsstrukturen befindlichen Oberflächen auftritt. Im Falle der LPS Erkennungsstrukturen handelt es sich hierbei um eine Oberfläche mit Decanresten, unterhalb der anti-CRP Antikörper Erkennungsstrukturen liegen Glutarsäurereste vor. Die Tests bezüglich unspezifischer Wechselwirkung beider Analytmoleküle mit den genannten Oberflächen sind in Abbildung 62 dargestellt.



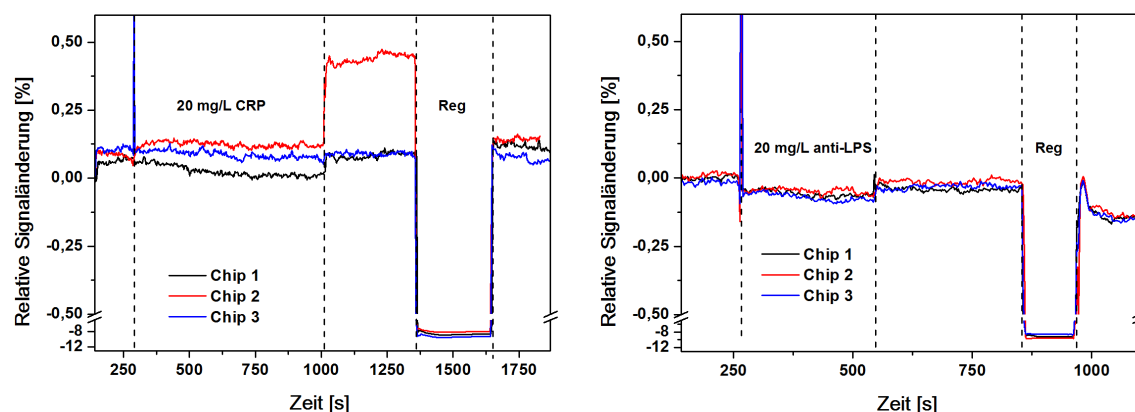
**Abbildung 62:** Test einer Decan Oberfläche (links) sowie einer Glutarsäure Oberfläche (rechts) bezüglich unspezifischer Wechselwirkung mit anti-LPS Antikörpern und CRP.

Sowohl auf der mit Decan als auch auf der mit Glutarsäure modifizierten Oberfläche kann keine ausgeprägte unspezifische Wechselwirkung mit den jeweiligen Analytmolekülen beobachtet werden. Eine minimale Signaländerung ist auf der Decanoberfläche für beide Analytmoleküle sichtbar, was in der hohen Hydrophobizität der Oberfläche begründet werden kann. Allerdings ist dieser Effekt sehr gering und wird einen noch geringeren Einfluss auf das eigentliche Messsignal haben, wenn nur Randbereiche von freiem Decan auf der Oberfläche vorliegen. Somit kann eine Beeinflussung der spezifischen Bindungssignale durch unspezifische Wechselwirkung der Analytmoleküle mit Randbereichen außerhalb der immobilisierten Erkennungsstrukturen ausgeschlossen werden.

Um sicherzustellen, dass die beiden Analyte Salmonellenantikörper und CRP ausschließlich spezifisch mit der Sensoroberfläche wechselwirken, wurden Untersuchungen zu unspezifischer Wechselwirkung zwischen den Analytmolekülen und Erkennungsstrukturen auf der Sensoroberfläche durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob CRP Moleküle mit den LPS Erkennungsstrukturen auf der Sensoroberfläche wechselwirken oder ob eine unspezifische Wechselwirkung von



Salmonellenantikörpern mit den anti-CRP Antikörpern auf der Oberfläche auftritt. Die entsprechenden Messungen sind in Abbildung 63 dargestellt.



**Abbildung 63:** Test der LPS Oberfläche bezüglich unspezifischer Wechselwirkung mit CRP (links) sowie Test der anti-CRP Antikörper Oberfläche bezüglich unspezifischer Wechselwirkung mit anti-LPS Antikörpern (rechts).

Die beobachteten Bindungssignale für unspezifische Wechselwirkung mit Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche sind für beide Analyte im Vergleich zum erwarteten spezifischen Bindungssignal von ca. 1 % Signaländerung für 20 mg/L CRP (vgl. Abbildung 49) und ca. 3 % Signaländerung für 20 mg/L Salmonellenantikörper (vgl. Abbildung 38) vernachlässigbar gering. Die deutlich abweichende Basislinie nach CRP Injektion bei der Messung auf Chip 2, kommt durch eine Störung des Signals durch Luftblasen zustande. Im Rahmen der Regeneration konnten diese jedoch entfernt werden, sodass die Basislinie nach der Regeneration wieder im Bereich der Basislinien der Messungen auf Chip 1 und Chip 3 liegt. Die durchgeführten Messungen belegen somit, dass eine Beeinflussung der spezifischen Bindungssignale durch unspezifische Wechselwirkung der Erkennungsstrukturen mit den jeweils nicht komplementären Analytmolekülen ausgeschlossen werden kann.

#### 4.5.3 Multi-Analyt-Kalibrierung des Sensors für Salmonellenantikörper und CRP

Basierend auf den Voruntersuchungen bezüglich Messaufbau, Fluidik sowie der Assayharmonisierung konnte eine Multi-Analyt-Kalibrierung des Sensors in Puffer durchgeführt werden. Hierzu wurden jeweils Bindungssignale für Salmonellenantikörper als auch für CRP gemeinsam aus einer Probe für unterschiedliche Konzentrationen bestimmt. Zur Kalibrierung wurden Konzentrationen an Salmonellenantikörpern zwischen 0 und 70 mg/L und CRP Konzentrationen zwischen 0 mg/L und 30 mg/L verwendet und diese gemäß Abschnitt 3.2.5.2 gemessen und analog zu Abschnitt 3.2.6 ausgewertet. Die aus den Dreifachmessungen erhaltenen Kalibrierkurven sind in Abbildung 64 dargestellt. Die Werte der Kalibrierfunktionen, die ermittel-

ten Nachweis- (MDC) und Bestimmungsgrenzen (RDL) sowie die Arbeitsbereiche sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgeführt.

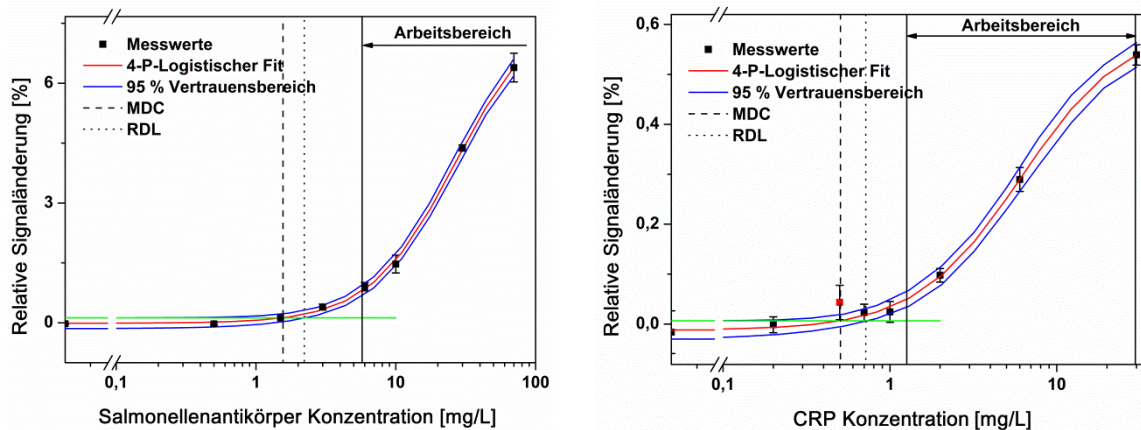


Abbildung 64: Erhaltene Kalibrierkurven bei Mehrfachmessungen unterschiedlicher Konzentrationen an Salmonellenantikörpern und CRP aus jeweils einer Probe.

Tabelle 8: Parameter der Kalibrierfunktion für Salmonellenantikörper (links) und daraus ermittelte Kenngrößen (rechts) für die Multi-Analyt-Kalibrierung in Puffer.

	Wert	Standardfehler		[mg/L]
R	0,99942		MDC	1,56
A <sub>1</sub>	-0,00011	0,00048	RDL	2,21
A <sub>2</sub>	0,07994	0,00344	Arbeitsbereich	5,74 – 122,52
x <sub>0</sub>	26	2,03029		
P	1,44	0,08367		

Tabelle 9: Parameter der Kalibrierfunktion für CRP (links) und daraus ermittelte Kenngrößen (rechts) für die Multi-Analyt-Kalibrierung in Puffer.

	Wert	Standardfehler		[mg/L]
R	0,99929		MDC	0,51
A <sub>1</sub>	-0,00012	0,00006	RDL	0,72
A <sub>2</sub>	0,00599	0,00019	Arbeitsbereich	1,26 - 29,56
x <sub>0</sub>	6,1	0,40619		
p	1,4	0,10233		

Der Korrelationskoeffizient R der Kalibrierfunktion für Salmonellenantikörper belegt eine gute Interpolation der Messwerte durch die 4-Parameter Logistische Fitfunktionen. Bei der entsprechenden Kalibrierkurve wird die Signalsättigung nicht vollständig erreicht, sodass der Wert für die obere Asymptote A<sub>2</sub> durch Extrapolation der Kalibrierkurve zustande kommt und nicht durch Messwerte belegt ist. Auf dieser Extrapolation basiert auch die obere Grenze des Arbeitsbereichs bei einer Salmonellenantikörperkonzentration von 122,52 mg/L. Aufgrund der sehr guten

Korrelation zwischen der Fitfunktion und den gemessenen Werten kann zwar angenommen werden, dass auch der extrapolierte Bereich des Fits den weiteren Verlauf für Messungen höherer Antikörperkonzentrationen verlässlich wiedergibt, jedoch sollte bei Anwendung der Kalibrierkurve für höhere Salmonellenantikörperkonzentrationen berücksichtigt werden, dass für den Verlauf der Kalibrierkurve in diesem Bereich keine Messwerte zugrunde liegen. Die ermittelten Werte für die Nachweis- (MDC) und Bestimmungsgrenze (RDL) liegen bei Konzentrationen von 1,56 mg/L und 2,21 mg/L und ermöglichen in Kombination mit dem weiten dynamischen Arbeitsbereich zwischen 5,74 mg/L und 122,52 mg/L eine Quantifizierung sowohl bei niedrigen, als auch bei hohen Salmonellenantikörperkonzentrationen.

Auch der Korrelationskoeffizient R der Kalibrierfunktion für CRP belegt eine gute Korrelation zwischen den Messwerten und der 4-Parameter-Logistischen Fitfunktion. Zur Erstellung der Kalibrierkurve für CRP wurde die Konzentration von 0,5 mg/L CRP nicht berücksichtigt, da die Messwerte nicht auf der Kalibrierkurve lagen und diese somit als Ausreißer maskiert wurden. Es liegt nahe, dass hierbei ein Pipettierfehler vorlag, der sich bei Vorbereitung der drei Proben durch direkt aufeinanderfolgendes Pipettieren eines bestimmten Volumens der CRP Stammlösung folglich auf alle drei Proben gleich auswirkte. Alle anderen zur Kalibrierung verwendeten CRP Konzentrationen werden jedoch sehr gut von der Kalibrierfunktion wiedergegeben. Daraus konnten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für CRP Konzentrationen von 0,51 mg/L und 0,72 mg/L und ein Arbeitsbereich zwischen 1,26 mg/L und 29,56 mg/L CRP bestimmt werden.

Für einen Vergleich der erhaltenen Kalibrierfunktionen aus Ein-Analyt-Messungen sowie aus den Zwei-Analyt-Messungen für Salmonellenantikörper sind in Tabelle 10 die Parameter  $x_0$  und p der Kalibrierfunktionen sowie die Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich der jeweiligen Kalibrierkurven gegenübergestellt.

**Tabelle 10:** Vergleich der Parameter  $x_0$ , p sowie der Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich für die aus Ein- und Zwei-Analyt-Messungen aufgestellten Kalibrierfunktionen für den Nachweis von Salmonellenantikörpern.

