

Ein Messaufbau zur Detektion homogener Immunoassays mittels laserinduzierter Fluoreszenz

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Urs Hilbig

aus Nürtingen

Tübingen

2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 06.02.2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Weimar

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mir das Verfassen dieser Dissertation durch ihre Hilfe und Unterstützung ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gauglitz, meinem Doktorvater und Erstgutachter. Ich möchte Ihm dafür danken, mir das interessante Thema und Projekt zur Bearbeitung überlassen zu haben. Die sehr gute Betreuung und das allzeit offene Ohr, sowie die Möglichkeit Projekttreffen, nationale und internationale Konferenzen zu besuchen haben mich in dieser Zeit viel Lernen lassen.

Herrn Prof. Dr. Udo Weimar danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die gute Nachbarschaft während meiner Zeit im VG. Außerdem gilt mein Dank dem AK Weimar für die Hilfe und gute Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe Professor Gauglitz möchte ich für die schöne Zeit im „AK“ danken. Patricia Weber für ihre Hilfsbereitschaft und die lustige Büronachbarschaft. Sabrina Rau für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und die schönen Dienstreisen u.a. nach Blaubeuren. Dominik Furin für die gemeinsame Admin Zeit. Johannes Riedt für die vielen technischen Fachsimpeln und die allzeit unkomplizierte Hilfe bei Verwaltungsfragen. Constanze Keck für die vielen Messungen und das entspannte Arbeiten und Fachsimpeln im Labor. Daniel Sydes für die schönen Radtouren mit und ohne Fachgespräche. Marina Schmid für die gute Zeit im AK und beim „SportIn“. Goran Marcovic für die Anfangszeit im AK und die schöne Zeit in der Neckarhalde. Oliver Bleher und Alexander Le Blanc für Tipps und Tricks. Besonderer Dank gilt Marcel Berner vom Projektpartner IPV Stuttgart für die unzähligen Messsessions, WhatsApp Nachrichten und das spannende Forschen bis spät in die Nacht. Felix Waßmer und Julian Vogler für die Hilfe im Labor. Kathrin Freudenberger für die gute und ausdauernde gemeinsame Arbeit am Projekt NANODEM.

Carolin Huhn für die gute Nachbarschaft und gute Zusammenarbeit beim Klausurstellen. Meinen AK Kollegen Johanna Hutterer und Lothar Leidner für die schöne Zeit im AK.

Den Projektpartnern INESC-MN für die Siliziumwafer, mfcs für die Doppelklebebandzuschnitte und USTUTT für die Messphotodioden und viele andere Teile des LIF-Messaufbaus. Allen Projektpartnern, im speziellen dem Projektkoordinator Francesco Baldini und seinem AK für die stets unkomplizierte Zusammenarbeit. Den Firmen 3M, Zeonex und Reichelt Chemietechnik für die großzügigen Materialproben. Frau Dagmar Thumm vom NMI für die kompetente Unterstützung bei Klebefragen. Der Werkstatt der physikalischen und theoretischen Chemie, im speziellen Herrn Schaupp und Herrn Schnapper.

Meinen Eltern für die Unterstützung während all der Zeit.

Für Mareike und Matthis

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Motivation und Zielsetzung	2
2.	Theoretischer Teil	3
2.1.	Optische Grundlagen	3
2.2.	Fluoreszenz Grundlagen	5
2.3.	Der Aufbau von Fluoreszenzspektrometern.....	8
2.4.	RfS Detektionsprinzip.....	9
2.5.	Grundlagen zu Antikörpern	11
2.6.	Immunoassay Detektionsprinzipien	13
2.7.	Unterscheidung von heterogenen und homogenen Immunoassays	15
2.8.	Das Immunsystem, Immunsuppressiva und Therapeutisches Drug Monitoring	20
2.9.	POCT-Geräte	23
2.10.	Das EU-Projekt Nanodem	25
3.	Material und Methoden	26
3.1.	Material.....	26
3.1.1.	Chemikalien, Partikel, Proteine und Antikörper	26
3.1.2.	Geräte	29
3.2.	Methoden	31
3.2.1.	Passivierung der Oberfläche	31
3.2.2.	Ganzflächige Oberflächenpräparation der Signaltransducer	31
3.2.3.	Spotting von definierten Flächen auf Signaltransducern	31
3.2.4.	Oberflächenpräparation der Partikel	45
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	45
4.1.	Der Nanodem LIF-Messaufbau	45
4.2.	Das LIF-Detektionsprinzip	50
4.3.	Auswertung der Messungen.....	51
4.4.	Messaufbau- und Flusszellentwicklung.....	58
4.4.1.	Entwicklung der Flusszelle für einen LIF-Messaufbau	59
4.4.2.	Zusammenbau der entwickelten Flusszelle.....	74
4.4.3.	Entwicklung der Flusszelloberseite.....	74
4.4.4.	Vergleich unterschiedlicher Flusszellwandmaterialien	85
4.4.5.	Vergleich unterschiedlicher Flusszelloböden	89

4.5.	LIF-Messaufbau Optimierung	90
4.5.1.	Allgemeine Optimierungen des LIF-Messaufbaus	90
4.5.2.	Verschiedene Halter für Flusszelle und Detektionseinheit	95
4.5.3.	Vergleich verschiedener Winkel zwischen Laser und Detektor	95
4.5.4.	Vergleich verschiedener Flusszellbreiten	98
4.5.5.	Vergleich verschiedener Messphotodiendimensionen.....	104
4.5.6.	Optimierung der Platzierung der Referenzdiode	110
4.5.7.	Verschiedene Optimierungen an der Optik.....	111
4.6.	Messaufbaucharakterisierung mittels Fluorophormessungen	113
4.7.	Weitere Messaufbaubestandteile	117
4.7.1.	Magnetfallen für magnetische Nanopartikel	117
4.7.2.	Aufbauten zur Homogenisierung von magnetischen Nanopartikeln	123
4.8.	Messungen zum MPA-Immunoassay im LIF-Messaufbau	128
4.8.1.	Charakterisierung der Fluoreszenz Sekundärantikörper	128
4.8.2.	MPA Immunoassaymessungen im LIF-Messaufbau	133
4.8.3.	Heterogene Immunoassaymessungen	133
4.8.3.1.	Detektion von fluoreszierenden Partikeln auf Flusszelloberflächen.....	133
4.8.3.2.	Heterogene Immunoassays auf ganzflächig funktionalisierten Oberflächen	135
4.8.3.3.	Heterogene Immunoassays auf partiell funktionalisierten Oberflächen	140
4.8.4.	Homogene Immunoassaymessungen.....	150
4.8.4.1.	Vergleich LIF-Messaufbau und Fluoreszenzspektrometer	151
4.8.4.2.	Homogene Immunoassays mit großen magnetischen Partikeln.....	155
4.8.4.3.	Messungen mit Sekundärantikörpern und magnetischen Partikeln.....	155
4.8.4.4.	Messungen mit fluoreszierenden und magnetischen Partikeln.....	158
4.8.4.5.	Messungen mit Permanentmagnet an der Flusszelle	159
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	166
6.	Literaturverzeichnis	169
7.	Anhang	174
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	174
8.2.	Akademische Lehrer	175
8.3.	Förderhinweis	175
8.4.	Lebenslauf.....	176
8.5.	Publikationen	176

8.5.1.	Paper	176
8.5.2.	Sonstige Publikationen	177
8.5.3.	Poster	178
8.5.4.	Vorträge	179

1. Einleitung

Eine Organtransplantation ist mit einem sehr hohen logistischen und finanziellen Aufwand verbunden. Es gibt viel weniger Spenderorgane als benötigt werden. Deswegen ist es wichtig, die vorhandenen Organe möglichst effizient für Transplantationen zu nutzen und den Verlust durch eine Fehldosierung von Immunsuppressiva möglichst komplett zu vermeiden. In den ersten Tagen nach einer Transplantation ist der Wirkstoffspiegel der Immunsuppressiva nicht vorhersagbar. Deswegen muss mittels Therapeutischem Drug Monitoring der Wirkstoffspiegel im Patientenblut überwacht werden. Momentan wird das Therapeutische Drug Monitoring durch Zentrallabore der Krankenhäuser betrieben, es werden im Idealfall alle 6 bis 12 Stunden Proben genommen.

Um den klinischen Outcome der Patienten zu Verbessern und Komplikationen zu vermeiden sollen mittels dem im Projekt entwickelten Point-of-Care-Testing (POCT)-Gerät stündliche Messungen am Patientenbett realisiert werden. Sie stellen den Hauptnutzen des Projektes dar. Aus ethischen und ökonomischen Gesichtspunkten darf ein gut funktionierendes Point-of-Care-Testing (POCT)-Gerät durchaus aufwändig und kostenintensiv sein, da es helfen kann, Fehldosierungen und somit Transplantatabstoßungen zu verringern. Im ambulanten Bereich, in dem die langfristige, lebenslange Medikamentenspiegelüberwachung erfolgt, kann es zu größeren zeitlichen Abständen zwischen Probennahme und Messergebnis kommen. Dies würde ein POCT Gerät in Schwerpunktpraxen beheben können.

Im EU geförderten NANODEM Projekt wurde ein miniaturisierbarer Laser-Induzierter-Fluoreszenz (LIF)-Messaufbau erforscht. Als primäres Ziel galt es einen partikelbasierten, homogenen Immunoassay zur Detektion von Immunsuppressiva Konzentrationen, zu erforschen. Dieser soll mit dem Messaufbau detektiert werden können. Den Immunoassay auf magnetischen Partikeln durchzuführen birgt einen entscheidenden Vorteil. Es muss nach einer Messung keine Oberfläche, welche zunehmend an Sensitivität verliert, regeneriert werden. Dies wäre bei herkömmlichen heterogenen Immunoassays der Fall.

Es wurden verschiedene Immunoassayvarianten untersucht und erforscht. Neben dem homogenen Immunoassay im Volumen wurden auch heterogene Immunoassays auf Oberflächen realisiert. Sie ermöglichten den homogenen mit heterogenen Immunoassays zu Vergleichen und zu Charakterisieren. Von den heterogenen Immunoassays wurden zwei Varianten entwickelt: mit ganzflächig funktionalisierten Oberflächen und partiell funktionalisierten Oberflächen durch Spotten.

Die im heterogenen Bereich leicht überlegenen partiell funktionalisierten Oberflächen wurden entwickelt, um Projektpartnern zu helfen und die Möglichkeiten dieser Variante abzuschätzen.

Der Messaufbau wurde so entwickelt, um ohne viel Aufwand in ein miniaturisiertes, einfach zu bedienendes POCT-Gerät übertragen zu werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich detailliert mit der Mikrofluidik und der Erforschung und Charakterisierung einer einfach und preiswert herzustellenden Flusszelle für den LIF-Messaufbau, welche dennoch die optischen und biochemischen Voraussetzungen zur Detektion von Analyten im mikro- bis nanomolaren Nachweisbereich erfüllt.

1.1 Motivation und Zielsetzung

Im LIF-Messaufbau des NANODEM Projektes sollen homogene Immunoassaymessungen auf magnetischen Nanopartikeln durchgeführt werden. Zusätzlich sollen Messungen auf dem Flusszellboden durchgeführt werden können. Dieses Sekundärziel ergab sich während der Forschungsarbeit, um Projektpartner bei der Untersuchung von Regenerations- und Blockreagenzien zu unterstützen und die neu entwickelten homogenen Immunoassays mit den heterogenen im selben Messaufbau vergleichen zu können.

Messaufbau:

In der vorliegenden Dissertation ist es das Ziel, einen innovativen und praxistauglichen LIF-Messaufbau durch die Erforschung und die detaillierte Untersuchung unterschiedlichster Aspekte zu erhalten. Es werden Entwicklungsmöglichkeiten struktureller und operativer Art aufgezeigt, bei denen gezielt in Richtung der optimalen instrumentellen Umsetzung eines LIF-Messaufbaus gearbeitet wurde.

Der LIF-Messaufbau soll die in großen Labormessaufbauten erprobten Methoden zur Anwendung in miniaturisierten Messaufbauten bringen. Dabei wurde ein Entwicklungsschwerpunkt auf die Entwicklung eines POCT-Gerätes gelegt. Der Einsatz und die Erprobung von preiswerten Materialien und Herstellungsmöglichkeiten für die Fluss- oder Messzelle wurden untersucht und eine Flusszelle mit diesen Eigenschaften konstruiert. Ebenso hat eine möglichst einfache Handhabbarkeit des Messaufbaus eine hohe Priorität, mit einer austauschbaren Flusszelle ohne Neujustierung der Optik wurde dieser Rechnung getragen.

In den miniaturisierten Aufbauten sollen ähnliche Nachweisgrenzen wie in den Laboraufbauten erreicht werden. In Laboraufbauten wird meist bezüglich Material und Handhabbarkeit eine teure und nur von Experten bedienbare Variante gewählt, um ein Proof-of-principle bzw. Proof-of-concept des Messverfahrens zu erhalten. Um vom Laboraufbau zu einem miniaturisierten und praxistauglichen LIF-Messaufbau zu gelangen, müssen einige Komponenten neu entwickelt werden. Hierfür wurden die analytischen Rahmenbedingungen des Messaufbaus erforscht, charakterisiert und optimiert, um reproduzierbare und aussagekräftige Messergebnisse zu erhalten. So können zum Beispiel nicht aufeinander abgestimmte Komponenten zu technischen Fehlfunktionen und fehlerhaften Messwerten führen. So kann zum Beispiel eine Überhitzung von zu kompakt gebauten Komponenten zu Fehlmessungen oder Gerätedefekten führen. Des Weiteren können günstigere Materialien, zum Beispiel Kunststoffe in der Fluidik, schneller altern oder mit der Oberflächenchemie des Biosensors inkompatibel sein. Alle Komponenten und Materialien wurden bezüglich der Materialeigenschaften, Störquellen und Temperatur abgestimmt und erst nach intensiven Untersuchungen verwendet.

Homogener Immunoassay:

Der homogene Immunoassay findet nicht auf großflächigen Oberflächen statt, sondern auf magnetischen Partikeln im μm Maßstab. Der große Vorteil des homogenen Immunoassays besteht darin, dass kein Regenerationsschritt benötigt wird und die Partikel und Antikörper für jede Messung neu und hoch sensitiv sind.

Zur Erforschung des neuartigen homogenen Immunoassays mussten die biologischen Interaktionen der Immunoassaybestandteile erforscht und verstanden werden, um anschließend die notwendigen analytischen Rahmenbedingungen zu schaffen. Die Untersuchung der spezifischen Wechselwirkungen und das Vermeiden unspezifischer Wechselwirkungen im LIF Messaufbau waren hierbei Arbeitsschwerpunkte. Die Detektion der Proben im LIF-Messaufbau wurde in vielen Messungen erforscht und an die Gegebenheiten des homogenen Assays angepasst. So wurden verschiedene Auswertemethoden, Magnetfallen und Flusszellen untersucht. In Zusammenarbeit mit Kathrin Freudenberger wurde der homogene Mycophenolsäureimmunoassay erforscht, untersucht und an den LIF Messaufbau angepasst.

Heterogener Immunoassay und Spotting:

Um die Messungen mit dem homogenen Immunoassay vergleichen zu können und Projektpartnern bei der Untersuchung von Regenerations- und Blockreagenzien zu unterstützen wurde ein heterogener Immunoassay auf den Flusszellboden im LIF Messaufbau gespottet. Im Gegensatz zur Funktionalisierung der gesamten Transduceroberfläche bietet das Spotten den Vorteil, dass der heterogene Assay nur über den Photodioden abläuft. Dadurch lassen sich niedrigere Nachweisgrenzen realisieren, da kein Signal vor dem Detektor in der Einlassregion verloren geht, wo sich keine Photodiode befindet. Es kann also die Fluoreszenz genau dort detektiert werden, wo die bei dem Immunoassay beteiligten Fluorophore lokalisiert sind. Dieses Vorgehen kann deutlich besser als eine flächige- oder Onlineimmobilisierung sein. Außerdem kann auch der Analyt bei Bedarf durch diese Vorgehensweise genau an der Stelle angereichert werden, an der er auch später zum Beispiel in einem Sandwich Assay detektiert wird.

2. Theoretischer Teil

2.1. Optische Grundlagen

2.1.1. Licht:

Lichtquellen senden elektromagnetische Wellen aus. Sie werden vom menschlichen Auge als Licht wahrgenommen. Die Energie E des Lichtes lässt sich mittels der Planck'schen Konstante h und der Frequenz ν beschreiben.

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

Das Produkt aus der Frequenz ν und der Wellenlänge λ ist die Lichtgeschwindigkeit c .

$$c = \nu \cdot \lambda \quad (2)$$

Der Brechungsindex n wird durch das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum (c_0) und im Medium (c_m) beschrieben.

$$n = \frac{c_0}{c_m} \quad (3)$$

2.1.2. Snelliussches Brechungsgesetz:

Wird Licht auf eine Phasengrenze zwischen einem optisch dünneren und einem optisch dichteren Medium gestrahlt, so wird ein Teil des Lichtes vom Lot weg gebrochen. Werden die Medien in anderer Reihenfolge durchschienen, wird zum Lot hin gebrochen. Der Brechungswinkel lässt sich gemäß des Snelliusschen Brechungsgesetzes (Gleichung (4)) errechnen. Bei n_1 und n_2 handelt es sich um die Brechungsindizes der beiden Medien. Ist $n_1 < n_2$, so wird zum Lot hin gebrochen. Ist $n_1 > n_2$, so wird vom Lot weg gebrochen. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, wird ein anderer Teil des Lichtes unter dem Winkel β reflektiert.

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{\sin(\gamma)}{\sin(\alpha)} \quad (4)$$

Erreicht der Winkel des eingestrahlt Lichtes den Grenzwinkel α_T , so tritt kein Licht mehr in das andere Medium über, es handelt sich dann um Totalreflektion.

$$\sin \alpha_T = \frac{n_2}{n_1} \quad (5)$$

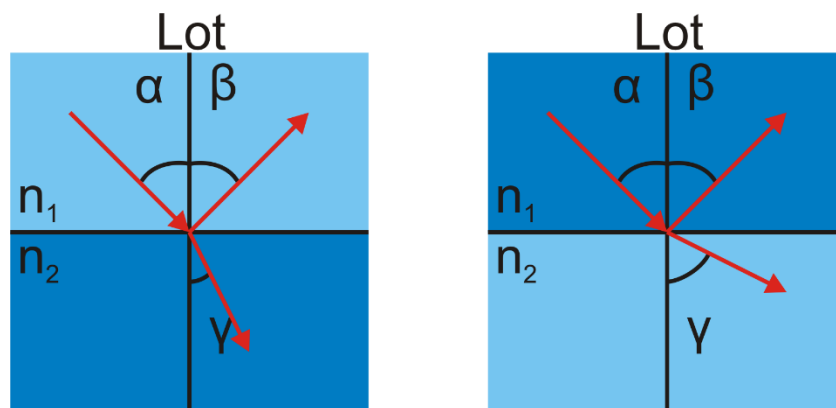


Abbildung 1: Einfallendes Licht trifft mit dem Winkel α auf die Phasengrenze. Ausfallendes Licht ist mit dem Winkel μ dargestellt und reflektiertes Licht mit dem Winkel β . Auf der linken Seite wird das Licht zum Lot hin gebrochen, da es in ein optisch dichteres Medium eindringt. Auf der rechten Seite wird es vom Lot weg gebrochen, da es in ein optisch dünneres Medium eintritt.

Das Snelliussche Brechungsgesetz ist bei der Charakterisierung der Flusszelle des LIF-Messaufbaus in Kapitel 4.4.3 von Bedeutung, da hiermit die Lichtbrechung an den Phasengrenzen exakt berechnet und dadurch vor dem Bau der Prototypen bestimmt werden konnte.

2.1.3. Lambert-Beersches Gesetz:

Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Intensitätsabnahme eines monochromatischen Lichtstrahls beim Durchtritt durch eine Probe mittels der Anfangsintensität I_0 und der Intensität I des heraustretenden Lichts.

Die Intensität dI des Lichtes nimmt proportional der durchstrahlten Schichtdicke dx mal der Intensität $I(x)$ ab. Es lässt sich für eine Wellenlänge folgende Differenzialgleichung aufstellen:

$$-dI(x) = k \cdot I(x) \cdot dx \quad (6)$$

Nach Integration und Variablentrennung zwischen den Grenzen I_0 und I , bzw. 0 und d erhält man:

$$\ln \frac{I_0}{I} = k \cdot d \quad (7)$$

Mit dem dekadischen Logarithmus erhält man für $k' = 0,4342 \cdot k$:

$$\log \frac{I_0}{I} = k' \cdot d \quad (8)$$

Für eine vollständig durchlässige Lösung gilt für die jeweilige betrachtete Wellenlänge:

$$k' = \varepsilon_\lambda \cdot c \quad (9)$$

Die molare Konzentration ist hierbei c und ε_λ der dekadische molare Extinktionskoeffizient. Zusammengefasst ergibt sich damit das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E_\lambda = \log \frac{I_{0(\lambda)}}{I_{(\lambda)}} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (10)$$

Das Lambert-Beersche Gesetz wird zur Auswertung von in dieser Arbeit durchgeführten Absorptionsmessungen im VIS Bereich benötigt und angewendet. Es ist in hinreichend verdünnten Systemen gültig.

2.2. Fluoreszenz Grundlagen

2.2.1. Jablonski Termschema:

Die Bewegungen eines Moleküls im Raum definieren seinen Energiegehalt. Sie bestehen aus Translationsenergie (Bewegungen im Raum), Rotationsenergie (Drehbewegungen), Schwingungsenergie (Schwingung der Atome im Molekül) und Elektronenenergie (Elektronendichteverteilung). Diese große Anzahl von möglichen Energiezuständen eines Moleküls wird in das Jablonski Termschema eingetragen. Zwischen diesen Elektronen-, Schwingungs- und Rotationszuständen sind verschiedene Arten von Übergängen (photophysikalische Prozesse) möglich, die teilweise untereinander konkurrieren. Abgesehen von der Abgabe von Energie mittels elektromagnetischer Strahlung gibt es zahlreiche weitere Prozesse: strahlungslose Desaktivierung und Öffnung von photochemischen Reaktionspfaden.

Die Elektronenzustände werden in verschiedene Schwingungsniveaus aufgeteilt: Singulettzustände (S_0, S_1, \dots, S_n) und Triplettzustände (T_1, T_2, \dots, T_n). Singulettzustände weisen antiparallele Elektronenspins mit einem Spin-Moment von Null und diamagnetische Eigenschaften auf. Triplettzustände weisen parallele Elektronenspins mit einem Spin-Moment ungleich Null und paramagnetische Eigenschaften auf. Das Pauli Verbot besagt, dass ein T_0 Grundzustand nicht existiert, falls keine entarteten Zustände existieren. Bei den

Tripletzuständen muss keine Spinpaarungsenergie aufgebracht werden, deshalb liegen sie energetisch unter den analogen Singulettzuständen.

Die zwischen den beiden Zuständen stattfindenden Übergänge können als photophysikalische Primärprozesse bezeichnet werden. Wird ein Molekül von Licht bestrahlt, wird es schnell (10^{-15} sec) nach Absorption in einen höheren elektronischen und vibronischen Zustand angeregt. Der angeregte vibronische Zustand desaktiviert schnell (10^{-13} bis 10^{-15} sec) und strahlungslos. Ein Wechsel in den ersten Schwingungszustand S_1 ist möglich, falls Wärmeenergie von der Umgebung aufgenommen werden kann. Der S_1 Zustand ist langlebig (10^{-11} bis 10^{-7} sec) und Ausgangspunkt für mehrere konkurrierende Prozesse.

Bei der strahlungslosen Abgabe von Energie (*te*, thermal equilibration, thermische Equilibrierung) wird statt Fluoreszenz oder Phosphoreszenz die Energie des Moleküls strahlungslos abgegeben. Zunächst wechselt das Molekül vom untersten Schwingungszustand des angeregten S_1 Zustandes in einen höheren Schwingungszustand des Grundzustands S_0 mittels innerer Umwandlung (*ic*, internal conversion). Daraufhin wird die Energie schrittweise als Wärme *te* abgegeben, bis der S_0 Elektronengrundzustand erreicht ist.

Definition Absorption:

Absorbiert (*A*) ein Molekül Energie, nimmt es Strahlungsenergie auf und geht vom Grundzustand S_0 in einen Schwingungszustand über.

Definition Fluoreszenz:

Fluoresziert (*F*) ein Molekül, so emittiert es Energie. Zunächst wird strahlungslos Energie an die Umgebung abgegeben, und dadurch der Schwingungsgrundzustand (S_1) erreicht. Dies geschieht mittels thermischer Equilibrierung (*te*). Daraufhin wird der Grundzustand (S_0) unter Strahlungsemission (hier: Fluoreszenz) erreicht.

Fluoreszenz ist ein Begriff für die spontane Emission von Licht. Die Energieabgabe tritt dabei innerhalb von 10^{-7} bis 10^{-10} sec nach Bestrahlung ein. Fluoreszenz unterscheidet sich von Phosphoreszenz durch den Zustand, aus dem heraus sie erfolgt. Bei der Fluoreszenz ist dies der Zustand S_1 , bei der Phosphoreszenz der Zustand T_1 (langlebiger), welcher eigentlich verboten ist. Durch thermische Equilibrierung wird ein Teil der Anregungsenergie umgewandelt, dadurch ist die emittierte Strahlung energieärmer (längerwelliges Licht). Die Stokes'sche Verschiebung bezeichnet diese Differenz. Fluoreszenz wird sowohl bei organischen als auch bei anorganischen Stoffen beobachtet. Nach [3].

Der Wechsel von einem angeregten S_1 Zustand zu einem tiefer liegenden S_0 Zustand ist ein erlaubter Dipolübergang, da die Spinmultiplizität erhalten bleibt. (Übergangszeit: 10^{-10} bis 10^{-7} sec)

Definition Phosphoreszenz:

Die Energieemission mittels Phosphoreszenz Strahlung (*P*) erfolgt von einem Molekül nach Spinumkehr in den Tripletzustand T_1 und vorheriger strahlungsloser Abgabe von Energie. Die Spinumkehr erfolgt Spin Bahn Kopplung. Die Phosphoreszenz wird bei dem Wechsel vom

T_1 in den S_0 Grundzustand ausgesendet, dies geschieht durch einen verbotenen Übergang. Dies geschieht in einem deutlich längeren Zeitrahmen als 10^{-9} sec.

Die Absorptionsbanden weisen im Mittel kürzere Wellenlängen auf als die Emissionsbanden der Fluoreszenz und Phosphoreszenz, da vor der Emission durch strahlungslose Vorgänge Energie verloren geht.

In Abbildung 2 ist das von Jablonski [4] publizierte Termschema dargestellt. Es zeigt die verschiedenen photophysikalischen Prozesse nach der Absorption von Strahlung und dadurch erfolgter Elektronenanregung.

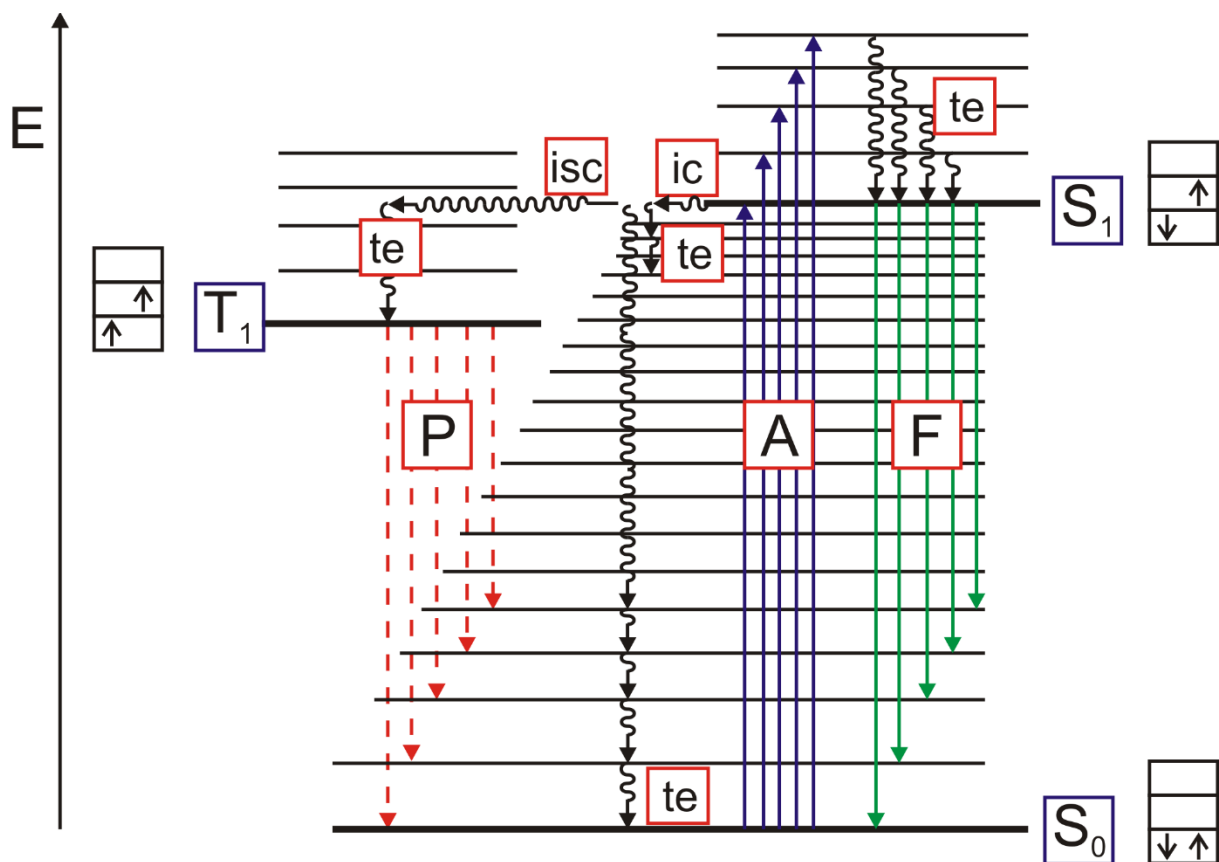


Abbildung 2: Das Jablonski Termschema: Absorption A (blau), Emission: Fluoreszenz F (grün) und Emission: Phosphoreszenz P (rot), thermische Äquibrierung: te (thermal equilibration), innere Umwandlung: ic (internal conversion), Interkombination: isc (intersystem crossing), y-Achse: zunehmende Energie E. In den Kästen mit den Pfeilen (bei S_0 , S_1 und T_1) sind die Elektronenzustände der einzelnen Schwingungsniveaus dargestellt.

In Abbildung 2 sind der Grundzustand S_0 und die angeregten Schwingungsniveaus S_1 und T_1 dargestellt. Die Lage und Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen diesen Energiezuständen sind stark vom Molekül abhängig und für die spektroskopischen Eigenschaften verantwortlich (Absorptions- und Emissionsspektrum des Moleküls). Die Rotationsniveaus sind der Übersichtlichkeit wegen im Diagramm nicht dargestellt, da die Abstände zwischen den Niveaus sehr gering sind. Nach einer Faustregel verhalten sich die Energieabstände zwischen Elektronen-, Schwingungs- und Rotationszuständen wie 10000 : 100 : 1.

2.3. Der Aufbau von Fluoreszenzspektrometern

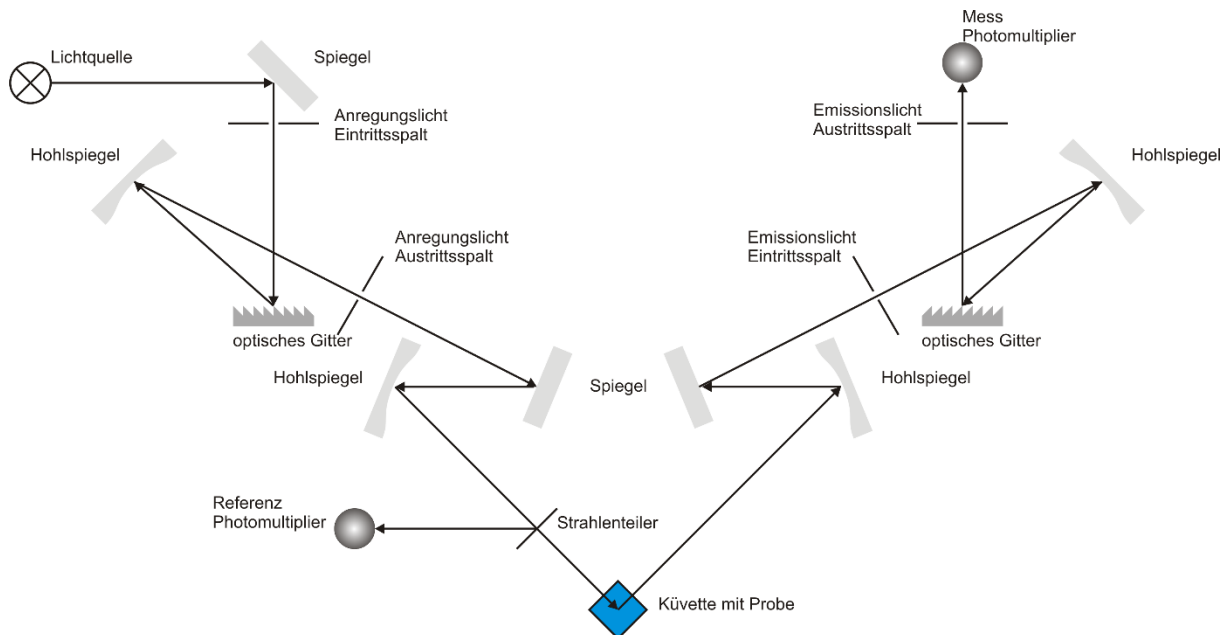


Abbildung 3: Der schematische Aufbau des Fluoreszenzspektrometers LS-50B von Perkin Elmer® wurde leicht verändert nach der Skizze in der Geräteanleitung wiedergegeben. Bei den Monochromatoren des Anregungs- und Emissionslichtes handelt es sich um modifizierte Czerny-Turner Monochromatoren.

Das Fluoreszenzspektrometer LS-50B verwendet weißes Licht einer Xenon Lampe als Lichtquelle. Ein erster Monochromator im Strahlengang selektiert Licht einer gewünschten Wellenlänge. Es entspricht der eingestellten Anregungswellenlänge im Computerprogramm. Das Anregungslicht wird durch die Probenküvette gelenkt und regt Moleküle in der Probenlösung zur Emission an. Ein Strahlenteiler lenkt Licht auf einen Referenzphotomultiplier, um Schwankungen der Lichtquelle zu erkennen und auszugleichen. Die Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz wird in orthogonaler Ausrichtung (90°) zur Anregungslichtquelle detektiert. In dieser Winkelausrichtung ist die Rayleigh Streuung minimal und der detektierte Anteil an Streulicht, verglichen mit anderen Ausrichtungen, deutlich verringert. Ein zweiter Monochromator ermöglicht die wellenlängenaufgelöste Messung. Die emittierte Strahlung wird von dem Messphotomultiplier detektiert. Es werden nicht wie bei einer Absorptionsmessung mit Bezugsküvette absolute Werte erhalten, sondern relative Intensitäten (a.u. arbitrary units).

A)

B)

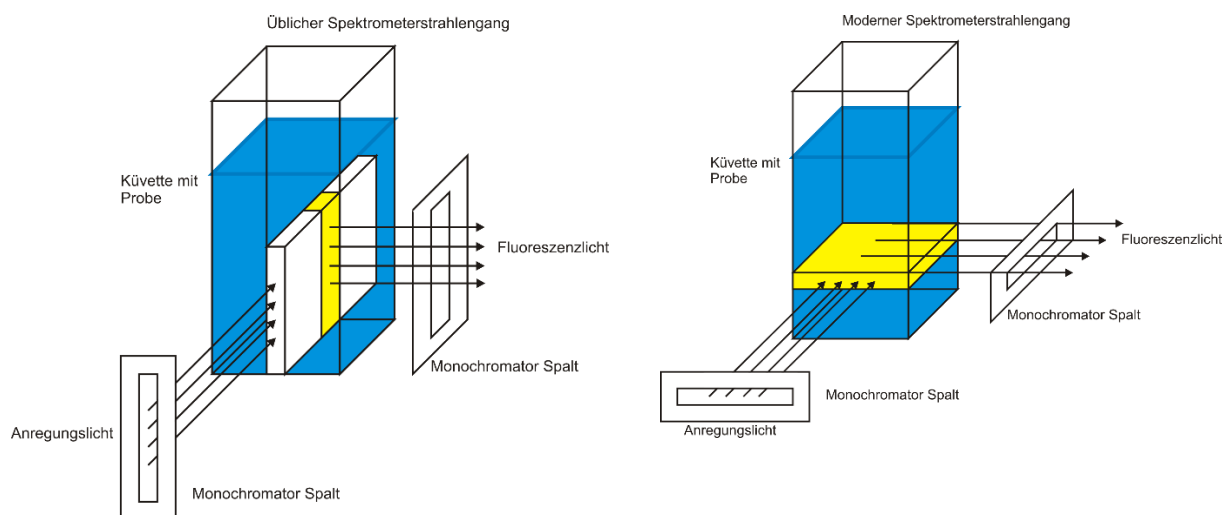


Abbildung 4: Auf der linken Seite (A) ist die klassische Strahlengangausrichtung zu sehen, auf der rechten Seite (B) die eines modernen Fluoreszenzspektrometers. Das detektierte Volumen entspricht der gelben Fläche.