Zahl Analyte	Testmittelpunkt $x_0$ [mg/L]	Steigung p [% · L/mg]	MDC [mg/L]	RDL [mg/L]	Arbeitsbereich [mg/L]
1	38	1,43	1,62	2,43	8,26 - 179,34
2	27	1,44	1,56	2,21	5,74 – 122,52

Während die Werte der Steigungen p sowie der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Kalibrierfunktionen der Ein- und Zwei-Analyt-Messungen sehr nahe beieinander liegen, fällt der Arbeitsbereich sowie der Wert für den Testmittelpunkt  $x_0$  bei der Zwei-Analyt-Kalibrierung klei-

ner aus. Eine mögliche Ursache könnte in der oben beschriebenen Problematik liegen, dass die Ermittlung des Arbeitsbereichs bei Zwei-Analyt-Messungen lediglich durch Extrapolation der Fitfunktion zustande kommt und dadurch eventuell fehlerbehaftet ist. Eine andere Ursache könnte in den adaptierten Assaybedingungen liegen. Da beim Zwei-Analyt-Assay für die Oberflächenmodifikation zur Immobilisierung von LPS ein Aminodextran mit 10 % Aminierungsgrad verwendet wurde, liegen im Vergleich zum Ein-Analyt-Assay, bei dem ein Aminodextran mit 50 % Aminierungsgrad verwendet wurde, deutlich weniger funktionelle Gruppen zur kovalenten Anbindung der Decansäure und anschließenden Immobilisierung von LPS vor. Eine daraus resultierende, niedrigere Oberflächenbelegung mit LPS äußert sich unter Umständen darin, dass bereits bei vergleichsweise niedrigen Salmonellenantikörperkonzentrationen überwiegend kinetisch kontrollierte Reaktionsbedingungen vorliegen und das Signal der Kalibrierkurve somit früher in eine Sättigung übergeht. Dennoch kann bei Vergleich der Werte in Tabelle 10 festgestellt werden, dass diese trotz der Verwendung eines anderen Messaufbaus für Zwei-Analyt-Messungen sowie unterschiedlicher Assaybedingungen sehr gut übereinstimmen.

Für einen Vergleich der erhaltenen Kalibrierfunktionen aus Ein-Analyt-Messungen sowie aus den Multi-Analyt-Messungen für CRP sind in Tabelle 11 die Parameter  $x_0$  und  $p$  der Kalibrierfunktionen sowie die Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich der jeweiligen Kalibrierkurven gegenübergestellt.

**Tabelle 11:** Vergleich der Parameter  $x_0$ ,  $p$  sowie der Kenngrößen MDC, RDL und Arbeitsbereich für die aus Ein- und Zwei-Analyt-Messungen aufgestellten Kalibrierfunktionen für den Nachweis von CRP.

Zahl Analyte	Testmittelpunkt $x_0$ [mg/L]	Steigung $p$ [% · L/mg]	MDC [mg/L]	RDL [mg/L]	Arbeitsbereich [mg/L]
1	9	1,30	1,02	1,59	1,81 – 44,66
2	6	1,39	0,51	0,72	1,26 - 29,56

Bei Vergleich der Werte in Tabelle 11 kann festgehalten werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der Ein-Analyt-Kalibrierung und Werten der Zwei-Analyt-Kalibrierung beobachtet werden können. Tendenziell verläuft die Steigung der Kalibrierkurve für Zwei-Analyt-Messungen etwas steiler und auch die Nachweis- (MDC) und Bestimmungsgrenze (RDL) liegen dort bei leicht niedrigeren CRP Konzentrationen. Der Arbeitsbereich hingegen fällt im Falle der Zwei-Analyt-Kalibrierung etwas kleiner aus. Dies kann zum einen als logische Konsequenz der höheren Steigung  $p$  betrachtet werden, andererseits kann z.B. auch die Verwendung unterschiedlicher Flusszellen bei Ein- und Zwei-Analyt-Messungen die Signaldynamik bei CRP

Injektion beeinflussen. Tendenziell sind die Werte der Zwei-Analyt-Kalibrierung für den Nachweis von CRP bezüglich Empfindlichkeit und Sensitivität trotz einer schlechteren zeitlichen Auflösung aufgrund der abwechselnden Verschiebung des Transducers an die Salmonellenantikörper- und CRP-Messpositionen sogar besser.

Die angestellten Vergleiche zwischen Werten der Kalibrierung aus Ein- und Zwei-Analyt-Messungen für Salmonellenantikörper und CRP lassen somit den Schluss zu, dass die neue Multi-Analyt Sensorplattform zur gleichzeitigen Bestimmung der zwei Analyte aus einer Probe ohne Einbußen bzw. sogar unter Steigerung der Empfindlichkeit (Steigung  $p$ ) und Sensitivität (MDC, RDL) eingesetzt werden kann.

#### 4.5.4 Untersuchung der inter-Chip Reproduzierbarkeit zur Multi-Analyt-Bestimmung

Zur Validierung der aus den Zwei-Analyt-Messungen erhaltenen Kalibrierfunktionen für die Analyte Salmonellenantikörper und CRP wurden die Wiederfindungen gemäß Abschnitt 3.2.6.4 für drei Proben bestehend aus jeweils verschiedenen Konzentrationen an Salmonellenantikörpern und CRP auf Sensorchips unterschiedlicher Batches bestimmt. Die erhaltenen Wiederfindungen sind in Abbildung 65 dargestellt.

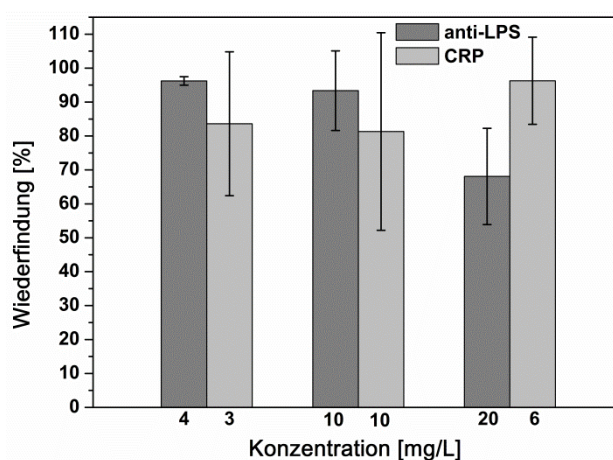


Abbildung 65: Wiederfindungen für Mehrfachmessungen von drei Proben bestehend aus 4 mg/L anti-LPS und 3 mg/L CRP, 10 mg/L anti-LPS und 10 mg/L CRP sowie 20 mg/L anti-LPS und 6 mg/L CRP auf Sensorchips unterschiedlicher Batches.

Bei Betrachtung der Wiederfindungen in Abbildung 65 fällt auf, dass die Standardabweichungen bei Mehrfachmessungen auf unterschiedlichen Sensorchips zum Teil relativ hoch ausfallen und somit eine schlechte inter-Chip Reproduzierbarkeit vorliegt. Dies hat vermutlich seine Ursache in der Durchführung der Chippräparation, wie sie in Abschnitt 3.2.1.6 beschrieben wird. Da nach Aufbringung des Biopolymers Aminodextran weitere Präparationsschritte durch orts aufgelöstes Auftropfen der Reagenzien und nicht weiter im Sandwichverfahren erfolgen, kann dies einen

negativen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Sensorchips haben. Durch Optimierung der Präparationsbedingungen, z.B. durch Einsatz eines Mikrodosiersystems anstelle des Auftropfens der Reagenzien per Pipette, könnten somit die Reproduzierbarkeit sowie die Wiederfindung auf Sensorchips unterschiedlicher Batches vermutlich noch weiter gesteigert werden. Abgesehen von der Konzentration von 20 mg/L Salmonellenantikörper, bei der im Mittel eine Wiederfindung von 69 % bestimmt werden konnte, liegen alle anderen Wiederfindung im Mittel zwischen 81 % und 96 % und belegen die prinzipielle Gültigkeit der durch Multi-Analyt-Messungen aufgestellten Kalibrierfunktionen für Salmonellenantikörper und CRP.

### 4.6 Untersuchung von Realseren

Um zu demonstrieren, dass die in dieser Arbeit charakterisierten Sensorplattformen zur Ein- und Multi-Analytbestimmung auch für die Untersuchung von Realseren eingesetzt werden können, wurden kommerziell verfügbare Referenzseren für Salmonelleninfektionen von Hühnern und Schweinen untersucht. Für Seren aus Hühnern lagen neben einem Referenzserum, welches keine Antikörper gegen Salmonellen aufweist (Negativserum) zwei Referenzseren vor, welche jeweils auf die Salmonellenserovare *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis als Antikörper-positiv eingestuft wurden. Für Seren aus Schweinen lag ein Antikörper-negatives Serum vor sowie ein Serum mit Antikörpern, welche das Serovar *Salmonella* Typhimurium erkennen.

#### 4.6.1 Untersuchung von Hühnerseren

Zunächst sollte unter Anwendung des Ein-Analyt-Aufbaus die Wechselwirkung der drei oben erwähnten Referenzseren mit LPS Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche untersucht werden. Dabei wurde zuerst die Wechselwirkung der Seren mit LPS des Serovars *Salmonella* Typhimurium untersucht. Zur Messung von Realseren wurde analog zur Vorgehensweise für Messungen von Salmonellenantikörpern in Rinderserum (FBS) in Abschnitt 4.2.9, vor der eigentlichen Messung der Seren ein Blockierungsschritt mit FBS eingeführt. Da die Seren nur in geringen Volumina vorlagen, wurden diese mit HEPES Puffer in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Zur Blockierung vor der Probeninjektion wurde eine Verdünnung des FBS mit Puffer von 1:2 gewählt.

In Abbildung 66 sind die Bindungskurven zu den durchgeführten Experimenten exemplarisch abgebildet, sowie die Gegenüberstellung der detektierten Signaländerungen in Abhängigkeit der Seren für Mehrfachmessungen.

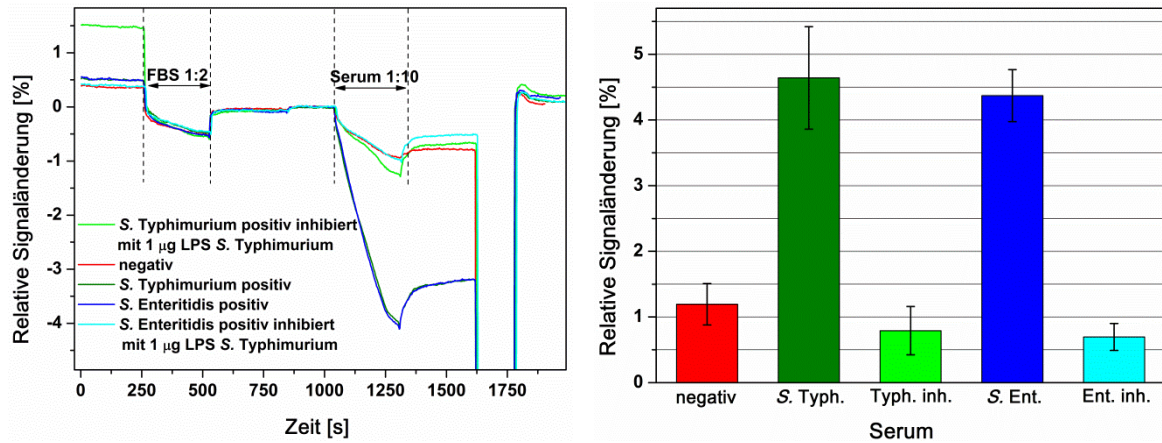


Abbildung 66: Bindungsstudien mit Realseren aus Huhn an einer mit LPS aus *Salmonella* Typhimurium beschichteten Sensoroberfläche (links) sowie beobachtete relative Signaländerungen bei Dreifachbestimmungen auf verschiedenen Sensorchips (rechts).

Wie zu erwarten, bindet *Salmonella* Typhimurium Antikörper-positives Serum an die auf der Sensoroberfläche befindlichen Lipopolysaccharide des Serovars *Salmonella* Typhimurium. Eine Inhibition dieses Bindungssignals durch Zugabe des entsprechenden LPS führt zu einer geringeren Signaländerung, die im Bereich des Antikörper-negativen Serums liegt.

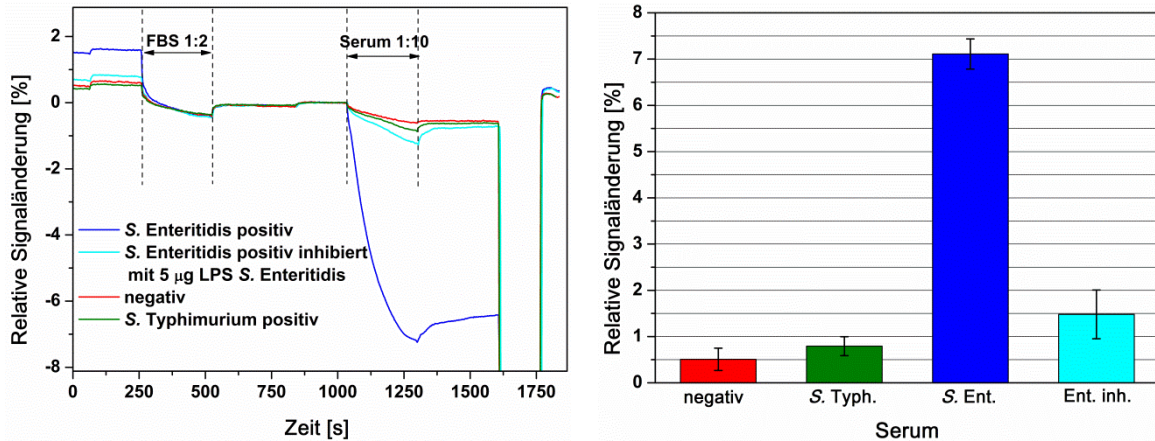
Entgegen der Erwartung bindet auch das *Salmonella* Enteritidis Antikörper-positives Serum an die Sensoroberfläche. Auch dieses Signal kann durch Zugabe von LPS des Salmonellenserovars Typhimurium inhibiert werden und belegt somit eine vorhandene Kreuzreaktivität zwischen dem auf *Salmonella* Enteritidis Antikörper-positiven Serum und den LPS des Serovars *Salmonella* Typhimurium.

Die Signale der positiven Seren unterscheiden sich deutlich von den Signalen des negativen Serums und verdeutlichen somit, dass unter Anwendung der 1-lambda-Reflektometrie zwischen Salmonellenantikörper-positiven und -negativen Hühnerseren unterschieden werden kann.

Als nächstes sollte die Wechselwirkung der Seren mit LPS Erkennungsstrukturen des Serovars *Salmonella* Enteritidis untersucht werden. Dabei wurden die Experimente analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise für Messungen auf Oberflächen mit LPS Typhimurium durchgeführt.

In Abbildung 67 sind die Bindungskurven zu den durchgeführten Experimenten auf einer mit LPS Enteritidis beschichteten Sensoroberfläche exemplarisch abgebildet, sowie die Gegenüberstellung der detektierten Signaländerungen in Abhängigkeit der Seren für Mehrfachmessungen.





**Abbildung 67:** Bindungsstudien mit Realseren aus Huhn an einer mit LPS aus *Salmonella* Enteritidis beschichteten Sensoroberfläche (links) sowie beobachtete relative Signaländerungen bei Dreifachbestimmungen auf verschiedenen Sensorchips (rechts).

Auf der Oberfläche, die mit LPS des Serovars *Salmonella* Enteritidis beschichtet ist, führt das auf dieses Serovar Antikörper-positive Serum zu einem ausgeprägten Bindungssignal mit einer relativen Signaländerung von ca. 7 %. Dieses kann durch Zugabe von 5 µg LPS aus *Salmonella* Enteritidis inhibiert werden, sodass danach eine Signalabnahme auf ca. 1,5 % beobachtet werden kann. Möglicherweise könnte durch Zugabe von mehr LPS oder einer längeren Inkubationszeit für die Inhibition das Bindungssignal noch weiter reduziert werden. Die relative Signaländerung bei Injektion des Antikörper-positiven Serums für das Serovar *Salmonella* Typhimurium liegt im Bereich der Signaländerung des negativen Serums, sodass eine Kreuzreaktivität der Oberfläche zu diesem Serum ausgeschlossen werden kann. Somit konnte auch auf der Oberfläche mit LPS des Serovars *Salmonella* Enteritidis eine Diskriminierung zwischen positiven und negativen Seren erfolgen und darüber hinaus zwischen Seren, die Antikörper gegen unterschiedliche Salmonellenserovare beinhalten, unterschieden werden.

Basierend auf diesen Voruntersuchungen unter Verwendung des Ein-Analyt-Aufbaus sollten die Einzelmessungen anschließend im Multi-Analyt-Aufbau kombiniert werden. Hierfür wurde ein Sensorchip gemäß Abschnitt 3.2.1.7 an zwei unterschiedlichen Messpositionen mit LPS des Serovars *Salmonella* Typhimurium sowie mit LPS des Serovars *Salmonella* Enteritidis beschichtet. Durch die Detektion an den entsprechenden Messpositionen wurde anschließend die Wechselwirkung der positiven, inhibierten und negativen Seren mit beiden LPS Erkennungsstrukturen zeitaufgelöst verfolgt.

Die erhaltenen Bindungskurven aus den durchgeführten Experimenten sind in Abbildung 68 exemplarisch dargestellt, ebenso die Gegenüberstellung der detektierten Signaländerungen in Abhängigkeit der Seren sowie der Messpositionen für Mehrfachmessungen.



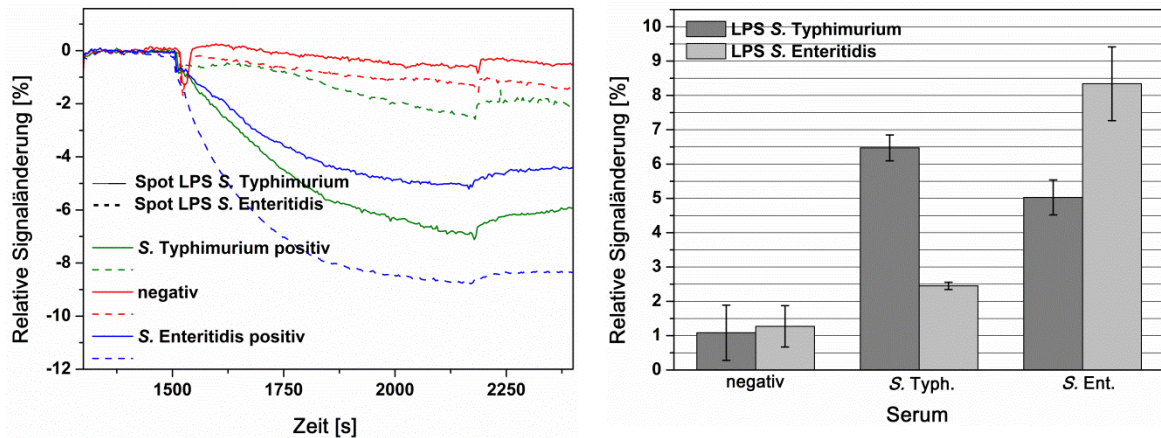


Abbildung 68: Zeitaufgelöste Bindungsstudien mit Realseren aus Huhn an zwei mit LPS aus *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis beschichteten Messpositionen (links) sowie beobachtete relative Signaländerungen bei Dreifachbestimmungen auf verschiedenen Sensorchips (rechts).

Bei der zeitaufgelösten Detektion der Wechselwirkung zwischen den Seren und beiden auf der Sensoroberfläche immobilisierten Erkennungsstrukturen bindet das negative Hühnerserum weder an das LPS des Serovars *Salmonella* Typhimurium, noch an das LPS des Serovars *Salmonella* Enteritidis in einem erkennbaren Ausmaß. Das Antikörper-positive Serum für das Serovar *Salmonella* Typhimurium bindet an das LPS aus *Salmonella* Typhimurium, während das detektierte Bindungssignal am LPS aus *Salmonella* Enteritidis für dieses Serum deutlich geringer ausfällt und ungefähr im Bereich der Signaländerung des negativen Serums liegt. Das Antikörper-positive Serum für das Serovar *Salmonella* Enteritidis bindet an das LPS aus *Salmonella* Enteritidis und aufgrund der bereits im obigen Abschnitt festgestellten Kreuzreaktivität auch an das LPS aus *Salmonella* Typhimurium, jedoch in einem kleineren Ausmaß. Anhand der Zwei-Spot-Messungen konnte demonstriert werden, dass durch die zeitaufgelöste Detektion der Wechselwirkung an zwei Messpositionen eine Klassifizierung der Seren bezüglich ihres Serovars möglich ist.

Für einen Vergleich der beobachteten Signaländerungen der Einzel- und Zwei-Spot-Messungen wurden die entsprechenden Signaländerungen in Abbildung 69 gegenübergestellt.

Bei den beobachteten Signaländerungen aufgrund der Wechselwirkung zwischen den Seren und den LPS Erkennungsstrukturen kann bei Zwei-Spot-Messungen allgemein das gleiche Bindungsverhalten beobachtet werden, wie es bei Durchführung der Ein-Spot-Messungen auf unterschiedlichen Sensorchips detektiert wurde. Abgesehen von den Messungen mit negativem Serum an LPS des Serovars Typhimurium kann zwischen Messungen an einem einzelnen Spot und Messungen an zwei Spots ein Trend hin zu höheren relativen Signaländerungen beobachtet werden. Dies ist auf das verwendete Probenvolumen zurückzuführen, welches bei Messungen an einem Spot nur halb so groß war, als bei Messungen an zwei Spots.

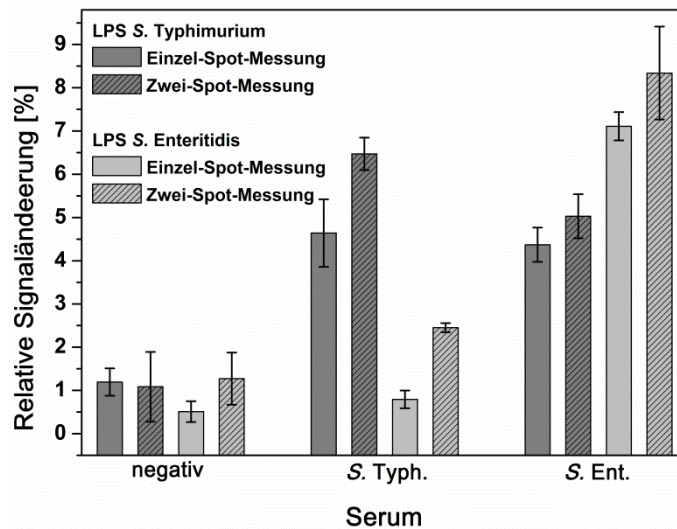


Abbildung 69: Gegenüberstellung der detektierten Signaländerungen bei Bindungsstudien zwischen Realseren aus Huhn und LPS aus *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis unter Durchführung von Einzel-Spot- und Zwei-Spot-Messungen.

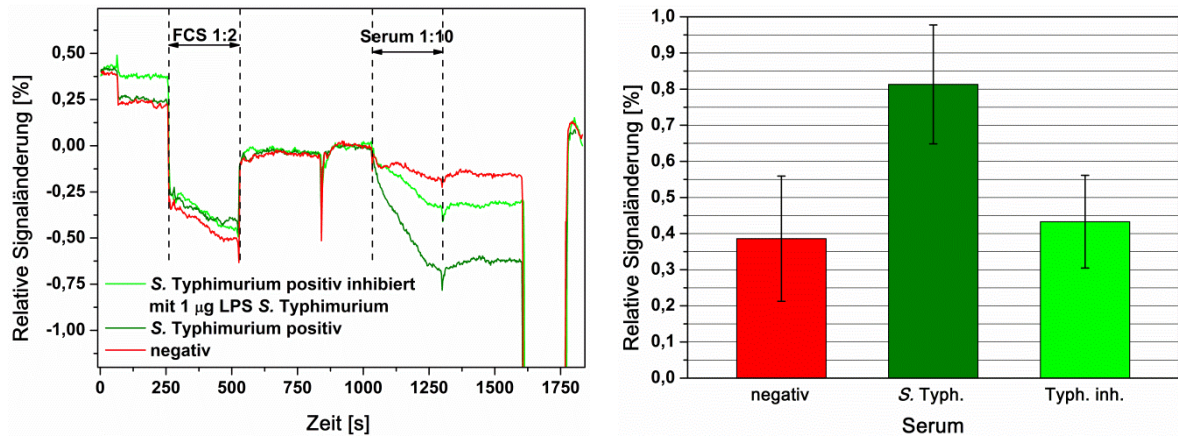
Es konnte demonstriert werden, dass die Untersuchung von Realseren mit der neuen Multi-Analyt Sensorplattform zu vergleichbaren Messergebnissen führt, wie sie auch durch einzelne Messungen erhalten werden. Darüber hinaus kann sich die Gesamtmesszeit, die z.B. zur Klassifizierung eines Serums benötigt wird, durch die zeitaufgelöste Detektion an zwei Messpositionen (unter Einsatz des gleichen Probenvolumens) auf die Hälfte reduzieren.

Die in diesem Kapitel erhaltenen Signaländerungen für positive Seren lagen im Mittel zwischen 7 % und 11 %. Obwohl die Seren vor den Messungen im Verhältnis 1:10 mit Puffer verdünnt wurden, liegen die erhaltenen Signaländerungen deutlich über den Werten der Kalibrierfunktion für Salmonellenantikörper in FBS. Daraus lässt sich folgern, dass die in dieser Arbeit verwendete Sensoroberfläche zur Quantifizierung von Salmonellenantikörper-positiven Realseren durchaus geeignet ist, da diese, falls erforderlich, auch in einer noch höheren Verdünnung untersucht werden könnten. Dabei würden gleichzeitig auch die beobachteten Matrixeffekte weiter minimiert werden, sodass der benötigte Blockierungsschritt mit FBS vermutlich nicht länger erforderlich wäre.