Wie in Abbildung 4 A) zu sehen ist, wird bei einem üblichen Fluoreszenzspektrometer mit einer vertikalen verlaufenden Linie angeregt und detektiert, wohingegen bei einem modernen Fluoreszenzspektrometer B) mit einer horizontalen Linie gearbeitet wird. Bei den meisten Fluoreszenzspektrometern, auch dem in der Arbeit zu Vergleichszwecken verwendeten, wird noch vertikal angeregt. Betrachtet man das gelb hervorgehobene Flüssigkeitsvolumen, wird bei dem modernen Fluoreszenzspektrometer ein größeres Volumen zur Detektion verwendet, somit können mehr Moleküle detektiert werden. Dadurch werden größere Signale detektiert und das Probenvolumen effizienter genutzt. Es können also niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden. Der in der Arbeit vorgestellte LIF-Messaufbau nutzt das unter B) gezeigte horizontale Messprinzip, wie es in speziellen Küvetten zur Detektion geringer Volumina und manchen modernen Fluoreszenzspektrometern Verwendung findet.

2.4. RIFS Detektionsprinzip

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie nutzt die Interferenz von Weißlicht an einem Schichtsystem im Nanometerbereich, um Schichtdickenänderungen an Sensoroberflächen im Nanometerbereich zu detektieren.

Die Detektion erfolgt, indem der Signaltransducer rückseitig durch eine Weißlichtquelle bestrahlt wird. Das Licht wird an jeder Phasengrenze eines dünnen Mehrschichtsystems auf der Oberfläche des Signaltransducers reflektiert. Die Teilstrahlen treten miteinander in Wechselwirkung und bilden ein charakteristisches Interferenzspektrum aus. Beim Anbinden eines Analyten kommt es zu einer Verschiebung des Interferenzspektrums und zu einer Veränderung der optischen Schichtdicke. Die beobachteten Bindungsprozesse sind zeitaufgelöst und markierungsfrei [5]. Diese Verschiebung kann in ein Bindungssignal aufgelöst werden und zur Quantifizierung des Analyten in einer Probe dienen. Nach der Regeneration einer Sensoroberfläche geht die Verschiebung zurück und das Bindungssignal

wieder auf die Basislinie zurück. Es kann mit einer weiteren Probendetektion begonnen werden.

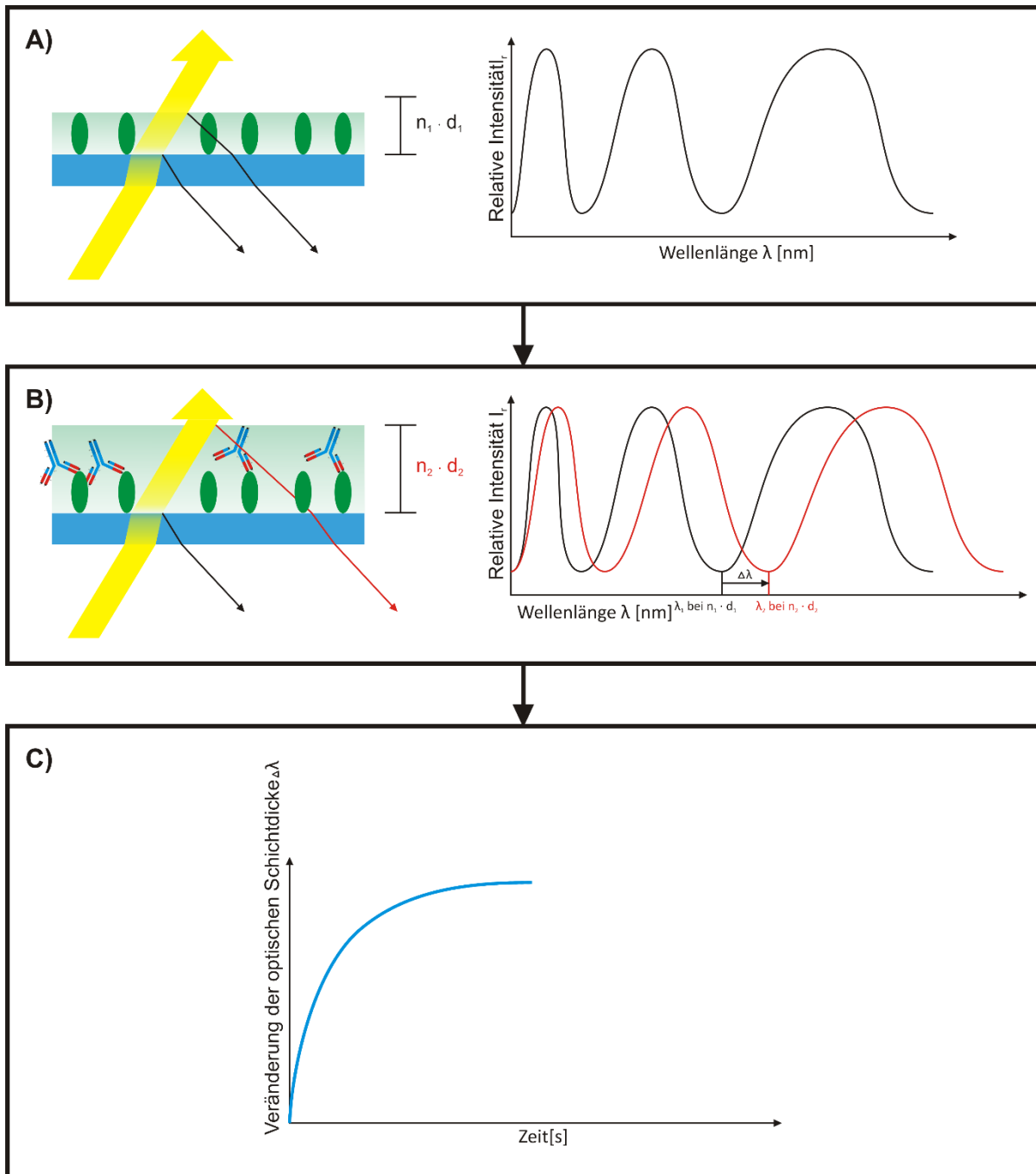


Abbildung 5: Das RIFs Detektionsprinzip beruht auf der Interferenz von Weißlicht an einem Schichtsystem im Nanometerbereich. Signaltransducer: blau, von unten eingekoppeltes Weißlicht: gelber Pfeil, Interferenz vor Anbindung: A und nach Anbindung: B, daraus generiertes Bindungssignal: C

In Abbildung 5 ist unter A exemplarisch ein RIFs Signaltransducer in Blau und immobilisierte Testosteronderivate als grüne Ellipsen dargestellt. In Teil B sind angebundene Antikörper gezeigt. Ein Bindungssignal, wie unter C gezeigt, kann durch die Verschiebung eines Minimums (B) generiert werden. Die Sensoroberfläche kann je nach verwendetem Immunoassay regeneriert und danach eine erneute Messung begonnen werden (nicht gezeigt).

2.5. Grundlagen zu Antikörpern

2.5.1. Antikörper als Detektionsstrukturen:

Antikörper werden als hochspezifische Erkennungsstrukturen in Immunoassays eingesetzt [6]. Sie können auf planen Oberflächen oder Partikeln immobilisiert und in verschiedenen Immunoassayformaten (Kapitel 2.6) verwendet werden. Die meisten Antikörper zeigen die niedrigsten Nachweisgrenzen bei physiologischen Bedingungen (pH= 7,4) und Isotonizität (Tonizität entsprechend einer 0,9 % Kochsalzlösung). Diese Bedingungen müssen bei Regenerationen verlassen werden, um die an den Antikörper angebondenen Strukturen wieder zu entfernen [7]. Folglich altert die Sensoroberfläche bei jedem Regenerationsschritt, dies kann je nach Immunoassay und Nachweisgrenzen mehrere hundert Mal wiederholt werden. Aptamere [8] sind nach erfolgter Optimierung robuster und können deutlich mehr Regenerationsschritte überdauern. Sie sind jedoch noch nicht ausreichend weit entwickelt [9], um zum Beispiel in verschiedenen oder leicht variierenden Matrices und zudem bei verschiedenen Temperaturen problemlos und zuverlässig arbeiten zu können.

2.5.2. Herstellung von Antikörpern:

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper aus dem Serum immunisierter Tiere gewonnen. Das reine Antigen für das der Antikörper erstellt werden soll wird mit einem Adjuvans zur Reaktionsverstärkung des Immunsystems versehen. Ein Tier (zum Beispiel eine Maus) wird zweifach in einem bestimmten zeitlichen Abstand mit der Mischung immunisiert. Nach 2 bis 3 Monaten werden die Antikörper aus dem Serum der Tiere isoliert und mittels der Affinitätschromatographie aufgereinigt. Bei den hier erhaltenen Antikörpern handelt es sich um polyklonale Antikörper. Außerdem können Antikörper gentechnisch direkt aus tierischen Stammzellen gewonnen werden, hierbei handelt es sich meist um monoklonale Antikörper. Der Unterschied zwischen poly- und monoklonalen Antikörpern wird im übernächsten Kapitel 2.5.4 vorgestellt.

2.5.3. Eigenschaften von Antikörpern:

Wie in folgender Abbildung 6 gezeigt, besteht ein IgG Antikörper aus einem Fc- und zwei Fab-Teilen [10]. Bei Bereichen mit der Abkürzung C handelt es sich um konstante Regionen, bei denen mit der Abkürzung V um variable Regionen. Die Bereiche mit V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} bestehen aus schweren Ketten (Index H). Die Bereiche mit V_L und C_L bestehen aus leichten Ketten (Index L). Der Fc-Teil besteht aus zwei konstanten Regionen der schweren Kette: C_{H2} und C_{H3} . Der Fab-Teil setzt sich aus C_{H1} , C_L , V_H und V_L zusammen. Die Teile sind in den Gelenkregionen durch Disulfidbrücken verbunden.

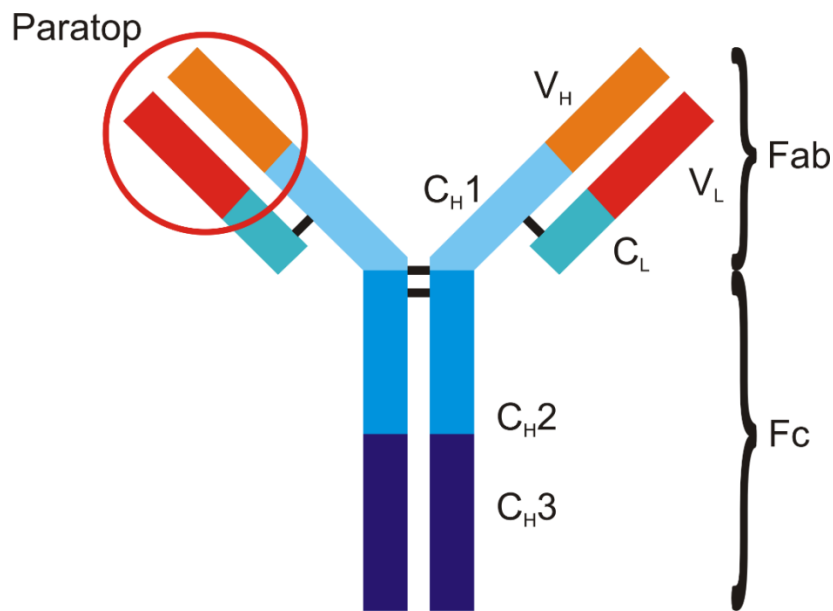


Abbildung 6: Schematisch dargestellter IgG Antikörper. Die verschiedenen Farben grenzen die einzelnen Unterbereiche ab. Die dicken schwarzen Balken stehen für die Disulfidbrücken zwischen den Unterbereichen.

Die konstante Region ist bei jeder Tierart und jedem Antikörpersubtyp jeweils gleich. Die variablen Regionen beinhalten jeweils drei hypervariable Bereiche (complementary determining regions: CDRs). Sie machen jeweils eine Antigenbindungsstelle aus. Neben dem IgG Antikörper kommen im menschlichen Körper noch weitere Typen: IgA, IgD, IgE und IgM vor. Sie werden in unterschiedlichen Krankheitsphasen bei unterschiedlichen Krankheitserregern- und Arten mit verschiedenen Aufgaben in unterschiedlichen Geweben gebildet. Der Hauptunterschied besteht in der Länge und Gestalt der schweren Ketten und der unterschiedlichen Anzahl an CDRs und somit Paratopen. Bei dem gezeigten IgG bilden eine V_H und V_L Kette gemeinsam ein solches Paratop aus, welches jeweils aus sechs CDRs besteht. Unter einem Paratop versteht man eine Bindungsstelle eines Antikörpers, welche an ein spezielles Epitop, die Bindungsstelle an einem Antigen, bindet. Die verwendeten IgG Antikörper haben zwei identische Paratope und können zwei Epitope binden.

2.5.4. Monoklonale und polyklonale Antikörper:

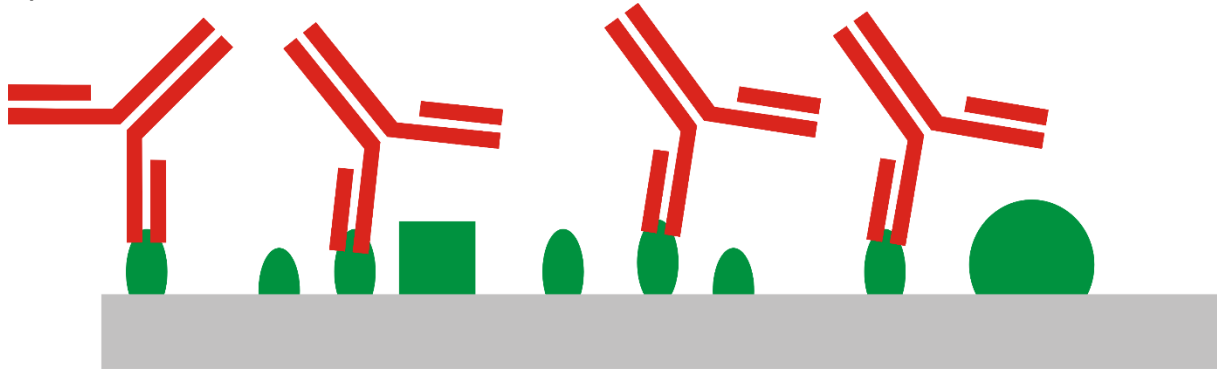
Es wird zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern unterschieden. Monoklonale Antikörper binden an eine definierte Stelle des Antigens, sie haben alle die gleichen Bindungsstellen (CDRs). Bei polyklonalen handelt es sich um eine Mischung von verschiedenen Antikörpern, welche an verschiedene Epitope binden. Sie besitzen unterschiedliche CDRs.

Beide Varianten haben Vor- und Nachteile. Monoklonale Antikörper sind eindeutig definiert und zeigen nur eine sehr geringe Varianz zwischen den unterschiedlichen Herstellungschargen. Bei polyklonalen Antikörpern können die verschiedenen Chargen relativ stark variieren. Dies kann von Nachteil sein, wenn Messergebnisse verschiedener Antikörperchargen verglichen werden sollen.

Polyklonale können an leicht unterschiedliche Epitope eines Antigens binden und dies auch erkennen, wenn immer dieselbe Seitengruppe durch eine kovalente Immobilisierung (zum Beispiel auf einer Sensor- oder Partikeloberfläche) nicht mehr zur Verfügung steht.

Monoklonale Antikörper können nicht mehr binden, wenn das eine Epitop das sie erkennen nicht mehr zugänglich ist. Falls allerdings Proteine detektiert werden sollen, können monoklonale Antikörper auch mehrere Regionen erkennen, da sich meist die Aminosäuresequenz einiger Regionen bei Proteinen wiederholt, wie dies zum Beispiel bei dem Protein CRP mit seinen fünf Untereinheiten der Fall ist [11].

A)



B)

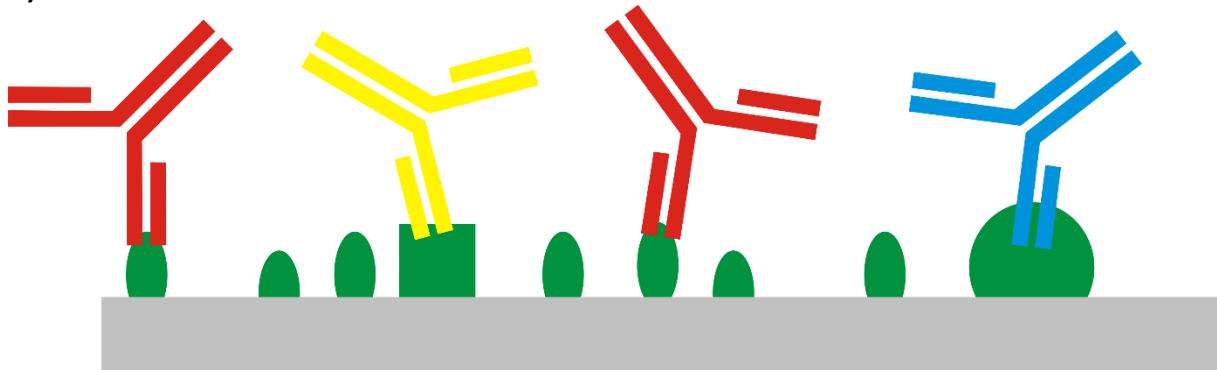


Abbildung 7: **A)** Monoklonale Antikörperanbindung: Die Antikörper haben alle dasselbe Paratop und können nur ein Epitop (Ellipse) des Antigens detektieren. **B)** Polyklonale Antikörperanbindung: Mehrere Epitope auf der Oberfläche (Kreis, Viereck und Ellipse) werden von den polyklonalen Antikörpern mit ihren unterschiedlichen Paratopen, durch die verschiedenen Farben der Antikörper angedeutet, detektiert.

2.6. Immunoassay Detektionsprinzipien

„Der Immunoassay ist ein Verfahren zur Detektion oder zum Messen spezifischer Proteine oder anderer Substanzen durch ihre Eigenschaften als Antigen oder Antikörper.“ [12]

Die vier im Folgenden vorgestellten Immunoassaytypen werden in der Arbeit von Sapsford et. al. verglichen [13]. Direkte und kompetitive Assays werden beide wegen ihrer Einfachheit gerne eingesetzt. Sandwich- und Bindungsinhibitionsassays sind für komplexere Problemstellungen geeignet. Im Folgenden werden die verschiedenen Immunoassaytypen vorgestellt und die zu erhaltenden Signale und Nachweisgrenzen diskutiert.

2.6.1. Direkter Assay:

Bei einem direkten Assay wird ein Antikörper zur Detektion auf einer Oberfläche immobilisiert. Die Probe mit Analyt (Antigen) wird über die Oberfläche geleitet. Der Analyt bindet an die spezifischen Bindungsstellen der Antikörper und erzeugt ein Bindungssignal

[14]. Diese Variante funktioniert nur, wenn der Analyt ausreichend groß oder gelabelt ist, um (zum Beispiel bei RfS) die optische Schichtdicke ausreichend stark zu verändern und dadurch ein detektierbares Signal erzeugt wird.

2.6.2. Kompetitiver Assay:

Bei einem kompetitiven Assay wird ein Antikörper, welcher den Analyt bindet, auf einer Oberfläche oder auf einem Partikel immobilisiert. Der kompetitive Assay wird durchgeführt, indem verschiedene Affinitäten von Analyt (Probe) und konjugiertem Analyt (zum Beispiel mit BSA) genutzt werden. Die beiden Komponenten mit den verschiedenen Affinitäten verhalten sich kompetitiv zur Bindungsstelle und generieren dadurch ein konzentrationsabhängiges Bindungssignal. Es wird bei RfS ein inverses Bindungssignal generiert, indem ein großes Signal für eine geringe Analytkonzentration steht [15].

2.6.3. Sandwich Assay:

Ein Sandwich Assay beruht auf dem Prinzip, dass zwei Antikörper gleichzeitig an einen Analyt binden. Der Analyt muss dafür ausreichend groß sein, um sterische Hinderungen zu vermeiden und über die passenden Epitope verfügen. Es werden auf einer Oberfläche oder einem Partikel Antikörper A (Fänger) immobilisiert. Der Analyt aus der Probe bindet im ersten Schritt an den Fängerantikörper. Danach bindet bei der labelfreien Detektion ein zusätzlicher Antikörper B an einer anderen Stelle an den Analyt, um das Signal zu verstärken. Bei der farbstoffbasierten Detektion ist der zweite Antikörper B mit einem Farbstoff oder Fluorophor gelabelt und erzeugt das Signal. Von Rowe et al. [16] wurden Sandwich Assays zur Detektion von Bakterien, Viren und Proteinen verwendet. Ein bekanntes Beispiel für einen Sandwich Assay ist eine Variante des ELISA Test (Enzym-linked immunosorbent assay) [17]. Ein hohes Signal steht somit für viel Analyt und anders herum.

2.6.4. Bindungsinhibitionstest:

Bindungsinhibitionstests werden oft verwendet, um sehr niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen. Es handelt sich um einen Spezialfall des kompetitiven Assays. Das inverse Bindungssignal führt dazu, dass wenig Analyt zu einem hohen Signal führt, wohingegen viel Analyt zu einem niedrigen Signal führt. Um einen Bindungsinhibitionstest durchzuführen, wird der Analyt auf einer Oberfläche oder einem Partikel immobilisiert. In einem Eppendorf® Cup wird die Probe (mit Analyt) und eine definierte Menge Antikörper für eine definierte Zeit ($t = 15 - 30 \text{ min}$) vorinkubiert. Im nächsten Schritt binden dann die Antikörper, welche keinen Analyt gebunden haben an die funktionalisierten Oberflächen oder Partikel. Bei ungelabelten Detektionsmethoden resultiert das Signal in der Veränderung der optischen Schichtdicke [18]. Bei gelabelten Detektionsmethoden ist der Antikörper direkt oder indirekt (über einen sandwichartigen Schritt) mit Fluoreszenzfarbstoff verbunden.

Der Bindungsinhibitionstest wurde bei vielen Immunoassaymessungen in der Arbeit verwendet. Er bietet einige Vorteile. Das inverse Signal ermöglicht niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen. Außerdem kann die Interaktion des Analyten und Antikörpers ungestört von statten gehen.

2.7. Unterscheidung von heterogenen und homogenen Immunoassays

2.7.1. Definition:

Ein heterogenes Immunoassayformat wird auf funktionalisierten Oberflächen durchgeführt. Es können verschiedene Varianten, je nach Anforderung, wie in Kapitel 2.6 gezeigt durchgeführt werden. Bei einem homogenen Immunoassayformat finden einige Immunoassayschritte im Volumen statt. Es werden Partikel mit funktionalisierten Oberflächen verwendet.

2.7.2. Heterogene Immunoassays:

Im Folgenden werden ein heterogenes und ein homogenes Immunoassayformat verglichen. Ein heterogener Immunoassay kann labelfrei (zum Beispiel mit der Methode RfS) oder mit Labeln (zum Beispiel mit der Methode TIRF) durchgeführt werden. Die Vorteile heterogener Immunoassays sind, dass gerade im labelfreien Fall, Kinetiken sehr gut bestimmt werden können und somit die einzelnen Immunoassaykomponenten und Parameter (Antikörper, Analytimmobilisierung und Regeneration) sehr gut ausgewählt, charakterisiert und optimiert werden können. Gerade durch die labelfreie Detektion kann davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Affinitätskonstanten nah an denen in vivo zu erwartenden sind, da die Antikörper in ihrer Anbindung kaum gehindert oder beeinflusst werden. Die Oberflächenchemie kann bei den heterogenen Immunoassays als etabliert angesehen werden und auch für anspruchsvolle Analyte wie die hydrophoben, schlecht wasserlöslichen und kleinen Immunsuppressiva angepasst werden.

Ein wesentlicher Nachteil der heterogenen Immunoassays besteht darin, dass zwischen den Messungen regeneriert werden muss. Die Regeneration wird durchgeführt, um den Biosensor zu säubern und die Oberfläche auf eine neue Messung vorzubereiten. Hierbei wird immer ein Teil der Detektionsschicht auf der Oberfläche des Sensors zerstört oder abgetragen. Somit nimmt von Messung zu Messung die Sensitivität, je nach Oberflächenchemie und Detektionselement mehr oder weniger linear ab. Manche Systeme können bis zu 400 mal regeneriert werden [7], dies ist jedoch die Ausnahme, denn in der Praxis ist bei den meisten Immunoassays mit deutlich weniger Regenerationsschritten zu rechnen. Die Auswertung der Messung erfolgt durch die Auswertung der Steigung oder Höhe des Bindungssignales, wie in Kapitel 4.3 diskutiert. Sollten kinetische Daten erhalten werden, müssen, wie dort diskutiert, mehrere Dinge wie zum Beispiel die Abtrennung der Probe durch eine Luftblase beachtet werden.

2.7.3. Homogene Immunoassays:

Homogene Immunoassays werden auf (Magnetischen-) Partikeln durchgeführt. Im Signalausdifferenzierungsschritt werden hierbei magnetische Partikel durch einen Magneten an eine Oberfläche gezogen und bilden eine pseudo-heterogene Oberfläche aus. Der Detektionsschritt erfolgt in der homogenen Phase im Flusszellvolumen oder pseudo-heterogen angereichert an einer Magnetfalle.

Die Auswertung der Messung erfolgt durch die Integration der Fläche unter der Kurve während des Durchpumpens der Probe (im Fluss). Dies birgt den Vorteil, dass im Volumen,

verglichen mit einer Oberflächenmessung, mehr Fluorophore angeregt und somit niedrigere Levels of Detection (LOD) erreicht werden können.

Alternativ kann aber auch wie in Kapitel 4.8.4.5 die Detektion durch Sammeln der Partikel an einen Magneten gegenüber der Messphotodiode erfolgen. Hierbei kann dann die Signalsteigung ausgewertet werden. Die Steigung ist dazu bei einer hohen Magnetpartikel mit Fluorophor Konzentration steiler und bei einer niedrigen Konzentration flacher. Der Vorteil besteht im Gegensatz zur Volumenmessung hier in der Anreicherung der magnetischen Partikel gegenüber der Messphotodiode.

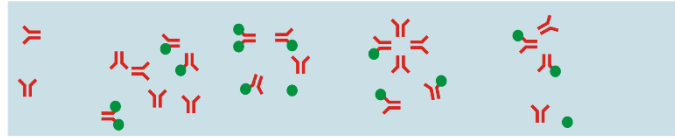
2.7.4. Vorteil der homogenen Immunoassays:

Der essentielle Vorteil der homogenen Variante ist, dass kein Regenerationsschritt benötigt wird und somit bei jeder Messung eine neue, nicht abgenutzte, hochsensitive Oberfläche zur Verfügung steht. Ein Nachteil besteht darin, dass magnetische Partikel meist eine braune oder schwarze Farbe haben und Licht dadurch absorbiert und das Signal dadurch verschlechtert werden kann. Die Herausforderungen bei den partikelbasierten homogenen Immunoassays bestehen darin, dass sie lagerstabil sein und möglichst geringe unspezifische Wechselwirkungen ausbilden sollen. Außerdem kann die Oberflächenchemie der heterogenen Immunoassays nicht ohne weiteres auf die der Partikel übertragen werden. Das Material der Partikel schränkt die Wahl der Lösungsmittel stark ein, die verwendeten Analyten ihrerseits schränken die Wahl der Lösungsmittel noch weiter ein. Die Dosierung aller Reagenzien für die Oberflächenchemie ist unbekannt und muss erforscht werden. Werden einzelne Reagenzien zu hoch konzentriert, klumpen die Partikel oder die Erkennungsstrukturen werden zerstört. Außerdem können die Erkennungsstrukturen aufgrund ihrer Hydrophobizität auch mit sich selbst Agglomerate bilden. Kathrin Freudenberger hat sich in ihrer Dissertation ausführlich mit der Oberflächenchemie der Partikel für homogene Immunoassays befasst [19].

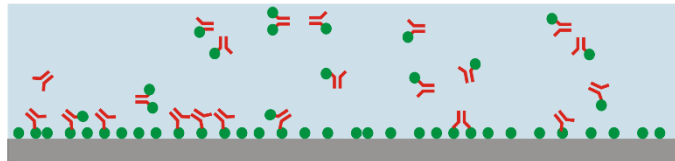
Eine weitere Herausforderung stellt die Dosiergenauigkeit der Partikel dar. Falls sie schnell sedimentieren oder an die Wände der Eppendorf® Cups agglomerieren, besteht die Gefahr der Entmischung und folglich fehlerhafter Immunoassaymessergebnisse. Im Kapitel 4.7.2 wird die Partikelsedimentation genauer untersucht und Aufbauten zur Verhinderung der Sedimentation und Entmischung erforscht und vorgestellt.

Heterogener Immunoassay

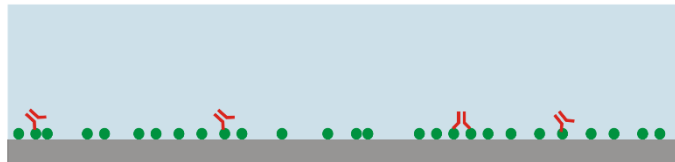
Schritt 1: Bindungsinhibitionsassay: Inkubation der Antikörper (MPA-AKs) mit dem Analyt (MPA) ($\Delta t=15 - 30 \text{ min}$)



Schritt 2: Detektion der ungebundenen Antikörper auf der Transduceroberfläche



Schritt 3: Regeneration der Sensoroberfläche für die nächste Messung



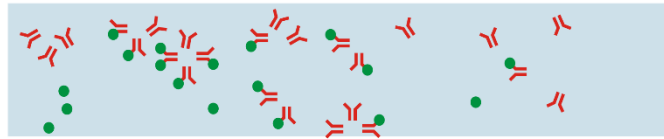
Legende:



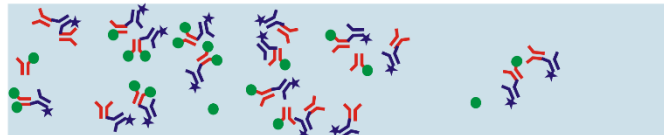
Abbildung 8: Exemplarischer Ablauf eines heterogenen Immunoassays in Form eines Bindungsinhibitionstestes.

Homogener Immunoassay

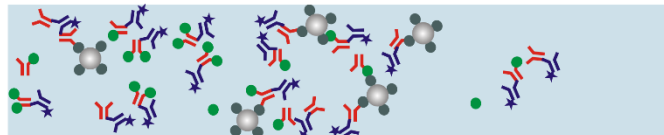
Schritt 1: Bindungsinhibitionsassay: Inkubation der Antikörper (MPA-AKs) mit dem Analyt (MPA) ($\Delta t = 15 - 30$ min)



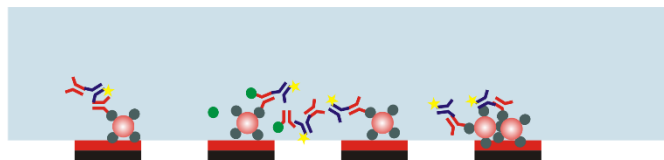
Schritt 2: Hinzufügen von fluoreszierenden Sekundärantikörpern ($\Delta t = 15$ min)



Schritt 3: Hinzufügen von magnetischen Partikeln mit Analyt-Ligand (MPA) ($\Delta t = 30$ min)



Schritt 4: Anreicherung & Detektion der Magnetpartikel am Permanentmagnet



Legende:

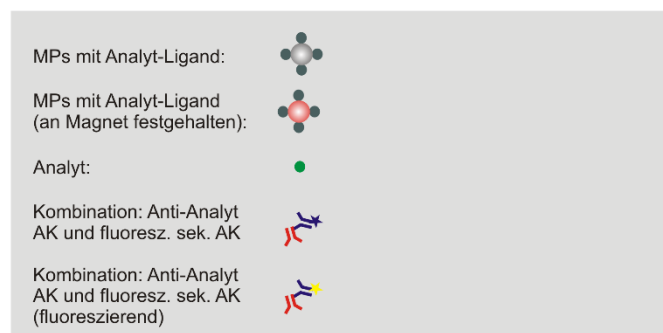


Abbildung 9: Exemplarischer Ablauf eines homogenen Immunoassays in Form eines Bindungsinhibitionstestes. Es ist exakt die in Kapitel 4.8.4.5 für die Kalibrierung verwendete Messabfolge dargestellt.

Die verschiedenen möglichen Varianten der heterogenen Immunoassays können in Kapitel 2.6 detailliert nachgelesen werden. In diesem Kapitel sind die einzelnen Immunoassayschritte für einen Bindungsinhibitionstest, einen direkten Assay, einen kompetitiven Assay und einen Sandwich Assay detailliert dargestellt. Hier soll auf den

homogenen Immunoassay im Detail eingegangen werden. In Abbildung 8 ist ein heterogener Bindungsinhibitionsassay detailliert zum Vergleich mit dem homogenen Bindungsinhibitionsassay (Abbildung 9) gezeigt.

2.7.5. Immunoassayschritte homogener Immunoassays:

Die im Folgenden vorgestellten Schritte wurden in den im Ergebnissteil gezeigten homogenen Immunoassays in verschiedenen Varianten durchgeführt.

Schritt 1: Inkubationsschritt

Anti-MPA-Antikörper, welche den Analyten (MPA) binden, werden mit der Probe, welche den Analyt enthält, vorinkubiert. Die Inkubationszeit beträgt $t = 15 - 30$ min. Während der Inkubation ruht der Ansatz in einem Eppendorf® Cup.

In Kapitel 4.8.4.4 werden statt der MPA-AKs im ersten Inkubationsschritt fluoreszierende, mit MPA-AKs gelabelte Partikel eingesetzt.

Kommentar zur Reihenfolge Schritte 2 und 3:

Die Reihenfolge der Schritte 2 und 3 ist bei den Messungen von Kapitel 4.8.4.4 und 4.8.4.5 genau wie beschrieben. In Kapitel 4.8.4.4 wurden fluoreszierende mit MPA-AKs gelabelte Partikel verwendet. Diese werden ebenfalls in dieser Reihenfolge verwendet, da keine Gefahr besteht, dass das Label den MPA-AK am Anbinden hindert. In der Standardreihenfolge konnte der fluoreszierende Sekundärantikörper schon in Schritt 2 zugegeben werden, da er Fc-Teil spezifisch ist. Nicht Fc-Teil spezifische Antikörper würden den gesamten MPA-AK verkleben und die Anbindung der MPs mit MPA auf der Oberfläche in Schritt 3 verhindern. Deswegen wurden die Messungen von Kapitel 4.8.4.1 und 4.8.4.3 mit den Schritten 2 und 3 in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Hier wurden nämlich Antikörper, welche nicht Fc-Teil spezifisch sind verwendet. Der Assay in Kapitel 4.8.4.3 wurde in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt, obwohl er mit Fc-Teil spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde. Die Auswirkung auf die Messergebnisse ist in betreffendem Kapitel diskutiert.

Schritt 2: Hinzufügen von fluoreszierendem Sekundärantikörper

In Schritt 2 wird eine definierte Menge fluoreszierender Sekundärantikörper im Überschuss zugegeben. Sie binden an die MPA-AKs und machen diese somit im LIF-Messaufbau sichtbar. In diesem Schritt die Sekundärantikörper zuzugeben vermeidet sterische Hinderungen durch die magnetischen Partikel.

Schritt 3: Kompetitive Reaktion

Es werden magnetische Partikel, welche mit dem Analyt (MPA) auf der Oberfläche gelabelt sind, zugegeben. Sie belegen die noch freien Bindungsstellen der MPA-AKs. Dieser Schritt kann sogar in einer problematischen Matrix durchgeführt werden, da die Matrix am Ende von Schritt 3 oder 4 gewaschen wird.

Schritt 4: Signalausdifferenzierung

Die Signalausdifferenzierung wird bei allen homogenen Messungen im Eppendorf® Cup in Form eines Waschschrattes durchgeführt. Bei manchen Immunoassayvarianten wird einmal am Ende gewaschen, bei manchen Varianten ein zusätzliches Mal, bevor die fluoreszierenden Sekundärantikörper zugegeben werden. Die nach Schritt 3 folgenden Assayschritte werden in exakt zusammengesetzter Pufferlösung durchgeführt. Es kann davon ausgegangen werden, dass keine Matrixbestandteile der Probe mehr vorhanden sind.

Schritt 5: Detektionsschritt

Im Detektionsschritt wird, wie in einem Bindungsinhibitionstest üblich, ein inverses Signal erhalten: je mehr Analyt erhalten ist, desto niedriger das Signal und umgekehrt. Er wurde in den Versuchen in zwei Varianten durchgeführt. In Kapitel 4.8.4.1, 4.8.4.3 und 4.8.4.4 wurden die magnetischen Partikel mit schon ausdifferenziertem Signal durch den Flusskanal gepumpt und die AUC während einem bestimmten Zeitraum detektiert und ausgewertet. Es wird die Fluoreszenz im Volumen der Flusszelle gemessen werden und nicht nur an der Oberfläche.

In der zweiten Variante, wie in Kapitel 4.8.4.5 genutzt, werden die magnetischen Partikel durch den Permanentmagneten am Flusskanal aus dem Volumen während langsamen Pumpens eingefangen und angereichert. Hierbei dürfen die hydrodynamischen Kräfte nicht die Magnetkraft der Magnetfallen überschreiten. Durch diese Anreicherung kann man ein höheres Signal und niedrigere Nachweisgrenzen erreichen. Die Anfangssignalsteigung bei der Probeninjektion kann ausgewertet werden.

Schritt 5: Spül- oder Regenerationsschritt (nicht in Abbildung 9 gezeigt)

Im Spül- oder Regenerationsschritt wird alles aus der Flusszelle herausgepumpt. Es wird sehr schnell oder mit einer Luftblase gespült, um die magnetischen Partikel vom Permanentmagneten abzulösen. Die nächste Messung kann mit komplett neuen und unbenutzten Reagenzien durchgeführt werden. Man kann in diesem Spülschritt sehr starke Reinigungsreagenzien einsetzen oder sehr schnell pumpen, um MNPs, Liposomen oder sonstige Verunreinigungen aus der Flusszelle während Langzeitmessungen zu entfernen.