#### 4.6.2 Untersuchung von Schweineseren

Zur Untersuchung des negativen Schweineserums und des Schweineserums, welches Antikörper gegen das Salmonellenserovar Typhimurium beinhaltet, wurde ein Sensorchip mit LPS aus *Salmonella* Typhimurium beschichtet und die Wechselwirkung der Oberfläche mit beiden Seren untersucht.

In Abbildung 70 sind die Bindungskurven zu den durchgeführten Experimenten exemplarisch abgebildet, sowie die Gegenüberstellung der detektierten Signaländerungen in Abhängigkeit der Seren für Mehrfachmessungen.



**Abbildung 70:** Bindungsstudien mit Realseren aus Schwein an einer mit LPS aus *Salmonella Typhimurium* beschichteten Sensoroberfläche (links) sowie beobachtete relative Signaländerungen bei Dreifachbestimmungen auf verschiedenen Sensorchips (rechts).

Auf der mit LPS aus *Salmonella Typhimurium* beschichteten Sensoroberfläche führt das entsprechende Antikörper-positive Serum zu einem Bindungssignal, welches sich vom Signal für Antikörper-negatives Serum unterscheidet. Zudem ist eine Inhibition des positiven Bindungssignals durch Zugabe von LPS des Serovars Typhimurium möglich, wodurch Signaländerungen erhalten werden, die im Bereich der Signaländerungen für das negative Serum liegen. Somit kann angenommen werden, dass es sich beim höher ausfallenden Signal für das Antikörper-positive Serum um eine spezifische Wechselwirkung zwischen den Antikörpern und den LPS auf der Sensoroberfläche handelt.

Generell fallen die Signaländerungen bei Wechselwirkung der Schweineseren mit der Sensoroberfläche deutlich geringer aus als die Signaländerungen, welche bei der Untersuchung von Hühnerseren beobachtet werden. Da wie oben erwähnt, Signaländerungen für Salmonellenantikörper in Rinderserum ebenfalls andere Werte aufweisen, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass Sensorsignale für Antikörper aus Seren von verschiedenen Tierarten unterschiedlich hoch ausfallen. Ein Grund hierfür kann in einer unterschiedlich stark ausgeprägten Immunantwort der entsprechenden Tierart liegen, was sich unter anderem in unterschiedlich hoch affinen Antikörpern sowie in unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen im jeweiligen Serum äußern kann. Eine weitere mögliche Ursache für die voneinander abweichenden Signale für einzelne Tierarten sind Matrixeffekte, die zwar durch den Blockierungsschritt und die Verdünnung der Hühner- und Schweineseren weitestgehend unterdrückt werden, aber dennoch anhand der unspezifischen Bindungssignale bei Negativseren beobachtet werden können. So

beträgt die Signaländerung bei Wechselwirkung der LPS Typhimurium Sensoroberfläche mit dem negativen Schweineserum ca. 0,4 %, während die Signaländerung des entsprechenden Hühnerserums auf dieser Oberfläche bei 1,1 % liegt. Dies spricht für eine unterschiedlich stark ausgeprägte unspezifische Wechselwirkung der jeweiligen Seren mit der Sensoroberfläche. Bei verhältnismäßig hohen Signaländerungen für Positivseren, wie sie bei Untersuchung der Hühnerseren beobachtet werden können, führt der Anteil der unspezifischen Wechselwirkung bei der Diskriminierung zwischen positiven und negativen Seren zu keiner Problematik. Für kleinere Signaländerungen jedoch, wie sie bei Untersuchung der positiven Schweineseren beobachtet werden können, kann die Signaländerung für unspezifische Wechselwirkung dazu führen, dass keine Diskriminierung zwischen positiven und negativen Seren mehr möglich ist.

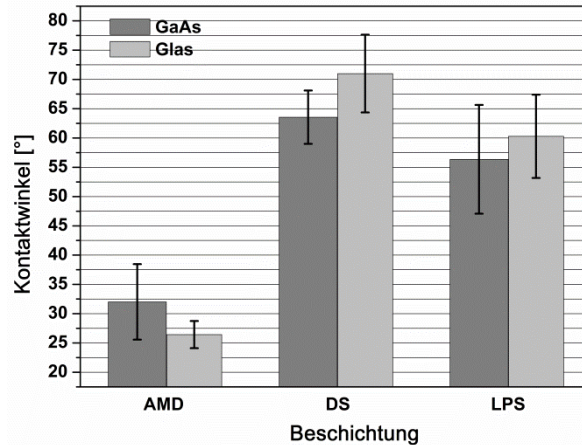
### **4.7 Adaptation des Salmonellenassays auf Galliumarsenid**

Galliumarsenid ist ein Halbleitermaterial, welches für Wellenlängen im mittleren Infrarot durchlässig ist und somit ein geeignetes Transducermaterial für Sensoranwendungen in diesem Spektralbereich darstellt. In dieser Arbeit wurden Voruntersuchungen bezüglich der Oberflächenmodifizierung von Galliumarsenid angestellt, die eigentliche Sensoranwendung im mittleren Infrarot wurde dabei jedoch im Rahmen eines Projektes von Seiten eines Kooperationspartners her untersucht und wird daher an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt.

Um Galliumarsenid Transducer für die biomolekulare Interaktionsanalyse in einem Sensor einsetzen zu können, bedarf es einer geeigneter Oberflächenmodifikationen, sodass eine stabile, sensitive Schicht auf dem Transducer aufgebracht werden kann. Exemplarisch wurde untersucht, inwiefern die Oberflächenmodifikation auf Glas zur Detektion von Salmonellenantikörpern auf das Material Galliumarsenid übertragen werden kann. Dabei wurde die Präparation der Transducer wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

#### **4.7.1 Charakterisierung der Chippräparation mittels Kontaktwinkelmessungen**

Zur Charakterisierung der erzeugten Schichten nach den einzelnen Präparationsschritten wurde deren Benetzung mit Wasser durch Kontaktwinkelmessungen gemäß Abschnitt 3.2.2 untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse wurden den Kontaktwinkelmessungen auf Glas aus Abschnitt 4.2.1 in Abbildung 71 gegenübergestellt.

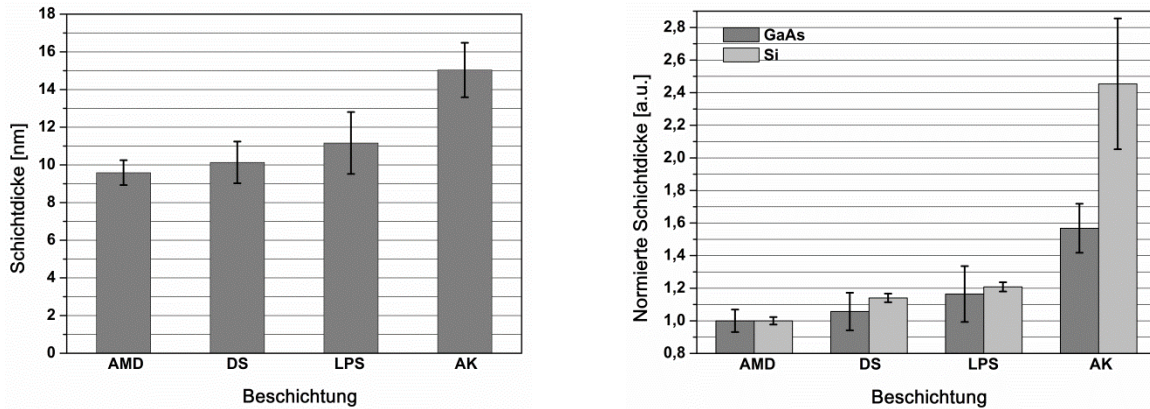


**Abbildung 71:** Gegenüberstellung von Kontaktwinkelmessungen mit Wasser nach Modifizierung von Transducern aus GaAs und Glas mit Aminodextran (AMD), Decansäure (DS) und Lipopolysaccharid (LPS).

Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmen die ermittelten Kontaktwinkel für unterschiedlich beschichtete Galliumarsenid- und Glasoberflächen sehr gut überein. Abgesehen von den Werten für Kontaktwinkel auf Aminodextran, können auf Galliumarsenidtransducern tendenziell leicht niedrigere Werte für Kontaktwinkel festgestellt werden als auf Glas Transducern. Nach Aktivierung der Galliumarsenid Oberfläche im Sauerstoffplasma konnte eine vollständige Benetzung der Oberfläche mit Wasser beobachtet werden, was für eine erfolgreiche Ausbildung von Hydroxylfunktionen auf der Oberfläche spricht. Die Gründe für Kontaktwinkeländerungen bei Modifikation der Oberflächen wurden bereits in Abschnitt 4.2.1 diskutiert. Anhand der beobachteten Kontaktwinkel auf unterschiedlich beschichteten Galliumarsenidtransducern kann zunächst davon ausgegangen werden, dass die Oberflächenpräparation der Sensorchips erfolgreich war.

#### 4.7.2 Charakterisierung der Chippräparation mittels spektraler Ellipsometrie

Zur Charakterisierung der erhaltenen Schichtdicken nach Durchführung der einzelnen Präparationsschritte wurden mittels spektraler Ellipsometrie Messungen unter einem Winkel von 70 ° auf Galliumarsenidtransducern durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse für die Schichtdicken nach Auswertung der Spektren gemäß Abschnitt 3.2.3 sind in Abbildung 72 dargestellt und wurden nach Normierung den Ergebnissen für Schichtdickenbestimmungen auf Silizium aus Abschnitt 4.2.2 gegenübergestellt.



**Abbildung 72:** Bestimmung von Schichtdicken mittels spektraler Ellipsometrie nach Modifikation von drei Galliumarsenid Sensorchips mit Aminodextran (AMD), Decansäure (DS), Lipopolysaccharid (LPS) und Antikörper (AK) (links) und Vergleich mit ellipsometrischen Messungen auf Silizium durch Gegenüberstellung der jeweils normierten Schichtdicken (rechts).

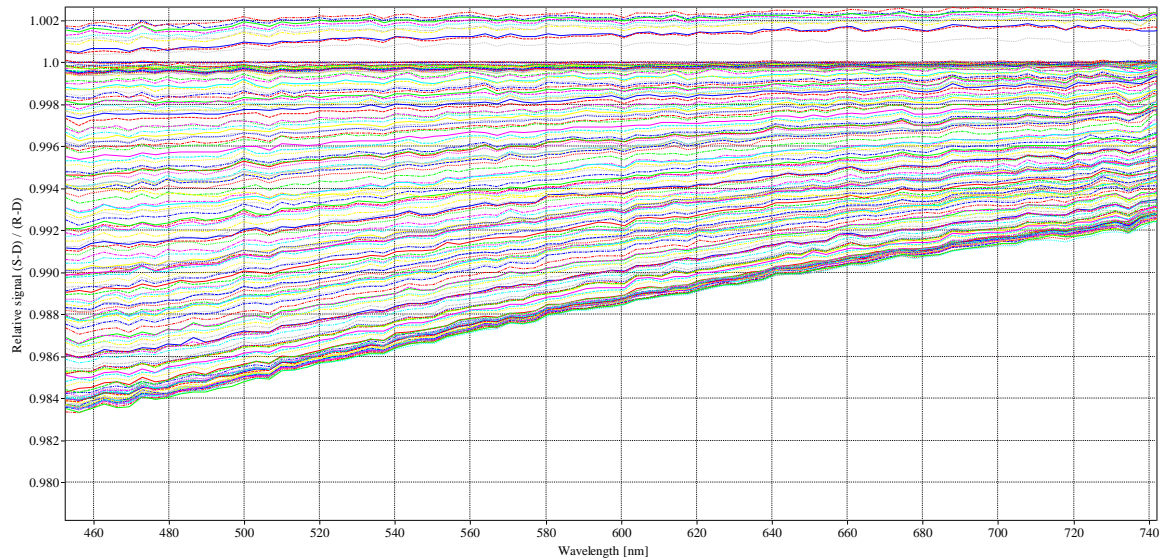
Bei Betrachtung der Schichtdickenänderungen ausgehend von AMD bis zur Zugabe von Salmonellenantikörpern kann auf Galliumarsenid Transducern analog zu Transducern aus Silizium eine Schichtdickenzunahme festgestellt werden. Allerdings wurden unter Anwendung eines Cauchy Modells für AMD auf Galliumarsenid im Mittel Schichtdicken von ca. 10 nm erhalten, während diese auf Silizium im Mittel ca. 3 nm betragen. Daher wurden für einen Vergleich der Schichtdickenänderungen auf beiden Substraten die entsprechenden Werte auf AMD normiert. Tendenziell kann bei den untersuchten Galliumarsenid Beschichtungen, abgesehen von der Antikörperbeschichtung, anhand der Standardabweichungen in Abbildung 72 eine etwas schlechtere Chip-zu-Chip Reproduzierbarkeit als bei Beschichtungen auf Siliziumtransducern beobachtet werden. Während die normierten Schichtdickenänderungen nach Modifikation der Transducer mit Decansäure und LPS im Rahmen der Messgenauigkeit gut übereinstimmen, liegt eine geringere Antikörperanbindung bei modifizierten Galliumarsenid Transducern als bei modifizierten Silizium Transducern vor. Da die Messbedingungen, wie bereits unter Abschnitt 4.2.2 erwähnt, nicht den natürlichen Gegebenheiten von Antikörpern entsprechen, sollten die hier erhaltenen Ergebnisse lediglich dazu dienen, einen Trend im Schichtdickenwachstum bei Präparation der Transducer zu beobachten. Die genauere Untersuchung der Antikörperanbindung an die modifizierte Galliumarsenid Oberfläche wird im folgenden Kapitel näher untersucht.

### 4.7.3 Messungen mittels RfS an Galliumarsenid

Um anhand von spektralen Messungen zu untersuchen, ob eine Wechselwirkung zwischen Salmonellenantikörpern und LPS auf Galliumarsenid detektiert werden kann und bei welchen Wellenlängen eine Signaländerung auftritt, wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie verwendet. Da Galliumarsenid ein nicht transparentes Material ist, wurde der Aufbau wie er

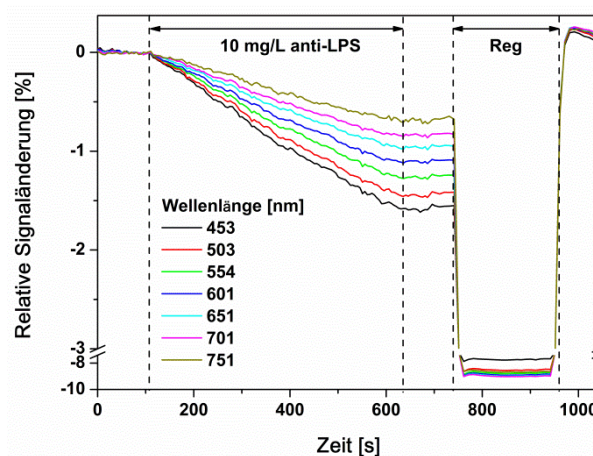


normalerweise für transparente Transducer bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie verwendet wird, gemäß der Beschreibung in Abschnitt 3.2.4.2 modifiziert. Zunächst wurden Spektren bei der Detektion von Salmonellenantikörpern unter Verwendung von Galliumarsenid ausgewertet. In Abbildung 73 sind die bei der Messung erhaltenen Spektren gezeigt, welche auf das erste Spektrum normiert wurden.



**Abbildung 73:** Auf das erste Spektrum normierte Spektren bei Detektion von Salmonellenantikörpern auf Galliumarsenid mittels RIFS.

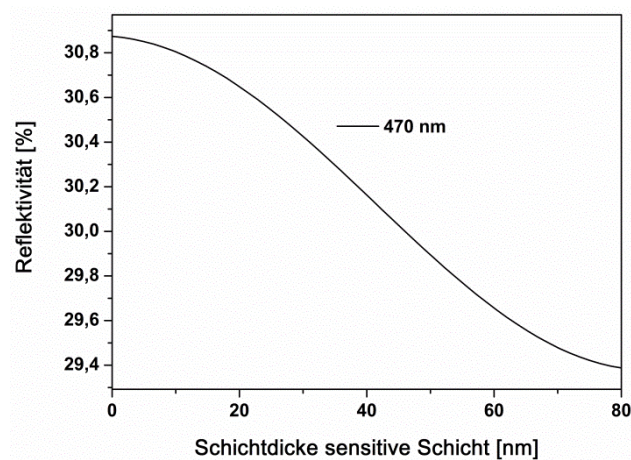
Die detektierte Intensität ändert sich während der Messung für jede Wellenlänge. Dabei wird die beobachtete Intensitätsänderung während der Antikörperinjektion ausgehend von der kleinsten Wellenlänge bei 453 nm hin zu größeren Wellenlängen immer kleiner. In Abbildung 74 sind die zugehörigen Bindungskurven für Salmonellenantikörper dargestellt, die bei Auswertung der Signaländerung in Abhängigkeit der Zeit bei unterschiedlichen Wellenlängen beobachtet werden können.



**Abbildung 74:** Bindungskurven für 10 mg/L Salmonellenantikörper an einem LPS beschichteten Galliumarsenid Transducer bei Auswertung einzelner Wellenlängen einer spektralen Messung.

Die Signaländerungen in Abbildung 74 verlaufen negativ. Wie bereits bei den auf das erste Spektrum normierten Spektren in Abbildung 73 beobachtet werden konnte, fällt die Signaländerung in Abbildung 74 umso größer aus, je kleiner die Detektionswellenlänge gewählt wird. Des Weiteren ändern sich die beobachteten Signale in Abhängigkeit der Wellenlänge linear, was an den annähernd äquidistanten Abständen zwischen den einzelnen Basislinien nach Antikörperinjektion beobachtet werden kann. Der gesamte Signalverlauf einer Messung mit Regeneration ist dem Signalverlauf für Messungen unter Verwendung der 1-lambda-Reflektometrie auf Goethedglas in Abbildung 36 sehr ähnlich und belegt die Wechselwirkung von Salmonellenantikörpern mit der sensitiven Schicht auf Galliumarsenid.

Da Messungen zur Detektion von Salmonellenantikörpern unter Einsatz der 1-lambda-Reflektometrie bei einer Wellenlänge von 470 nm durchgeführt wurden und in Abbildung 74 festgestellt werden konnte, dass bei dieser Wellenlänge ein mit anderen Wellenlängen vergleichbares, jedoch mitunter höheres Signal zu erwarten ist, wurde überprüft, ob zudem ein linearer Zusammenhang zwischen der Messgröße Reflektivität und der Schichtdickenänderung der sensitiven Schicht gegeben ist. Hierzu wurde eine Simulationsrechnung durchgeführt, welche in Abbildung 75 dargestellt ist.



**Abbildung 75: Simulationsrechnung für die Änderung der Reflektivität in Abhängigkeit der Schichtdicke sensitiver Schichten auf Galliumarsenid bei einer Wellenlänge von 470 nm.**

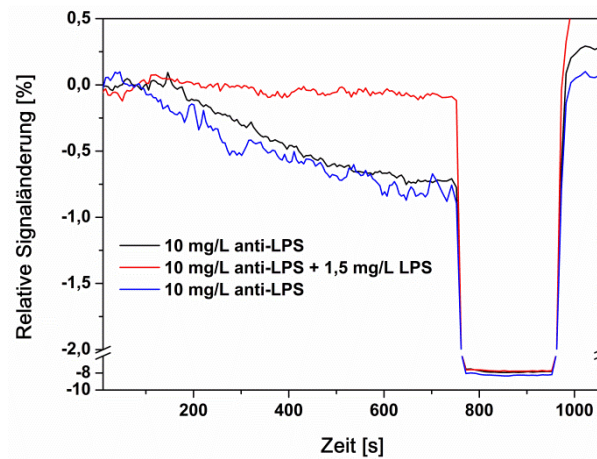
Analog zu den beobachteten, negativen Bindungssignalen in Abbildung 74 wurde durch die Simulationsrechnung ebenfalls ein negativer Signalverlauf bei wachsender Schichtdicke der sensitiven Schicht berechnet. Im Bereich sehr kleiner Schichtdicken zwischen 0 nm und 20 nm liegt kein linearer Zusammenhang zwischen der Reflektivität und der Schichtdicke der sensitiven Schicht auf Galliumarsenid vor. Im Bereich zwischen 20 nm und 60 nm, der bei der biomolekularen Interaktionsanalyse auf mit Aminodextran beschichteten Galliumarsenid Transducern wahrscheinlich durchlaufen wird, kann ein linearer Signalverlauf beobachtet werden. Somit ist die



Quantifizierung von Analyten mittels spektraler RfS-Messungen bei Auswertung einer Wellenlänge von 470 nm auf Galliumarsenid möglich. Daher wurde bei den folgenden spektralen Messungen mit RfS stets diese Wellenlänge zur Auswertung herangezogen.

#### 4.7.4 Test der Wechselwirkung auf Spezifität

Um zu überprüfen, ob das erhaltene Antikörperbindungssignal bei Verwendung von Galliumarsenid auf einer spezifischen Wechselwirkung der Antikörperparatope mit den Epitopen der Antigene basiert, wurde wie unter Abschnitt 4.2.4 näher beschrieben, ein Bindungshemmtest durchgeführt. Die erhaltenen Bindungskurven für den Bindungshemmtest sowie Kontrollmessungen sind in Abbildung 76 dargestellt.

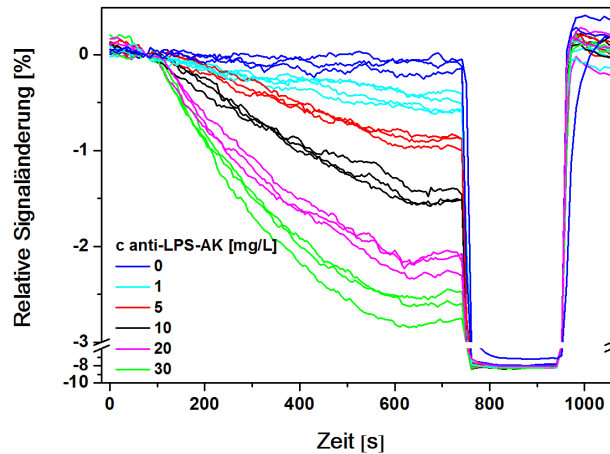


**Abbildung 76:** Inhibition des anti-LPS-Antikörper Bindungssignals durch Zugabe eines molaren Überschusses an LPS zur Antikörperlösung mit zuvor und danach durchgeführten Antikörper Kontrollmessungen unter Verwendung eines Galliumarsenid Transducers und Auswertung spektraler Messungen bei einer Wellenlänge von 470 nm.

Die Inhibition der Wechselwirkung kann anhand des ausbleibenden Bindungssignals (keine Signalabnahme) im Vergleich zu dem zuvor beobachteten Bindungssignal für 10 mg/L Antikörperlösung bestätigt werden und belegt somit die Spezifität der Wechselwirkung. Eine anschließende Wiederholung der Messung mit 10 mg/L Antikörperlösung bestätigt, dass es sich beim zuvor ausbleibenden Bindungssignal um eine Inhibition und nicht etwa um einen Aktivitätsverlust der Oberfläche handelt. Das starke Rauschen des Messsignals für diese Messung ist vermutlich auf vorhandene Luftblasen innerhalb der Flusszelle zurückzuführen, welche wahrscheinlich nach der Regeneration der zuvor durchgeführten Messung in die Flusszelle eingedrungen sind. Dies kann anhand der abweichenden Basislinie nach der Regeneration der Inhibitionsmessung beobachtet werden.

#### 4.7.5 Konzentrationsmessungen auf modifiziertem Galliumarsenid

Zur Untersuchung der Signaldynamik bei Antikörpermessungen und gleichzeitig der Stabilität der Oberfläche bezüglich Mehrfachmessungen wurden Salmonellenantikörper Konzentrationen zwischen 0 mg/L und 30 mg/L ohne bestimmte Reihenfolge insgesamt dreifach bestimmt. Die hierfür durchgeführten 18 Messzyklen sind in Abbildung 77 dargestellt.



**Abbildung 77:** Mittels RfS durchgeführte Konzentrationsmessungen mit Salmonellenantikörper Lösungen auf einem mit LPS beschichtetem Galliumarsenid Transducer bei Auswertung einer Wellenlänge von 470 nm.

Anhand der durchgeführten Mehrfachmessungen kann festgestellt werden, dass konzentrationsabhängige Signale erhalten werden, sodass eine Quantifizierung von Salmonellenantikörpern unter Verwendung von Galliumarsenid als Transducermaterial somit prinzipiell möglich ist. Des Weiteren sind die Signaländerungen für einzelne Konzentrationen über die 18 Messzyklen hinweg sehr gut reproduzierbar, sodass gezeigt werden kann, dass der Sensor durch Regeneration mit Guanidinhydrochloridlösung für Mehrfachmessungen eingesetzt werden kann. Somit führt die Strategie zur Immobilisierung der sensitiven Schicht auf Galliumarsenid zu stabilen Oberflächen, die bei Einsatz als Sensor im wässrigen Medium sowie unter Bestrahlung mit Licht stabil sind. Die beobachteten Signaländerungen für verschiedene Konzentrationen auf Galliumarsenid in Abbildung 77 liegen verglichen mit Signaländerungen auf Goetheglas bei einer Wellenlänge von 470 nm in Abbildung 38 tendenziell in ähnlichen Bereichen und betragen beispielsweise für eine Salmonellenantikörper Konzentration von 10 mg/L auf Goetheglas 1,4 % und auf Galliumarsenid 1,5 %.