[2.8. Das Immunsystem, Immunsuppressiva und Therapeutisches Drug Monitoring](#)

[2.8.1. Das menschliche Immunsystem:](#)

Das menschliche Immunsystem besteht aus der adaptiven und der angeborenen Immunantwort. Die angeborene Immunantwort erkennt die bei vielen Erregern ähnlichen Zellwand- und Oberflächenstrukturen. Sie bekämpft diese mittels Makrophagen und Monozyten.

Bei der adaptiven Immunantwort werden körperfremde Strukturen von Antikörpern markiert. Sie selbst schädigen die Antigene, die sie erkennen, nicht. Sie rekrutieren lediglich Makrophagen und das Komplementsystem, um deren Beseitigung zu veranlassen. Jeder Mensch hat ca. 100 Millionen verschiedene Antikörper in Form von B-Lymphozyten Rezeptoren (IgD). All diese Antikörper reagieren auf körperfremde Strukturen. Diese hohe Menge an verschiedenen Antikörpern ist nötig, da Erkennungsstrukturen vorsichtshalber gegen alles Körperfremde gebildet werden und es zunächst ein Zufall ist, ob an einen Erreger

gebunden werden kann. Die Affinität der Antikörper kann aber bei einer hohen oder wiederholten Erregerbelastung durch den Körper optimiert und somit auf Erreger spezialisiert werden. Die Vielfalt der Antikörper beruht auf mehreren Mechanismen: der somatischen Rekombination, dem Mechanismus der ungenauen Verknüpfung und der Leserasterverschiebung. Auf diese Weise können theoretisch bis zu 100 Milliarden verschiedene Antikörper entstehen.

B- und T-Lymphozyten sind Bestandteile der adaptiven Immunantwort. T-Lymphozyten haben hauptsächlich regulatorische Aufgaben, wohingegen B-Lymphozyten effektorische Aufgaben erfüllen. Es bilden jedoch beide Zelltypen Gedächtniszellen zu vergangenen Infektionen aus. Während ihres Reifungsprozesses wird mittels der klonalen Deletion sichergestellt, dass keine körpereigenen Strukturen erkannt werden. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und T-Lymphozyten im Thymus. Bei Antigenkontakt erfolgt mittels klonaler Expansion die Anregung der Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten. Der menschliche Körper benötigt vier bis fünf Tage für die adaptive Immunantwort. In den einzelnen Expansionsphasen bzw. nach Wiederansteckung werden verschiedene, immer höher affine Antikörper IgG1, IgG2, usw. ausgebildet. Schließlich reicht die Menge an Antikörpern für die adaptive Immunantwort aus. Manche Antikörpertiter bleiben nach Infektionen oder Impfungen ein Leben lang erhalten.

2.8.2. Immunsuppressiva und deren Wirkmechanismen:

Die verschiedenen Klassen der Immunsuppressiva werden im Folgenden mit ihrem Wirkmechanismus kurz vorgestellt.

Tacrolimus und Cyclosporin A:

Bei Tacrolimus (Tac) [20] und Cyclosporin A (CsA) [21] handelt es sich um Calcineurininhibitoren. Beide binden an Immunophiline und blockieren den Effekt von Calcineurin. Dadurch wird die Produktion von IL-2 verringert und die Proliferation von T-Lymphozyten reduziert, welche bei der Immunantwort in weiten Teilen benötigt werden. Tac bindet an das Immunophilin FKBP12. CsA bindet an das Immunophilin Cyclophilin. Tac und FKBP12 bilden einen Komplex aus, welcher die calciumabhängige Phosphataseaktivität des Calcium Calmodulin Komplexes inhibiert. Dadurch wird indirekt die Signaltransduktion der T-Lymphozyten und die IL-2 Transkription blockiert [22]. Calcineurininhibitoren können zu einer Vasokonstriktion in der Niere führen, welche in Kombination mit einer möglichen Überexpression des Transforming growth factors zu einer interstitiellen Fibrose führt [23]. Um diese drastischen Nebenwirkungen zu vermeiden, werden Tac und CsA in niedrigerer Konzentration in Kombination mit MPA oder Sirolimus eingesetzt.

Sirolimus und Everolimus:

Sirolimus [24] und Everolimus sind proliferations Signalinhibitoren. Beide sind Inhibitoren des mechanistic Target of Rapamycin (mTOR), einer Kinase des Zellzyklus. Dadurch werden der Zellzyklus und die Aktivierung der T-Lymphozyten unterbunden. Beide Wirkstoffe haben eine sehr ähnliche chemische Struktur, unterscheiden sich jedoch signifikant bezüglich ihrer Halbwertszeiten: Sirolimus mit 60 h und Everolimus mit 30 h. Das Nebenwirkungsprofil

beider Wirkstoffe ist ähnlich wie das von Tacrolimus und Cyclosporin A, es tritt aber in anderen Schwerpunkten auf.

Mycophenolsäure:

Durch Mycophenolsäure (MPA) [25] wird die Inosin Monophosphatdehydrogenase reversibel inhibiert und dadurch die Proliferation der B- und T-Lymphozyten teilweise inhibiert. Mycophenolsäure kann als Natriumsalz oder als die Prodrug Mycophenolatmofetil eingesetzt werden.

Es gibt noch weitere Immunsuppressiva, auf die hier nur der Vollständigkeit halber hingewiesen wird. Bei allen vorgestellten Immunsuppressiva ist Therapeutisches Drug Monitoring empfehlenswert. Bei MPA ist es von Fall zu Fall zu entscheiden.

2.8.3. Immunosuppressive Therapie:

Beim Supprimieren des Immunsystems eines Patienten nach einer Organtransplantation können Immunsuppressiva, welche an unterschiedlichen Wirkorten angreifen, kombiniert werden. Dadurch kann die Dosierung jedes einzelnen Immunsuppressivums verringert und die Nebenwirkungen der einzelnen Wirkstoffe können reduziert werden [26]. Häufig wird Cyclosporin A und Mycophenolsäure oder Tacrolimus und Mycophenolsäure, beide oftmals mit Glukokortikoiden kombiniert [27-29]. Die daraus resultierenden niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen bedeuten eine zusätzliche Herausforderung für die Konzentrationsbestimmung mittels POCT-Geräten im Vollblut. Diese analytischen Herausforderungen wurden in den vergangenen Jahren teilweise in Zentrallaboren und mittels Immunoassays gelöst. Von K. Freudenberger wurden der Stand der Technik und die erreichten und therapeutisch notwendigen Nachweisgrenzen der Immunoassays aufgezeigt [30].

2.8.4. Therapeutisches Drug Monitoring:

Unter Therapeutischem Drug Monitoring (TDM) versteht man das Messen von Wirkstoffkonzentrationen im Blut eines Patienten. Es wird durchgeführt, wenn es keine klinisch relevanten Marker oder Parameter gibt, welche in der Regel einfacher überwacht werden können. Ein Wirkstoff muss die folgenden Eigenschaften aufweisen, um TDM durchzuführen [31]: ein klarer Zusammenhang zwischen Dosierung und therapeutischem Effekt muss bestehen [32], er muss eine enge therapeutische Breite aufweisen, eine große Variabilität der Pharmakokinetik zwischen Patienten (dadurch geringer prädikativer Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung) und die pharmakologische Wirksamkeit muss schwer zu ermitteln oder rückzuschließen sein. Das Ziel einer individualisierten Therapie mittels TDM ist, die schwer einzustellende Medikation mit einem optimierten klinischen Outcome durchzuführen. Die Liste der Wirkstoffe, bei denen TDM empfohlen wird, wächst stetig: Antiepileptika, herzwirksame Wirkstoffe, einige Antibiotika, Psychopharmaka, Immunsuppressiva, Zytostatika und Hormone [33].

Nach der Transplantation einer Niere, einer Leber oder eines Herzens benötigen Patienten Immunsuppressiva. Sie dienen dazu, eine Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem des Patienten zu verhindern. Die Dosierung besagter Arzneimittelklasse stellt, speziell bei frisch transplantierten Patienten, eine Herausforderung dar. Es kann keine generelle, zum Beispiel

gewichts- oder altersspezifische Dosierung angegeben werden, da die Wirkstoffe individuell sehr unterschiedlich verstoffwechselt werden und bioverfügbar sind. Zusätzlich weisen sie eine sehr enge therapeutische Breite auf. Die Pharmakokinetik bezüglich der Absorption, Distribution, des Metabolismus und der Elimination müssen unter der Beeinflussung durch das Alter, Geschlecht, genetische Mutationen und Nieren- oder Leberinsuffizienz des Patienten bedacht und berücksichtigt werden. Wechselwirkungen mit anderen Wirkstoffen und Entzündungen können die Pharmakokinetik noch zusätzlich beeinflussen [34]. Nach dem Verdacht auf eine Interaktion eines Immunsuppressivums mit einem anderen Wirkstoff muss schnell gehandelt werden. Die Interaktion muss identifiziert und das TDM unter einer Dosierungsanpassung engmaschig durchgeführt werden [35]. Dies bedeutet, dass man den korrekten Wirkstoffspiegel im Blut sehr genau einstellen muss, um starke Nebenwirkungen zu vermeiden. Außerdem wird mancher Wirkstoff durch das frisch transplantierte Organ selbst verstoffwechselt, was zu einer praktisch unvorhersehbaren Pharmakokinetik in den ersten Tagen nach einer Transplantation führt. Sollte ein Patient unterdosiert werden, würde das Immunsystem das transplantierte, körperfremde Organ abstoßen. Würde er überdosiert werden, könnte er an den Folgen einer Infektionskrankheit versterben.

Um eine Fehldosierung zu vermeiden ist dringend dazu angeraten, [36] die Wirkstoffspiegel, insbesondere in den ersten 48 – 72 h nach einer Transplantation, engmaschig durch TDM zu überwachen. In diesem Zeitraum nach einer Transplantation liegt der Patient meist stationär auf der Intensivstation, was eine regelmäßige Blutprobennahme für das TDM vereinfacht.

Nach dem Verlassen des Krankenhauses ist eine lebenslange Medikation mit Immunsuppressiva vonnöten, um eine Abstoßung des transplantierten Organs zu verhindern. Es sind Routineblutuntersuchungen nötig, um den Medikamentenspiegel zu überwachen und eventuell die Dosierung anzupassen. Momentan werden die TDM Messungen von Zentrallaboren in Krankenhäusern mittels LC-MS/MS [37-39] durchgeführt. Die Qualität dieser Messungen ist sehr gut. Es kann jedoch je nach Labor unterschiedlich lange dauern, bis das Ergebnis zum Arzt bzw. Patienten gelangt. Eine engmaschige Überwachung mit, zum Beispiel stündlichen Messungen, welche in manchen Fällen wünschenswert sind, lassen sich kaum auf diese Weise realisieren. Außerdem hat ein POCT-Gerät beim Hausarzt den Vorteil, dass bei Routineuntersuchungen nicht lange auf Ergebnisse aus einem Zentrallabor gewartet werden muss, sondern direkt In Beisein des Patienten gehandelt und entschieden werden kann.

2.9. POCT-Geräte

Der Markt der Point-of-care testing (POCT)-Geräte ist ein Wachstumsmarkt [2]. Wie von Luppa et al. [40] beschrieben hat POCT viele Vorteile, zum Beispiel, dass Testergebnisse in einer sehr kurzen Zeitspanne verfügbar sind und Entscheidungsprozesse in der Klinik und ambulant beschleunigt werden können.

In der Klinik führt ein gut eingeführtes POCT-Gerät außerdem zu einem verbesserten medizinischen Outcome und geringeren Kosten. POCT beinhaltet zwei Hauptfelder: Handheld Geräte und Benchtop Geräte, beide entstehen aus miniaturisierten „Laborinstrumenten“ oder alternativen Entwicklungen für diese Zwecke [41].

Für das Therapeutische Drug Monitoring von Immunsuppressiva bietet sich ein Point-of-Care Testing Gerät an, welches am Patientenbett dem Arzt stündliche Messungen liefert und ein schnelles Reagieren auf eine Fehldosierung ermöglicht. Sowohl am Patientenbett in der Klinik, als auch in der Notfallmedizin oder Ambulanz könnte ein solches Gerät sinnvoll sein. Momentan sind die Intensivstation und Notfallmedizin die beiden wichtigsten POCT Geschäftsfelder [42].

2.9.1. Anforderungen an POCT-Geräte:

Im Fall des TDM von Immunsuppressiva gibt es einige besondere Anforderungen an ein POCT-Gerät. Die zu detektierenden hydrophoben Arzneistoffe sind in großen Teilen an Blutbestandteile gebunden, dadurch sind diese Teile für Immunoassays nicht sicht- und detektierbar. Die freie, ungebundene Fraktion kann allerdings von den Immunoassays detektiert werden, ist jedoch teilweise sehr niedrig konzentriert. Zusätzlich ist die Matrix Patientenblut bzw. Blutserum herausfordernd, es stehen nur geringe Probenvolumina zur Verfügung.

Für ein POCT-Gerät sind folgende Eigenschaften essentiell: die Levels of Detection (LOD) und Levels of Quantification (LOQ) der Messungen sollen vergleichbar mit denen eines Zentrallabors sein. Die Messungen sollen in einem kleinen, leisen und kompakten Gerät am Bett des Patienten stattfinden. Das Gerät soll von einer Krankenschwester bedienbar sein (Austauschen von Einwegbauteilen oder Reagenzien). Die Einwegbauteile sollen einen angemessenen Preis haben, den Sicherheitsrichtlinien von Intensivstationen entsprechen und optimierte und zuverlässige Immunoassays als zentrales Element haben.

2.9.2. Integration von Teilkomponenten:

Die Integration von Teilkomponenten ist essentiell für die Weiterentwicklung von Geräten. Bei Smartphones oder Laptops wurde schon erfolgreich gezeigt, dass damit die Miniaturisierung entscheidend vorangetrieben werden kann. Außerdem können Produktionskosten gesenkt und die Zuverlässigkeit erhöht werden. Diese Integration von Teilkomponenten soll auch bei den POCT-Geräten verfolgt werden. Eine Miniaturisierung in Zusammenhang mit POCT-Geräten birgt zusätzliche Vorteile: die benötigte Probenmenge kann verringert werden, was eine engmaschige und lang andauernde Patientenüberwachung ermöglicht. Einige Forschergruppen haben die Miniaturisierung durch die Integration von optischen Elementen mit mikrofluidischen Komponenten vorangetrieben. Exemplarisch sollen technisch unterschiedliche Ansätze von fünf verschiedenen Arbeitsgruppen genannt werden.

Amorphe Siliziumphotodioden wurden von Pereira et al. mit PDMS Mikrofluidikkanälen kombiniert [43]. Auf den Photodioden wurde direkt ein Filter abgeschieden, auf welchen dann die Flusskanäle aufgebracht wurden. Sie ermöglichen direkte fluoreszenzbasierte Antikörper Antigen Detektionen. Es werden also drei Aufbauelemente in ein Bauteil kombiniert, was die Miniaturisierung begünstigt, aber die Austauschbarkeit der Elemente erschwert.

Außerdem wurden glasfaserbasierte Lichtleiter in austauschbare Multi Kanal Mikrofluidikchips aus Mylar und PMMA integriert, wie von Irawan et al. gezeigt [44]. Es kann

mittels einer blauen LED und einer Photodiode der Modellanalyt BSA (Fluoreszein gelabelt) detektiert werden. Die Integration der Lichtleiter in die Fluidik erleichtert die optische Ausrichtung, erschwert aber den Austausch der Fluidik.

Li et al. haben die Integration eines multimodalen Lichtleiters in einen Glasmikrofluidikchip realisiert [45]. Der Flusskanal ist direkt mittels PDMS mit einem integrierten Filtersystem auf dem Photomultiplier Tube platziert. Dadurch konnten viele optische Komponenten eingespart werden.

Des Weiteren wurden austauschbare Einweg Mikrofluidikchips mit integrierten, selbst ausgerichteten planaren 2D Mikrolinsen aus PDMS entwickelt. Durch sie wird orthogonal zum Detektor hin angeregt. Die Linsen sind eine Innovation, um die Ausrichtung der Optik zu vereinfachen [46]. Auf ähnliche Weise haben Kamei et al. Mikrolinsen und Filter mit integrierten Photodioden an Elektrophorese Kapillaren in dem von ihnen entwickelten Messaufbau befestigt [47].

2.10. Das EU-Projekt Nanodem

Im EU-Projekt Nanodem sollen mittels Immunoassays Immunsuppressiva in einem POCT-Gerät detektiert werden. Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Entwicklung des im Rahmen des Projektes entstandenen miniaturisierbaren POCT-LIF-Messaufbaus. Dabei wurde speziell auf die Flusszelle und Optimierung der Komponenten Wert gelegt.

Eine schematische Darstellung des Einsatzes eines POCT-Gerätes am Patientenbett ist in Abbildung 10 gezeigt. Am Mikrodialysekatheter wird Perfusat eingespeist und Dialysat mit Analyt erhalten. Die Samplingeinheit am Patientenarm soll Dialysat während 5 - 15 min sammeln und dann an das POCT-Gerät weitergeben. Im Dialysat wird die Probe mit dem zu detektierenden und zu quantifizierenden Analyt erhalten. Das POCT-Gerät detektiert daraufhin diese freie Fraktion der Immunsuppressiva im Patientenblut.

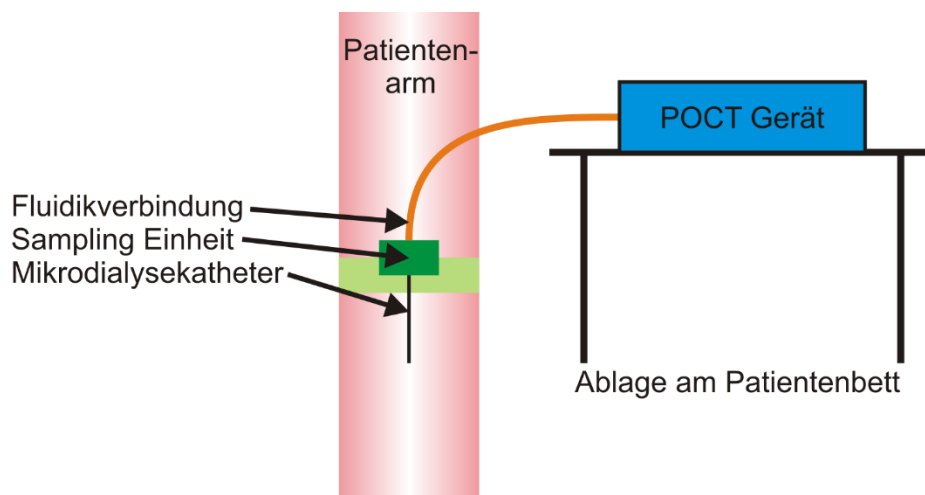


Abbildung 10: Einsatz des POCT-Gerätes am Patientenbett. Die orangene Fluidikverbindung dient dazu, die gesammelte Probe an das POCT-Gerät zu überführen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien, Partikel, Proteine und Antikörper

3.1.1.1. Chemikalien:

- *AMD, Aminodextran*, 100 kDa, gelagert bei 4°C, Aminierungsgrad 50%, Innovent e.V., Jena, Deutschland
- *CHAPS, 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat*, Sigma - Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
- *DCC, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid*, gelagert bei RT, Sigma - Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
- *DIC, N,N'-Diisopropylcarbodiimid*, gelagert bei RT, Fluka, Neu Ulm, Deutschland
- *DMF, N,N' Dimethylformamid*, gelagert bei RT, Fluka, Neu Ulm, Deutschland
- *DMSO, Dimethylsulfoxid*, Sigma - Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
- *DY 652, Fluorophor, Labeling-Kit*, M= 905,03 g/mol, $\lambda^{\text{abs}}_{\text{max}}=654$ nm, $\lambda^{\text{abs}}_{\text{max}}=675$ nm in Ethanol, bei -20°C gelagert, Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
- *DY 634 COOH, Fluorophor*, M= 969,03 g/mol, $\lambda^{\text{abs}}_{\text{max}}=635$ nm, $\lambda^{\text{abs}}_{\text{max}}=658$ nm in Ethanol, Strukturformel in Kapitel 4.6., Trocken bei -20°C gelagert, Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
- *DY 636 COOH, Fluorophor*, M= 760,91 g/mol, $\lambda^{\text{abs}}_{\text{max}}=645$ nm, $\lambda^{\text{abs}}_{\text{max}}=671$ nm in Ethanol, Strukturformel in Kapitel 4.6., Trocken bei -20°C gelagert, Dyomics GmbH, Jena, Deutschland
- *Glycerin, Propan-1,2,3-triol*, gelagert bei RT, Sigma – Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
- *GndCl, Guanidiniumchlorid*, Sigma - Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
- *GOPTS, 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan*, gelagert bei RT, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- *HCl, Salzsäure*
- *H₂O₂, Wasserstoffperoxid*, 30 Vol. %
- *H₂SO₄, konzentrierte Schwefelsäure*
- *NaCl, Natriumchlorid*, bei RT gelagert, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- *NaH₂PO₄ · H₂O, Natriumdihydrogenphosphat monohydrat*, bei RT gelagert, Merck, Darmstadt, Deutschland
- *Na₂HPO₄, Dinatriumhydrogenphosphat anhydrat*, bei RT gelagert, Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
- *New coccine red, Farbstoff, Cochenillerot A*, bei RT gelagert, Sigma - Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
- *NHS, N-Hydroxysuccinimid*, bei RT gelagert, Sigma - Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
- *Octylglucosid, 1-O-n-Octyl-β-D-glucopyranosid*, gelagert bei 4°C, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
- *PEG (COOH)₂, Dicarboxypolyethylenglykol*, M(PEG)=2000 Da, gelagert bei -20°C, Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland

- *PEG (Lipidanker), 1,2-Distearyl-sn-Glycerol-3 Phosphoethanolamin-N-Carboxypolyethylenglykol*, M(PEG)=2000 Da, bei -20°C gelagert, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, USA
- *PEG (NH₂)₂, Diaminopolyethylenglykol*, M(PEG)=2000 Da, bei -20°C gelagert, Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland
- *SDS, Natriumlaurylsulfat*, Konzentration in H₂O wie angegeben mit HCl auf den angegebenen pH-Wert eingestellt, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

3.1.1.2. Biochemikalien:

- *β₂GP-I AK, Anti- β₂GP-I Antikörper*, aus Ziegen Serum, polyklonal, affinitätsgerinigt, kristallin gefriergetrocknet, bei -20°C gelagert, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Texas, USA
- *C, Cholesterin, 3 β-Hydroxy-5-Cholesterin*, Pulver aus Lanolin (Wollwachs), bei 5°C gelagert, Sigma - Aldrich, Saint-Louis, Missouri, U.S.A.
- *CL, Cardiolipin, 1,1' 2,2' Tetramyristyl Cardiolipin*, Natriumsalz in Chloroform gelöst, Reinheit: >99%, bei -20°C gelagert, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, USA
- *HS, Humanserum*, bei -20°C gelagert, Sigma - Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
- *MPA, Mycophenolsäure*, bei -20°C und bei 8°C gelagert, , Sigma - Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA und Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
- *MPA-AK, Anti-Mycophenolsäure Antikörper*, bei -20°C gelagert, Randox Life Sciences Kearneysville, West Virginia, USA
- *PC, L-α-Phosphatidylcholin*, aus Eigelb gewonnen, Fettsäurereste zu 33% Palmoyl, 13% Stearyl, 32% Oleyl und 15% Linoyl, in Chloroform gelöst, bei -20°C gelagert, Sigma – Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
- *Sekundär-AK Nr.1, anti-Schaf IgG Antikörper*, Fc Fragment spezifisch, affinitätsgerinigt, aus Kaninchenserum, mit Alexa Fluor 647 konjugiert, Prod. Nr.: 313-605-046, Lot Nr.: 110687, polyklonal, bei -80°C gelagert, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, United Kingdom
- *Sekundär-AK Nr.2 und 3, anti-Schaf IgG Antikörper*, IgG (H und L) spezifisch, affinitätsgerinigt, aus Affenserum, mit Alexa Fluor 647 konjugiert, Prod. Nr.: 713-605-003, Lot Nr.: 123957 (Nr.2), Lot Nr.: 111791 (Nr.3), polyklonal, bei -80°C gelagert, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, United Kingdom
- *Sekundär-AK Nr.4, anti-Schaf IgG Antikörper*, IgG (H und L) spezifisch, affinitätsgerinigt, aus Kaninchenserum, mit Alexa Fluor 594 konjugiert, Prod. Nr.: 313-585-003, Lot Nr.: 101134, polyklonal, bei -80°C gelagert, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, United Kingdom
- *Sekundär-AK Nr.5, anti-Schaf IgG Antikörper*, IgG (H und L) spezifisch, affinitätsgerinigt, aus Kaninchenserum, mit DyLight 650 konjugiert, Prod. Nr.: SA5-10057, Lot Nr.: RB2152741, polyklonal, bei -80°C gelagert, invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA
- *Sekundär-AK Nr.6, anti-Schaf IgG Antikörper*, IgG (H und L) spezifisch, affinitätsgerinigt, aus Affenserum, mit Alexa Fluor 633 konjugiert, Prod. Nr.: A-21100, polyklonal, bei -80°C gelagert, invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA

- *Testosteron-AK, anti-Testosteron Antikörper*, IgG1, affinitätsgereinigt, aus Mäuseseren, Prod. Nr.: BM2076, Lot Nr.: 6H23313, bei -20°C gelagert, Acris Antibodies Inc., San Diego, Californien, USA
- *Testosteronoxim*, Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim, bei RT gelagert, Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

3.1.1.3. Partikel:

- *Fluoreszierende funktionalisierte Partikel*, Proof of Principle in Kapitel 4.8.3.1, Carboxyoberfläche, screenCORE/R-Carboxyl, 1µm Durchmesser, hochporöse Siliciumoxid Matrix, bei 4°C gelagert, Abs. max.: 633nm Em. Max.: 672nm, chemicell GmbH, Berlin, Deutschland
- *Fluoreszierende funktionalisierte Partikel*, Proof of Principle in Kapitel 4.8.3.1, Streptavidin auf Oberfläche, screenCORE/R-Streptavidin, 1µm Durchmesser, hochporöse Siliciumoxid Matrix, bei 4°C gelagert, Abs. max.: 633nm Em. Max.: 672nm, chemicell GmbH, Berlin, Deutschland
- *Fluoreszierende funktionalisierte Partikel*, Kapitel 4.8.4.4, screenCORE/R-Protein G (bindet Fc Teil der Antikörper), gelabelt mit MPA AKs, 1µm Durchmesser, hochporöse Siliciumoxid Matrix, bei 4°C gelagert, Abs. max.: 633nm Em. Max.: 672nm, chemicell GmbH, Berlin, Deutschland
- *Magnetische Partikel Micromer® M*, in Kapitel 4.8.4.1, 4.8.4.3, 4.8.4.4 und 4.8.4.5 verwendet, 3µm Durchmesser, Oberfläche mit PEG-NH₂ funktionalisiert, Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Deutschland
- *Magnetische Nanopartikel Merck Estapor®*, in Kapitel 4.7.2 verwendet, 360 nm Durchmesser, Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.1.4. Reagenzien und Puffer:

- *PBS, Phosphate Buffered Saline, Phosphatpuffer*, m(NaCl)=7,28g, m (NaH₂PO₄ · H₂O) = 1,38 g, m (Na₂HPO₄) = 2,2 g, V (H₂O) = 1 L, pH = 7,4, Isoton
- *PIRANHA*, 60 % H₂SO₄ konz. und 40 % H₂O₂ 30 %
- *Reinstwasser*
- *Spottingpuffer*, Reinstwasser mit 0,005 % CHAPS oder PBS
- *Waschpuffer für Spotter*, 10 % Ethanol, 0,1 % TWEEN in Reinstwasser
- *PBS (normal)* aus Kapitel 4.7.2: entspricht PBS.
- *PBS (verdünnt)* aus Kapitel 4.7.2: m (NaH₂PO₄ · H₂O) = 6,9 g pH = 7,4, V (H₂O) = 1 L
- *NaCl Puffer* aus Kapitel 4.7.2: m (NaCl) = 9 g, V (H₂O) = 1 L
- *W & B Puffer* aus Kapitel 3.2.4: 0,1 mol/L Na₃PO₄; 0,15 mol/L NaCl; pH = 7,5

3.1.1.5. Kunststoffe, Klebstoffe und Doppelklebebänder:

- *3M Doppelklebeband, 3M 9629PC*, 43,5 µm Acrylatkleberschicht, 13 µm PE (Polyester) Trägerfolie, 43,5 µm Acrylatkleberschicht, Gesamtdicke: 0,10 mm, 3M, Neuss, Deutschland

- *mfcs Doppelklebeband*, 60µm Acrylatklebeschicht, 25 µm PET (Polyethylenterephthalat) Trägerfolie, 60 µm Acrylatkleberschicht, Gesamtdicke: 140 µm, auf jeder Seite eine Schutzfolie bei Auslieferung, microfluidik ChipShop GmbH, Jena, Deutschland
- *NOA 68 Kleber*, Härtet mittels UV Licht, $R = 1,54$, Für Wellenlängen > 420 nm zu 100 % Transparent, Norland optical adhesive, Cranbury, New Jersey, USA
- *PE, Polyethylen*
- *PMMA, Polymethylmethacrylat*
- *UHU Epoxidharzkleber*, 2-Komponenten-Klebstoff PLUS SOFORTFEST, Endfestigkeit bis zu 800 N/cm², UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland

3.1.2. Geräte

3.1.2.1. LIF-Aufbau (Kapitel 4.1):

- *Absorptionsfilter*: Lang-Pass Filter der Firma Schott® (Typ RG645), Maße: $5 \cdot 5 \cdot 0,3$ cm und $1 \cdot 2 \cdot 0,3$ cm
- *Amperemeter*: Keithley 6517B Elektrometer/ High Resistance Meter zum Messen der Ströme der Photodioden
- *Fluidik*: Hamilton® Microlab 500 Spritzenpumpe und Hamilton® MVP Ventil, Teflonschlauch
- *Lichtquelle*: Laser: MLL-H-593.5 ultra-low noise solid state Laser vom Hersteller Photontec Berlin GmbH wurde als Anregungslichtquelle mit der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 593,5$ nm verwendet. Der Laser arbeitet in der continuous wave (CW) Mode. Maximale Leistung: 20 mW, Leistungsstabilität (RMS, während 4h) $< 2\%$ und ein Amplitudenrauschen (RMS, 20Hz zu 20MHz) $< 0,5\%$. Der Laserstrahl hat eine Divergenz von unter 1,5 mrad.
- *Netzteil Laser*: Keithley 2400 Sourcemeater, 5V eingestellt.
- *Netzteil Photodioden*: HP 3245 Universal Source, 0V Biasspannung für die Photodioden
- *Photodioden*: Eigenentwicklung IPV Stuttgart, Details zur Herstellung und Charakterisierung siehe [48].
- *Kurzpassfilter*: FES0600, cut-off Wavelength: 600 nm, Thorlabs Inc, Newton, New Jersey, USA
- *Sampler*: Cetax zur Detektion der Farbstoffkonzentrationen von Kalibriergerade B) in Kapitel 4.6.
- *Shutter*: Ansteuerung: Arduino®, Motor: Modellbauservo, Eigenbau IPV Stuttgart

3.1.2.2. Magnetfallen (Kapitel 4.7.1):

- *Elektromagnetschalter*, Arduino® basiert, gebaut von Marcel Berner, IPV Stuttgart
- *Elektromagnet*, Magnetfalle Variante A, Elektromagnet 210 N 12 V/DC 3.2 W Tremba GTO-25-0.5000-12VDC, Durchmesser: 2,5cm, Länge & Höhe: 2,1 cm
- *Elektromagnet*, Doppelmagnetfalle Variante C, ein weiterer Magnet wie in Variante A
- *Permanentmagnet*: zylinderförmig, NdFeB-Magnet N45, zylinderbauform, Durchmesser: 5mm, Höhe: 20mm, Remanenz: 1,33- 1,37, Grenztemperatur: 80 °C

3.1.2.3. Arduino® Vortexer (Kapitel 4.7.2 a):

- Arduino® UNO R3 Mikrocontroller Board
- Motorensteuerungen gelötet nach (<http://learningaboutelectronics.com/Articles/Vibration-motor-circuit.php>)
- Vibrationsmotor Typ 1, Hauptmotor vertikal, Vibration Motor, Firma Generic
- Vibrationsmotor Typ 2, Nebenmotor horizontal, DC1.5-6V 1750-7000RPM Hochleistung Elektromotor Mini Vibration Motor
- *Peristaltik Schlauchpumpe*: Ismatec® REGLO Digital, IDEX Corporation, Lake Forest, Illinois, USA

3.1.2.4. Oberflächenpräparation- und analytik:

- *Extruder*: Avanti Mini – Extruder, verwendete Membran: Polycarbonat, 0,1 µm Porenweite, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, UAS
- *Fluoreszenz Plate Reader*: GenePix 4100A, Fluorescence Plate Reader, Molecular Devices GmbH, Biberach
- *pH-Meter*: CG 843, Schott, Mainz, pH Elektrode Sentix 81
- *Pipetten*: Kolbenhubpipetten der Größen: 0,5-10 µL, 10-100 µL, 50-200µL, 100-1000µL, 500-2500µL und 500-5000µL, Reference-Serie, Firma: Eppendorf, Hamburg
- *Reinstwasseranlage*: vollentsalztes Wasser aus einer Ionentauscheranlage mit einer reversen Osmose Anlage durch Ultrafiltration aufbereitet, PURELAB Classic, Firma: ELGA Labwater, Celle, Deutschland
- *Spotter*: BioOdyssey Calligrapher Mini Arrayer, BioRad, Hercules, Californien, USA
- *Ultraschallbad*: Sonorex Super 10P, Firma: Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
- *Ultraschallstab*: Ansteuerungsgerät: Sonopuls GM 70, Ultraschallstab: UW 70, Firma: Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
- *Zentrifuge*: Heraeus Labofuge 400R, Thermo Scientific, Watham, USA

3.1.2.5. Messgeräte:

- *UV/VIS Spektrometer*: Lambda 9, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- *Fluoreszenzspektrometer*: LS-50B, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
- *Fluoreszenzspektrometer*: Varian, Mulgrave, Australien

3.1.2.6. Software:

- Origin® 7, 9, 2016 und 2017
- Measure® 7, 8 und 8.5 zur Messauswertung und Fluidikansteuerung
- IFZ®
- LabVIEW®
- Arduino® Genuino® Suite
- Microsoft® Office: Excel, Word

3.2. Methoden

Im Folgenden werden verschiedene Methoden der Oberflächenpräparation für Flusszelloberflächen, Signaltransduceroberflächen und Partikeloberflächen beschrieben. Es wird auf die klassische ganzflächige Präparation und die Präparation von definierten Teilflächen mittels Spottings eingegangen. Sowohl die technischen, als auch die chemischen Abläufe werden dargestellt.

3.2.1. Passivierung der Oberfläche

Für die homogenen Immunoassays ist eine Passivierung der Oberfläche des Flusskanals von Nöten, damit die durchgepumpten Immunoassay-Komponenten nicht an den Wänden, Oberseiten oder Böden haften bleiben. In der Praxis stellten sich AMD und PEG(NH₂)₂ als für den Flusszellboden geeignete Passivierungsschicht heraus. Die Wände und Flusszelloberseite wurden durch die Inkubation mit Prionex®- oder BSA Lösungen passiviert.

Bei den heterogenen Immunoassays wurde ähnlich verfahren und es wurde nur der Flusszellboden funktionalisiert, da sich die Flusszelloberseiten der Varianten 2 bis 5 aus PMMA nicht für eine kovalente Immobilisierung von AMD/ PEG (NH₂)₂ oder Analytderivaten eignen.

Weiterhin ist PMMA nicht mit der NHS/DIC Chemie kompatibel, da die Flusskanaloberseite durch den Einsatz dieser Chemie zerstört wird. Es zeigte sich jedoch, dass die Flusskanalböden aus Glas klassisch [49-51] ganzflächig präpariert werden können oder ganzflächig mit dem Spotter gespottet und trotzdem noch dicht mit dem Doppelklebeband mit der Fluidik verklebt werden können.

3.2.2. Ganzflächige Oberflächenpräparation der Signaltransducer

Bei der ganzflächigen Oberflächenpräparation wird wie folgt vorgegangen. Zunächst werden die Transducer in einer PIRANHA Lösung aus Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid gereinigt und aktiviert. Danach werden die Transducer mit Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Im nächsten Schritt werden die Transducer mit GOPTS silanisiert. Dies geschieht eine Stunde lang mit zwei gesandwichten Transducern in der trockenen Glaskammer bei Raumtemperatur, danach wird mit Aceton gespült und wieder mit Stickstoff getrocknet. Der darauffolgende Schritt der Oberflächenpräparation wird entweder mit AMD, das mit Aminogruppen funktionalisiert ist oder mit PEG(NH₂)₂ durchgeführt. Bei AMD wird in einer Wasserkammer über Nacht inkubiert und am folgenden Tag mit Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet. Bei PEG(NH₂)₂ wird mit DCM im Ofen bei 70°C über Nacht inkubiert. Danach wird mit Wasser gespült und Stickstoff getrocknet. Weitere Details zur ganzflächigen Oberflächenpräparation sind in folgenden Arbeiten zu finden: [52-54].

3.2.3. Spotting von definierten Flächen auf Signaltransducern

3.2.3.1. Ablauf und Faktoren des Spottings:

Ein Spotter spottet oder drückt mit einer Nadel in Flüssigkeiten enthaltene Analyte auf Signaltransducer auf. Hierbei lässt sich die Nadel auf wenige µm genau über und auf der

Oberfläche positionieren. In der Arbeit wurde kontaktlos mit einer soliden Nadel an einem Biorad Calligrapher gespottet. In diesem Prozess wird die Nadel bis auf wenige μm an die Oberfläche herangeführt und gibt mittels sogenanntem Kontaktprinting einen kleinen Tropfen auf die Oberfläche ab. Hierbei berührt nicht, wie der Name vermuten lässt der Pin die Oberfläche, sondern der Tropfen an dem Pin berührt die Oberfläche und wird auf derselben durch den Kontakt und aufgrund seiner ihm eigenen Oberflächenspannung abgesetzt. Im Gegensatz zur Funktionalisierung der gesamten Oberfläche, wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt, wird hier nur eine begrenzte Fläche und somit ein Teil der mittels PEG oder AMD passivierten Oberfläche mit einer sensitiven Schicht (zum Beispiel Erkennungselemente in Form von Antigenen) funktionalisiert.