Somit erlauben die hier beobachteten Ergebnisse die Folgerung, dass Galliumarsenid durch Wahl einer geeigneten Immobilisierungsstrategie als Transducermaterial in Biosensoranwendungen eingesetzt werden kann.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde ein vereinfachter und portabler Aufbau der 1-lambda-Reflektometrie entwickelt, der die quantitative Multi-Analyt-Bestimmung von (veterinär)diagnostisch relevanten Parametern ermöglicht, wobei zur Detektion der biomolekularen Wechselwirkung anstelle einer CCD-Kamera lediglich eine Photodiode verwendet wurde.

Zunächst wurden hierfür, basierend auf Messungen mit der RlFS, Simulationen zur Auswahl geeigneter Detektionswellenlängen durchgeführt und anhand von Untersuchungen mittels 1-lambda-Reflektometrie, Signal-zu-Rausch Verhältnisse unter Verwendung unterschiedlicher Wellenlängen sowie verschiedener Schichtsysteme ermittelt. Es hat sich gezeigt, dass die Verwendung einer LED bei 470 nm in Kombination mit Goetheglas für diesen Aufbau am besten geeignet ist, wobei für Messungen auf Interferenzglas unter Verwendung einer LED bei 520 nm kein markanter Unterschied in der Signaldynamik beobachtet werden konnte und daher diese Kombination für zukünftige Anwendungen ebenfalls denkbar wäre.

Des Weiteren wurden die gerätespezifischen Eigenschaften des Detektionsmoduls untersucht. Hierfür wurden optimale Einstellungen für die Aufnahme von Datenpunkten bei der Detektion biomolekularer Wechselwirkungen ermittelt. Das niedrigste Signalrauschen wurde bei Einstellung hoher average Werte erreicht, wobei die Anzahl an Datenpunkten dadurch pro Zeiteinheit abnahm. Ferner wurde getestet, inwiefern sich eine Variation des Abstandes zwischen Transducer und Detektionsmodul aufgrund der integrierten, konfokalen Optik auf das Bindungssignal auswirkt, wobei festgestellt werden konnte, dass der Aufbau demgegenüber sehr robust ist.

Basierend auf diesen Voruntersuchungen konnte zunächst ein Assay für den Nachweis von Salmonellenantikörpern entwickelt werden. Dabei wurde die Präparation der sensitiven Schicht anhand ellipsometrischer Messungen und Kontaktwinkelbestimmungen charakterisiert sowie die Spezifität der Wechselwirkung bewiesen. Eine durch 1-lambda-Reflektometrie-Messungen erstellte Kalibrierfunktion wurde einer entsprechenden Kalibrierfunktion, die durch Messungen mit der RlFS erhalten wurde, gegenübergestellt. Anhand dessen konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung der 1-lambda-Reflektometrie vergleichbare Ergebnisse erhalten werden, wie sie mit RlFS beobachtet werden können. Des Weiteren wurde anhand der Kalibrierung in unverdünntem Serum demonstriert, dass die 1-lambda-Reflektometrie auch in komplexen Matrices eine quantitative Analytbestimmung ermöglicht. Ermittelte Wiederfindungsraten in Puffer und Serum belegten zudem die Reproduzierbarkeit der Messungen, was sowohl für einen robusten Messaufbau als auch für eine einheitliche Chippräparation spricht. Anhand von Langzeituntersu-

chungen bezüglich unspezifischer und spezifischer Wechselwirkung der präparierten Oberflächen konnte eine Stabilität der Sensorchips über mehrere Wochen hinweg beobachtet werden.

Des Weiteren wurde ein Assay für den Nachweis von CRP entwickelt. Dabei konnte demonstriert werden, dass die Immobilisierung von Antikörpern auf der sensitiven Schicht einen qualitativen und quantitativen Nachweis von CRP ermöglicht. Durch Untersuchungen der sensitiven Schicht auf deren Stabilität gegenüber Regenerationslösungen war es möglich, die Sensoroberfläche nach CRP-Detektion zu regenerieren, ohne dabei die Aktivität der Erkennungsstruktur (anti-CRP) nachhaltig zu beeinflussen. Auf dieser Grundlage konnten mehrere Messungen auf einem Sensorchip durchgeführt und dieser somit kalibriert werden. Anhand der Kalibrierdaten wurden zwei unterschiedliche Auswertestrategien durchgeführt und gegenübergestellt. Es hat sich gezeigt, dass die Auswertung der Signaländerung nicht anhand des Niveaus der Basislinie bestimmt werden kann, sondern für die Auswertung ein Zeitpunkt während der Probeninjektion gewählt werden muss, der den dynamischen Signalverlauf über unterschiedliche CRP-Konzentrationen unverfälscht wiedergibt. Bei der Auswertung der Signalanfangssteigung konnte festgestellt werden, dass hierfür zukünftig eine größere zeitliche Auflösung nötig ist, um die relativ schnell verlaufende Assoziation von CRP an die Oberfläche mit genügend Datenpunkten erfassen und anschließend fitten zu können. Generell konnten bei dieser Auswertestrategie ein schmaler verlaufendes Konfidenzband für die Kalibrierkurve sowie etwas bessere Wiederfindungsraten beobachtet werden. Die über beide Auswertestrategien ermittelten Kenngrößen der Kalibrierung erlauben eine prinzipielle Unterscheidung zwischen gesunden und erkrankten Tieren, wobei sehr hohe CRP Konzentrationen, wie sie oft im Falle von bakteriellen Infektionen auftreten, für beide Auswertestrategien nicht mehr im Arbeitsbereich lagen. Zukünftig ist es jedoch denkbar, dass über eine zeitlich höher aufgelöste CRP Detektion, z.B. bei einem average Wert von 1, eine korrekte Auswertung der Signalanfangssteigung durchgeführt werden kann und somit eine Quantifizierung auch höherer CRP Konzentrationen möglich sein wird.

Für die orts aufgelöste Detektion an zwei Messpositionen, wurde ein neuer Aufbau bestehend aus einem 1-lambda-Reflektometrie Detektionsmodul und einem steuerbaren x-y-Tisch realisiert. Auch der Multi-Analyt-Aufbau konnte bei Variation des Abstandes zwischen Transducer und Detektor, was aufgrund der mechanischen Verschiebung des Transducers während der Messung auftreten könnte, als robust befunden werden. Des Weiteren wurden für den neuen Aufbau unterschiedliche Flusszellegeometrien in Kombination mit verschiedenen Fließgeschwindigkeiten im Hinblick auf die Signaldynamik untersucht und dabei festgestellt, dass eine Flusszelle mit einem 1 mm breiten Flusskanal kombiniert mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5  $\mu\text{L/s}$  zu den größten Signaländerungen führt und somit vorteilhaft für die hier angestrebte

---

Anwendung ist. Störende Reflektivitäten oder Streulicht aufgrund der Transparenz der verwendeten Flusszelle konnten durch einen Signalvergleich bei Einsatz einer nicht transparenten Flusszelle ausgeschlossen werden. Abschließend konnte die Eignung der Flusszelle für Multi-Analyt-Messungen bestätigt werden, da trotz flächiger Beschichtung des Transducers mit Antigenen, keine Verarmungseffekte entlang des Flusskanals beobachtet werden konnten.

Nach diesen Voruntersuchungen konnten die Assays für den Nachweis von Salmonellenantikörpern und CRP nach erfolgreicher Harmonisierung der Assaybedingungen auf den Multi-Analyt-Aufbau übertragen werden. Unspezifische Wechselwirkungen der Analyte mit Oberflächenstrukturen konnten ausgeschlossen und somit eine Kalibrierung für die Bestimmung beider Analyte aus einer Probe erfolgreich durchgeführt werden. Bei Vergleich der Kalibrierkurven und deren Kenngrößen mit denen der Einzel-Analyt-Messungen, konnte tendenziell sogar eine etwas höhere Empfindlichkeit und Sensitivität für die Zwei-Analyt-Kalibrierung festgestellt werden. Wiederfindungsraten zeigten hingegen größere Standardabweichungen als bei Ein-Analyt-Messungen, was auf eine schlechtere inter-Chip Reproduzierbarkeit zurückgeführt werden kann, die vermutlich aufgrund der relativ aufwändigen Oberflächenpräparation vorliegt. Hier könnte zukünftig durch den Einsatz eines automatischen Mikrodosiersystems anstelle des Auftropfens der Reagenzien per Pipette die Chipreproduzierbarkeit eventuell weiter erhöht werden. Dadurch könnten außerdem deutlich kleinere Beschichtungsbereiche realisiert werden, sodass auf dem Transducer weitere Erkennungsstrukturen aufgebracht werden könnten, ohne dass die hierfür benötigten Reagenzien während der Beschichtung ineinander laufen. So könnte z.B. bei Immobilisierung von vier verschiedenen Erkennungsstrukturen die Analysezeit im Vergleich zur einzelnen Bestimmung der vier Parameter unter Einsatz der Multi-Analyt-Plattform auf ein Viertel reduziert werden. Allerdings gilt es zu beachten, dass mit jedem hinzugefügten Parameter die zeitliche Auflösung aufgrund eines zusätzlichen Positionierungsvorganges schlechter wird und der Anzahl an Parametern daher bei Verwendung nur eines Detektionsmoduls Grenzen gesetzt sind. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Aneinanderreihung mehrerer Detektionsmodule und dem Verzicht auf den Positionierungsvorgang. Dies wäre laut Gerätehersteller innerhalb der x-y-Verschiebeeinheit als Option möglich. Mit jedem hinzugefügten Parameter steigen in diesem Fall jedoch, unter Berücksichtigung der Gerätekosten bei der Durchführung von Messungen die Kosten pro Test enorm an und es muss abgewogen werden, ob für eine bessere zeitliche Auflösung der Wechselwirkungsprozesse bzw. für die gleichzeitige Detektion von mehreren Parametern höhere Anschaffungskosten gerechtfertigt sind.

Bei der Untersuchung von Realseren mit diesem neuartigen Aufbau hat sich gezeigt, dass Hühnerserum zu deutlich größeren Signaländerungen führt als Schweineserum und dass trotz des

eingeführten Blockierungsschrittes mit Rinderserum sowie der verwendeten Verdünnung der Seren, weiterhin unspezifische Wechselwirkung im Bindungssignal auftritt, was eine Diskriminierung zwischen schwach positiven und negativen Seren erschweren kann. Ein Blockierungsschritt mit der jeweiligen Probenmatrix anstelle von Rinderserum könnte dieses Problem beheben, allerdings liegen wohl definierte Negativseren oftmals nicht für alle Tierarten in unbegrenztem Ausmaß vor. Dennoch konnte demonstriert werden, dass eine Diskriminierung zwischen Antikörper-positiven und –negativen Seren sowohl bei Hühner- als auch bei Schweineseren möglich ist und darüber hinaus eine Klassifizierung in zwei unterschiedliche Salmonellenserovare innerhalb einer Messung erfolgreich durchgeführt werden konnte. Somit kann die prinzipielle Eignung des in dieser Arbeit neu entwickelten Multi-Analyt-Aufbaus für den Einsatz in der Veterinärdiagnostik abschließend positiv beantwortet werden.

Im Rahmen der Voruntersuchungen auf dem Transducermaterial Galliumarsenid konnte die erfolgreiche Präparation der sensitiven Schicht für den Nachweis von Salmonellenantikörpern anhand von ellipsometrischen Messungen und Kontaktwinkelbestimmungen bestätigt werden. Für die Untersuchung der Wechselwirkung der sensitiven Schicht mit Salmonellenantikörpern wurde der klassische Aufbau der RfS modifiziert, wodurch die Detektion von biomolekularen Wechselwirkungen auf diesem nicht transparenten Transducermaterial möglich wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Reflektometrische Interferenzspektroskopie durchaus das Potential besitzt, zukünftig auch im infraroten Spektralbereich eingesetzt werden zu können. Unter Auswertung der Spektren bei einer geeigneten Wellenlänge konnten die Spezifität der Wechselwirkung auf Galliumarsenid bestätigt und konzentrationsabhängige, reproduzierbare Bindungssignale erhalten werden. Daher kann Galliumarsenid zukünftig als Transducermaterial prinzipiell in Biosensoren eingesetzt werden, ohne dass die darauf befindliche sensitive Schicht aufgrund der wässrigen Umgebung bzw. durch fluidische Effekte [Arudra, et al., 2012; Kirchner, et al., 2002] oder aufgrund von Lichteinwirkung [Yang, et al., 2003] abgetragen wird. In Abhängigkeit des nachzuweisenden Analyten müssen jedoch die Oberflächenpräparation sowie die Assaybedingungen stets neu angepasst und auf ihre Eignung hin untersucht werden.

---

## 6 LITERATUR

- [Alexander und Rietschel, 2001] C. Alexander und E. T. Rietschel, *Journal of Endotoxin Research*, Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, 2001, **7**, 167-202.
- [Alt, et al., 1987] F. W. Alt, T. K. Blackwell, G. D. Yancopoulos, *Science*, Development of the primary antibody repertoire, 1987, **238**, 1079-1087.
- [Anders und Eichinger, 1965] H. Anders und R. Eichinger, *Appl. Opt.*, Optical properties and practical uses of inhomogeneous thin films, 1965, **4**, 899-905.
- [Arudra, et al., 2012] P. Arudra, G. M. Marshall, N. Liu, J. J. Dubowski, *The Journal of Physical Chemistry C*, Enhanced Photonic Stability of GaAs in Aqueous Electrolyte Using Alkanethiol Self-Assembled Monolayers and Postprocessing with Ammonium Sulfide, 2012, **116**, 2891-2895.
- [Atkins, 2013] P. W. D. P. J. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, Bergstr, 2013.
- [Azzam und Bashara, 1977] R. M. A. Azzam und N. M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light*, North-Holland, 1977.
- [Bailey, et al., 1987] M. P. Bailey, B. F. Rocks, C. Riley, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, On the use of fluorescent labels in immunoassay, 1987, **5**, 649-658.
- [Bleher, et al., 2013] O. Bleher, A. Schindler, M.-X. Yin, A. B. Holmes, P. B. Lupp, G. Gauglitz, G. Proll, *Anal. Bioanal. Chem.*, Development of a new parallelized, optical biosensor platform for label-free detection of autoimmunity-related antibodies, 2013, Ahead of Print.
- [Brecht, 1993] A. Brecht, Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen, Dissertation, 1993.
- [Brecht und Gauglitz, 1994] A. Brecht und G. Gauglitz, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, Optimized layer systems for immunosensors based on the RIFS transducer, 1994, **349**, 360-366.
- [Brecht, et al., 1992a] A. Brecht, G. Gauglitz, W. Nahm, *Analisis*, Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors, 1992a, **20**, 135-140.
- [Brecht, et al., 1992b] A. Brecht, J. Ingenhoff, G. Gauglitz, *Sens. Actuators, B*, Direct monitoring of antigen-antibody interactions by spectra interferometry, 1992b, **6**, 96-100.
- [Busse, et al., 2001] S. Busse, M. DePaoli, G. Wenz, S. Mittler, *Sensors and Actuators B: Chemical*, An integrated optical Mach-Zehnder interferometer functionalized by  $\beta$ -cyclodextrin to monitor binding reactions, 2001, **80**, 116-124.
- [Campbell, et al., 1985] R. L. Campbell, D. B. Wagner, J. P. O'Connell, Solid phase immunoassay with visual readout, 1985, **EP154749A1**, 37 pp.
- [Clyne und Olshaker, 1999] B. Clyne und J. S. Olshaker, *J Emerg Med*, The C-reactive protein, 1999, **17**, 1019-1025.
- [Cohen und Porter, 1964] S. Cohen und R. B. Porter, *Adv Immunol*, Structure and biological activity of immunoglobulins, 1964, **27**, 287-349.
- [Darai, 2012] G. Darai, *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen : Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012.
- [DIN-32645, 2008] DIN-32645, *DIN Deutsches Institut für Normung e. V.*, Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung 2008, **2008-11**.

- [Dudley, et al., 1985] R. A. Dudley, P. Edwards, R. P. Ekins, D. J. Finney, I. G. McKenzie, G. M. Raab, D. Rodbard, R. P. Rodgers, *Clin Chem*, Guidelines for immunoassay data processing, 1985, **31**, 1264-1271.
- [Eddowes, 1987] M. J. Eddowes, *Biosensors*, Direct immunochemical sensing: basic chemical principles and fundamental limitations, 1987, **3**, 1-15.
- [Engvall und Perlmann, 1971] E. Engvall und P. Perlmann, *Immunochemistry*, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, 1971, **8**, 871-874.
- [Ewald, 2009] M. Ewald, Entwicklung und Charakterisierung eines Sensors zum Nachweis von Salmonelleninfektionen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Diplomarbeit, Tübingen, 2009.
- [Ewald, et al., 2012] M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, *GIT Labor-Fachzeitschrift*, Sensoren in der Veterinärmedizin - Kostendruck als treibende Kraft für Innovation, 2012, Vol. 56, No. 58 (2012), p. 2596-2598.
- [Ewald, et al., 2013] M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, G. Proll, *Anal. Bioanal. Chem.*, A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera, 2013, **405**, 6461-6469.
- [Fagraeus, 1947] A. Fagraeus, *Nature*, Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro, 1947, **159**, 499.
- [Faulstich, et al., 2008] K. Faulstich, K. Haberstroh, R. Gruler, M. Eberhard, T. Wiest, D. Lentzsch, Handheld and portable test systems for immunodiagnostics, nucleic acid detection and more, 2008.
- [Feng, et al., 2003] J. Feng, G. Shan, A. Maquieira, M. E. Koivunen, B. Guo, B. D. Hammock, I. M. Kennedy, *Anal. Chem.*, Functionalized europium oxide nanoparticles used as a fluorescent label in an immunoassay for atrazine, 2003, **75**, 5282-5286.
- [Fersht, 1987] A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci. (Pers. Ed.)*, The hydrogen bond in molecular recognition, 1987, **12**, 301-304.
- [Fischer, 1894] E. Fischer, *Ber.*, Influence of configuration on the action of enzymes, 1894, **27**, 2985-2993.
- [Frank, 2005] R. Frank, Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik, Dissertation, Tübingen, 2005.
- [Galfre, et al., 1977] G. Galfre, S. C. Howe, C. Milstein, G. W. Butcher, J. C. Howard, *Nature (London)*, Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, 1977, **266**, 550-552.
- [Gauglitz, et al., 1993] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm, *Sens. Actuators, B*, Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, 1993, **11**, 21-27.
- [Goepel und Ziegler, 1994] W. Goepel und C. Ziegler, *Structure of Matter: Foundations, Microscopy and Spectroscopy*, Teubner, 1994.
- [Grimont und Weill, 2007] P. A. Grimont und F.-X. Weill, *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France*, Antigenic formulae of the Salmonella serovars, 2007.
- [Guibourdenche, et al., 2010] M. Guibourdenche, P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemuhl, P. A. D. Grimont, F.-X. Weill, *Res Microbiol*, Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme, 2010, **161**, 26-29.



- 
- [Hahn, 2009] H. Hahn, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer, Heidelberg, 2009.
- [Hedlund, 1947] P. E. R. Hedlund, *Acta Medica Scandinavica*, The appearance of acute phase protein in various diseases, 1947, **128**, 579-601.
- [Hehl, 1998] K. Hehl, Untersuchung dünner polymerer Filme und deren Wechselwirkung mit Analyten mit spektraler Ellipsometrie, Dissertation, Tübingen, 1998.
- [Heller und Feldman, 2010] A. Heller und B. Feldman, *Acc. Chem. Res.*, Electrochemistry in Diabetes Management, 2010, **43**, 963-973.
- [Jönsson, et al., 1991] U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Roos, I. Rönnerberg, *BioTechniques*, Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology, 1991, **11**, 620-627.
- [Kabat, 1968] E. A. Kabat, *Structural concepts in immunology and immunochemistry*, Holt, Rinehart & Winston, New York [usw.], 1968.
- [Kauffmann, 1941] F. Kauffmann, *Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe: (Typhus-Paratyphus-Enteritis-Gruppe)*, Munksgaard, Kopenhagen, 1941.
- [Kauzmann, 1959] W. Kauzmann, *Advances in Protein Chem.* (C. B. Anfinsen, M. L. Anson, Kenneth Bailey, and John T. Edsall, editors, Academic Press Inc.), Some factors in the interpretation of protein denaturation, 1959, **14**, 1-63.
- [Kirchner, et al., 2002] C. Kirchner, M. George, B. Stein, W. J. Parak, H. E. Gaub, M. Seitz, *Advanced Functional Materials*, Corrosion Protection and Long-Term Chemical Functionalization of Gallium Arsenide in an Aqueous Environment, 2002, **12**, 266-276.
- [Kohler und Milstein, 1975] G. Kohler und C. Milstein, *Nature*, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, 1975, **256**, 495-497.
- [Köhler und Ansorg, 2001] W. Köhler und R. Ansorg, *Medizinische Mikrobiologie*, Urban & Fischer, München, 2001.
- [Koshland, 1958] D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis, 1958, **44**, 98-105.
- [Kraus, 1993] G. Kraus, Reflektometrisch-interferometrische Bestimmung organischer Verbindungen, Dissertation, Tübingen, 1993.
- [Kraus und Gauglitz, 1992] G. Kraus und G. Gauglitz, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, Application and comparison of algorithms for the evaluation of interferograms, 1992, **344**, 153-157.
- [Kumpf, 2005] M. Kumpf, Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) im elektrophoretischen Fluss, Dissertation, Tübingen, 2005.
- [Le Minor und Popoff, 1987] L. Le Minor und M. Y. Popoff, *International journal of systematic bacteriology*, Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion, 1987, **37**, 465-468.
- [Leidner, et al., 2013] L. Leidner, M. Ewald, M. Sieger, B. Mizaikoff, G. Gauglitz, Migrating the Mach-Zehnder chemical and bio-sensor to the mid-infrared region, 2013.
- [Leidner und Gauglitz, 2011] L. Leidner und G. Gauglitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Development of a modified grating coupler in application to geosciences, 2011, **400**, 2783-2791.

- [Leyman, et al., 2011] B. Leyman, F. Boyen, A. Van Parys, E. Verbrugghe, F. Haesebrouck, F. Pasmans, *Vaccine*, Salmonella Typhimurium LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs, 2011, **29**, 3679-3685.
- [Luppa, et al., 2011] P. B. Luppa, C. Mueller, A. Schlichtiger, H. Schlebusch, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives, 2011, **30**, 887-898.
- [Markovic, 2008] G. Markovic, Einsatz von Nanopartikeln und optimierten Schichtsystemen für die Signalverstärkung in reflektometrischen Biosensoren, Dissertation, Tübingen, 2008.
- [Modrow, 2010] S. Modrow, *Molekulare Virologie*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 2010.
- [Mutschler, 2004] T. Mutschler, Charakterisierung bio- und chemosensitiver Schichten mit Ellipsometrie und AFM, Dissertation, Tübingen, 2004.
- [Nopper, 2000] D. C. Nopper, Charakterisierung neuartiger sensitiver Materialien für optische Sensoren in flüssiger Phase, Dissertation, Tübingen, 2000.
- [O'Connell, et al., 1993] M. A. O'Connell, B. A. Belanger, P. D. Haaland, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Calibration and assay development using the four-parameter logistic model, 1993, **20**, 97-114.
- [Piehler, et al., 1996] J. Piehler, A. Brecht, K. E. Geckeler, G. Gauglitz, *Biosensors and Bioelectronics*, Surface modification for direct immunoprobes, 1996, **11**, 579-590.
- [Piehler, et al., 1997] J. Piehler, A. Brecht, T. Giersch, B. Hock, G. Gauglitz, *J. Immunol. Methods*, Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, 1997, **201**, 189-206.
- [Piehler, et al., 1999] J. Piehler, A. Brecht, K. Hehl, G. Gauglitz, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Protein interactions in covalently attached dextran layers, 1999, **13**, 325-336.
- [Piehler, et al., 2000] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Biosensors and Bioelectronics*, A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces, 2000, **15**, 473-481.
- [Proell, et al., 2005] F. Proell, B. Moehrle, M. Kumpf, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, Label-free characterization of oligonucleotide hybridization using reflectometric interference spectroscopy, 2005, **382**, 1889-1894.
- [Pröll, 2010] F. Pröll, iRlFS-imaging Reflectometric Interference Sensor : ein System für die hochparallele und markierungsfreie Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen, Dissertation, Tübingen, 2010.
- [Proll, et al., 2007] G. Proll, L. Steinle, F. Pröll, M. Kumpf, B. Moehrle, M. Mehlmann, G. Gauglitz, *Journal of Chromatography A*, Potential of label-free detection in high-content-screening applications, 2007, **1161**, 2-8.
- [Raven, et al., 2006] P. H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn, *Biologie der Pflanzen*, de Gruyter, Berlin [u.a.], 2006.
- [Reeves, et al., 1989] M. W. Reeves, G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, J. J. Farmer, III, *J. Clin. Microbiol.*, Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other Salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella bongori comb. nov, 1989, **27**, 313-320.