Einige Faktoren spielen für ein gutes Spottingergebnis eine wichtige Rolle. Als äußere Faktoren können die Luftfeuchtigkeit im Spotter und die Temperatur des Signaltransducers, der Spottingkammer, sowie der zu spottenden Lösung angesehen werden. Hierbei ist besonders darauf zu achten, ein Antrocknen an der Nadel während des Spottingvorgangs zu vermeiden und die Kühlung so einzustellen, dass der zu spottende Analyt nicht denaturiert oder ausfällt. Außerdem muss die Kühlung so reguliert werden, dass die Antriebsmotoren des Nadelarms den Probenraum nicht zu sehr erhitzen. Sie befinden sich baulich bedingt unter dem Probenraum.

Bei den Lösungen müssen folgende Einflussgrößen beachtet werden. Da ein Spottingvorgang ca. 2 - 3 h dauert, sollte die zu spottende Lösung nicht leicht flüchtig sein. Außerdem muss die Viskosität der Lösung richtig eingestellt werden, um spottbar zu sein und nicht zu verlaufen oder verfrüht abzutropfen. Die Osmolarität und der pH-Wert der Lösung müssen eine langfristige Stabilität des zu spottenden Analyten sicherstellen. Ein spezieller Spottingpuffer dient dazu, die Nadel zwischen den einzelnen Punkten zu säubern und zu trocknen.

3.2.3.2. Spottingmuster:

Zunächst wurde ein Spottingmuster mit passenden Bemaßungen und Oberflächenbeladung für die Flusszelle und die Lokalisierung der Photodioden des LIF-Messaufbaus entwickelt. In Vorversuchen wurde die exakte Platzierung der Flächen ermittelt und der Spotter zum Spotten auf kleineren Glaschips mit der für den Messaufbau passenden Bemaßung ($1 \cdot 2 \text{ cm}$), statt standardgemäß auf Standardobjektträgern, eingerichtet.

Durch Spotten zweier Muster ineinander, welche nacheinander gedruckt werden, konnte eine ausreichend hohe Oberflächenbeladung der gespotteten Flächen erreicht werden. Außerdem wurden alle Punkte bei späteren Messungen doppelt gespottet, um eine noch höhere Oberflächenbeladung zu erhalten.

Die gespotteten Punkte sind in Abbildung 11 durch dunkelblaue (erster Durchlauf) und türkise Punkte (zweiter Durchlauf) gekennzeichnet. Eine der Herausforderungen beim Spotten besteht darin, die einzelnen Punkte nicht zu eng auf den Transducer zu spotten, um ein Zusammenlaufen der Punkte zu verhindern. Zusammengeliefene Tropfen führen zu Asymmetrien und verlaufen aus den vorgegebenen Flächen heraus. Diese kleinstmöglichen Abstände zwischen den Punkten, bei denen sie noch nicht miteinander verlaufen, wurden in Vorversuchen experimentell ermittelt. Sie betragen $333 \mu\text{m}$ in der Vertikalen und

Horizontalen des ersten und zweiten Musters. Das Zweite wurde in die Mitte der durch das erste Muster geformten Punktegitter gedruckt.

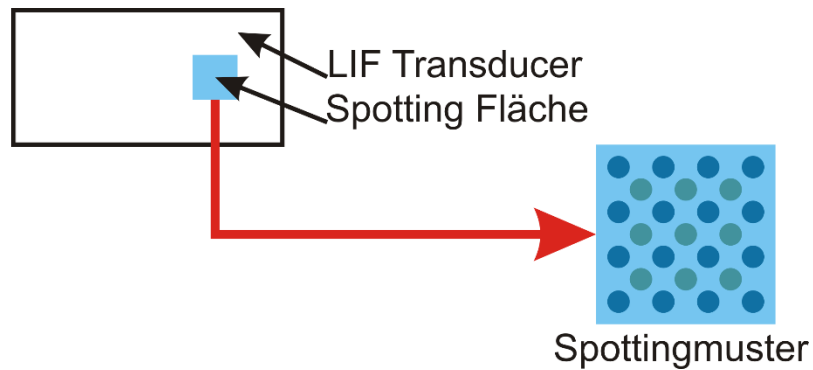


Abbildung 11: Prinzip des Spottingmusters. Im ersten Schritt werden die dunkelblauen Punkte nacheinander aufgedruckt. Dies geschieht, indem jeder Punkt zweimal wiederholt wird und von links nach rechts und oben nach unten gespottet wird. Im zweiten Schritt wird das zweite Muster in die Mitte der entstandenen Vierecke des ersten Musters gespottet (türkise Punkte).

Das in Abbildung 11 schematisch gezeigte Spottingmuster wurde an die verschiedenen Messphotodiodendimensionen des LIF-Messaufbaus angepasst.

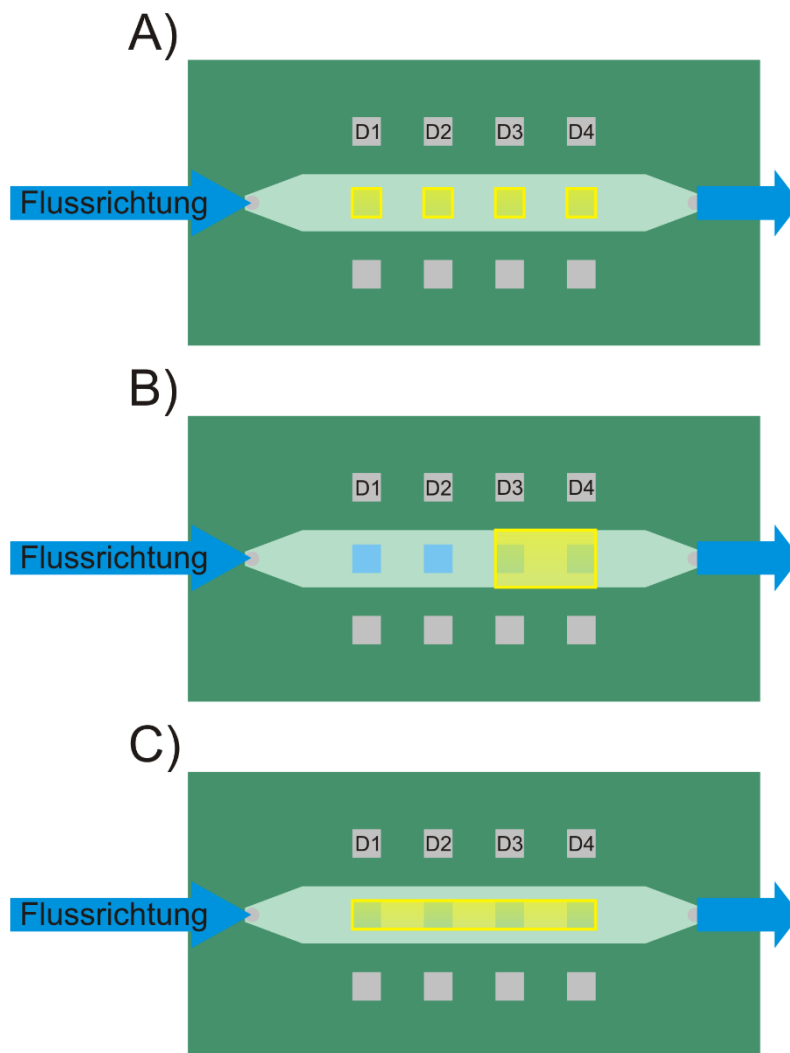


Abbildung 12: Die gelben Felder stehen für gespottete Flächen. Darunter sind die vier Photodioden mit einer Fläche von je 1 mm^2 zur Orientierung dargestellt. Der hellgrüne Bereich stellt den Flusskanal (2 mm Breite) dar. **A)** zeigt Variante A, bei der alle vier Photodioden bedeckt sind und **B)** zeigt Variante B bei der die hinteren beiden Photodioden verbunden und bedeckt sind. **C)** zeigt Variante C, bei der auch die Flächen zwischen den Photodioden komplett bedeckt sind.

In Tabelle 13 (Kapitel 4.8.3.3) wird aufgelistet, welche Spottingvariante von Abbildung 12 bei welcher Messreihe der heterogenen Immunoassays im LIF-Messaufbau verwendet wurden.

Verschiedene Varianten der Spottingsmuster zur Optimierung der Signaldetektion durch die Photodioden wurden entwickelt und getestet (Abbildung 12). Bei Variante A für den Chip mit vier Einzelphotodioden wurde ein Muster von $4 \cdot 4$ Punkten beim ersten Durchlauf und dann $3 \cdot 3$ Punkte dazwischen gespottet. Bei Variante B wurde nur bei den beiden hinteren Photodioden und deren Zwischenfläche gespottet. Es wurden $12 \cdot 7$ beim ersten Drucken und $11 \cdot 6$ Punkte beim zweiten Drucken aufgebracht. Variante C ist flächig, auch zwischen den Photodioden, gespottet. Bei dieser Variante wurden $33 \cdot 4$ beim ersten Durchlauf und $33 \cdot 3$ beim zweiten Durchlauf gespottet.

3.2.3.3. Spotting für den heterogenen Assay im LIF-Messaufbau:

Es wurden verschiedene Experimente zum Spotten des Analyten Mycophenolsäure (MPA) als Modellsubstanz vorgenommen. Zunächst wurden Messungen im RifS Aufbau

durchgeführt. Mycophenolsäure besitzt eine Säuregruppe und kann dadurch relativ einfach kovalent mittels einer Peptidbindung an eine funktionalisierte Oberfläche mit Aminogruppen angebunden werden. Die Hydrophobizität des Moleküls ist, wie bei allen anderen Immunsuppressiva, ein schwer zu handhabender Parameter, da durch sie bei der Immobilisierung auf einer Oberfläche nur Lösungsmittel, welche ausreichend apolar sind, eingesetzt werden können. Dies schränkt die Auswahl an verwendbaren Lösungsmitteln deutlich ein. Zusätzlich müssen die eingesetzten Lösungsmittel mit der Oberflächenchemie und den Gerätematerialien (zum Beispiel der Spotternadel) kompatibel sein. Außerdem musste die Viskosität der zu spottenden Lösung und deren Verträglichkeit mit Luft sichergestellt werden.

Um das Spotten von Mycophenolsäure zu testen, wurden verschiedene Spottingverfahren und Oberflächenchemien untersucht. Die etablierte Standard Oberflächenchemie musste „umgedreht“ werden, um das Spotting durchführen zu können. Die aktivierte Carboxygruppe ist beim Spotten nämlich in Lösung und nicht auf der Oberfläche und die Aminogruppe ist auf der Oberfläche und nicht in Lösung. Bei der Standard Oberflächenchemie ist die Carboxygruppe, welche zum Beispiel auf PEG ist, fest immobilisiert. Diese wird dann mittels NHS und DIC in DMF Chemie aktiviert. Im Sandwich wird es 4 h lang inkubiert. Im nächsten Schritt wird dann die anzubindende Substanz mit freier Aminogruppe aufgegeben und bindet über Nacht an.

Im folgenden Unterkapitel ist in Tabelle 2 die chemische Zusammensetzung der verschiedenen Spottingprozeduren gezeigt.

3.2.3.4. Oberflächenchemie:

Um definierte Flächen auf den Transducern spotten zu können, musste die Standardoberflächenchemie für heterogene Immunoassays angepasst und optimiert werden. Die Standardoberflächenchemie sieht DIC und NHS als Kopplungsreagenzien zur Anbindungen von Carboxygruppen auf Oberflächen mit Aminogruppen vor. Wie in den Arbeiten von Daniela Dankbar [55, 56] unter anderem gezeigt, kann aber auch DCC statt DIC als aktivierende Kopplungsreagenz verwendet werden. Für das im Folgenden beschriebene Spotten wurde mit der erwähnten umgedrehten Oberflächenchemie gearbeitet.

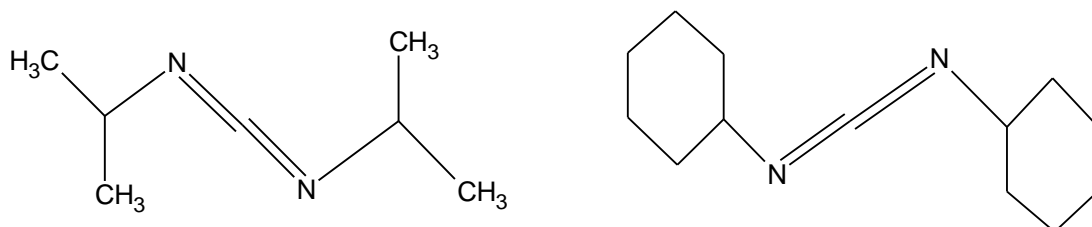


Abbildung 13: Vergleich von DIC und DCC als Reagenz. Die charakteristische Carbodiimidgruppe ist bei beiden Reagenzien gleich. Der Unterschied besteht in den Seitengruppen der Reagenzien.

Wenn beim Spotten DIC statt DCC verwendet wird, können Messungen mit einer besseren Reproduzierbarkeit erhalten werden. DCC ist allerdings im Handling im Labor unpraktischer als DIC, da sich größere Konglomerate im Vorratsgefäß aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften bilden. DIC ist eine gut lagerbare und einfach zu pipettierende und damit einfach abzumessende Flüssigkeit. Die Vorteile in der Reproduzierbarkeit überwiegen jedoch

und lassen die Unannehmlichkeiten bei der Handhabung im Labor in den Hintergrund treten. Im Folgenden wird der Reaktionsmechanismus der Anbindung mittels NHS und DCC gezeigt.

3.2.3.5. Oberflächenchemie: Anbindung mittels NHS/ DCC:

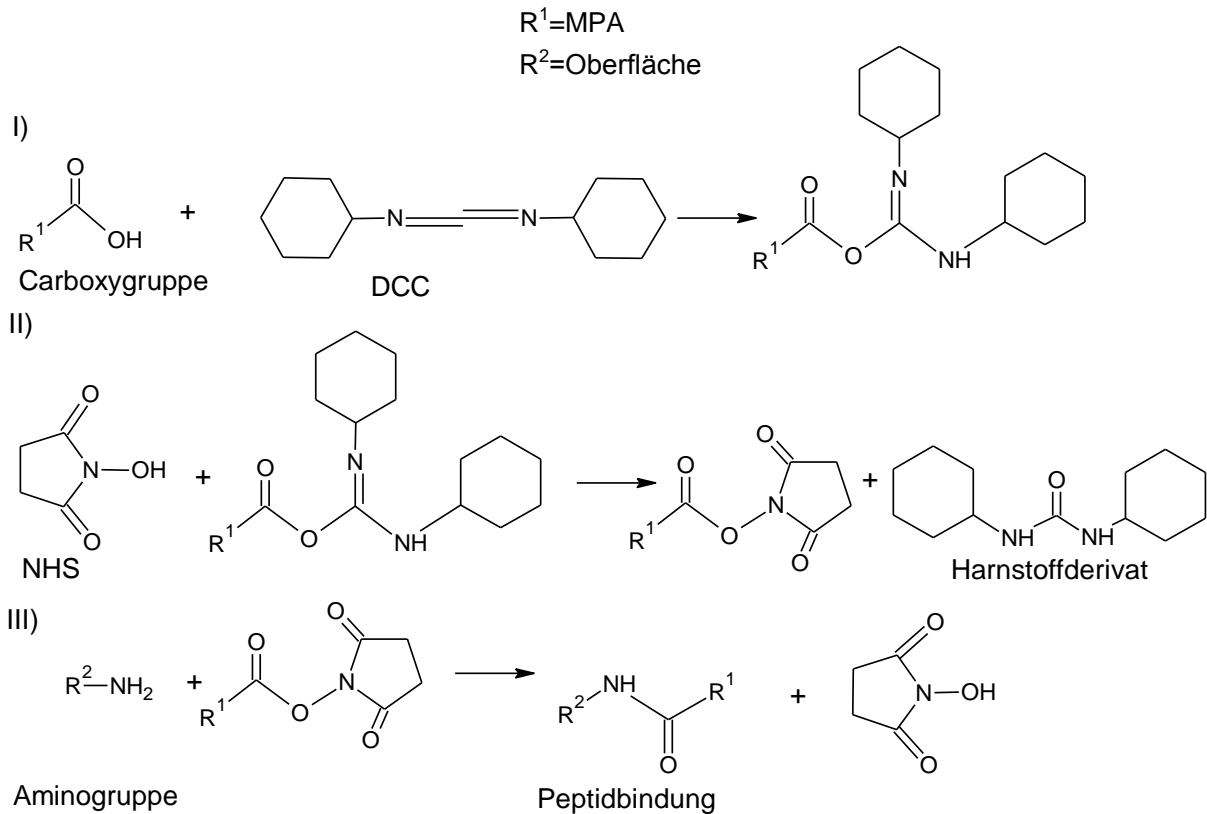


Abbildung 14: Aktivierung einer Carboxygruppe (Reaktionsgleichung I und II) mit folgendem Spotting auf eine Oberfläche (Reaktionsgleichung III) mit Aminogruppen unter Ausbildung einer Peptidbindung mittels NHS und DCC Chemie.

In Abbildung 14 ist die Anbindung einer Carboxygruppe an einer Aminogruppe unter Ausbildung einer Peptidbindung gezeigt. Die in der folgenden Tabelle 1 erwähnte Inkubationszeit vor dem Spotten findet nach Reaktionsgleichung 2 statt. Das ganz rechts gezeigte Harnstoffderivat fällt vermutlich bei der Inkubation über Nacht in Form von transparenten Kristallnadeln aus. Die dritte Reaktionsgleichung findet auf der Oberfläche, nachdem der Flüssigkeitstropfen auf der mit Aminogruppen funktionalisierten Oberfläche gegeben wurde, statt.

3.2.3.6. Optimierung und Entwicklung der Spotting Prozedur (RfS):

Spotting & Oberflächenchemie:

Um möglichst schnell eine zuverlässige und stabile Oberfläche zu erhalten, wurden Vorversuche durchgeführt. Sie dienten im speziellen dazu, eine für das Spotten passende Oberflächenchemie zu entwickeln und die Ergebnisse mittels der etablierten und zuverlässigen RfS Methode zu detektieren. Es wurden Standard RfS Signaltransducer [57], welche mit einer PEG(NH₂)₂ Oberfläche funktionalisiert sind, verwendet.

Tabelle 1: Verschiedene Spottinprozeduren des heterogenen MPA Immunoassays.

Prozedur	A	B	C	D
Oberflächen Chemie:	NHS/ DIC/ DMF	NHS/ DCC/ DMF	NHS/ DCC/ DMF	NHS/ DCC/ DMF
Inkubationszeit vor dem Spotten:	Über Nacht, im Kühlschrank: Harnstoffkristalle fallen aus → Abzentrifugation vor Spotten (Lsg. 1 Tag alt)	Über Nacht, im Kühlschrank: Harnstoffkristalle fallen aus → Abzentrifugation vor Spotten	120 min im Kühlschrank: (bis Harnstoffkristalle ausfallen)	keine
Waschen der Nadel:	Ja, zwischen jedem Spot	Ja, zwischen jedem Spot	Ja, zwischen jedem Spot	Ja, zwischen jedem Spot
Regeneration:	GndCl 6M pH=1,8	SDS 0,375% pH=2,5	SDS 0,25% pH=2,5	SDS 0,375% pH=2,5
Transduceralter bei Messung (im Kühlschrank gelagert):	2 Tage	7 Tage	1 Tag	1 Tag

Für die Versuche wurde ein quadratisches Muster in die Mitte des Signaltransducers über den Messpunkt des Lichtleiters aufgebracht. Es besteht aus 8 · 8 und bei Prozedur B bis D zusätzlich aus 7 · 7 Punkten zwischen den 8 · 8 Punkten. Alle Punkte wurden zweifach hintereinander gespottet, um eine hohe Oberflächenbeladung zu erhalten.

Wie aus Tabelle 2 entnommen werden kann, wurde MPA in verschiedenen Konzentrationen auf die Oberfläche gespottet. Ausgehend von der Arbeit von Daniela Dankbar [55] wurde mit der Abtrennung von auskristallisierten Harnsäurederivatkristallen nach verschiedenen langen Inkubationszeiten begonnen. Zuletzt wurde mit Prozedur D auch ein Spotten ohne Inkubation getestet, was zu sehr guten Ergebnissen führte. Inkubationszeiten sind bei dieser Oberflächenchemievariante auch von Lösungsmittel, Kopplungsreagenzien und Wassergehalt der Lösungen abhängig und müssen für jeden Analyt und jede Assayvariante getestet und optimiert werden.

Ein Waschen bzw. Benetzen der Spotternadel während des Spottens ist unabdingbar für reproduzierbare Signale. Deswegen wurde die Nadel immer in Spottingpuffer mit CHAPS zwischen den einzelnen Spots und deren Reprints getaucht. Vermutlich wurde das Abfließen der Peptidbindungsreaktion durch die Anwesenheit von kleinsten Mengen Wasser begünstigt. Außerdem hat CHAPS bei geringen Beladungen der zu spottenden Lösung durch seine Eigenschaften als Tensid einen günstigen Einfluss auf die Spotmorphologie [58].

Des Weiteren wurden die Transducer zu Beginn mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (DMF oder Puffer) vor den Messungen abgespült. Im Verlauf der Versuche stellte sich jedoch heraus, dass das Spülen mit PBS meist ausreichend ist, wenn nicht über Nacht inkubiert wird und keine Harnsäurederivatkristalle vom Transducer gelöst werden müssen. Mit den Kristallen auf der Oberfläche kann im RfS wegen der Trübung und resultierenden

Lichtstreuung nicht gemessen werden. Bei manchen Lösungsmitteln zeigte sich außerdem, dass die angebundene MPA vermutlich mit den entfernten Harnsäurederivatkristallen teilweise mit entfernt wird.

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung der verschiedenen Spottingprozeduren. Die Anteile hinter den Massen sind die jeweils relativen Stoffmengenanteile der Chemikalien, wobei MPA immer auf 1 gesetzt wurde. Dadurch sind die molaren Verhältnisse einfacher nachvollziehbar.

Prozedur	Standard Chemie:	A: NHS/ DIC/ DMF	B: NHS/ DCC/ DMF	C: NHS/ DCC/ DMF	D: NHS/ DCC/ DMF
m(MPA) [mg]	3 (1 Teil)	3 (1 Teil)	5 (1 Teil)	2,5 (1 Teil)	4,4 (1 Teil)
m(NHS) [mg]	5,7 (5,3 Teile)	6,3 (5,8 Teile)	1,9 (1,1 Teile)	1,9 (2,2 Teile)	3,5 (2,2 Teile)
m(DCC) [mg]	-	-	4,8 (1,5 Teile)	4,8 (3 Teile)	10 (3,5 Teile)
MPA, NHS und DCC in DMF gelöst:					
V(DMF) [μ L]	38	90	90	90	159,5
Anschließendes zugeben von DIC:					
V(DIC) [μ L]	12 (10,2 Teile)	11,7 (8 Teile)	-	-	-

Es wurde von der Standard Oberflächenchemie zur Funktionalisierung von homogenen Oberflächen auf Transducern ausgegangen und dann verschiedene Chemikalien im Überschuss zugesetzt und getestet. Sie ist auf der ganz linken Seite in Tabelle 2 gezeigt. Bei ihr wird 1 mol NHS mit 1,5 mol DIC kombiniert.

Parameter:

Es wurden Vorversuche gemacht, bei denen die Interaktion zwischen MPA auf der Oberfläche und der Mycophenolsäure Antikörperanbindung im Fluss detektiert wurde. Bei den Messungen von Prozedur B – D wurden die MPA-AKs mit der Konzentration $c = 0,033$ mg/ml bei jeder Messung verwendet. Die Messung von Prozedur A wurde mit der MPA-AK Konzentration $c = 0,018$ mg/mL durchgeführt.

Die Untersuchung der Oberflächen auf **unspezifische Wechselwirkungen** mit Fremdstoffen wurde mit einem Fremd-Antikörper durchgeführt. Übliche Blockreagenzien hätten zu einem sehr hohen und wenig aussagekräftigen Signal geführt, da MPA generell sehr gut an lipophile Substanzen an sich bindet. Dies liegt auf der Hand, da die Substanz sehr lipophil ist und im Körper zu einem hohen Prozentsatz an Blutplasmae Proteine wegen ihrer Lipophilie bindet.

Messungen der Prozeduren A - D:

Die Steigung der Bindungssignale der Antikörperanbindung ohne Analyt wurde ausgewertet und bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit verglichen, die Werte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Der Sensor wurde nach jeder Messung regeneriert. Die Regenerationsmittel wurden optimiert und angepasst.

Zu Beginn der Experimente mussten die Oberflächenchemie und die Regenerationslösungen in verschiedenen Parametern optimiert werden, um eine notwendige, gute Reproduzierbarkeit zu erreichen. In Vorversuchen musste die Reproduzierbarkeit der Wirkung von Regenerationslösungen bezüglich Konzentration, pH-Wert, Volumen der Lösung und Pumpgeschwindigkeit optimiert werden. Weiterhin wurde die mikrofluidische Anbindung aller Reagenzien optimiert und zur Vermeidung von Verdünnungseffekten direkt an das Ventil angeschlossen. Wenn immer nur ein Cup mit Regenerationslösung pro Messung und kein Vorratsgefäß angeschlossen wird, muss jedes Mal der Probenschlauch mit Puffer gespült werden, um Luftblasen aus dem Schlauch zu entfernen. Durch den Puffer im Schlauch wird das Regenerationsmittel zum Teil verdünnt über den Transducer geleitet. Bei Vorratsgefäßen wird also eine Verdünnung vermieden und keine Luft in den Schlauch gezogen, welche später entfernt werden müsste.

Speziell die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Messungen konnte mit den verschiedenen Spotting Prozeduren aus Tabelle 2 nach und nach verbessert werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Prozeduren A – D wurden alle Messungen gleich skaliert geplottet.

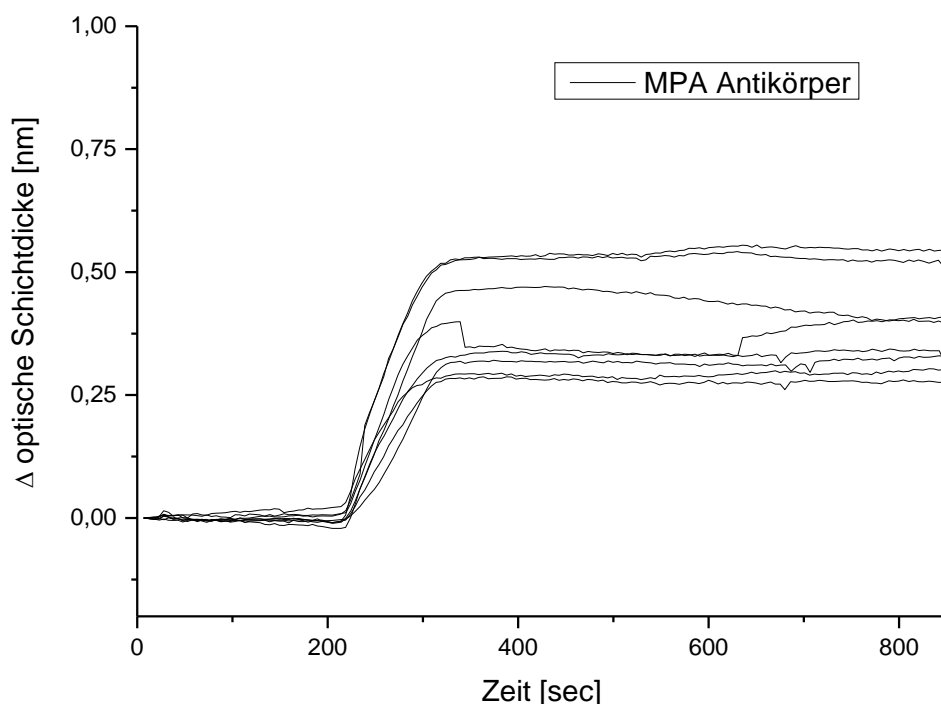


Abbildung 15: **Spotting Prozedur A:** Gezeigt sind acht Wiederholungsmessungen von MPA-Antikörpern. Es ist die Anbindung mit darauffolgender Regeneration (nicht gezeigt) gezeigt. Es ist die relative optische Schichtdicke [nm] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Prozedur A:

Abbildung 15 zeigt die Messungen, die auf einem Signaltransducer durchgeführt wurden, welcher mit Prozedur A gespottet wurde. Die Messungen zeigen deutliche Signale, was darauf schließen lässt, dass die Funktionalisierung erfolgreich verlaufen ist. Jedoch zeigen sie nur eine sehr geringe Reproduzierbarkeit bezüglich der Steigung und Signalhöhe. Außerdem

zeigte sich, dass GndCl als Regenerationsmittel nicht gut eignet ist. Bei den folgenden Versuchen wurde deswegen SDS verwendet. Die Regeneration ist unzureichend oder die gespottete Oberfläche instabil. Außerdem wurde bei Prozedur A noch kein Muster zwischen das 8 · 8 Spotmuster hinein gedruckt. Diese geringere Oberflächenbeladung führte eventuell zusätzlich zu den relativ niedrigen und stark streuenden Signalen.

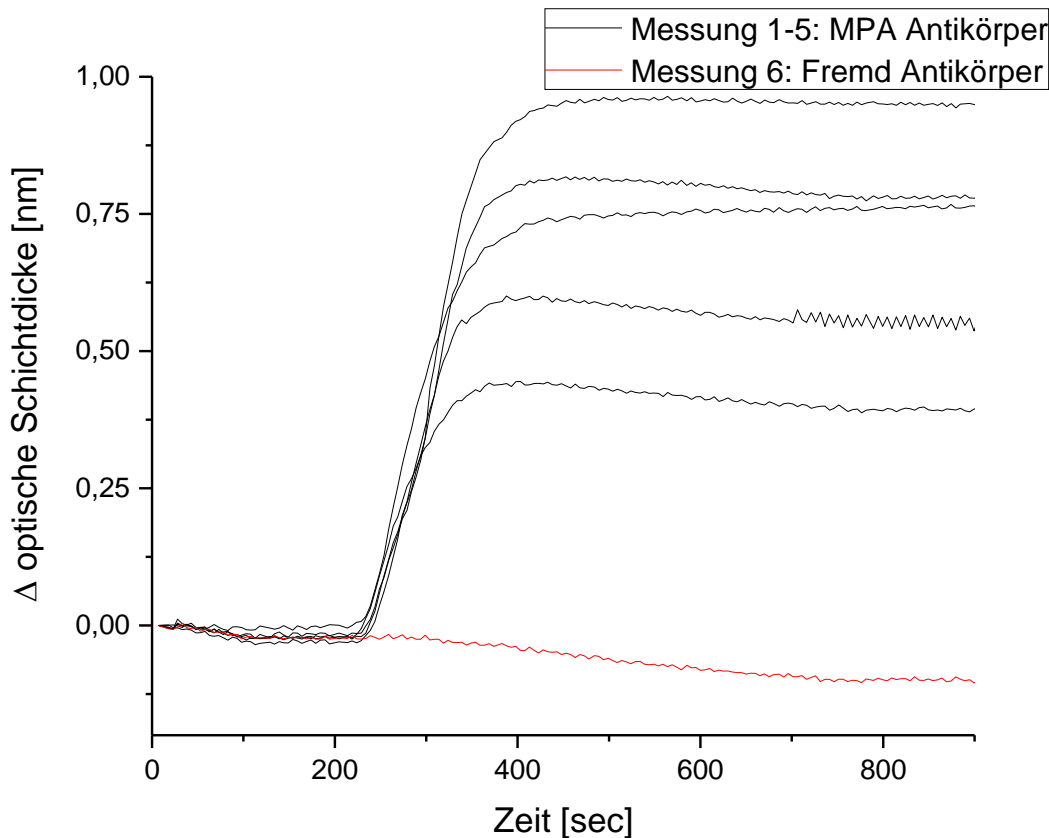


Abbildung 16: **Spotting Prozedur B:** Die Messungen 1 - 5 sind Wiederholungsmessungen von MPA-Antikörpern. Messung 6 zeigt den Test auf unspezifische Wechselwirkungen mit einem Fremd-Antikörper. Es ist die relative optische Schichtdicke [nm] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Prozedur B:

Spotting Prozedur B zeigt höhere Signale, da die Oberflächenbeladung mit MPA höher ist. Jedoch ist noch immer eine schlechte Reproduzierbarkeit gegeben, da die Basislinie nach der Regeneration nicht erreicht wird (nicht in Abbildung gezeigt). Messung 6 zeigt den Test auf unspezifische Wechselwirkungen mit einem Fremd-Antikörper, es wird keine Anbindung detektiert. Die Abschirmung der Oberfläche gegen unspezifische Wechselwirkungen funktioniert somit, aber die Regeneration ist unzureichend und die Oberfläche vermutlich instabil.

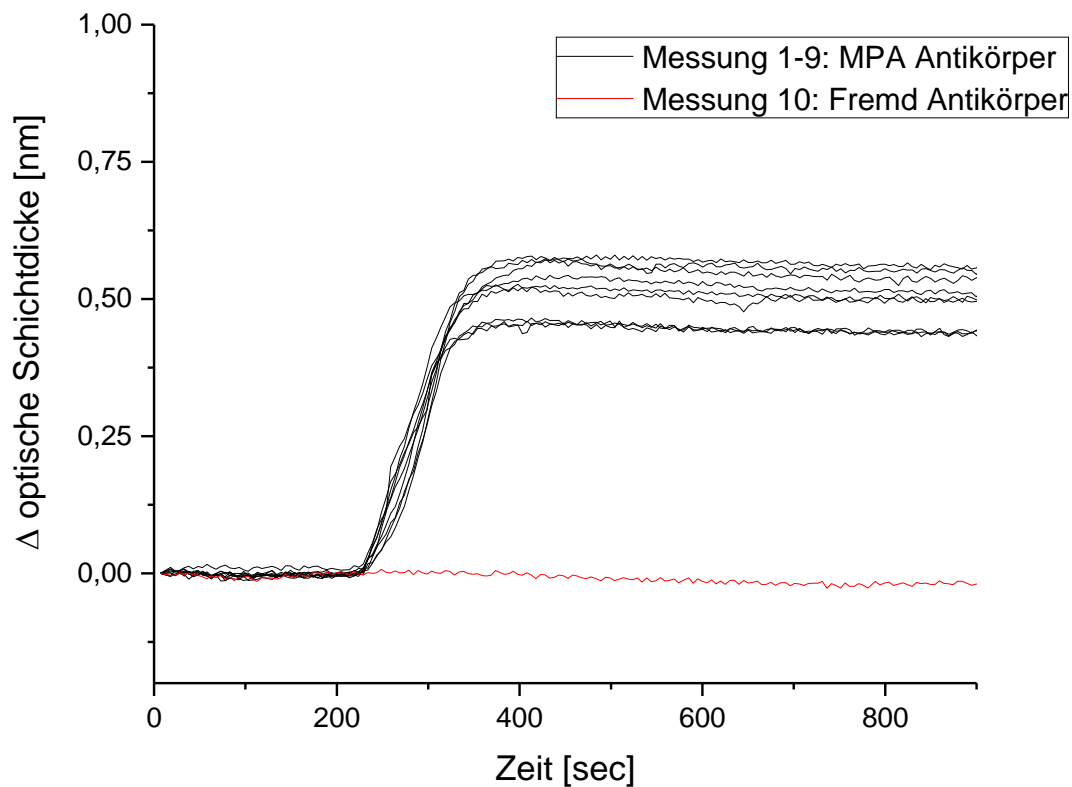


Abbildung 17: **Spotting Prozedur C:** Die Messungen 1 - 9 sind Wiederholungsmessungen von MPA-Antikörper Detektionen. Messung 10 zeigt den Test auf unspezifische Wechselwirkungen mit einem Fremd-Antikörper. Es ist die relative optische Schichtdicke [nm] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Prozedur C:

Um die Reproduzierbarkeit der Signale zu erhöhen, wurde die Beladung der Oberfläche mit MPA reduziert. Dadurch wird die Hydrophobizität der Oberfläche verringert und die Abschirmung der Oberfläche verbessert. Die Wahrscheinlichkeit, dass der MPA-Antikörper spezifisch anbindet, wird erhöht. Man könnte bei oberflächlicher Betrachtung annehmen, dass dies im Widerspruch zu den Messungen mit dem Fremd-Antikörper stünde, welche schon bei Prozedur B mit hoher Oberflächenbeladung eine ausreichende Abschirmung der Oberfläche attestieren. Jedoch ist der MPA-Antikörper schwierig zu handhaben weil er vermutlich über einige lipophile Domänen verfügt. Es wurde auch bei Prozedur C mittels des Fremdantikörpers eine gute Abschirmung nachgewiesen.

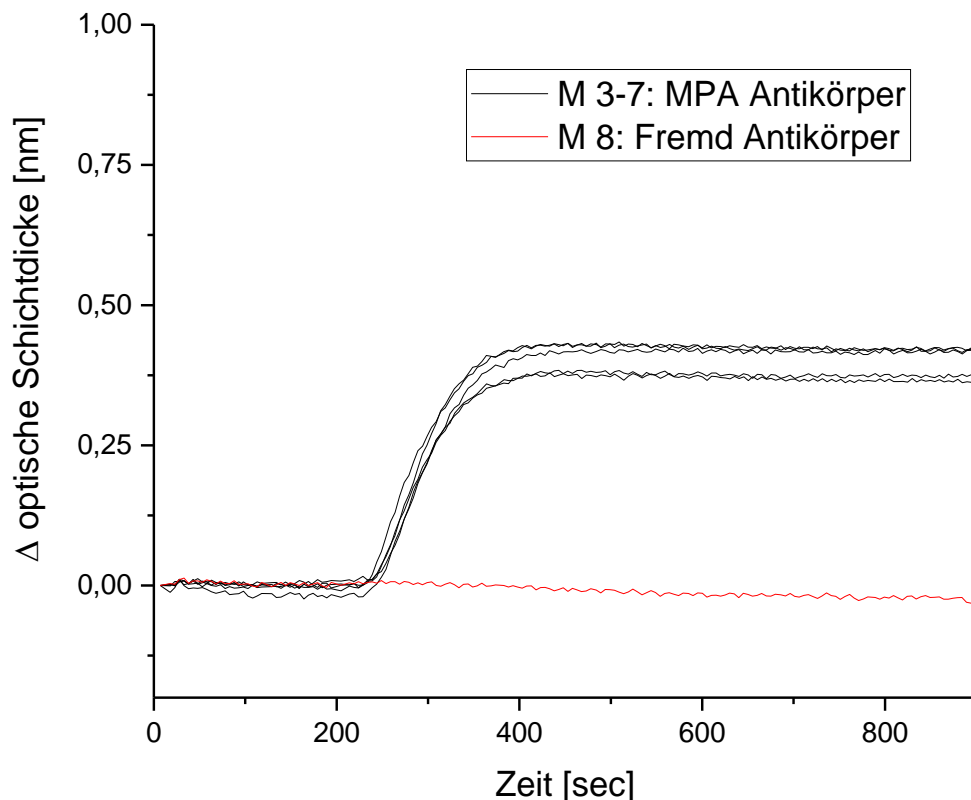


Abbildung 18: **Spotting Prozedur D:** Die Messungen 1 - 5 sind Wiederholungsmessungen von MPA-Antikörper Detektionen. Messung 6 zeigt den Test auf unspezifische Wechselwirkungen mit einem Fremd-Antikörper. Es ist die relative optische Schichtdicke [nm] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Prozedur D:

Bei Spotting Prozedur D wurde auf eine Inkubation der Reagenzien vor dem Spotten verzichtet. Generell sind niedrige MPA Konzentrationen auf der Oberfläche zuverlässiger regenerierbar. Bei den durchgeführten Messungen wird ab der dritten Messung auf dem Transducer eine deutlich bessere Regenerierbarkeit und Stabilisierung der Oberfläche erreicht. Die ersten beiden Messungen wurden verworfen, sodass erst die dritte Messung als Messung 1 bezeichnet wird. Die Messung 6 mit dem Fremd-Antikörper zeigt kein Bindungssignal. Somit wurde eine gute Anbindung nachgewiesen. Prozedur D zeigt eine zuverlässige Regenerierung und gut reproduzierbare Messungen.

Ergebnisdiskussion:

Zusammenfassend wird aus Tabelle 3 ersichtlich, dass das Spotten von Prozedur A bis D stetig verbessert werden konnte. Es wurden immer 15 aufeinanderfolgende Datenpunkte im linearen Anfangsbereich der Probeninjektion, wie in Kapitel 2.4, ausgewertet. Alle gezeigten Messungen wurden ausnahmslos in die Auswertung einbezogen.

Tabelle 3: Vergleich der erhaltenen Messsignale aus den einzelnen Spottingvarianten.

Prozedur:	A	B	C	D
Mittlere Anfangssignalsteigung:	0,00443	0,00609	0,004773	0,003898
Standardabweichung:	0,00118	0,000973	0,00041	0,00021
Prozentuale Standardabweichung:	26,64 %	15,97 %	8,69 %	5,5 %

Es wurde nachgewiesen, dass eine hohe MPA Konzentration in der Spottinglösung zu hohen Signalen führt, aber gleichfalls zu hohen Standardabweichungen. Die optimierten Spotting Prozeduren C und D sind gute Alternativen zur in Kapitel 3.2.2 gezeigten ganzflächigen Oberflächenfunktionalisierung. Prozedur D ist eine etwas bessere Variante und außerdem zeitsparend, da die Inkubationszeit vor dem Spotten wegfällt. Prozedur C und D wurden verwendet, um heterogene Immunoassaymessungen auf gespotteten Oberflächen im LIF-Messaufbau durchzuführen. Diese werden in Kapitel 4.8.3.3 beschrieben und diskutiert.

3.2.3.7. Proof-of-Principle: MPA Immunoassay mit Fluoreszenz-Sekundärantikörpern:

Proof of Principle Messungen wurden durchgeführt um zu beweisen, dass der bei den Spotting Prozeduren A bis D verwendete MPA Immunoassay auch fluoreszenzbasiert durchgeführt werden kann. Mittels der labelfreien Methode RfS wurde nachgewiesen, dass fluoreszenzgelabelte sekundär Anti-IgG Antikörper nur dann anbinden, wenn MPA-Antikörper an die durch spotten mit MPA funktionalisierte Oberfläche angebunden sind. Durch diesen Anbindungsschritt wird gezeigt, dass Messungen des Assays im LIF-Messaufbau möglich sind und Signale erhalten werden können.

Parameter:

Es wurde die noch nicht optimierte Spotting Prozedur A für die Oberflächenfunktionalisierung verwendet. Es wurde dieselbe Menge MPA-AK wie beiden Messungen mit Spotting Prozedur A (0,018 mg/mL) verwendet. Die Konzentration an fluoreszierendem Sekundärantikörper beträgt 0,027 mg/mL.

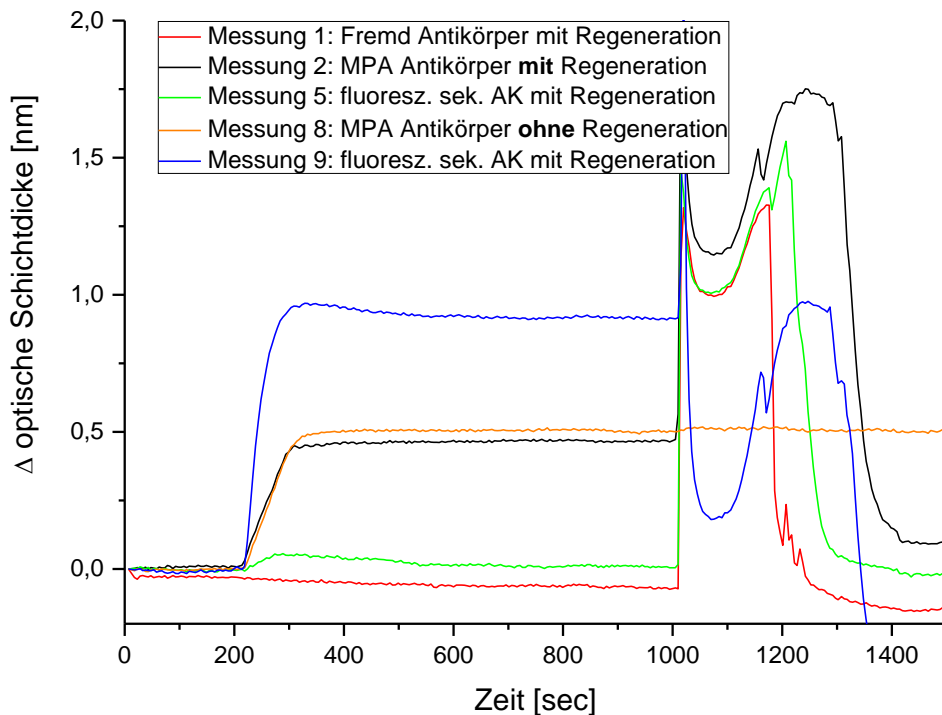


Abbildung 19: Die schwarze und orangene Kurve zeigt, dass MPA-AKs in etwa reproduzierbar an die Oberfläche anbinden. Die grüne Messkurve zeigt, dass ohne MPA-AKs auch keine Sekundär-Antikörper anbinden. Die blaue Kurve zeigt das Bindungssignal des Sekundärantikörpers (Alexafluor), wenn MPA-AKs sich auf der Oberfläche befinden. Die rote Kurve ist der Test auf unspezifische Wechselwirkungen mit einem Fremd-Antikörper. Es wurde mit SDS 0,5 %, pH= 1,9 regeneriert.

Die Aussagen der Messungen aus Abbildung 19 werden im Folgenden diskutiert. Um die unspezifische Wechselwirkung der Oberfläche mit fremden Substanzen zu charakterisieren wurde ein für MPA nicht spezifischer Fremd-Antikörper verwendet. Übliche Blockreagenzien hätten zu einem sehr hohen und wenig aussagekräftigen Signal geführt, da MPA generell sehr gut lipophile Substanzen an sich bindet. In Messung 1 wird nachgewiesen, dass Fremd-Antikörper nicht auf der Oberfläche anbinden, die Abschirmung gegen unspezifische Wechselwirkungen ist somit erfolgt. Bei der Messung 2 erfolgte die Anbindung von MPA-Antikörpern auf der mit MPA funktionalisierten Oberfläche und weiterhin ist die anschließende Regenerierung der Sensoroberfläche ab Sekunde 1005 dargestellt. Bei Messung 5 ist zu sehen, dass fluoreszierende sekundäre Anti-IgG-Antikörper nicht anbinden und nur eine geringe unspezifische Wechselwirkung zeigen, wenn kein MPA-Antikörper auf der Oberfläche angebunden ist. Messung 8 zeigt die MPA-Antikörper Anbindung ohne Regeneration. Bei Messung 9 ist die Anbindung der fluoreszierenden Sekundär-Antikörper an die MPA-Antikörper auf der Oberfläche zu sehen. Messung 8 und 9 zeigen, dass fluoreszierende Sekundärantikörper nur dann anbinden, wenn MPA-AKs sich auf der Oberfläche befinden.

Die Regeneration bei Messung 9 ab Sekunde 1350 ist so stark ausgeprägt, da 2 „Schichten“ Antikörper vom Transducer entfernt werden und zu Beginn jeder Messung auf 0 referenziert wird, dadurch fällt das Signal unter den referenzierten Nullwert.

Mittels RfS Messungen konnte nachgewiesen werden, dass der heterogene MPA Immunoassay mit fluoreszenzgelabelten Sekundär-Antikörpern funktioniert und im LIF-Messaufbau eingesetzt werden kann.

3.2.4. Oberflächenpräparation der Partikel

Die Oberflächenpräparation der verwendeten magnetischen Partikel wurde von Kathrin Freudenberger durchgeführt. Die Funktionalisierungsprotokolle der Micromer® M Partikel sind in der Dissertation von Kathrin Freudenberger [19] zu finden. Die in Tabelle 4 aufgelisteten Partikel wurden für die Messungen der homogenen Immunoassays in Kapitel 4.8.4 verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Partikel und deren Einsatzzweck.

Partikel	Durchmesser	Einsatzzweck	Verwendet in Kapitel
Micromer®M -NH ₂	3 µm	mit MPA und Testosteronoxim gelabelt	4.8.4.1, 4.8.4.3, 4.8.4.4, 4.8.4.5
ScreenCORE®/R	1 µm	mit MPA-AKs gelabelt	4.8.4.4

Das Labeling der fluoreszierenden ScreenCORE®/R Protein G Partikel mit MPA-AKs wurde vom Verfasser durchgeführt. Es wurde nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers vorgegangen, da eine deutlich geringere Menge als vorgesehen benötigt wurde und die Partikel im Immunoassay statt zur IgG Aufreinigung verwendet wurden.

Es wurden im ersten Schritt 200 µL ScreenCORE®/R Partikel mit 200 µL W & B Puffer versetzt und mit 2730 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt, die Partikel am Schluss in 100 µL resuspendiert. Die Antikörperlösung soll nun mit W & B Puffer 1:1 gemischt werden. Die Maximalkonzentration nach Herstellerangabe ist 3,3 mg/mL. In 100 µL wurde die halbe Konzentration mit 1,6 mg/mL MPA-AKs eingesetzt und mit 100 µL W & B Puffer versetzt. Die ScreenCORE®/R Partikel werden zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wird zweimal wiederholt und die Partikel schließlich im letzten Schritt in 300 µL PBS resuspendiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Zunächst wird der LIF-Messaufbau und dessen Entwicklung vorgestellt, dann die darin durchgeführten Messungen gezeigt.

4.1. Der Nanodem LIF-Messaufbau

Im Nanodem Messaufbau wird mittels der laserinduzierten Fluoreszenz (LIF) Fluoreszenz von Fluorophoren im Flusskanal angeregt und detektiert. Der ultra-low-noise-solid-state-Laser regt bei der Wellenlänge $\lambda = 593,5$ nm mit einer Leistung von 20 mW an. Für diese Anregungswellenlänge wurden passende Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt. Ein

Langpassfilter schirmt die Anregungswellenlänge des Lasers, je nach Ausrichtung, weitgehend ab. Der Filter besitzt die, wie in Abbildung 20 gezeigten, optischen Eigenschaften. Die Absorption und Emission des Farbstoffes DY636 wurde beispielhaft in das Schaubild eingezeichnet. Messungen in Humanserum zeigen, dass eine langwellige Anregungswellenlänge, wie zum Beispiel $\lambda = 593,5$ nm von Vorteil ist. Später sollen im Messaufbau Proben aus Patientendialysat im Volumen der Flusszelle detektiert werden können.

Das Spektrale Design, die Auswahl der Anregungswellenlänge und die des Absorptionsfilters wurden zusammen mit Marcel Berner vom IPV interdisziplinär diskutiert und entschieden.

4.1.1. Auswahl der Anregungswellenlänge:

Bei der Auswahl der Anregungswellenlänge und unteren Wellenlängenbegrenzung des LIF-Messaufbaus müssen einige limitierende Faktoren bedacht werden.

Das Hauptkriterium, nach dem die Auswahl der Anregungswellenlänge erfolgte, war die bestmögliche Vermeidung von Eigenfluoreszenz. Die Eigenfluoreszenz der Matrix und von Immunoassaybestandteilen, mit denen im Aufbau später einmal gemessen werden soll, muss minimiert werden. Sie hätte die Messungen signifikant verfälscht und möglicherweise komplett unbrauchbar gemacht. Der LIF-Messaufbau soll, wie in Kapitel 2.10 eingeführt, Immunoassays in verdünnten Proben aus Humanserum oder aus Dialysat messen können.

Im Arbeitskreis wurden von Patricia Weber im Rahmen ihrer Diplomarbeit [59] Vorversuche zu diesem Thema gemacht. Die im Folgenden diskutierten Messungen stellen ein „Worst-Case-Szenario“ dar, da in verdünntem Dialysat weniger störende Bestandteile zu erwarten sind, als in den gemessenen puren Seren. Sie zeigten, dass je nach Spender und dessen Gesundheits- und Ernährungsstatus (nüchtern oder nach einer fettigen Mahlzeit) die Absorption des Serums sehr unterschiedlich ausfällt. Deshalb kann die Eigenfluoreszenz von Humanseren nicht absolut bestimmt oder vorausgesagt werden.

Es können aber allgemein gültige Trends erhalten werden. Bei den untersuchten gepoolten Humanseren wurde zwischen 400 und 700 nm in Schritten von 20 nm beginnend bei 400 nm angeregt. Es wurde jeweils 20 nm über der Anregungswellenlänge bis 700 nm das Eigenfluoreszenzspektrum schrittweise detektiert. Die Messungen zeigten, dass bei einer längeren Anregungswellenlänge die Absorption und in Folge dessen auch die Eigenfluoreszenz (Autofluoreszenz) signifikant abnimmt und diese folglich prinzipiell besser geeignet sind. Bei verbreitet genutzten Anregungswellenlängen wie bei 473 nm ist die Eigenfluoreszenz von unverdünnten Humansera relativ stark ausgeprägt, daher wurde in dem vorgestellten LIF-Messaufbau eine signifikant längere Wellenlänge gewählt. Natürlich ist die Wellenlänge von 473 nm für manche Problemstellungen geeignet, aber nicht für die vorliegende Fragestellung.

Die Anregungswellenlänge wurde folglich so weit in den langwelligen Bereich verschoben, wie es die Komponenten zulassen: in den Bereich zwischen 580 und 600 nm. Bei der Wellenlänge von 593 nm wurde eine bezahlbare, stabile und rauscharme Laserlichtquelle von Marcel Berner an der Uni Stuttgart gefunden und beschafft.

4.1.2. Auswahl des Farbstoffes und Absorptionsfilters:

Bei der Auswahl des Farbstoffes und Absorptionsfilters muss die obere Wellenlängenbegrenzung beachtet werden.

Der spektrale Abstand zum Absorptionsfilter muss ausreichend sein, damit dieser das Licht der Anregungswellenlänge ausreichend stark von den Photodioden abschirmt. Der Abstand sollte mindestens ca. 50 nm betragen. Außerdem soll der Filter möglichst schmalbandig sein und stark absorbieren. Schmalbandig bedeutet, dass der Filter in einem kleinen Bereich eine hohe Steigung von 100 % auf 0 % Transmission aufweist.

Der Bereich des Absorptionsfilters überschneidet sich im gezeigten Setup etwas mit dem Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes (Abbildung 20). Würde man die Anregungswellenlänge in noch längerwellige Bereiche verschieben wollen, um die Eigenfluoreszenz weiter zu minimieren, könnte man zum Beispiel die Anregungswellenlänge von 632,8 nm wählen. Folglich müsste der Filter für eine vergleichbare Signalunterdrückung das Licht ab 685 nm absorbieren. Mit den verwendeten Photodioden ist es aber nicht möglich, da sie in dem angestrebten Detektionsbereich nicht mehr ausreichend sensitiv sind. Das amorphe Silizium Absorbermaterial hat relativ niedrige Absorptionskoeffizienten für lange Wellenlängen. Dadurch nimmt die Quanteneffizienz des Detektors für Photonen längerer Wellenlänge deutlich ab. Die Photodioden fangen ab einer Wellenlänge von 680 nm und längerwelliger an, signifikant in ihrer Sensitivität abzunehmen. Folglich würde der Hauptteil der Emission verloren gehen und das erhaltene Signal sehr klein. Um genau dies zu vermeiden und einen Kompromiss zwischen maximaler Anregungslichtunterdrückung und maximaler Emissionssignalausbeute zu erhalten, wurde die vorliegende optimierte Konfiguration gefunden.

4.1.3. Zusammenfassung zu spektralem Design:

In dem spektralen Bereich zwischen oberer und unterer Grenze müssen die Anregungslichtquelle, der Fluoreszenzfarbstoff und der Absorptionsfilter vor den Photodioden eingepasst werden. Es muss ein Kompromiss zwischen der Unterdrückung der Anregungslichtquelle und der Signalstärke der Fluoreszenz des Fluorophores gefunden werden. Die Eigenfluoreszenz der Sera oder Dialysate setzen die untere Grenze für die Anregungswellenlänge und die spektrale Limitierung der Photodioden [48] die obere Grenze.

Als guter Kompromiss wurde die Wellenlänge von 593 nm gewählt, um die Störung der Fluoreszenzdetektion durch Bestandteile des zu untersuchenden verdünnten Humanserums, Dialysates oder Immunoassaybestandteils mittels Eigenfluoreszenz zu vermeiden und ein starkes Fluoreszenzsignal (hohe Absorption des Farbstoffes) zu erhalten. Im gewählten Bereich gibt es eine größere Auswahl an stabilen Fluoreszenzfarbstoffen. Es wurden verschiedene passende Fluoreszenzfarbstoffe getestet. Der Farbstoff DY636 erwies sich in den gezeigten Messungen als sehr gut zu den Eigenschaften des LIF-Messaufbaus passend und wurde daher ausgewählt.

4.1.4. Eigenschaften DY636:

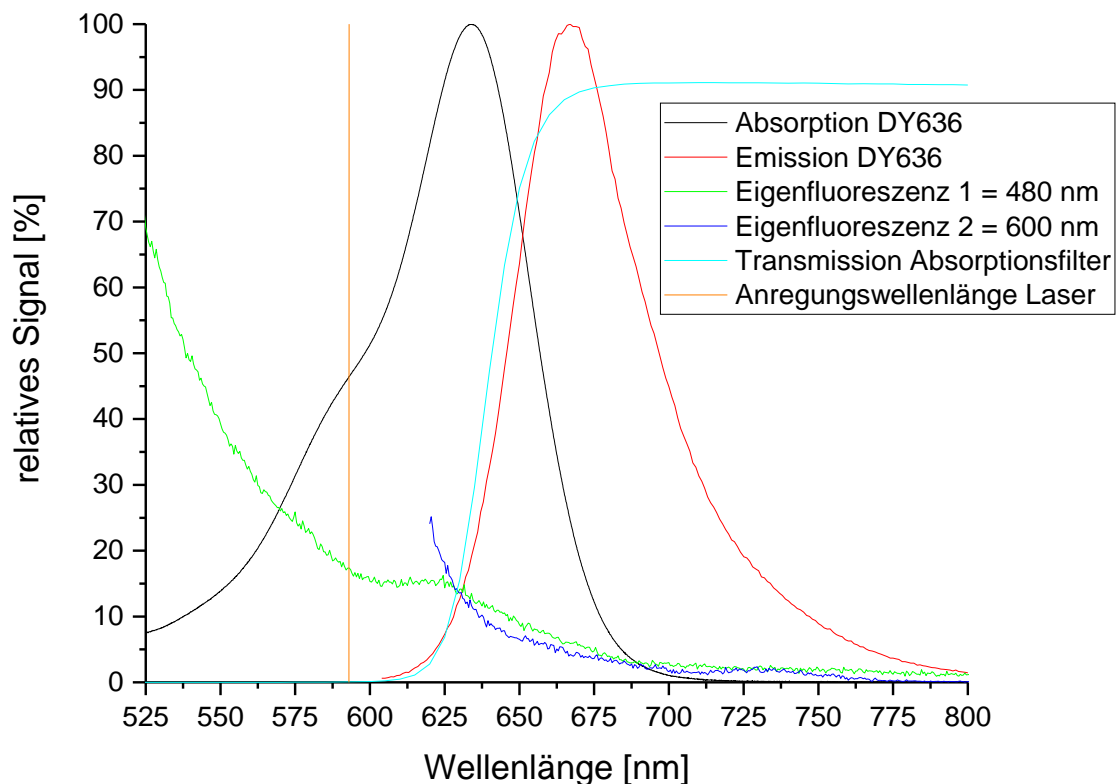


Abbildung 20: Die Anregungswellenlänge des Lasers $\lambda = 593 \text{ nm}$ ist in Orange eingezeichnet. Die Absorption des Farbstoffes DY636 in Schwarz, die Emission ist in Rot gezeigt. Die Transmission des Absorptionsfilters ist in Hellblau eingezeichnet. Die beiden Eigenfluoreszenzmessungen in Grün und Blau. Es ist das relative Signal der Messungen [%] gegen die Wellenlänge [nm] aufgetragen. Bei der Absorptions- und Emissionsmessung wurde jeweils der höchste Wert als 100 % gesetzt. Bei der Transmissionsmessung wurde eine theoretische 100%ige Transmission als 100 % gesetzt. Bei den Eigenfluoreszenzmessungen wurde der höchste Wert (nicht gezeigt) der Messung 1 als 100 % gesetzt. Messung 2 wurde im Bezug zu Messung 1 in ihrer Größe skaliert.

Abbildung 20 gibt die optischen Parameter des LIF-Messaufbaus wieder. Der im Schaubild exemplarisch gezeigte Fluorophor DY636 wird in Kapitel 4.6 zu Kalibriermessungen im LIF-Messaufbau verwendet. Die Anregungswellenlänge des Lasers mit $\lambda = 593 \text{ nm}$ ist in Orange dargestellt. Das Fluorophor DY636 wird auf einer linken Schulter, wie aus der Absorptionsmessung des DY636 in Schwarz ersichtlich, angeregt. Sein Emissionsspektrum ist in Rot dargestellt. Die Messungen wurden in Reinstwasser durchgeführt. In Reinstwasser hat der Fluoreszenzfarbstoff DY636 eine Quantenausbeute von 10 %. Bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 593 \text{ nm}$ hat der DY636 eine normalisierte Absorption von 46,8 %. Der Absorptionsfilter vor den Messphotodioden transmittiert am Peak der Emissionswellenlänge des DY636 87 % des Lichtes. Bei der Anregungswellenlänge des Lasers ist er praktisch undurchlässig. Er ist in Hellblau dargestellt. Eigenfluoreszenzmessung 1 (Grün) wurde bei 480 nm und Messung 2 (Blau) bei 600 nm angeregt. Beide wurden in 100 % Humanserum gemessen. Es ist sehr gut ersichtlich, dass bei einer Anregung von 600 nm ein deutlich geringeres Eigenfluoreszenzsignal erhalten wird.

4.1.5. Der LIF-Messaufbau:

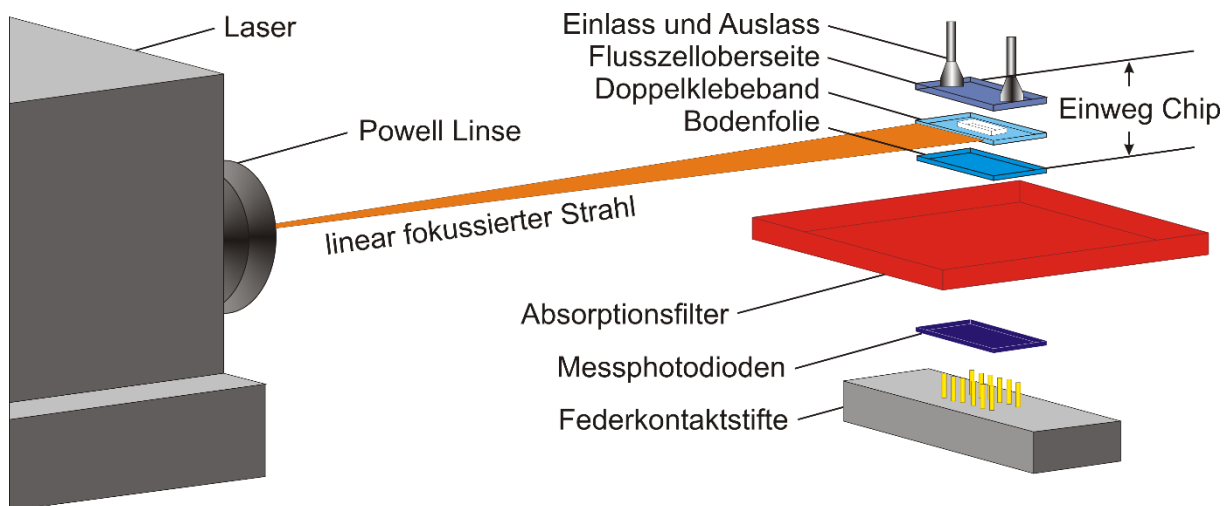


Abbildung 21: Gezeigt ist eine Explosionszeichnung der wichtigsten Komponenten des Laser-Induzierte-Fluoreszenz (LIF)-Messaufbaus. Der Aufbau ist für Fluoreszenzmessungen im Volumen optimiert. Die Abbildung ist nach einer technischen Zeichnung von Marcel Berner angefertigt worden.

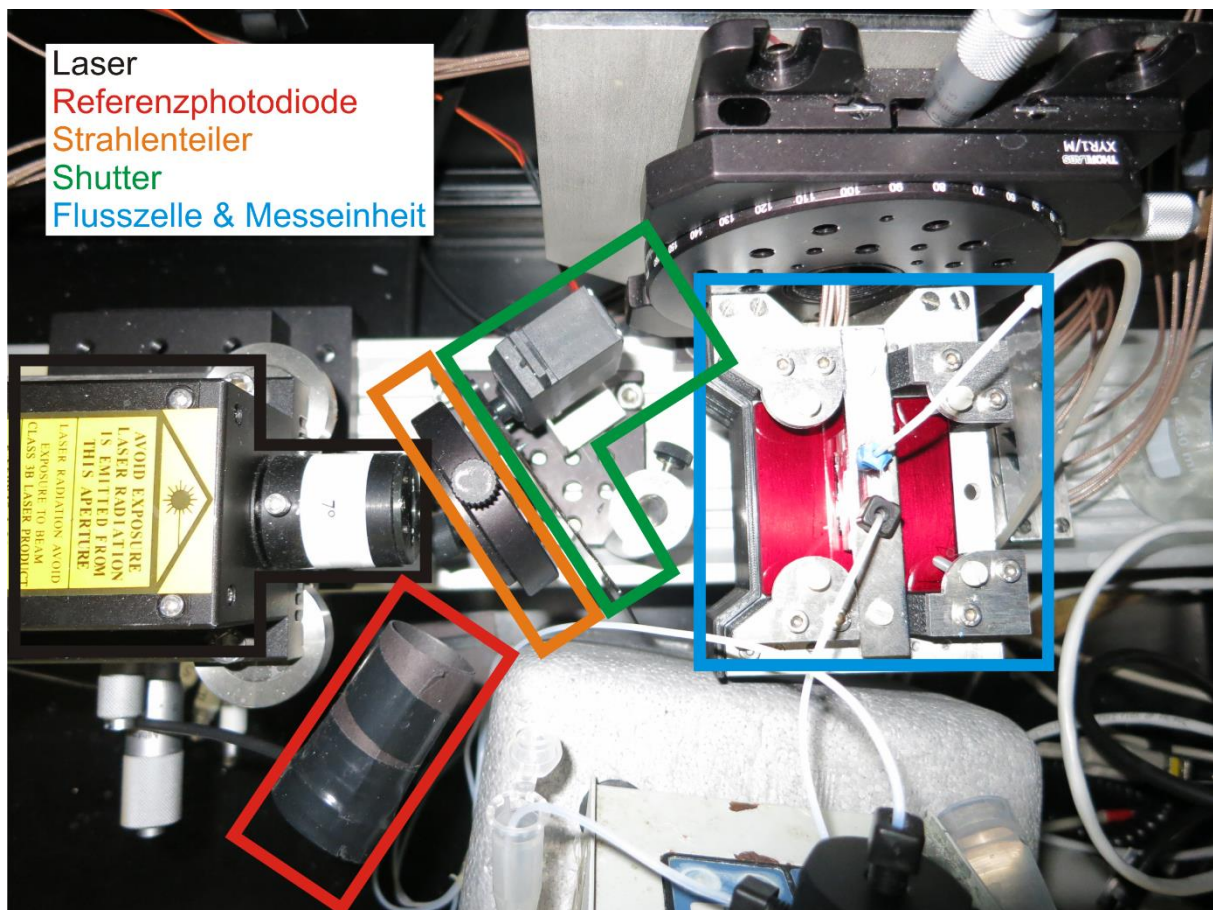


Abbildung 22: Aufsicht auf den LIF-Messaufbau: Auf der linken Seite ist der Laser zu sehen, mittig oben der Shutter, darunter die Referenzphotodiode und der Strahlenteiler, rechts die Flusszelle mit darunter liegendem Absorptionsfilter (rote Fläche)

Die optischen Komponenten, die Halterungen und Schiene (Abbildung 22) wurden von Marcel Berner am IPV der Universität Stuttgart entwickelt.

Es wird in eine direkt am Laser verbaute Powell Linse eingekoppelt, um einen linienförmigen Focus auf der langen Seite des Flusskanals zu erhalten. Der Strahl beleuchtet die Doppelklebebandschicht des austauschbaren Einweg-Flusskanals, welche die Wände des Flusskanals ausbildet. Im Gegensatz zu einer üblichen Zylinderlinse erzeugt eine Powell Linse eine gleichmäßig ausgeleuchtete Linie auf ihrer gesamten Länge. Bei einem Abstand von 20 cm zwischen Laser und Flusszelle öffnet sich der Strahl auf 2 cm Breite und leuchtet das Doppelklebeband des Flusskanals auf seiner gesamten Länge gleichmäßig aus.

Ein Absorptionsfilter blockt Streulicht der Anregungslichtquelle welches, zum Beispiel an den Flusskanalwänden, durch das Doppelklebeband entsteht. Ein Halter aus Teflon® mit Federkontaktstiften verbindet die Photodioden auf den Photodioden-Chips mit einem Amperemeter und Netzteil.

Die Photodioden sind im Bereich von 400 – 740 nm bei der verwendeten Biasspannung von 0 V sensitiv [48]. Durch das Blocken des Absorptionsfilters wird allerdings nur der Bereich 650 – 740 nm genutzt.

Die kurze Seite der Laserlinie hat eine Weite von ungefähr 400 µm. Während den Messungen am Aufbau zeigte sich, dass die Ausrichtung des fokussierten Laserstrahls auf den Flusskanal unkritisch und zuverlässig ist. Mittels einer Mikrometerschraube kann die relative Höhe zwischen dem Flusskanal und der Laserlinie eingestellt werden. Die betroffene schmale Seite der Laserlinie ist etwa dreimal breiter als die Höhe der wellenleitenden Träger des Doppelklebebandes (in Abbildung 23 zu sehen). Deswegen sind Einkopplung und deren Effizienz einfach einzustellen und auszurichten und unempfindlich gegenüber kleinen Variationen in der vertikalen Höhe. Die korrekte Ausrichtung bleibt bei einem Tausch des Flusskanals erhalten. Der Tausch kann somit sehr einfach durchgeführt werden.

Das Laserlicht ist im planaren Wellenleiter und den anderen Schichten des Stacks horizontal polarisiert und stimmt mit der TE (transversal elektrisch) Mode überein. Simulationen an der Universität Stuttgart (IPV, Marcel Berner) mit der Software Zemax® zeigten, dass die TE-Mode eine vernachlässigbar höhere Einkoppeleffizienz für ideal rechtwinklige Ausrichtungen als die TM-Mode (transversal magnetic) hat. Gerade in Bezug auf die Ausrichtung und die Einkopplung des Laserlichtes besitzt die TE-Mode Vorteile. Sie ist robuster bezüglich leichter Fehlansichtungen des Einstrahlwinkels der Laserstrahlung auf die Flusszelle im Messaufbau und deswegen zu bevorzugen. Wie in Abbildung 23 eingezeichnet, wird in den Simulationen davon ausgegangen, dass die Trägerfolie zwischen den beiden Klebstoffschichten der Wellenleiter ist.

4.2. Das LIF-Detektionsprinzip

Im Messaufbau wird das LIF (Laser Induzierte Fluoreszenz) Prinzip angewendet. Der Laser (Anregungslicht) beleuchtet von der Seite die Flusszelle mit dem zu detektierenden Fluorophor. Dieses emittiert daraufhin längerwelliges Licht in alle Richtungen. Um möglichst wenig Anregungslicht und Streuung zu detektieren, wurde mit einem Absorptionsglasfilter vor der Photodiode und in (zunächst) orthogonaler Ausrichtung gemessen.

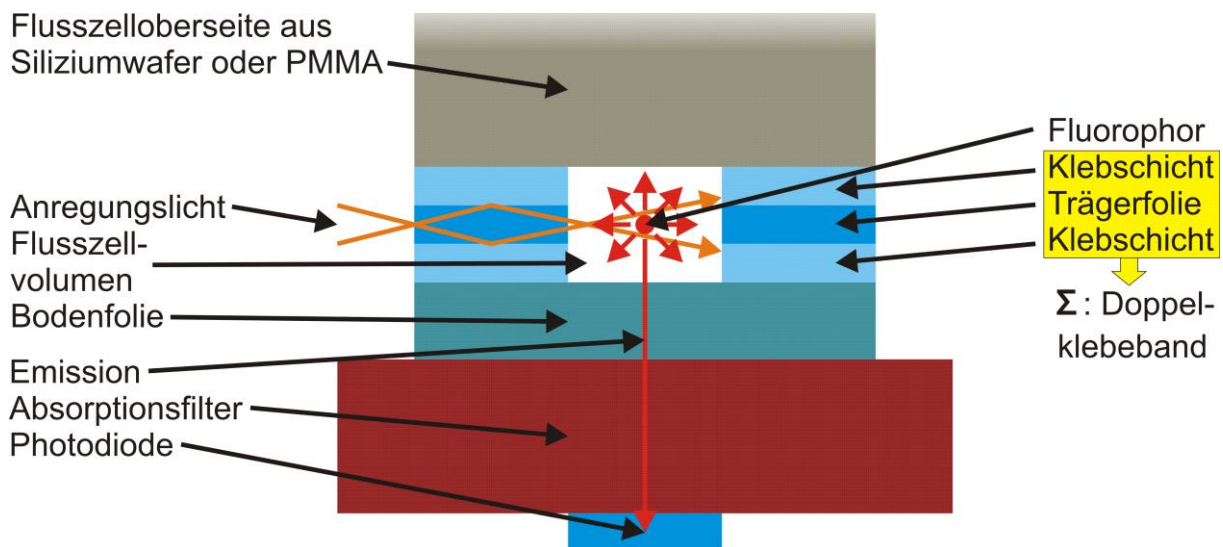


Abbildung 23: Das LIF-Detektionsprinzip im realisierten Messaufbau. Längsschnitt in der Mitte zwischen Einlass und Auslass der Fluidik.

Das LIF-Detektionsprinzip ermöglicht den Nachweis von fluoreszenzgelabelten Immunoassays in mikro- bis hin zu picomolaren Konzentrationen. Es wird in Verbindung mit mikrofluidischen Chips in verschiedenen Einsatzgebieten verwendet. So wurden Lab-on-a-chip [60], Kapillarelektrophorese [47, 61, 62] und miniaturisierte Biosensoren [63-65] realisiert. Je nach Detektionsprinzip und Implementierung wird die Detektion im Flusszellvolumen oder auf einer funktionalisierten Oberfläche durchgeführt [66-68]. Die zitierten Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass miniaturisierte, integrierte Systeme mit geringen Betriebskosten realisierbar sind.

Mittels totaler interner Reflektions Fluoreszenz (TIRF) wurden in der Arbeitsgruppe Gauglitz [69-71] und in anderen Arbeitsgruppen [72] schon viele fluoreszenzbasierte Immunoassays entwickelt. Bei TIRF werden Immunoassays auf einer funktionalisierten Oberfläche detektiert, indem fluoreszenzgelabelte Analyten mittels evaneszenter Felder angeregt werden. Die evaneszenten Felder werden durch in Totalreflektion eingekoppeltes Laserlicht erzeugt. Es werden ausschließlich oberflächennahe Fluorophore detektiert. Obwohl auf einigen Oberflächen sehr viele Messungen durchgeführt werden konnten, ist die Regenerierbarkeit oder Wiederbenutzbarkeit der Oberfläche der limitierende Faktor für den Einsatz der auf diese Weise entwickelten Biosensoren. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurde in dieser Arbeit der Immunoassay auf eine Messung auf Partikeln im Volumen übertragen. Um diese Partikel im Volumen zu detektieren, wurde das LIF-Detektionsprinzip für diese Arbeit gewählt. Im Vergleich zu TIRF kann bei LIF ein definiertes Volumen der Flusszelle ausgeleuchtet und für die Detektion von fluoreszierenden Partikeln oder Antikörpern im Volumen und gegebenenfalls auf der Oberfläche verwendet werden.

4.3. Auswertung der Messungen

Tabelle 5: Alle in der Arbeit durchgeführten Immunoassays mit deren Auswertungsprinzip und verwendeten Reagenzien.

Immunoassayart	Immunoassareagenzien	Auswertungsprinzip	Kapitel
----------------	----------------------	--------------------	---------

Heterogen, Direkter Assay	Oberfläche: Biotin, fluoreszierende Streptavidin Partikel	AUC, Signalplateauhöhe	4.8.3.1
Heterogen, Bindungsinhibition	Oberfläche: ganzflächig MPA, fluoreszenzgelabelte MPA-AKs	AUC, Signalplateauhöhe	4.8.3.2
Heterogen, Bindungsinhibition	Oberfläche: gespottete MPA, MPA, MPA-AKs, fluoreszenzgelabelte Anti-IgGs allgemein und Anti-Fc	AUC, Signalplateauhöhe	4.8.3.3
Homogen, Bindungsinhibition	MPs-MPA (3 µm), MPA, MPA-AK, fsAKs Anti-IgG	AUC (Zeit/Wellenlänge)	4.8.4.1
Homogen, Bindungsinhibition	MPs-MPA (3 µm), MPA; MPA-AKs, fsAKs Anti IgG Fc Teil	AUC	4.8.4.3
Homogen, Bindungsinhibition	MPs-MPA (3 µm), MPA, FPs mit MPA-AKs (1 µm)	AUC	4.8.4.4
Homogen, leicht modifizierte Bindungsinhibition	MPs-MPA (3 µm), MPs-Testosteronoxim (3 µm), MPA, MPA-AKs, fsAKs Anti IgG Fc Teil	Anfangssteigung bei Probeninjektion	4.8.4.5

4.3.1. Mess- und Auswertesoftware:

Um die Messungen durchzuführen, werden zwei Computerprogramme benutzt. Measure[®] steuert die Mikrofluidik (Spritzenpumpe, Ventil und Sampler) und den Shutter vor dem Laser. Außerdem sendet es Befehle an das zweite Programm LabVIEW[®], welches die Signale der Referenz- und Messphotodiode aufnimmt. Über Befehle von Measure[®] werden die Messungen in LabVIEW[®] gestartet und gestoppt. Dies ist essentiell für automatisierte Messungen und ermöglicht das Vergleichen von Messungen mit demselben Programmablauf, da dadurch die Fluidik und das Aufnehmen der Messungen synchron ablaufen. LabVIEW[®] wird benötigt, um Ströme der Mess- und Referenzphotodiode aufzunehmen, da dies mit Measure[®] technisch nicht möglich ist. LabVIEW[®] schreibt die Daten in eine Textdatei. In drei Spalten werden die Zeit in Sekunden, der Strom der Messphotodiode und der Wert der Referenzphotodiode proportional zu Strom in Watt aufgezeichnet. Er kann mittels des Proportionalitätsfaktors und der EQE in Strom umgerechnet werden.

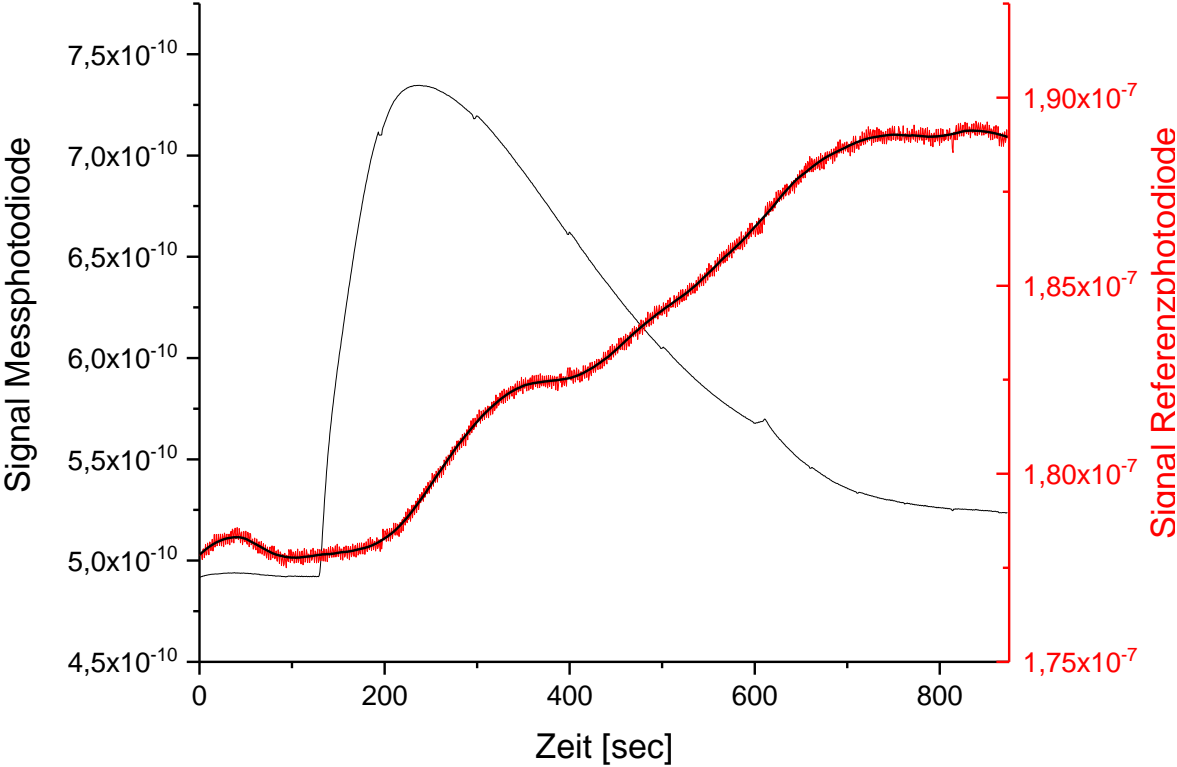
4.3.2. Generelle Datenaufbereitung:

Bei der Auswertung mittels Origin[®] werden zunächst die Werte der Referenzphotodiode durch einen Savitzky-Golay-Fit geglättet, da diese Photodiode leider ein relativ starkes Rauschen zeigt. Sie ist dennoch für die Überwachung der Laserintensität vollkommen ausreichend, da ihre Daten nach der Glättungsoperation hinreichend aussagekräftig für die Anwendung sind. Sie gibt sehr gut Auskunft über die mittel- und langfristige Drift des Lasers.

In Abbildung 24 ist unter A) Messung 1 (rot) das Signal der Referenzphotodiode [Watt], in Messung 2 das der Messphotodiode [Ampère] (schwarz) und unter B) das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gezeigt. Das Signal aus Messung 2 wird, wie oben erwähnt, geglättet

(schwarze Linie in rotem Signal). Danach wird das absolute Signal der Messphotodiode aus Messung 2 durch das geglättete Signal geteilt. Bei dem unter B) referenzierten Fluoreszenzsignal wird dann der erste Wert auf null gesetzt, um die Messungen besser vergleichen und weiter auswerten zu können.

A)



B)

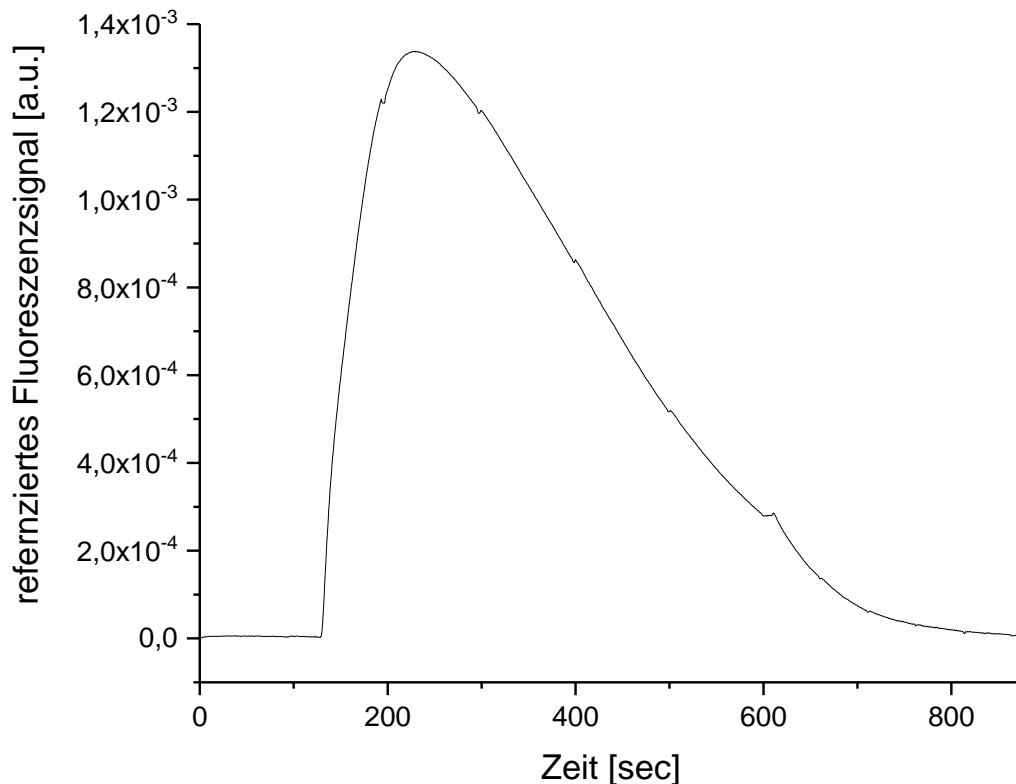


Abbildung 24: Unter A) ist die rote Messung das Signal der Referenzphotodiode, die schwarze Messung das der Messphotodiode und das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] unter B) gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Es wurde $c(\text{DY636}) = 1,31 \mu\text{mol/L}$ hier detektiert.

Bei den weiteren Auswertungsschritten wird zwischen Messungen im Durchfluss und auf der Oberfläche unterschieden. Für einige Operationen und Übersichten wurde Excel® zusätzlich zur Datenauswertung durch Origin® verwendet. In Kapitel 4.5 sind einige Messaufbauoptimierungen zur Erhöhung der Stabilität der Messsignale gezeigt. So wurde die Platzierung der Referenzphotodiode, der Winkel zwischen Laser und Messphotodiode und diverse andere Dinge optimiert.

4.3.3. Messungen im Durchfluss:

Bei Messungen im Durchfluss handelt es sich um Messungen von Fluorophoren, welche über einen bestimmten Zeitraum in einem definierten Probenvolumen durch die Flusszelle gepumpt und währenddessen detektiert werden. Es wird also ein Summensignal über eine bestimmte Zeitspanne detektiert. Die Fluorophore sind hierbei an Reagenzien eines homogenen Immunoassays gebunden (Kapitel 4.8.4) oder freischwimmend (Kapitel 4.6). Bei einem homogenen Messansatz mit einer Messung des Flusszellvolumens im Durchfluss wird die AUC (area under the curve), gleichbedeutend mit der Fläche unter der Kurve über einen bestimmten Zeitraum integriert. Zunächst wird die generelle Datenaufbereitung durchgeführt, wie in Abbildung 24 und dem zugehörigen Text im vorangehenden Absatz vorgestellt.

Abbildung 25 zeigt beispielhaft einen Messablauf einer Fluoreszenzdetektion im Volumen und im Durchfluss. Bei A) wird eine Basislinie vor der Messung aufgenommen, um die Stabilität des Messaufbaus vor der Probeninjektion zu analysieren. B) ist der Zeitraum der Probeninjektion. Der rot hervorgehobene Bereich stellt die AUC (Area under the curve, Fläche unter der Kurve) dar, welche integriert wird, um die Werte für Vergleichssäulen oder Werte zur Erstellung einer Kalibrierfunktion zu erhalten. Die grüne Linie steht für die Steigung des Signals zu Anfang der Probeninjektion, welche bei manchen Immunoassays ausgewertet werden kann. Bei C) folgt der Spül- oder Regenerationsschritt, bei welchem der Flusskanal wieder geleert und eventuell gereinigt wird. Unter D) wird wieder die Basislinie aufgenommen.

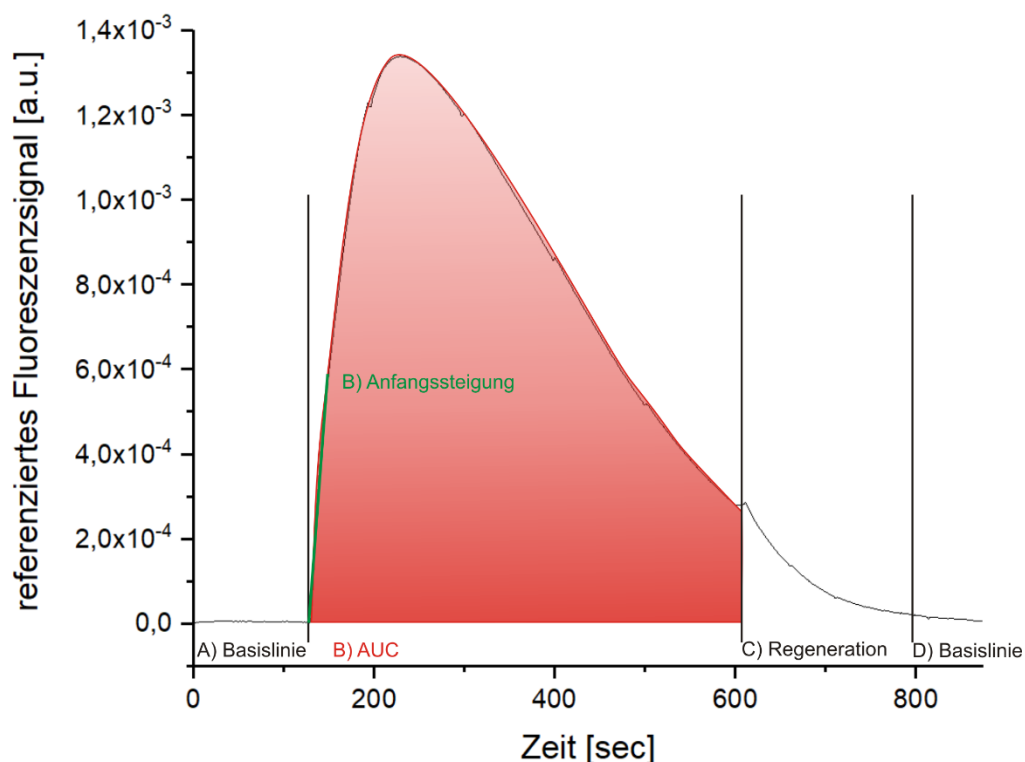


Abbildung 25: Messablauf einer Standard Fluoreszenzmessung im Durchfluss über die Zeit im LIF Messaufbau. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Der Auswerteschritt wie er in Abbildung 25 zu sehen ist, wird in Kapitel 4.8.4.1 genauso ausgeführt.

Aufgrund der in Abbildung 25 bei der Phase B) auftretenden Anfangssteigung kann eine Kalibrierfunktion aufgrund der Steigungen erstellt werden. Bei der Auswertung der Steigungen wird eine Steigung wie beim Bindungsinhibitionsassay aus Abbildung 102 die Messung mit 0 mg MPA als 100 % gesetzt und die anderen in Bezug dazu gesetzt. Es wird die Steigung [%] gegen die MPA Konzentration [mg] aufgetragen.

Bei beiden Auswertevarianten müssen je nach Fragestellung Signalausdifferenzierung Schritte vor der Detektion erfolgen.

4.3.4. Messungen auf der Oberfläche:

Bei der heterogenen oder pseudo-heterogenen Messung werden die Signalhöhe am Ende der Probeninjektion mit der Basislinie vor der Probeninjektion verglichen und ausgewertet oder, je nach Fragestellung, die Signalsteigung im linearen Anfangsbereich einer Probeninjektion ausgewertet. Diese Art der Auswertung kann analog zu klassischen RfS Messungen gesehen werden. Zunächst wird die generelle Datenaufbereitung durchgeführt, wie in Abbildung 24 und dem zugehörigen Text im vorangehenden Absatz vorgestellt.

Aus der Signalhöhe kann keine kinetische Information gewonnen werden, da nicht mit einer Luftblase abgetrennt wurde. Sie werden bei der vorliegenden Problemstellung aber auch nicht benötigt.

4.3.5. Heterogene Immunoassays Auswertung:

Die Auswertung der Signalhöhe nach der Probeninjektion erfolgt bei den heterogenen, fluoreszenzbasierten Immunoassays in vier Schritten. Zunächst wird die Basislinie (A) erfasst, danach wird die Probe (B) injiziert, die aus im Überschuss zugesetzten fluoreszierenden Immunoassayreagenzien (Antikörper oder Nanopartikel) besteht. In der Signalausdifferenzierung (C) sind nur noch die Partikel an der Oberfläche, welche einen Bindungspartner gefunden haben, der Rest im Flusszellvolumen wurde in den Abfall gepumpt. Nach der Regenerationsphase (D) wird die Basislinie wieder erreicht. Man sieht also zu Beginn der Probeninjektion (B) ein Summensignal aller Fluorophore in der Probe und zu Ende das ausdifferenzierte Signal der angebundenen Fluorophore in der Plateauphase (C). Auf diese Weise wurden alle Messungen in Kapitel 4.8.2 ausgewertet.

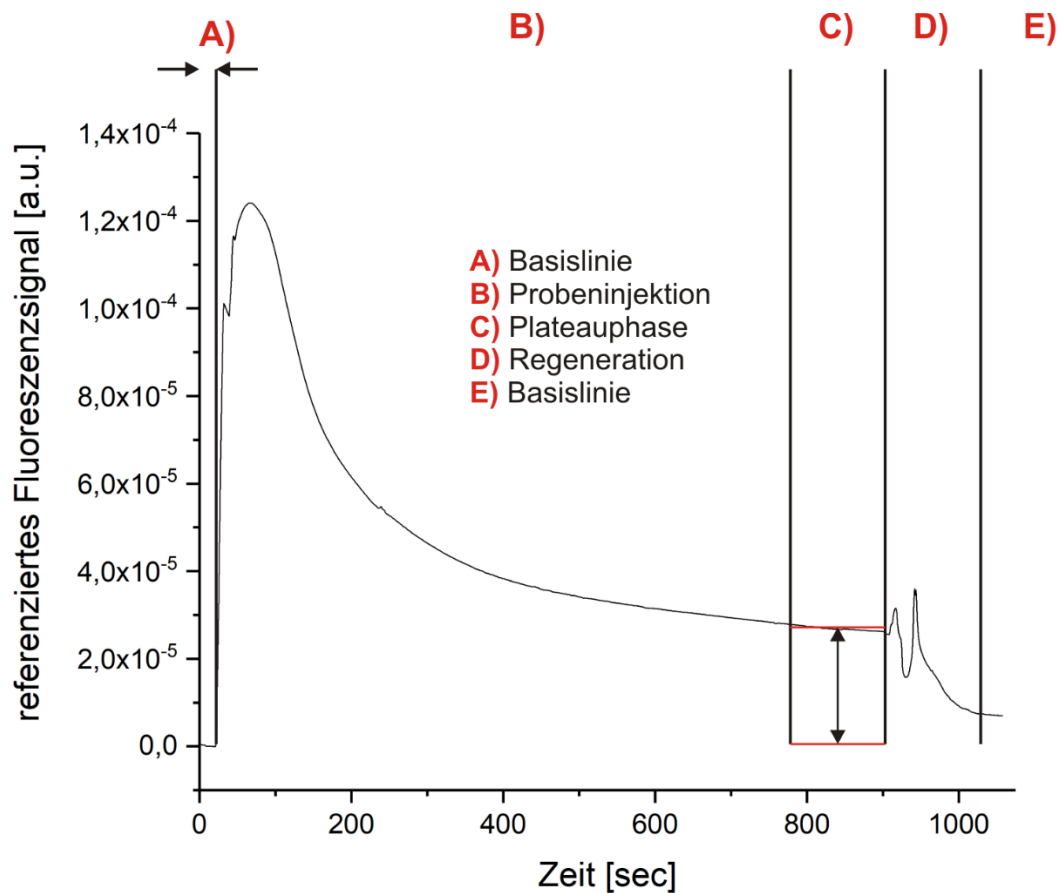


Abbildung 26: Für heterogene Immunoassays ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Bei A) ist die Basislinie vor der Probeninjektion; B) die Probeninjektion mit „Überschuss“ und anschließender Signalausdifferenzierung; C) Plateau; D) Regeneration oder Spülschritt; E) Basislinie.

Die Auswertung der Signalhöhe am Ende einer Messung hat den Vorteil, dass sich dann Puffer im Flusszellvolumen befindet und das Signal nicht durch Artefakte im Flusszellvolumen beeinflusst wird. Dieses Auswerteprinzip wurde auch in den Arbeiten zu Messungen von Diclofenac in Milch von Sabrina Rau [52] mittels RfS und Amitriptylin von Kathrin Krieg mittels TIRF [73] (nach einem Waschschrift) genutzt.

Wenn man die Methoden RfS, TIRF und LIF in dieser Auswertevariante vergleicht, so haben alle drei Methoden Vor- und Nachteile. Die Methoden TIRF und RfS haben den Vorteil, dass die Sensitivität der Detektion im Flusszellvolumen von der Biosensoroberfläche kommend exponentiell abfällt. Dadurch sind beide Methoden weniger gegenüber Artefakten im Flusszellvolumen anfällig. Allerdings ist, verglichen mit TIRF bei LIF, das Bleaching der Oberfläche nicht so stark ausgeprägt und im Vergleich mit RfS die Nachweisgrenze niedriger, da fluoreszenzbasiert detektiert wird.

4.3.6. Pseudo-heterogene Immunoassayauswertung:

In Abbildung 27 ist die Auswertung der Steigung in der pseudo-heterogenen Detektionsphase eines homogenen Immunoassays wie in Kapitel 4.8.4.5 gezeigt. Es wird die Steigung des Signals ausgewertet. Durch die Steigung kann rückgeschlossen werden, wie viele MPs mit wieviel Fluoreszenzgelabelten Sekundär-Antikörpern pro Zeit vom

Permanentmagneten gegenüber der Messphotodiode eingefangen werden. Dies kann auf diese Weise geschehen, da der Signalausdifferenzierungsschritt, also das Abtrennen der nicht angebondenen Fluoreszenzgelabelten Sekundär-Antikörper, schon zuvor durchgeführt wurde.

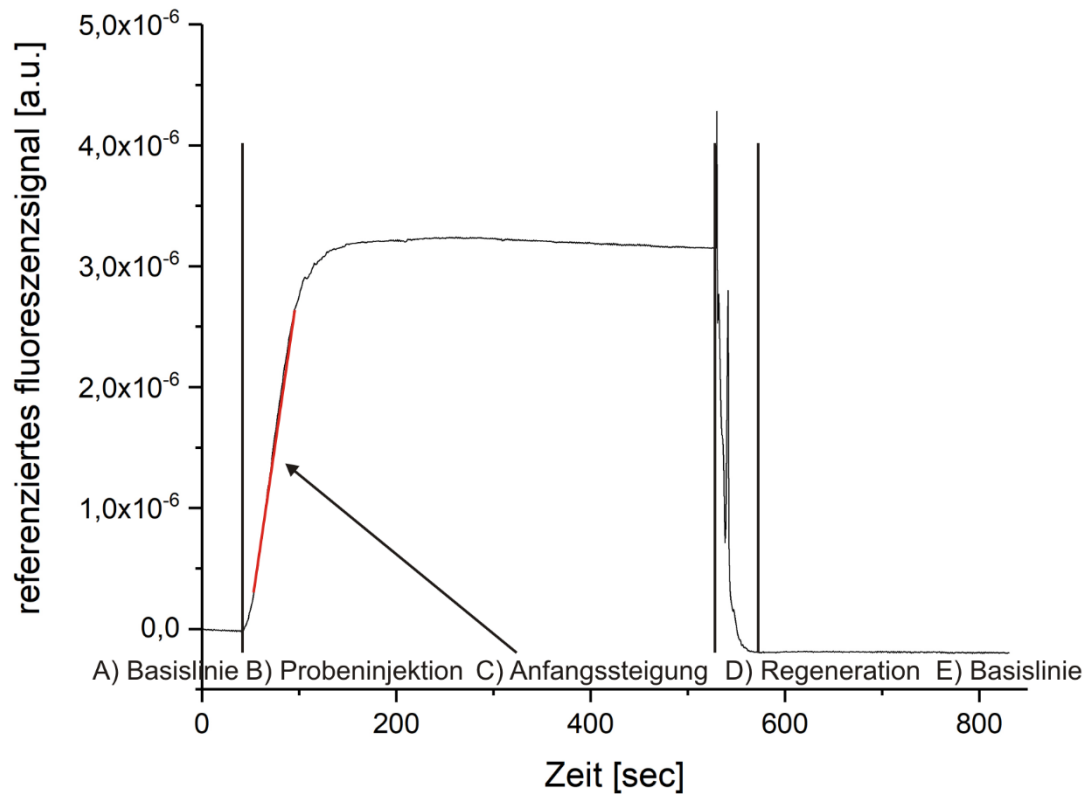


Abbildung 27: Für pseudo-heterogene Immunoassays ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Bei A) ist die Basislinie vor der Probeninjektion; B) die Probeninjektion ohne „Überschuss“ C) Anfangssteigungsauswertung; D) Regeneration oder Spülschritt; E) Basislinie.

4.4. Messaufbau- und Flusszellentwicklung

Vorgehen:

Die LIF-Messaufbau- und Flusszellentwicklung wurde zunächst mit theoretischen Überlegungen und Zeichnungen begonnen, welche mit den Projektpartnern diskutiert wurden. Es wurden diverse Voruntersuchungen durchgeführt und Materialeigenschaften erforscht und diskutiert, um die Entwicklung bei den vielversprechendsten Ansätzen zu beginnen.

Anforderungen an den Messaufbau:

Der LIF-Messaufbau soll die in Kapitel 2.9.1 formulierten Anforderungen an POCT Geräte erfüllen. Außerdem sollen, die in der Einleitung und Kapitel 1.1 diskutierten Messproblemstellungen, die praktische Bedienbarkeit während der Immunoassayentwicklung und die Herstellungskosten in Betracht gezogen werden.

Untersuchungsschritte um die Teile des Aufbaus zu erhalten:

Kapitel 4.4.1 zeichnet die Überlegungen während der theoretischen Entwicklung nach und stellt mit der umgesetzten Variante 5 am Ende des Kapitels den umgesetzten Messaufbau vor. Im Anschluss wird der erhaltene Ansatz 5 weiter erforscht und optimiert. In Kapitel 4.4.2 werden der Zusammenbau der Flusszelle aufgezeigt, in Kapitel 4.4.3 die Optimierung und Charakterisierung verschiedener Flusszelloberseiten, in Kapitel 4.4.4 verschiedene Flusszellwände und Kapitel 4.4.5 verschiedene Flusszellböden aufgezeigt.

4.4.1. Entwicklung der Flusszelle für einen LIF-Messaufbau

Vorgehen:

Im Folgenden wird auf die Mikrofluidik, im Speziellen auf die Erforschung, Optimierung und Charakterisierung einer einfach und preiswert herzustellenden Flusszelle für den LIF-Messaufbau, welche dennoch die optischen und biochemischen Voraussetzungen zur Detektion von Analyten im mikro- bis nanomolaren Nachweisbereich erfüllt, eingegangen. Alle diese Arbeiten wurden vom Verfasser an der Universität Tübingen durchgeführt.

Anforderungen an die Flusszelle:

In der Flusszelle des LIF-Messaufbaus im NANODEM Projekt sollen Immunoassaymessungen auf magnetischen Nanopartikeln durchgeführt werden. Alternativ sollen auch Messungen auf dem Flusszellboden durchgeführt werden können. Dieses Sekundärziel ergab sich während der Arbeit, um Projektpartner bei der Erforschung von Regenerations- und Blockreagenzien zu unterstützen und die homogenen Immunoassays von den heterogenen im selben Messaufbau abzugrenzen.

Der LIF-Messaufbau soll Messungen in möglichst kleinen Volumina ermöglichen und als Herzstück eine möglichst günstige, einfach in großen Stückzahlen herzustellende, leicht auszutauschende Flusszelle enthalten. Die Ausrichtbarkeit zwischen Anregungslichtquelle und Detektor soll möglichst frei wählbar sein, um Optimierungen während der Assaymessungen vornehmen zu können. In der Praxis sollen am Messaufbau, mit der Flusszelle als Kernelement, viele Messungen in Reihe durchgeführt werden können. Hierbei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf der Temperaturstabilität und der Möglichkeit die Flusszelle einfach und ohne komplette Neujustierung des Messaufbaus zu tauschen. Die Anordnung der Komponenten soll durchdacht sein und ein geringes Hintergrundsignal generieren. Es wurden Flusszellen mit integrierten Magneten und nicht integrierten Magneten realisiert, um eine möglichst praxistaugliche und flexible Platzierung der Magneten zu finden. Zusätzlich wurde der Aufbau hinsichtlich einer späteren Weiterentwicklung in Richtung eines Point-of-Care-Test-Gerätes konzipiert. Viele Gerätekomponenten sind schon in miniaturisierter Form entwickelt worden.

Entwicklungsschritte:

Im Folgenden ist die gedankliche Entwicklung des Nanodem LIF-Messaufbaus in Form einiger Studien und Ideen gezeigt. Es werden die fünf vielversprechendsten Flusszellen mit deren Anregungs- und Detektionskomponenten ausführlich vorgestellt. Diese Ideen wurden mit

Projektpartnern diskutiert und weiter optimiert, um schließlich von den vielversprechendsten Varianten (4 und 5) Prototypen zu bauen. Variante 5 wurde für alle gezeigten Messungen verwendet und in den folgenden Kapiteln weiterentwickelt. Ein noch nicht optimierter Zwischenstand wurde von Variante 5 mit Fluorophormessungen verschiedener Konzentrationen veröffentlicht [74].

4.4.1.1. Variante 1:

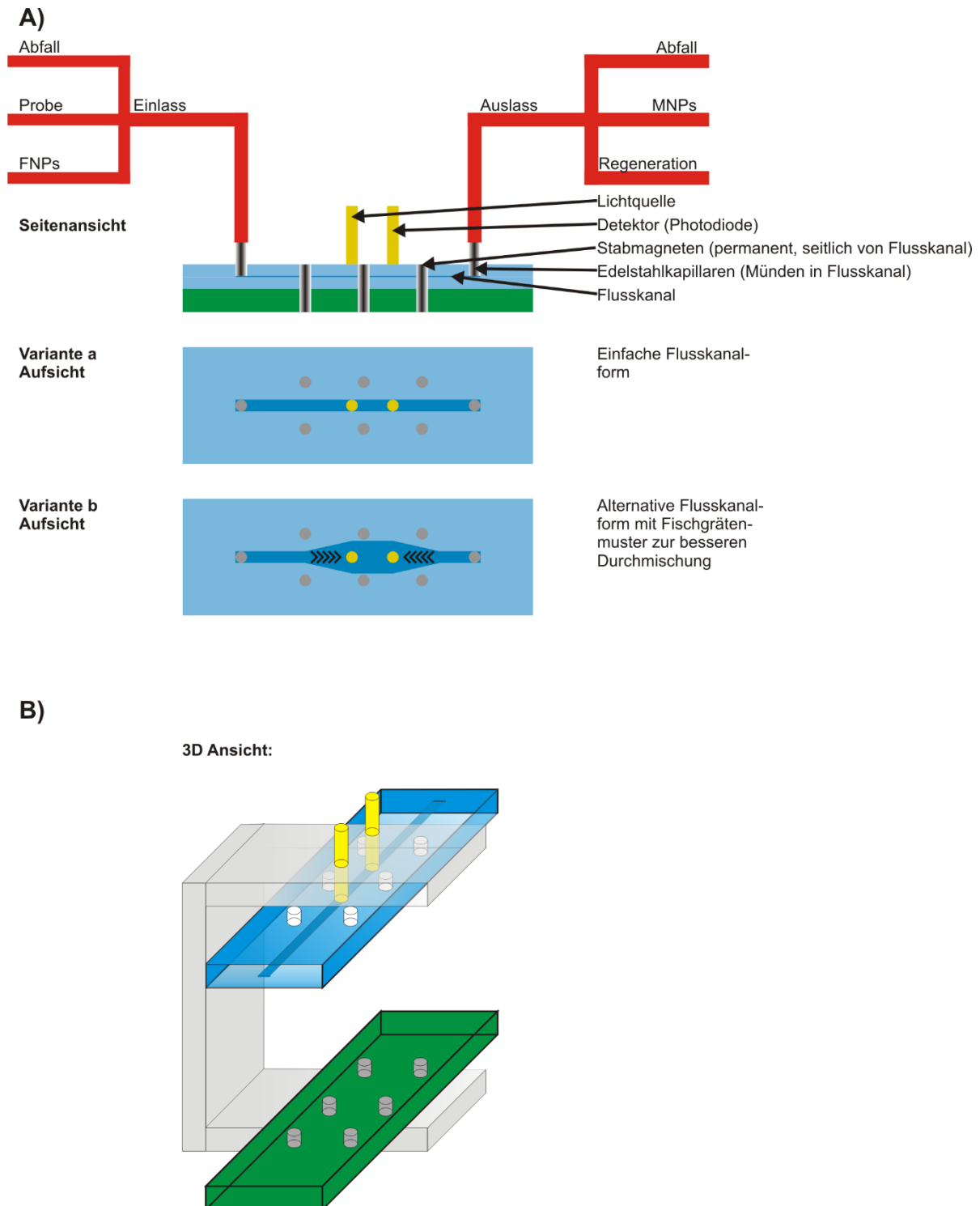


Abbildung 28: **Variante 1:** A) In der Seitenansicht ist die gesamte Flusszelle, Fluidik, Anregungs- und Detektionseinheit schematisch gezeigt. Darunter zeigt Aufsicht a) eine einfach gehaltene Flusszellform,

wohingegen Aufsicht b) eine alternative Flusskanalform zeigt. B) Die 3D-Ansicht zeigt das Positionieren durch die Stabmagneten in den Aussparungen und die Austauschbarkeit der Flusszelle.

Flusszelle:

Der Flusskanal hat eine Höhe von 100 μm , damit magnetische Partikel einfach an Magnetfallen festgehalten werden können. Die Flusszelle besitzt eine geringe Höhe von 2,1 mm inklusive der Mikrofluidik und Magnetfallen und erfüllt somit den erwünschten Miniaturisierungsgrad. Der Flusskanal liegt in der Mitte der Flusszelle. Außerdem ist das Flusszellvolumen im gewünschten Bereich.

Es wurden zwei verschiedene Flusszellformen diskutiert, eine sehr einfach gehaltene, gerade und eine alternative Flusszellform. Die alternative Form wurde von Pike et al. [75] als für Flusskanäle sehr gut geeignete Form beschrieben. Sie gilt als geeignete Form, wenn man einen Volumenstrom möglichst laminar aufweiten möchte. Die schwarzen Winkel in der Zeichnung sollen ein Fischgrätenmuster zur besseren Durchmischung darstellen. Das Fischgrätenmuster wurde nicht realisiert, da sich im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, dass Partikel im μm und nm Bereich an Flusskanalwände haften, falls die Flussraten zu langsam sind oder kein ausreichendes Blocken der Oberfläche durchgeführt wurde. Zusätzliche Oberflächenvergrößerungen und Unebenheiten würden hier zu einer Verstärkung der Problematik führen.

Magnetfallen:

Bei der ersten Variante des Messaufbaus waren Elektromagnetsäulen oder Permanentmagnetsäulen als Magnetfallen vorgesehen, um die magnetischen Partikel (MPs) festzuhalten. Sie sollten durch Löcher der Mikrofluidik gehen, um diese an einer definierten Stelle zu fixieren. Da diese Magnetsäulen sehr nah an den Flusskanal müssten, um die MPs ausreichend stark festzuhalten, wären die Flusszellen in dieser Variante vermutlich zu teuer geworden. Es wäre ein großer technischer Aufwand, die Löcher für die Magnetsäulen im Flusskanal im Abstand weniger μm genau zu positionieren. Um reproduzierbar messen zu können, hätten die Löcher immer an genau derselben Stelle bei verschiedenen Flusszellen befinden müssen. Durch die Nähe zum Flusskanal wäre mit Dichtigkeitsproblemen bei hohen Flussraten bzw. Drücken in dieser Mikrofluidik zu rechnen, da kein hinreichend starker Rand die Flusszelle stabilisieren könnte. Zusätzlich wäre die Flusszelle geschlossen geliefert worden, was die Funktionalisierbarkeit und Passivierbarkeit von Oberflächen im Labor vor Messungen deutlich eingeschränkt hätte.

Messaufbau:

Die Anregung und Detektion der Fluoreszenz erfolgt komplett von der Oberseite des Chips aus. Die Anregungslichtquelle und der Detektor sind nicht ausrichtbar und nicht orthogonal zueinander.

Folglich stellt diese Anordnung keine hohen Herausforderungen an die optischen Filter, kann aber wegen der nur indirekten Beleuchtung der Fluorophore im Flusskanal keine niedrigeren Nachweisgrenzen erreichen.

Fazit zur Weiterentwicklung:

Zusammenfassend wurde Variante 1 nicht gebaut, da die Platzierung der Magnetfallen, der Anregungslichtquelle und der Detektoren kein praxistaugliches Design aufweisen. Die Flusszelle hat bereits das angestrebte Volumen, kann aber noch weiter miniaturisiert werden und wird in einer möglichst einfach gehaltenen Geometrie einfacher in der Massenfertigung sein und weniger unspezifische Wechselwirkungen hervorrufen.

4.4.1.2. Variante 2:

Flusszelle & Fluidik:

Es wurden detailliertere Überlegungen zur zu- und ableitenden Fluidik gemacht um möglichst wenige Komponenten effizient einzusetzen. Die Positionierung der Pumpe zwischen dem Ventil zur Aufnahme der einzelnen Reagenzien und dem Einlass der Flusszelle ist so gewählt worden, um nur eine Pumpe zu benötigen und die Probe in die Flusszelle vorwärts zu pumpen und nicht anzusaugen. Letzteres könnte zu einer Luftbläschenbildung durch Kavitation in der Fluidik führen. Die Probenschleifen befinden sich vor und hinter der Flusszelle, um bei Mischschritten den Immunoassay vorwärts und zurück pumpen zu können (Abbildung 29). Die Flusszelle wurde weiter miniaturisiert und durch die einfachere Form im Preis reduziert und in ihrer Herstellbarkeit vereinfacht. Dadurch kann Sie in einem POCT-Gerät als günstiger Einmalartikel eingesetzt werden.

Messaufbau:

Bei Variante 2 sind schaltbare Elektromagneten auf einem Wafer, alternierend mit Lichtquellen vorgesehen. Sie würden den Oberteil des Aufbaus ausmachen, in der Mitte wäre die Flusszelle und als Unterteil der Chip mit den Photodioden. Der Mittelteil wäre ein Einmalartikel, Ober- und Unterteil könnten mehrfach verwendet werden. Diese Form der Miniaturisierung sieht vielversprechend aus, birgt jedoch das Risiko der Überhitzung.

Fazit zur Weiterentwicklung:

Diese Variante wurde nicht gebaut, da die Lichtquellen und Photodioden nebeneinander zu viel Hitze produzieren und intensiv gekühlt werden müssten. Die Lichtquellen würden direkt auf die Photodioden strahlen, wären somit nicht orthogonal ausgerichtet oder frei ausrichtbar. Die Fluidik und die Flusszelle zeigen viele praktische Aspekte auf und wurden im finalen Messaufbau in ähnlicher Form umgesetzt.

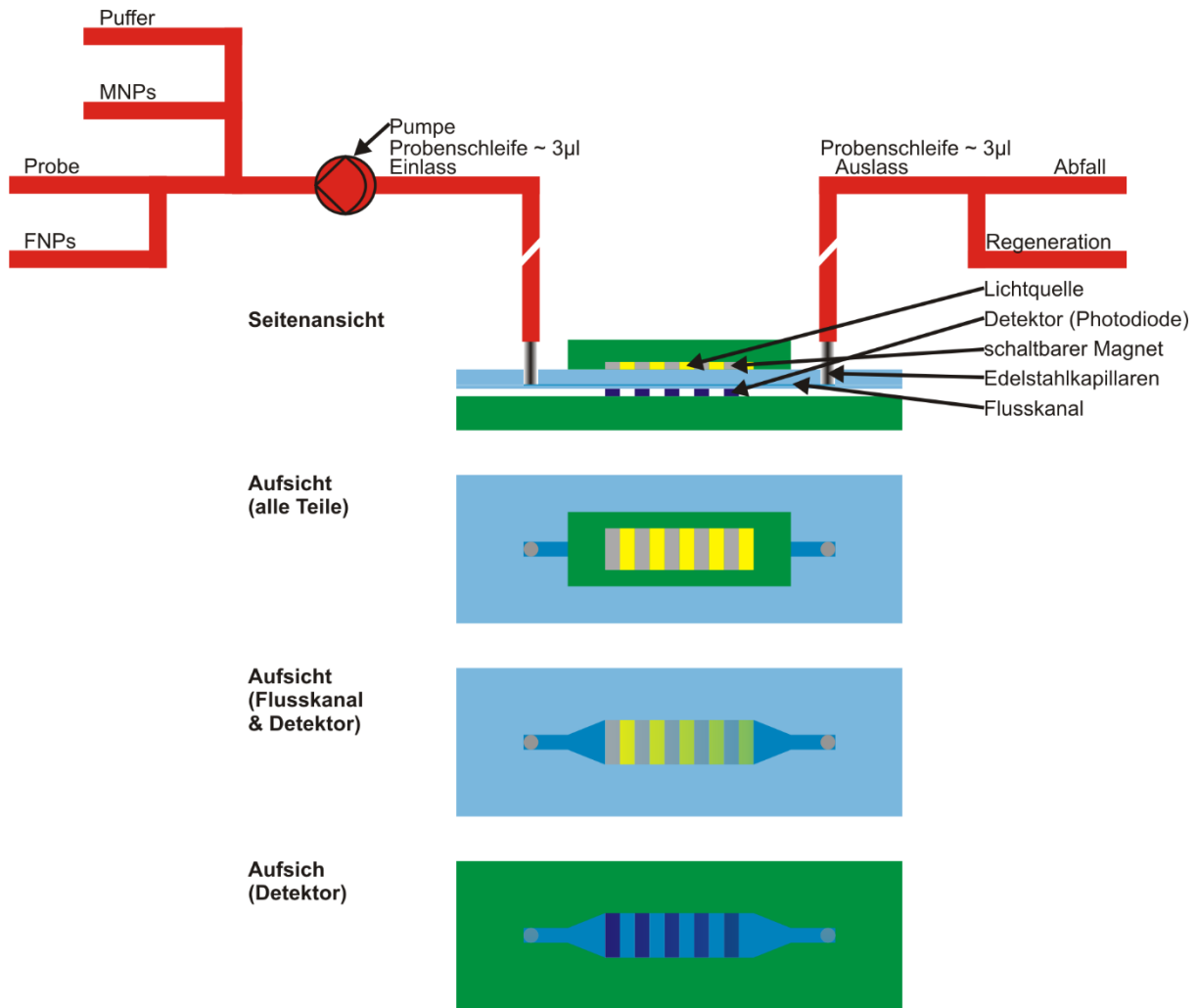


Abbildung 29: **Variante 2:** Der Flusskanal ist mit einer Höhe von $100\ \mu\text{m}$ vorgesehen. Der Fluidikchip soll insgesamt $1\ \text{mm}$ hoch sein, der Flusskanal soll in $200 - 500\ \mu\text{m}$ Höhe von unten her gemessen liegen. Die Lichtquelle und die Detektoren sollen in einem Wafer mit $2\ \text{mm}$ Höhe liegen.

4.4.1.3. Variante 3:

Bei Variante 3 wurde hauptsächlich an der Anregungs- und Detektion gearbeitet.

Messaufbau:

Es wurde nur eine Lichtquelle zu verwendet, da mehrere Lichtquellen zu Problemen führen können. So könnten die Lichtquellen ungleich in ihrer Intensität sein, zusätzlich in ihr schwanken und driften oder ungleich altern. Außerdem würden mehrere Lichtquellen mehr Hitze produzieren. In dieser Variante würden Detektoren mit Abstand zueinander, auf der Lichtquelle sitzend, verbaut werden. Die Lücken würden dazu genutzt werden, den Flusskanal zu beleuchten. Die Photodioden wären von Seiten der Lichtquelle mittels eines optischen Filters geschützt. Somit könnten sie das zurückgeworfene Licht detektieren.

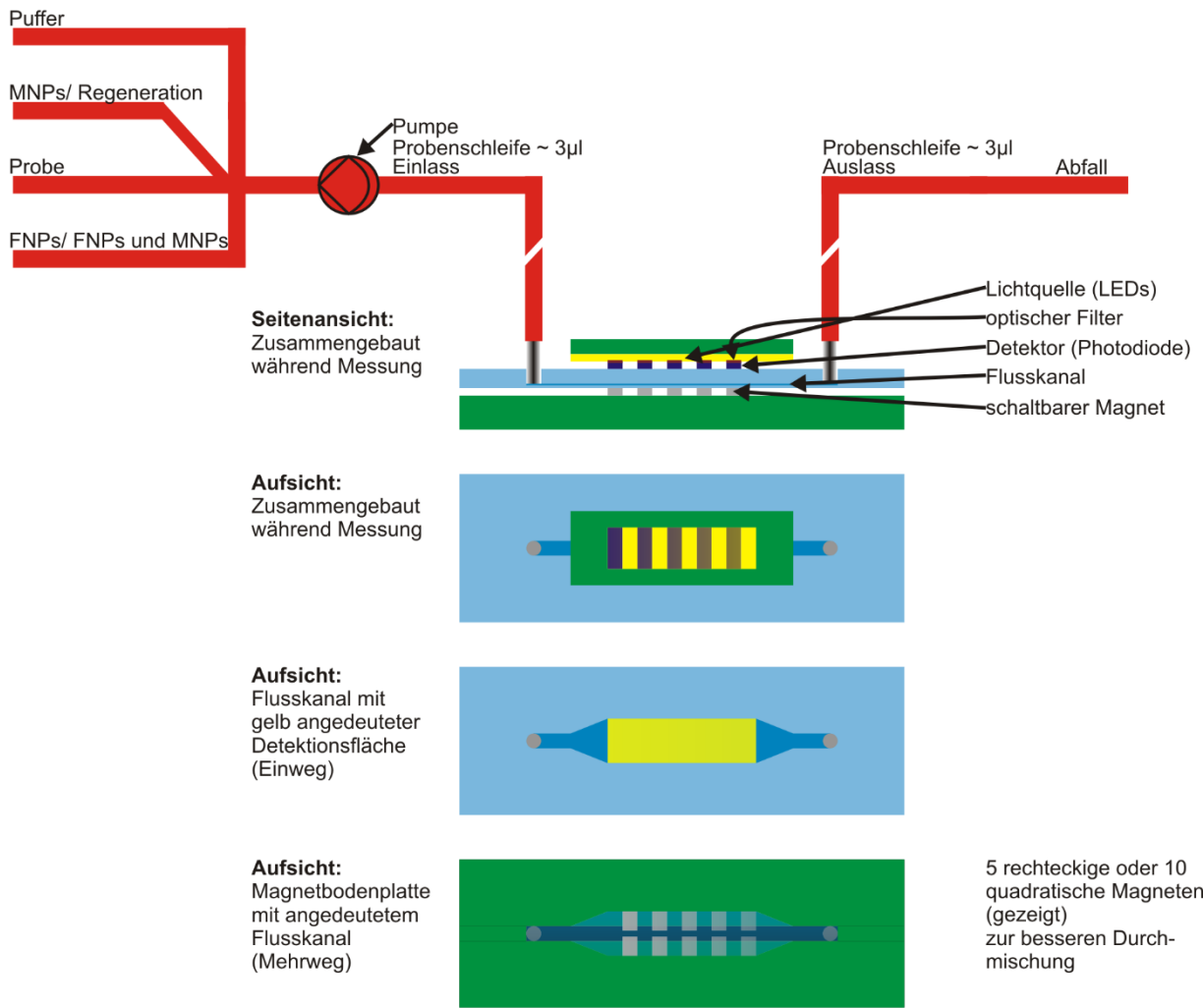
Zwischen dem Anregungs- und Detektionswafer und dem Wafer mit den schaltbaren Elektromagneten befindet sich die Fluidik. Auf diese Weise können magnetische, fluoreszierende Partikel gegenüber den Photodioden angereichert und dadurch die Nachweisgrenze verringert werden. Wie in Teil B von Abbildung 30 zu sehen ist, kann hier

eine Kavität zur Anpassung des Brechungsindex, zum Beispiel mittels Glycerol, zwischen Anregungslichtquelle, Detektor und Flusszelle integriert werden.

Fazit zur Weiterentwicklung:

Bei Variante 3 bleibt die Temperaturproblematik bei der Lichtquelle und den Detektoren durch die zu große Nähe bestehen, außerdem gibt es keine Möglichkeit, die Ausrichtung zwischen Lichtquelle und Photodiode zu verändern.

A)



B)

Kavität mit Glycerol zum optischen Matching
zwischen Detektor, LED und Flusszelle.
Die Flusszelle ist das einzige Einwegteil.

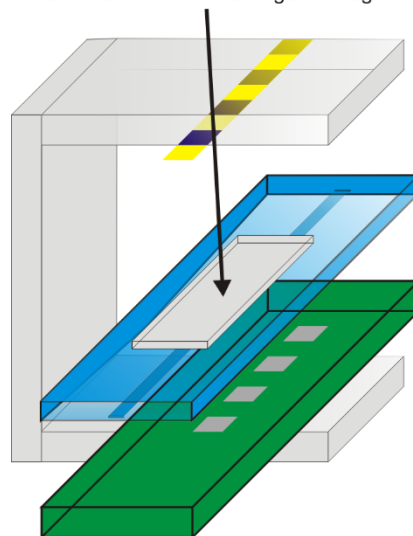


Abbildung 30: **Variante 3:** A) Die Magneten sollen aus fünf rechteckigen oder zehn quadratischen Magneten (gezeigt) gegenüber den Photodioden bestehen, um die Partikel anzureichern. In dieser Variante wäre ausschließlich die Flusszelle ein Einwegprodukt, die Detektionseinheit und die Magneten könnten mehrfach verwendet werden. B) Die 3D-Ansicht soll die Einfachheit des Austausches der Fluidik als Einwegprodukt veranschaulichen und die Kavität zum Matching zeigen.

4.4.1.4. Variante 4:

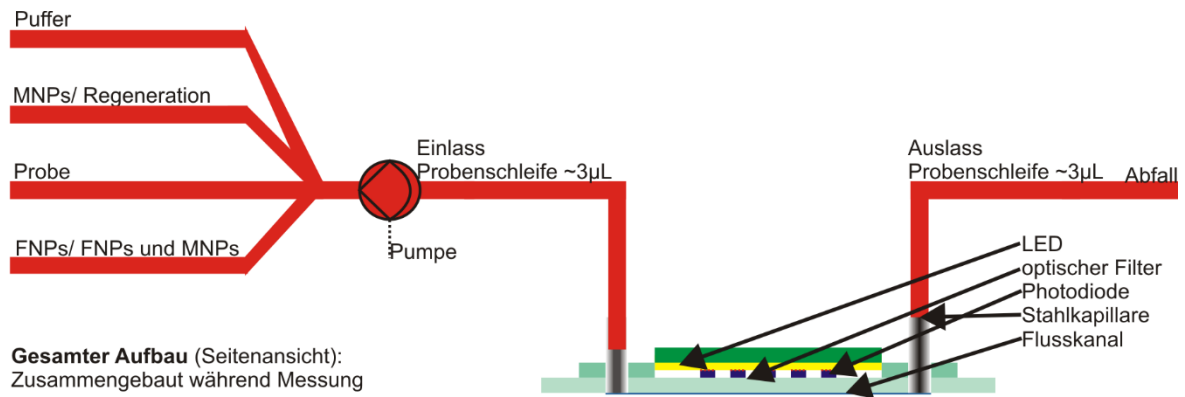
Flusszelle:

Von Variante 4 konnte ein erster Prototyp aus PMMA gefertigt werden. Die drei Teile wurden jeweils aus einem PMMA Block gefräst. Es wurde eine sandwichartige Bauweise gewählt, um die Mikrofluidik aus einem Oberteil, Mittelteil und Bodenteil zusammenzufügen. Das Material ist bei den gewählten Anregungs- und Detektionswellenlängen transparent. Außerdem ist es auch gegenüber Regenerationsmitteln, starken Säuren oder Basen mit Tensiden, stabil.

Fazit zur Weiterentwicklung:

Das verwendete Material PMMA ist für die Realisierung der erforderlichen sehr stark miniaturisierten Bauweise des Flusskanals mit seinen kleinen Geometrien zu spröde. Die spröden Stellen erzeugen viele Streuquellen, welche die Messung stören und potenzielle Bruchstellen bei Alterung oder starker Beanspruchung darstellen. Das Kleben der Teile war sehr schlecht möglich, da ungehindert Klebstoff in das auszuspärende Flusskanalvolumen vordringen kann und diesen dann irreversibel verschließt. Die Flusskanalhöhe wird zum Teil durch die Dicke der Klebefilme bedingt und kann nur unzureichend kontrolliert werden. Diese ist jedoch für die Vergleichbarkeit von Messungen in zwei verschiedenen Mikrofluidikchips essentiell [58]. Es ist also bezüglich einer Massenfertigung keine reproduzierbare Flusskanalhöhe zu erwarten. Außerdem stellte die Fertigung der Teile einen hohen zeitlichen Aufwand dar. Des Weiteren sind Lichtquelle und Detektor in dieser Variante weder orthogonal noch frei ausrichtbar zueinander orientiert.

A)



Oberteil (Seitenansicht):
2 eingeklebte Kapillaren in 2 aufgeklebten Verstärkungsbändern



Oberteil (Aufsicht):
Oberseite



Oberteil (Aufsicht):
Unterseite Dicke: 1mm
hellgrüner Teil ausgefräst



Mittelteil (Seitenansicht):
Dicke: 1mm, teilweise ausgeschnitten



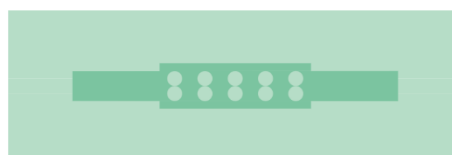
Mittelteil (Aufsicht):
schwarze Linien stehen für polierte Seitenkanten



Bodenteil (Seitenansicht):



Bodenteil (Aufsicht):
Dicke: 1mm,
hellgrüner Teil ausgefräst
Tiefe: 0,9mm von der planen Seite aus



B)

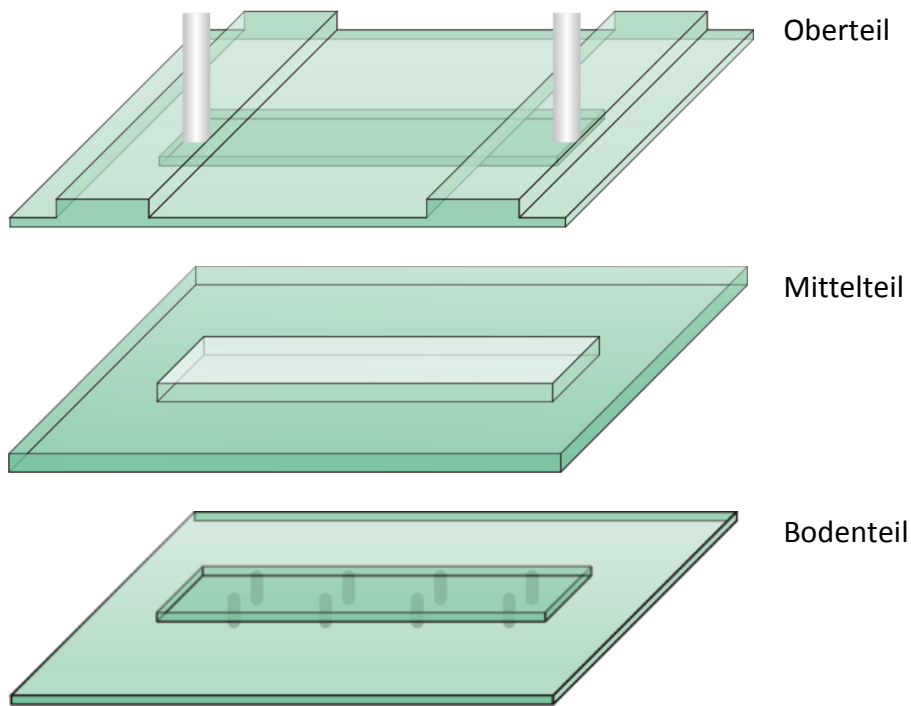


Abbildung 31: **Variante 4:** Erster realisierter Fluidikentwurf. Die Flusskanalhöhe beträgt $100\ \mu\text{m}$, die Detektionsfläche $10\ \text{mm} \cdot 3\ \text{mm}$, sie weitet sich aus $2\ \text{mm}$ auf. Die Flusskanallänge beträgt $16\ \text{mm}$. Unter A) sind die Seitenansichten und Aufsichten gezeigt. Bei B) sind 3D Ansichten des Oberteils, Mittelteils und Bodenteils gezeigt.

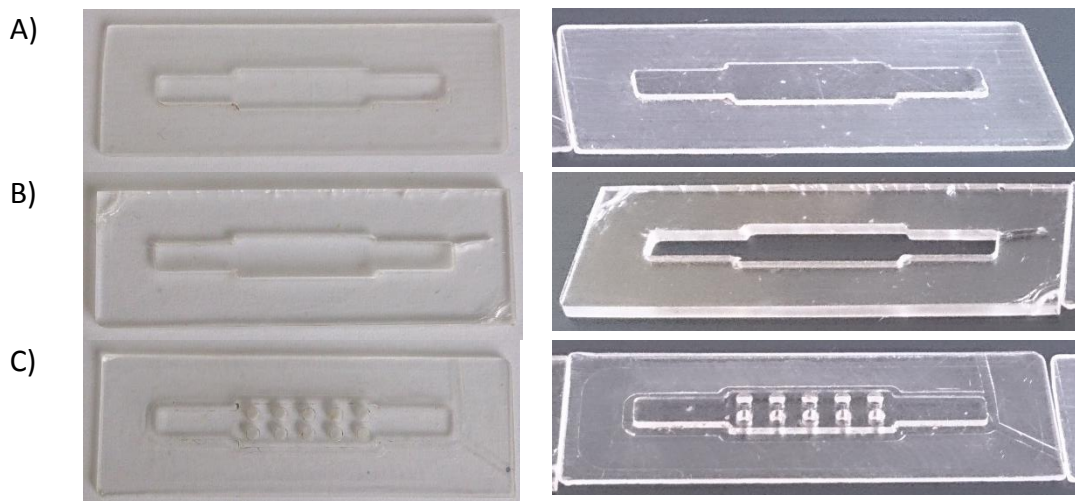


Abbildung 32: Fotos der ersten gefertigten Flusszelle (Variante 4): A) Oberteil, B) Mittelteil, C) Unterteil

4.4.1.5. Variante 5:

Variante 5 ist der in der Arbeit realisierte Messaufbau.

Messaufbau:

Zur Vermeidung potentieller Fehlerquellen, die in den Varianten 1-4 auftreten könnten wurde ein orthogonaler Aufbau der Messeinrichtung (Variante 5) entwickelt (Abbildung 33). Es wurde eine ideale Beleuchtung des Flusskanals im Winkel von 90° zu den Detektoren gewählt, analog dem Strahlengang eines modernen Fluoreszenzspektrometers, um die Vorteile dieses Strahlengangs für eine Messung im Volumen zu realisieren. Dadurch wird der

Detektor nicht direkt von der Anregungslichtquelle beleuchtet und es kann ein schwächerer Filter verwendet werden. Außerdem können die Komponenten durch den modulhaften orthogonalen Aufbau unabhängig voneinander realisiert werden und sind bei einem möglichen Defekt einzeln austauschbar. Zudem wird die Temperaturproblematik deutlich verringert. Außerdem können die Komponenten einfach bei den einzelnen Projektpartnern hergestellt und im Messaufbau zusammengebaut werden. Die Verwendung einer Einwegfluidik ist in dieser Variante einfach realisierbar.

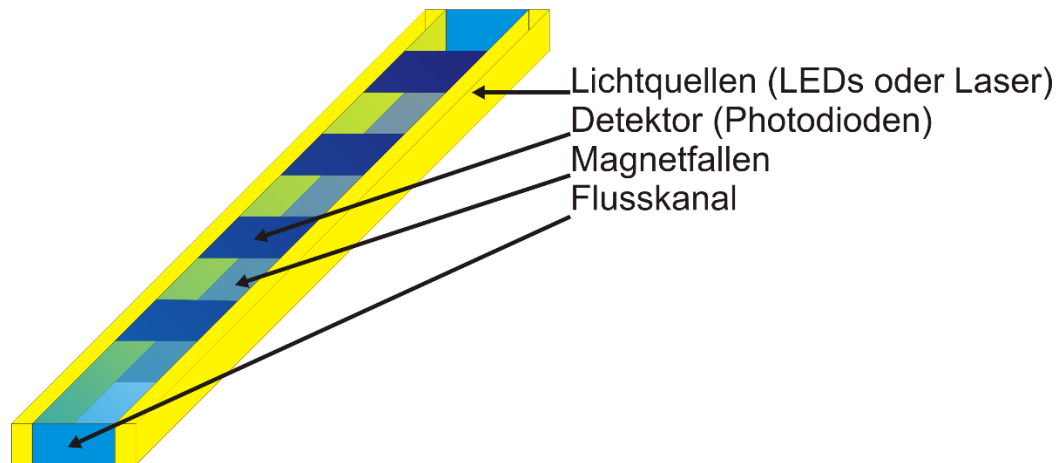


Abbildung 33: Alternative Anordnung der Lichtquellen, der Detektoren und Magneten. Im realisierten Messaufbau wurde die Idee der Platzierung der Lichtquellen orthogonal zu den Detektoren aufgegriffen.

Flusszelle:

Die Flusszelle der Variante 5 wurde in einer aus Variante 4 weiterentwickelten Sandwichbauweise gebaut. Die verwendeten Flusszelloberseiten der Varianten 2-5 sind aus PMMA gefertigt und haben Schraubgewinde für Ein- und Auslass auf der Oberseite sowie einer planen Fläche mit zwei Löchern auf der Unterseite oder in der einfachsten Variante einem Siliziumwafer (Variante 1). In die Flusszelloberseiten lassen sich zwischen Ein- und Auslass Magnetfallen in Form von Permanentmagneten oder Elektromagneten platzieren, nachdem Kavitäten von oben in den PMMA-Block eingefräst oder in die Siliziumwafer strukturiert wurden. Die Unterseite des Oberteils wird mit dem Mittelteil, dem Doppelklebeband, zusammengeklebt. Die in der Mitte durch einen Laser ausgeschnittene Kavität im Doppelklebeband bildet den Flusskanal aus. So kann zweidimensional in der Doppelklebebandebene jede beliebige Flusskanalgeometrie durch lasergeschnittenes Doppelklebeband einfach realisiert werden. Marcel Berner vom Projektpartner IPV hat viele der in der Arbeit gezeigten Doppelklebebänder mit einem Femtosekundenlaser ausgeschnitten. Außerdem wurden vom Projektpartner mfcs® viele Doppelklebebänder lasergeschnitten und verwendet.

Die Flusskanalhöhe wird durch die Doppelklebebandhöhe vorgegeben und ist somit reproduzierbar und in Grenzen variierbar. Die einfach gehaltene Flusskanalgeometrie und das exakt geschnittene Doppelklebeband zeigen weniger optische Streuquellen als die vorherigen Ansätze. Als Flusszellboden kann ein Glastransducer oder eine Zeonor® Folie verwendet werden.

Bezüglich der Mikrofluidik weist die verwendete Variante 5 einige Vorteile auf. Die erfolgreichen Untersuchungen zur chemischen Stabilität werden in Kapitel 4.4.4 dargelegt. Weiterhin können sehr hohe Flussraten ab Flusszelloberseiten der Variante 2 (Kapitel 4.4.3) verwendet werden. Außerdem ist ab der Variante 5 durch die eingefügten Schraubgewinde die Flusszelle sehr einfach und schnell anschließbar. Im realisierten Aufbau können nun die Anregungsquelle und der Detektor frei oder orthogonal zueinander ausgerichtet werden. Dies ermöglicht umfangreiche Optimierungen und Tests, die in Kapitel 4.5.3 und 4.5.6 durchgeführt werden.

Ein kleiner Nachteil besteht darin, dass der Kanal mit der Doppelklebebandvariante nur einmal verschlossen werden kann. Nach dem Öffnen des Kanals muss der Bodenteil und das Doppelklebeband verworfen werden. Außerdem muss das Doppelklebeband, welches die Wände des Flusskanals ausbildet, und die Flusszelloberseite vor einer Messung geblockt oder chemisch passiviert werden.

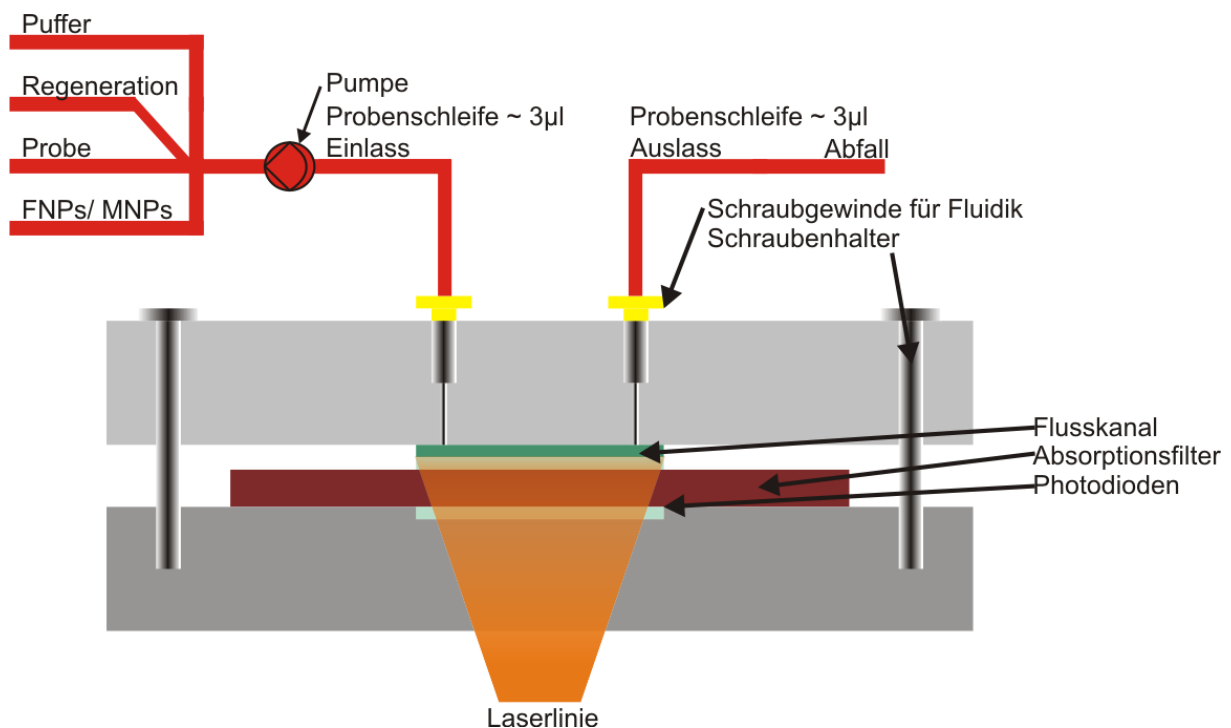


Abbildung 34: **Variante 5:** realisierter Aufbau, Seitenansicht, zusammengebaut während der Messung.

A)

B)

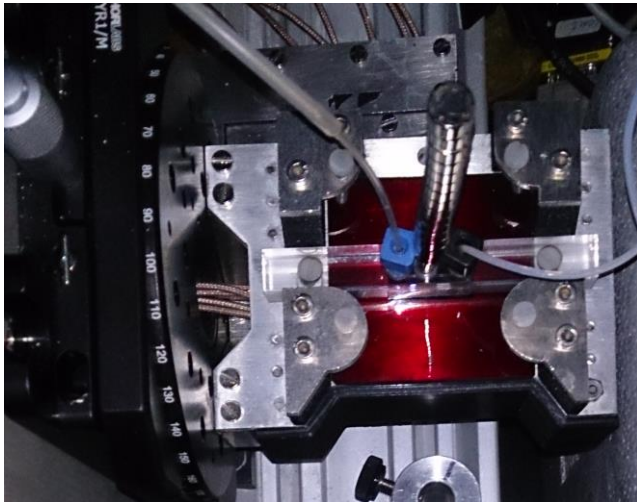


Abbildung 35: Bei A) und B) sind Fotos des realisierten Mounts mit Flusszelle (A) und ohne Flusszelle (B) gezeigt.

In der Seitenansicht von Variante 5 (Abbildung 35) wird deutlich, dass alle Komponenten gut zugänglich und reproduzierbar miteinander verschraubt und die Komponenten einfach zu tauschen sind. Nach einem Flusszellentausch muss keine Neuausrichtung erfolgen, da die Schrauben die vertieften und passgenauen Halter des Photodiodenchips und Absorptionsfilters korrekt positionieren. Der Halter wurde von Marcel Berner am IPV gebaut und entworfen. Die gesamte Fluidik und Flusszelle wurde vom Verfasser entwickelt.

Aufsichten des realisierten Aufbaus:

Deckelteil:
PMMA



Mittelteil:
Ausgeschnittenes
Doppelklebeband



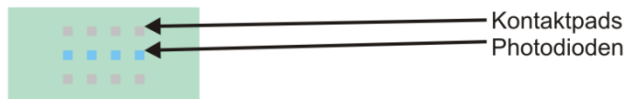
Bodenteil:
Zeonor oder Glas



Absorptionsfilter:
Glas



Photodiodenchip:
Glas



Photodiodenhalter:
Aluminium

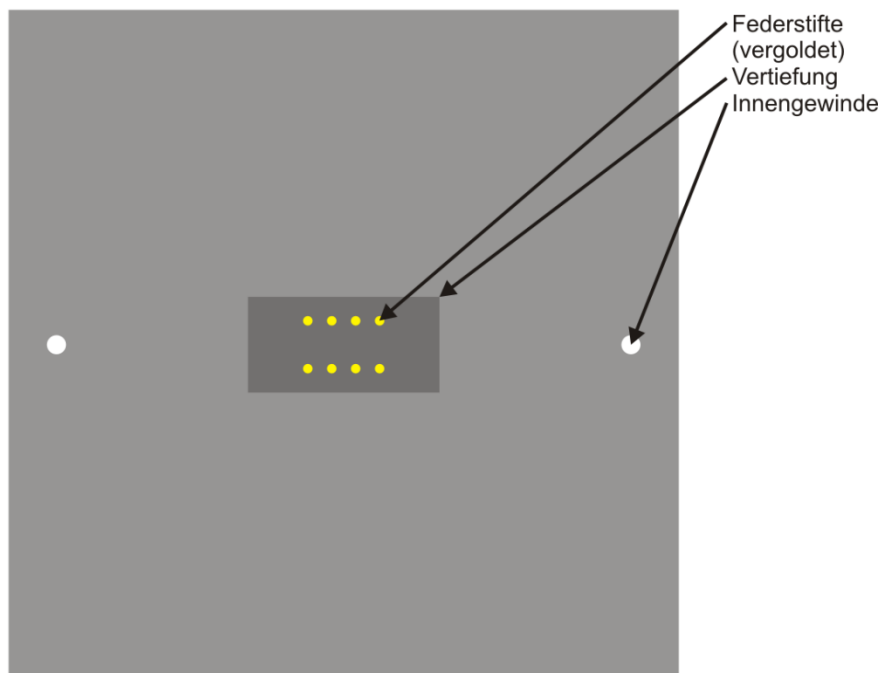


Abbildung 36: **Variante 5:** realisierter Aufbau, Aufsichten (maßstabsgetreu zueinander gezeichnet)

Abbildung 22 in Kapitel 4.1 zeigt ein Foto der Detektionseinheit mit Variante 5 auf einer Schiene mit den weiteren Messaufbaubestandteilen in der Black Box. Weitere Untersuchungen und Optimierungen werden ab Kapitel 4.4.3 gezeigt.

Fazit zu Variante 5:

Zusammenfassend hat Variante 5 viele Vorteile erbracht, die die anderen Varianten zuvor nicht in Summe aufweisen konnten. Die Hitze Problematik wurde so weit wie möglich minimiert und tritt nur bei hohen Umgebungstemperaturen im Labor oder bei sehr langen Messreihen ohne Pause auf. Der Winkel zwischen Laser und Detektor, die Abstand des Lasers und die Höhe der Flusszelle lassen sich einstellen und ermöglichen somit ein hochflexibles Arbeiten. Die modulhaften Komponenten ermöglichen einen problemlosen Austausch bei Defekt einer Komponente. Die Flusszelle ist eine einfach zu handhabende, leicht herzustellende Einwegkomponente, die eine hohe Dichtigkeit aufweist und mit hohen Flussraten verwendet werden kann. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt wie in einem modernen Fluoreszenzspektrometer unter Verwendung eines großen Volumenanteils der Flusszelle.

4.4.1.6. Zusammenfassung zu Flusszellvarianten:

Eine Vergleichstabelle der 5 Varianten wurde anstelle einer Vergleichsdiskussion erstellt.

Tabelle 6: Alle fünf Varianten werden mit ihren vier wichtigsten Eigenschaften verglichen. Die Bewertungsskala ist von –(ungeeignet) bis ++ (sehr gut geeignet).

	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4	Variante 5
Freie Ausrichtbarkeit	-	-	-	-	++
Herstellbarkeit	-	0	0	-	++
Praxistauglichkeit	0	-	-	-	+
Anordnung der Komponenten	--	-	0	-	+
Magneten in der Nähe des Flusskanals Platzierbar	+	++	++	+	+

Viele verschiedene Winkel zwischen Anregungslichtquelle und Detektor werden durch eine **freie Ausrichtbarkeit** der Module erreicht. Die **Herstellbarkeit** der Flusszelle soll günstig und in großen Stückzahlen möglich sein. Die **Praxistauglichkeit** des Messaufbaus ist wichtig, er soll keine Temperaturprobleme haben, die Flusszelle soll einfach zu tauschen sein. Nach dem Tausch soll möglichst keine Neuausrichtung nötig sein. Die **Anordnung der Komponenten** muss so gewählt werden, dass das Hintergrundsignal minimiert wird. Je näher die **Magneten am Flusskanal platziert** werden können, desto stärkere Magnetfallen können Sie erzeugen.

Mit Variante 5 konnten alle Parameter erfüllt werden.

4.4.2. Zusammenbau der entwickelten Flusszelle

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Flusszelle lässt sich sehr einfach aus drei Teilen zusammenbauen (Abbildung 37). Sie besteht aus der Flusszelloberseite, dem Doppelklebeband und der Flusszellunterseite.

Notwendige Schritte für den Zusammenbau der Flusszelle:

- (1) Doppelklebeband und der Flusszellboden müssen zugeschnitten und mitsamt der Flusszelloberseite gereinigt werden.
- (2) Das Doppelklebeband wird auf der Flusszelloberseite angebracht und unter leichtem Druck (ca. 10 N) angepresst. Hierbei ist eine exakte Positionierung wichtig.
- (3) Im folgenden Schritt wird der Flusszellboden angeklebt und es muss erneut mit ca. 10 N für 2 Stunden angepresst werden.

Vor einer Messung kann die Flusszelle je nach zu untersuchendem System durch Inkubation über Nacht mit einer Blocklösung zur chemischen Passivierung (BSA, OVA oder Prionex®) inkubiert werden. Der Vorteil bei dieser Flusszellbauweise ist, dass sie sehr einfach zusammenzubauen und zu fertigen ist und Ober- und Unterseite nach einer gründlichen Säuberung wiederverwendet werden können. Jedoch muss der Flusskanal zum Öffnen zerstört werden. In einer industriellen Fertigung wäre sie günstig und ohne großen Aufwand herzustellen.



Abbildung 37: Zur besseren Sichtbarkeit der Fertigungsschritte wurde der Siliziumwafer als Flusszelloberseite gewählt. A) Flusszelloberseite, B) Flusszelloberseite mit Doppelklebeband und Schutzfolie auf Doppelklebeband, C) fertiger Flusskanal.

4.4.3. Entwicklung der Flusszelloberseite

Es wurden verschiedene Flusszelloberseiten entwickelt, um für Messungen im Flusszellvolumen und auf der Flusszelloberfläche bestmögliche Signalausbeuten zu erhalten. Alle Flusszelloberseiten haben einen ähnlichen Aufbau, welcher durch die Größe und Platzierung der Photodioden und des Absorptionsfilters vorgegeben wird. Ein Einlass gefolgt von einem geraden Flusskanal und einem Auslass auf derselben Seite, der Oberseite, haben alle Varianten gemeinsam.

Anforderungen:

Die Handhabbarkeit, Zuverlässigkeit und Platziergenauigkeit der Fluidik auf der Detektionseinheit wurde untersucht und optimiert. Die Flusszelloberseiten sollen dicht sein, hohe Drücke aushalten und Säure- und Basenbeständig sein. Außerdem sollen sie geringe oder keine unspezifische Wechselwirkungen mit dem Immunoassay aufweisen.

Untersuchung von 5 verschiedenen Varianten:

Im Folgenden werden fünf verschiedene Varianten vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile diskutiert. Anschließend werden die fünf Varianten unter Rücksichtnahme verschiedener Winkel zwischen Anregungslichtquelle und Detektor mittels Fluorophormessungen im Flusszellvolumen verglichen. Die in Variante 2 - 5 verwendeten PMMA Flusszelloberseiten wurden maßstabsgetreu gezeichnet und von der Werkstatt der physikalischen Chemie gebaut. Variante 1 wurde aus einem Siliziumwafer vom Projektpartner INESC-MN aus Lissabon, Portugal gefertigt.

Bei allen Varianten zeigte sich, dass Druckschwankungen unter anderem durch die Bewegungen der Flusszellbodenfolie im Messsignal sichtbar sind. Die Bewegung der Flusszellbodenfolie hat sich in solchen Fällen durch eine Zunahme der Signalintensität zu Beginn eines Pumpschrittes und durch Abnahme der Signalintensität am Ende eines Pumpschrittes gezeigt. Dies erfolgt analog einem Aufblähen und Zusammenschrumpfen der Folie, da eine gerundete Folie mehr Streuung zeigt als eine plane Folie. Dieses Atmen tritt nicht bei allen Immunoassays und Messungen auf, es könnte durchaus auch von adhärennten Partikeln im Ein- oder Auslass herrühren.

4.4.3.1. Flusszelloberseite Variante 1:

Herstellungsverfahren:

Bei Variante 1 der Flusszelloberseite wurden Löcher in einen herkömmlichen Siliziumwafer durch einen Projektpartner (INESC-MN, Portugal) geätzt. Von der Rückseite aus wurden starre PEEK Schlauchstücke mit Muttern zur Stabilisierung mittels Epoxidharzkleber aufgeklebt. Der Klebevorgang ist sehr aufwändig, da die Schlauchstücke und Muttern durch Kupferdraht und Modelliermasse stabilisiert und hohl gehalten werden müssen. Auf dem Wafer entsteht im Kontakt mit Luft eine Siliziumoxidschicht. Diese Oberfläche eignet sich sehr gut für Flusszellen, da sie biokompatibel ist und sich bei Bedarf funktionalisieren lässt.

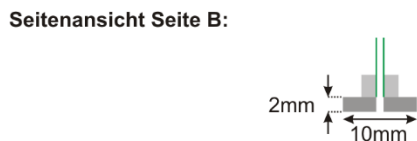
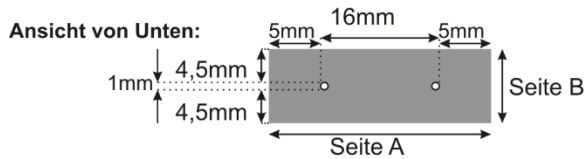
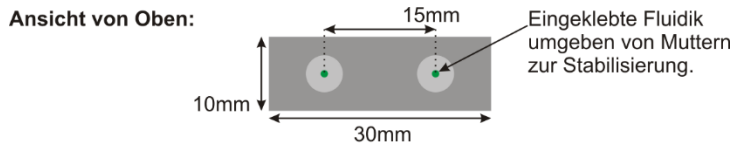
Praxistauglichkeit:

Im praktischen Einsatz stellte sich heraus, dass die angeklebten PEEK Schlauchstücke (Ein- und Auslass) sehr stör anfällig sind. Mechanische Belastungen, ein leichter Zug an den starren PEEK Schlauchstücken, längere Verwendung oder hohe Drücke, hervorgerufen durch hohe Flussraten, können dazu führen, dass Undichtigkeiten entstehen. Außerdem ist eine räumliche Montagetoleranz von Klebestellen der PEEK Schlauchstücke mit dem Wafer nicht immer ohne Versatz gegeben, Hohlräume oder Engstellen sind ebenfalls möglich. Letzteres ist speziell bei hohen Flussraten problematisch und kann zu Undichtigkeiten und Druckschwankungen führen. Dabei ist sowohl der Einlass als auch der Auslass kritisch und relevant.

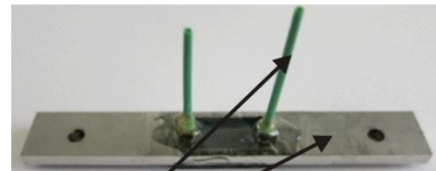
Flexibilität im Messaufbau:

In eine in den Messaufbau eingebaute Flusszelle kann nur orthogonal eingekoppelt werden, da der Siliziumwafer oben nicht transparent ist und nur in einer Ausrichtung das Licht, nämlich durch das transparente Doppelklebeband zum Flusskanal dringen kann. Die

spiegelnden Eigenschaften des Wafers haben signalverstärkende Wirkung, verstärken aber auch die Streuung in der Flusszelle und somit auch das Hintergrundsignal. Die Intensität des gemessenen Signals ist den PMMA Flusszelloberseiten sehr ähnlich.



Fotos der Flusszelle:



Schläuche
Metallhalter
Flusskanal
Einlass
Auslass



Abbildung 38: **Flusszellvariante 1** mit Siliziumwafer als Oberseite. Auf der linken Seite sind die Entwurfszeichnungen in verschiedenen Ansichten ohne den Metallhalter gezeigt. Auf der rechten Seite ist oben die Flusszelle mit Metallhalter zur Montage im Messaufbau gezeigt. Im unteren Foto ist die zusammengebaute Flusszelle von unten zu sehen. Der durch das Doppelklebeband ausgebildete Flusskanal ist deutlich mit dem Ein- und Auslass zu sehen.

4.4.3.2. Flusszelloberseite Variante 2:

Um die Problematik der PEEK Schlauchstücke zu vermeiden, wurde Variante 2 entwickelt.

Herstellungsverfahren:

Die komplette Flusszelloberseite wurde aus einem PMMA-Block geschnitten. Es sind ein Ein- und Auslass mit Schraubgewinde in einen PMMA-Block eingeschnitten worden. Mit den Schraubgewinden in der realisierten Flusszelle konnten die Undichtigkeiten komplett beseitigt werden.

Praxistauglichkeit:

Es kann mit sehr hohen Flussraten von bis zu 1200 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch diese Flusszelle gepumpt werden. Diese hohen Flussraten ermöglichen, Nano- oder Mikropartikel mittels des sehr starken Volumenstromes aus der Flusszelle oder von Permanentmagneten nahe der Flusszelle im Regenerationsschritt, wegzuspülen. Außerdem kann, falls der Immunoassay es zulässt, mit Luft regeneriert werden und diese danach durch die hohen

Pumpgeschwindigkeiten wieder komplett aus dem Flusskanal entfernt werden. Der Vorteil einer Regeneration durch Luft ist, dass eine Luftblase Partikel vor sich her aus der Flusszelle herauschieben kann. Bei partikelbasierten Immunoassays kann sie effektiver als alle klassischen flüssigkeitsbasierten Regenerationsmittel sein. Außerdem vereinfacht das Fehlen einer Regenerationslösung den Aufbau und vermeidet dessen Belastung durch Säuren oder Basen.

Flexibilität im Messaufbau:

Der transparente PMMA-Block ermöglicht das Kippen der Fluidik und die Detektion mit unterschiedlichen Winkeln zwischen Lichtquelle und Detektor.

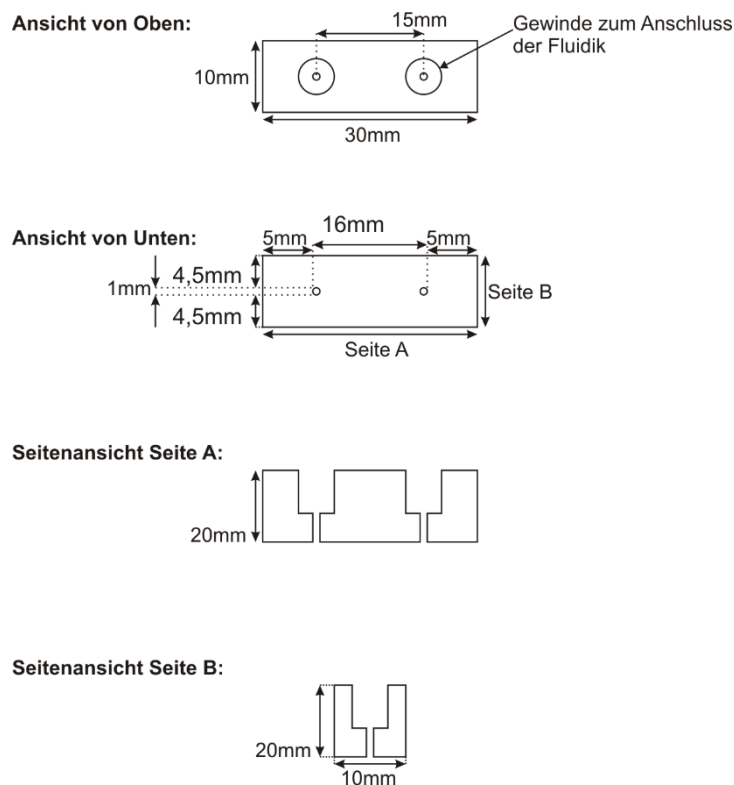


Foto des Metallhalters und der Flusszelloberseite:

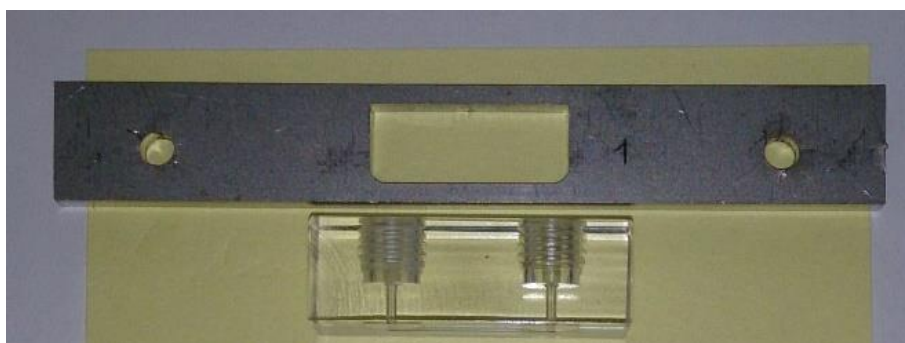


Abbildung 39: **Flusszellvariante 2:** Die Oberseite ist aus PMMA gefräst. Ansonsten ist sie sehr einfach gehalten, um Streuung und ungleichmäßige Ausleuchtung durch die Laserlinie zu vermeiden. Auf der linken Seite sind die Entwurfszeichnungen in verschiedenen Ansichten gezeigt. Auf der rechten Seite und unten sind Fotos der Flusszelle von Seitenansicht Seite A und der Metallhalterung gezeigt.

4.4.3.3. Flusszelloberseite Variante 3:

Variante 3 besitzt alle Vorzüge von Variante 2. Sie wurde jedoch in einem Parameter verändert.

Herstellungsverfahren:

Die Bauweise mit dem Doppelklebeband als Mittelteil gibt die Flusskanaltiefe durch die Doppelklebebanddicke vor. Die Verwendung des PMMA Blockes als Flusskanaloberseite ermöglicht, den Flusskanal nach oben hin zu vergrößern, indem eine Vertiefung im Bereich der Kavität zwischen Einlass und Auslass einfräst wird.

Praxistauglichkeit:

Die circa 1 mm hohe und 1 mm tiefe Vertiefung generiert ein zusätzliches Flusskanalvolumen von 14 μL zu dem durch das verwendete Doppelklebeband ausgebildete Volumen. Dadurch wird die Detektion eines größeren Volumens zu einem Zeitpunkt ermöglicht. Dies kann bei einigen Fragestellungen die Nachweisgrenze von Fluorophoren erniedrigen.

Flexibilität im Messaufbau:

Analog Variante 2

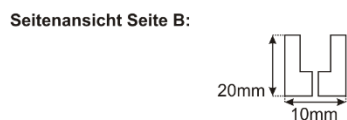
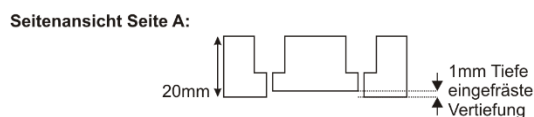
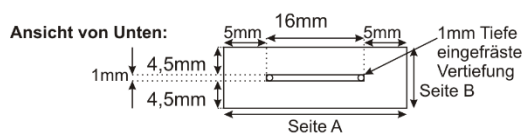
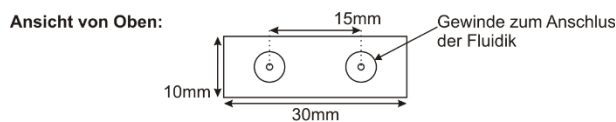


Foto der Flusszelloberseite:



Abbildung 40: **Flusszellvariante 3** mit Fräsung zwischen Einlass und Auslass. Auf der linken Seite sind die Entwurfszeichnungen in verschiedenen Ansichten gezeigt. Auf der rechten Seite ist ein Foto der Flusszelle von schräg oben gezeigt.

4.4.3.4. Flusszelloberseite Variante 4:

Die Flusszelloberseite der Variante 4 basiert auf Variante 2.

Herstellungsverfahren:

Variante 4 besitzt eine eingefräste Schräge zwischen Einlass und Auslass auf der Oberseite über dem Flusskanal. Diese Schräge soll ein Neigen der Flusszelle zur Lichteinkopplung

überflüssig machen und durch die Schräge das Licht in die Flusszelle hinein brechen. Mittels dem in Kapitel 2.1 beschriebenen Snelliusschen Brechungsgesetz, lässt sich die Brechung des eingekoppelten Laserlichtes in Richtung des Flusszellinneren berechnen:

$$\lambda = 593,5 \text{ nm}; n(\text{PMMA}) = 1,49; n(\text{Luft}) = 1; \gamma = 45^\circ$$

Formel mit errechnetem Wert:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{\sin(\gamma)}{\sin(\alpha)} \qquad \frac{1}{1,49} = \frac{\sin(45^\circ)}{\sin(\alpha)} \qquad \alpha = 24,49^\circ$$

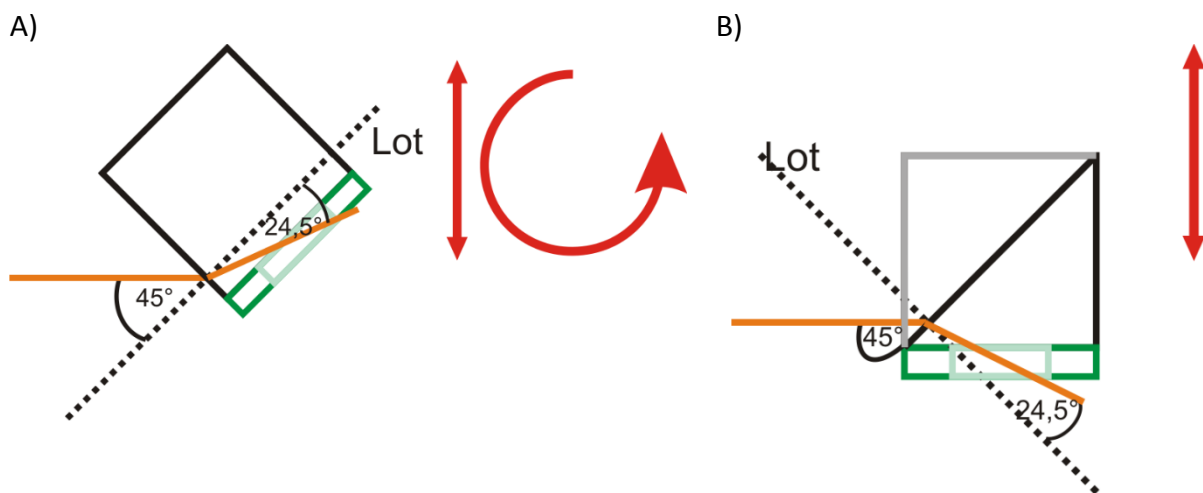


Abbildung 41: Bei A) ist die Flusszelloberseite Variante 2 zu sehen, welche geneigt und in der Höhe eingestellt wird. Bei B) ist die Flusszelloberseite Variante 5 zu sehen, welche nur noch in der Höhe feinjustiert wird.

Wie aus Abbildung 41 A) ersichtlich, ist ein Winkel von 45° als Schräge auf der Flusszelloberseite von Nöten, um das Anregungslicht, wie unter B) gezeigt, in den Flusskanal zu brechen. Hierbei ließ sich, wie oben gezeigt, mittels des Brechungsgesetzes der Winkel der Lichtbrechung in Richtung Flusskanal berechnen.

Praxistauglichkeit:

Der große Vorteil dieser Variante ist, dass statt der Neigung nur noch die Höhe der Flusszelle justiert werden muss. Außerdem ist in diese Flusszelloberseite zusätzlich die Halterung zur Anbringung an den Messaufbau integriert worden, um die Flusszelle einfacher ein- und ausbauen zu können. Der PMMA-Block ist folglich mit Löchern zur Befestigung am Messaufbau versehen worden und deutlich breiter. Bei Variante 1 bis 3 war zusätzlich ein Metallbügel, wie in Abbildung 38 rechts oben zu sehen, nötig, um die Flusszelle am Messaufbau anzubringen.

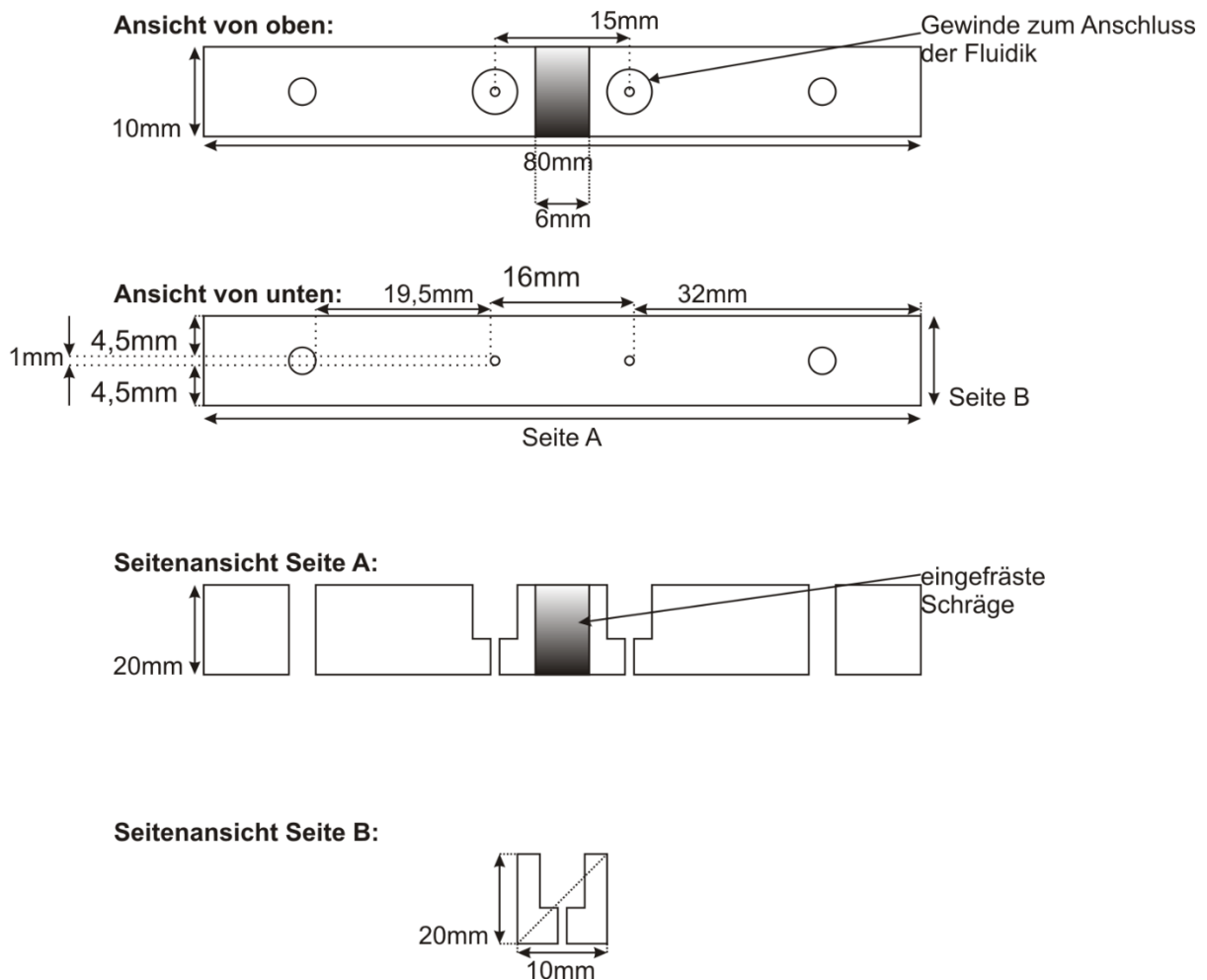


Foto der Flusszelloberseite:



Abbildung 42: **Flusszellvariante 4:** Die dunkle Fläche zwischen Einlass und Auslass zeigt die eingefräste Schräge. Oben sind die Entwurfszeichnungen in verschiedenen Ansichten gezeigt. Unten ist ein Foto der Flusszelle zu sehen.

4.4.3.5. Flusszelloberseite Variante 5:

Variante 5 der Flusszelloberseite vereint die Eigenschaften der Variante 3 und 4.

Herstellungsverfahren:

Es ist, wie in Variante 3, in die PMMA Unterseite etwas eingefräst, allerdings ist die Einfräsung gewinkelt, die Schräge ist der Außenschräge von Variante 4 nachempfunden. Es wird ein im Profil dreieckiger Flusskanal erhalten, welcher sich nach oben hin verjüngt.

Praxistauglichkeit:

Das zusätzlich generierte Flusszellvolumen beträgt 4 μL . Die Einfräsung soll zum einen das Flusszellvolumen vergrößern, um ein größeres Volumen zu einem Zeitpunkt zu betrachten.

Zusätzlich soll die Schräge das Anregungslicht in Richtung Flusskanal lenken und eine Neigung des Flusskanals überflüssig machen.

In der Praxis stellte sich leider heraus, dass Luftblasen häufig in der Dreiecksspitze der Einfräsung hängen bleiben und nur sehr schwer zu entfernen sind. Deswegen wurde für weitere Messungen eine andere Flusszelloberseite bevorzugt.

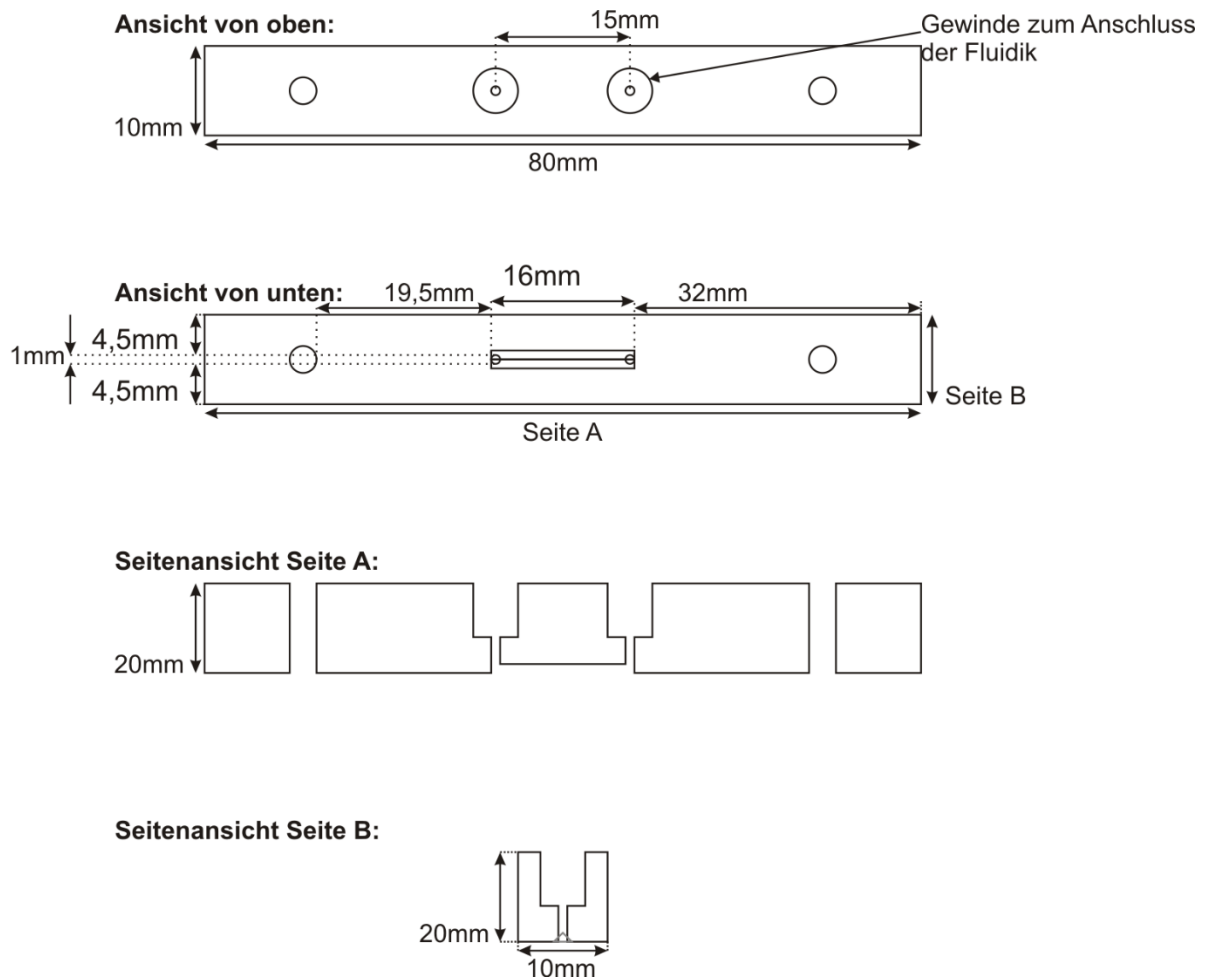


Foto der Flusszelloberseite:

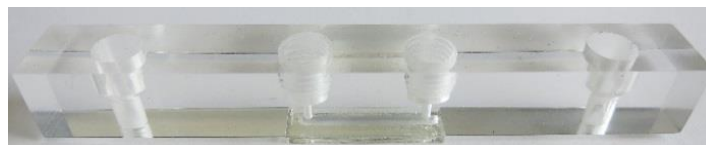


Abbildung 43: Flusszellvariante 5 mit rechteckig eingefrästem Flusskanal. Oben sind die Entwurfszeichnungen in verschiedenen Ansichten gezeigt. Unten ist ein Foto der Flusszelle zu sehen.

4.4.3.6. Vergleich der Flusszelloberseitenvarianten:

Abgesehen von den schon bei der Vorstellung der Flusszelloberseiten angesprochenen Aspekten der Herstellungsverfahren und Praxistauglichkeit werden im Folgenden die Flusszelloberseiten mittels Fluoreszenzmessungen verglichen.

Es wurden Dreifachmessungen im Durchfluss im Volumen mit Variante 1 bis 5 der Flusszelloberseite durchgeführt. Die Messungen wurden jeweils mit derselben Konzentration

Fluorophor durchgeführt. Falls möglich wurden zwei verschiedene Winkel zwischen Anregungslichtquelle und Detektor, 90° und 135°, untersucht. Alle Flusszelloberseiten konnten mit der orthogonalen Anordnung getestet werden. Variante 2 - 5 konnten, da ihre Oberseiten transparent sind und durch sie hindurch eingestrahlt werden kann, mit 135° Neigung zwischen Laser und Photodiode getestet werden. Der Messablauf war stets derselbe: Basislinie mit Puffer, langsame Probeninjektion und anschließend schnelles Spülen mit Puffer, bis die Basislinie wieder erreicht wird. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 4.3 unter dem Punkt Messungen im Durchfluss detailliert gezeigt.

Die x- und y-Achse der Abbildung 44 und Abbildung 45 sind genau gleich skaliert, um die Messungen mit den verschiedenen Winkeln besser vergleichen zu können.

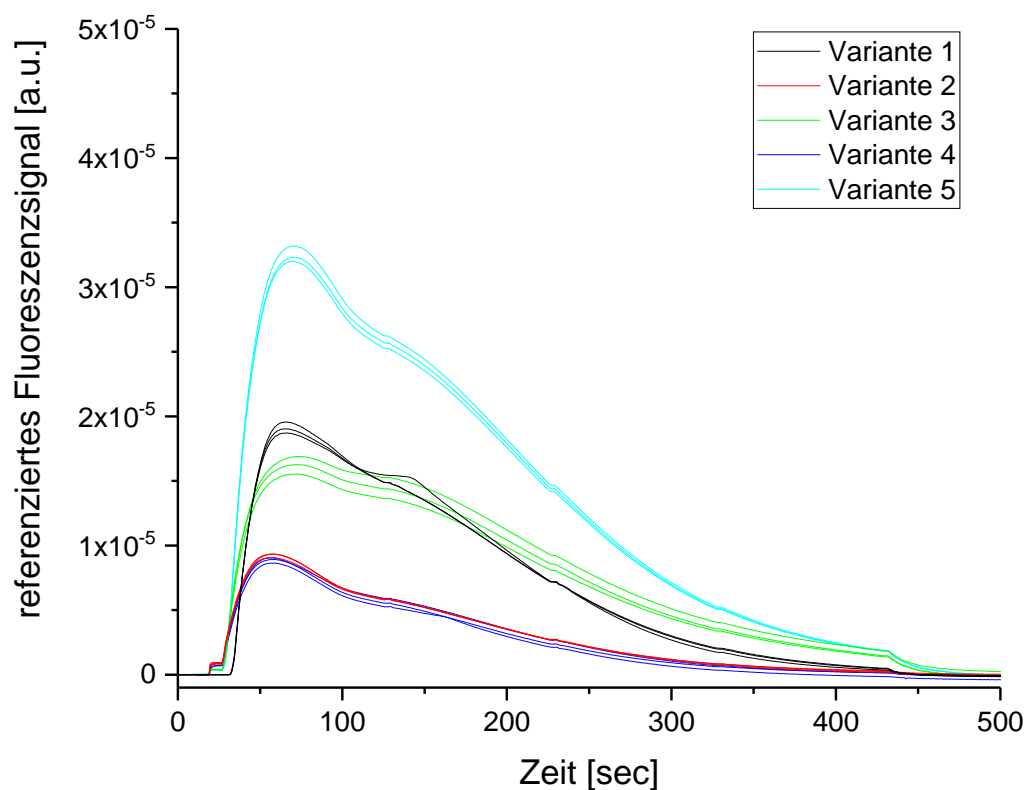


Abbildung 44: Vergleichsmessungen der verschiedenen Flusszelloberseiten mit 90° Flusszellneigung. Jede Flusszelle wurde optimiert ausgerichtet und dreifach gemessen. Bei allen Messungen wurde dieselbe Konzentration des Fluorophors DY636 verwendet. $c(\text{DY636}) = 1,3 \mu\text{mol/L}$ Es wurde das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Bei **Variante 1** handelt es sich um den Siliziumwafer als Flusszelloberseite. **Variante 2** ist ein PMMA-Block ohne Einfräsungen. **Variante 3** verfügt über eine viereckige Vertiefung und damit Vergrößerung des Flusskanals. **Variante 4** über eine über dem Flusskanal liegende Schräge zur Lichteinkopplung und **Variante 5** über eine rechteckige Einfräsung.

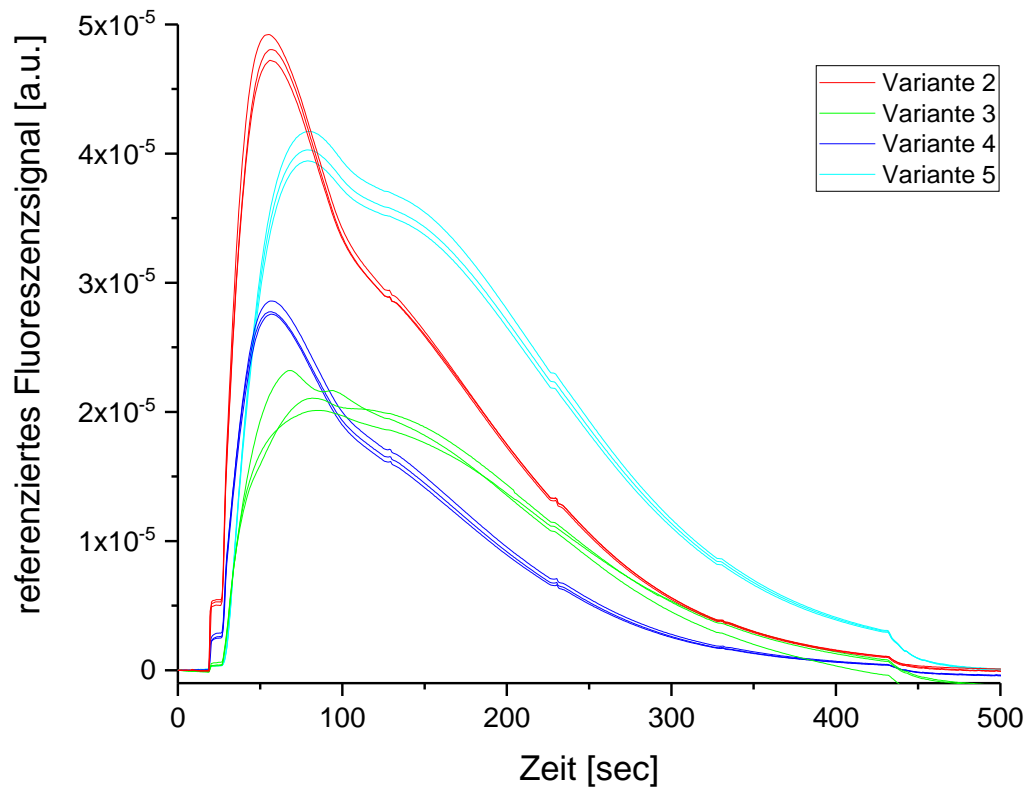


Abbildung 45: Vergleichsmessungen der verschiedenen Flusszelloberseiten mit 135° Flusszellneigung. Jede Flusszelle wurde optimiert ausgerichtet und dreifach gemessen. Bei allen Messungen wurde dieselbe Konzentration des Fluorophors DY636 verwendet. $c(\text{DY636}) = 1,3 \mu\text{mol/L}$. Es wurde das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen. **Variante 2** ist ein PMMA-Block ohne Einfräsungen. **Variante 3** verfügt über eine viereckige Vertiefung und damit Vergrößerung des Flusskanals. **Variante 4** über eine über dem Flusskanal liegende Schräge zur Lichteinkopplung und **Variante 5** über eine rechteckige Einfräsung.

Als Maß für die detektierte Fluoreszenz wird, wie in Kapitel 4.3 gezeigt, die Fläche unter der Kurve der Detektion im Fluss herangezogen. Die Stufen am Anfang der Probeninjektion bei den