- 
- [Rietschel und Brade, 1987] E. T. Rietschel und H. Brade, *Infection*, [Lipopolysaccharides, endotoxins and O-antigens of gram-negative bacteria: chemical structure, biologic effect and serologic properties], 1987, **15 Suppl 2**, S76-84.
- [Robert Koch-Institut, 2013] Robert Koch-Institut, *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2012*, Robert Koch-Institut, Berlin, 2013.
- [Schütt, 2011] C. Schütt, Bröker, Barbara, *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011.
- [Solem, et al., 1995] E. Solem, H. Ghafari, A. Zarrouk, *Laboratoriumsmedizin*, Gastroenteritis and infection markers. Significant increase of C-reactive protein in salmonellosis, 1995, **19**, 380-383.
- [Striebel, 1994] C. Striebel, Charakterisierung von biologischen Schichtsystemen mit spektraler Ellipsometrie und Oberflächenplasmonenresonanz, Dissertation, Tübingen, 1994.
- [Stuart und Whicher, 1988] J. Stuart und J. T. Whicher, *Arch Dis Child*, Tests for detecting and monitoring the acute phase response, 1988, **63**, 115-117.
- [Szabó, et al., 2008] I. Szabó, K. Scherer, U. Roesler, B. Appel, K. Nöckler, A. Hensel, *International Journal of Food Microbiology*, Comparative examination and validation of ELISA test systems for Salmonella typhimurium diagnosis of slaughtering pigs, 2008, **124**, 65-69.
- [Voller, et al., 1978] A. Voller, A. Bartlett, D. E. Bidwell, *J. Clin. Pathol.*, Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques, 1978, **31**, 507-520.
- [Wescott und Klibanov, 1994] C. R. Wescott und A. M. Klibanov, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, The solvent dependence of enzyme specificity, 1994, **1206**, 1-9.
- [Westphal, et al., 2003] G. Westphal, G. Gerber, B. Lipke, *Proteine : nutritive und funktionelle Eigenschaften; mit 67 Tab*, Springer, Berlin, 2003.
- [White, 1926] P. B. White, *Analyst*, Medical Research Council. Further studies of the Salmonella Group, 1926, **51**, 632-633.
- [Wide und Porath, 1966] L. Wide und J. Porath, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies, 1966, **130**, 257-260.
- [Wild, 2005] D. Wild, *The immunoassay handbook*, Elsevier, Amsterdam [u.a.], 2005.
- [Yang, et al., 2003] G. H. Yang, Y. Zhang, E. T. Kang, K. G. Neoh, *The Journal of Physical Chemistry B*, Deposition of Ultrathin Fluoropolymer Films on Si(100) and GaAs(100) Surfaces by RF Magnetron Sputtering of Poly(tetrafluoroethylene-co-hexafluoropropylene), 2003, **107**, 2780-2787.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungen

<b>AK</b>	Antikörper
<b>AMD</b>	Aminodextran
<b>anti-CRP</b>	Antikörper gegen C-reaktives Protein
<b>anti-LPS</b>	Antikörper gegen <i>Salmonella</i> Lipopolysaccharide
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
<b>CCD</b>	Ladungsgekoppeltes Bauteil (charged coupled device)
<b>CDR</b>	Antigenbindungsstelle (complementarity determining region)
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>DIC</b>	N,N' -Diisopropylcarbodiimid
<b>DMF</b>	N,N-Dimethylformamid
<b>DS</b>	Decansäure
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>FBS</b>	Rinderserum (fetal bovine serum)
<b>GA</b>	Glutarsäureanhydrid
<b>GdnHCl</b>	Guanidinhydrochlorid
<b>GOPTS</b>	(3-Glycidylxypropyl)trimethoxysilan
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>iRIFS</b>	imaging Reflectometric Interference Sensor
<b>LED</b>	Leuchtdiode (light emitting diode)
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MDC</b>	Nachweisgrenze (minimum detectable concentration)
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid

---

<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
<b>PDMS</b>	Polydimethylsiloxan
<b>PMMA</b>	Polymethylmethacrylat
<b>RDL</b>	Bestimmungsgrenze (reliable detection limit)
<b>Reg</b>	Regeneration
<b>RfS</b>	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
<b>SPR</b>	Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance)

## 7.2 Veröffentlichungen

### 7.2.1 Publikationen

- P. Fechner, O. Bleher, M. Ewald, K. Freudenberger, D. Furin, U. Hilbig, F. Kolarov, K. Krieg, L. Leidner, G. Markovic, G. Proll, F. Proell, S. Rau, J. Riedt, B. Schwarz, P. Weber, J. Widmaier, *Anal. Bioanal. Chem.*, Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction, 2014, doi: 10.1007/s00216-014-7834-4
- M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, G. Proll, *Anal. Bioanal. Chem.*, A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera, 2013, **405**, 6461-6469
- L. Leidner, M. Ewald, M. Sieger, B. Mizaikoff, G. Gauglitz, *Proc. SPIE*, Migrating the Mach-Zehnder chemical and bio-sensor to the mid-infrared region, 2013, **8774**, 87740S/87741-87740S/87715
- M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, *GIT Labor-Fachz.*, Sensors in veterinary diagnostics. Cost pressure as a driving force for innovation, 2012, **56**, 596-597
- M. Ewald, A. F. Le Blanc, V. Frimmer, G. Gauglitz, Eine neue Biosensor Plattform für den Einsatz in der Tierdiagnostik, *Dresdner Beiträge zur Sensorik*, 2011, **43**, 27-30
- A. F. Le Blanc, M. Ewald, G. Proll, J. Sindlinger, G. Gauglitz, *GIT Labor-Fachz.*, Reflectometric interference spectroscopy- A review on reflectometric interference spectroscopy with antibody immobilization in animal diagnostics, 2010, **54**, 90-93

### 7.2.2 Sonstige Publikationen

- M. Ewald und O. Bleher, *Anal Bioanal Chem*, Label-free technologies 2012: advances and applications, 2013, **405**, 2091-2092
- K. Krieg, M. Ewald, B. Schwarz, *Anal Bioanal Chem*, Europt(r)ode XI--11th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors in Barcelona, Spain, 2012, **404**, 9-10

- M. Ewald und B. Schwarz, *Anal Bioanal Chem*, 10th Dresdner Sensor-Symposium--an anniversary to celebrate, 2012, **403**, 389-390
- K. Krieg, S. Rau, O. Bleher, F. Kolarov, M. Ewald, *Anal Bioanal Chem*, Eighth advanced study course on optical chemical sensors--ASCOS, 2011, **401**, 3037-3038
- O. Bleher, M. Ewald, F. Kolarov, A. K. Krieg, A. F. Le Blanc, S. Rau, *Anal. Bioanal. Chem.*, ANAKON 2011 - German thoroughness meets Swiss precision, 2011, **401**, 871-872.
- K. Krieg, D. Furin, C. Albrecht, F. Kolarov, M. Ewald, *Anal. Bioanal. Chem.*, Europt(r)ode X : Tenth European conference on optical chemical sensors and biosensors, 2010, **398**, 1863-1864

### 7.2.3 Vorträge

- M. Ewald, Entwicklung und Charakterisierung einer portablen Sensorplattform zur Multi-Analyt-Bestimmung in der Veterinärmedizin, Institutskolloquium Physikalische und Theoretische Chemie, 12. Februar 2014, Tübingen, Deutschland
- M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, Label-free detection of infectious diseases and diagnostic markers in veterinary medicine, analytica Conference, 17.-20. April 2012, München, Deutschland
- M. Ewald, A. F. Le Blanc, V. Frimmer, G. Gauglitz, Eine neue Biosensor Plattform für den Einsatz in der Tierdiagnostik, 10. Dresdner Sensor-Symposium, 5.-7. Dezember 2011, Dresden, Deutschland
- M. Ewald, A.F. Le Blanc, G. Gauglitz, Nachweis von Parametern in der Veterinärmedizin mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, 4. Interdisziplinäres Doktoranden-seminar Attendorn, 21.-23. Februar 2010, Attendorn, Deutschland

### 7.2.4 Poster

- M. Ewald, G. Gauglitz, A label-free biosensor platform for multi-analyte detection, analytica Conference, 1.-3. April 2014, München, Deutschland
- M. Ewald, L. Leidner, G. Gauglitz, Etablierung eines Bioassays auf Galliumarsenid zur Identifizierung von Bakterien im MIR-Mach-Zehnder-Interferometer, GDCh-Wissenschaftsforum Chemie, 1.-4. September 2013, Darmstadt, Deutschland
- M. Ewald, L. Leidner, G. Gauglitz, „Biofunktionalisierung und Nanostrukturierung von GaAs für den Einsatz im MIR-Mach-Zehnder-Interferometer“, Forschungstag Hochtechnologie-forschung, 11. Juli 2013, Stuttgart, Deutschland
- M. Ewald, L. Leidner, G. Gauglitz, Oberflächenmodifizierung von GaAs für den Einsatz im MIR-Mach-Zehnder-Interferometer, ANAKON 2013, 4.-7. März 2013, Essen, Deutschland
- M. Sieger, X. Wang, L. Leidner, M. Ewald, G. Gauglitz, B. Mizaikoff, On-Chip Integrated Mid-Infrared GaAs/AlGaAs Mach-Zehnder Interferometer", Symposium Trends in Nanoscience, 24.-28. Februar 2013, Irsee, Deutschland
- M. Ewald, G. Gauglitz, A portable biosensor for multi-analyte detection, Label-Free Technologies: Advances and Applications, 1.-3. November 2012, Amsterdam, Niederlande
- M. Ewald, G. Gauglitz, A portable biosensor for multi-parameter detection, Europt(r)ode XI, 1.-4. April 2012, Barcelona, Spanien

- 
- M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, A portable biosensor platform for veterinary diagnostics, EUROanalysis, 11.-15. September 2011, Belgrad, Serbien
  - M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, Entwicklung eines tragbaren optischen Sensorsystems für die Tierdiagnostik, Sensor und Test, 7.-9. Juni 2011, Nürnberg, Deutschland
  - M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, Nachweis veterinärdiagnostisch relevanter Parameter mittels 1- $\lambda$ -RfS, *Posterpreis*, ANAKON, 22.-25. März 2011, Zürich, Schweiz
  - M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, A new miniaturized platform for veterinary diagnostics, EuCheMS Chemistry Congress, 29. August-2. September 2010, Nürnberg, Deutschland
  - M. Ewald, A. F. Le Blanc, G. Gauglitz, A new miniaturized platform for veterinary diagnostics, Europt(r)ode X, 28.-31. März 2010, Prag, Tschechien

### **7.3 Akademische Lehrer**

Prof. Dr. Klaus Albert, Prof. Dr. Thomas Chassé, Prof. Dr. Dines Christen, Prof. Dr. Heiner Eckstein, Prof. Dr. Günter Gauglitz, Prof. Dr. Jörg Ihringer, Prof. Dr. Walter Jäger, Prof. Dr. Norbert Kuhn, PD Dr. Hans-Georg Mack, Prof. Dr. Hermann A. Mayer, Prof. Dr. Martin E. Maier, Prof. Dr. Alfred J. Meixner, Prof. Dr. Hans-Jürgen Meyer, Prof. Dr. Ulrich Nagel, Prof. Dr. Heinz Oberhammer, Prof. Dr. Christian Ochsenfeld, PD Dr. Helmut Pommer, Prof. Dr. Volker Schurig, Prof. Dr. Michael Schwarz, Prof. Dr. Eberhard Schweda, Prof. Dr. Bernd Speiser, Prof. Dr. Vlada B. Urlacher, Prof. Dr. Udo Weimar, Prof. Dr. Lars Wesemann, Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller, Prof. Dr. Thomas Ziegler

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Melanie Ewald
Geburtsdatum und -ort	06.10.1984, Heilbronn-Neckargartach

### Ausbildung:

1991 – 1995	Elly-Heuss-Knapp-Grundschule, Heilbronn
1995 – 2004	Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium, Heilbronn
06/2004	Allgemeine Hochschulreife
2004-2009	Studium der Chemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Schwerpunktfach Synthesechemie Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Gauglitz am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen Titel: „Entwicklung und Charakterisierung eines Sensors zum Nachweis von Salmonelleninfektionen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie“
12/2009	Diplom im Fach Chemie
seit 01/2010	Doktorarbeit im Fach Chemie unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Gauglitz am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen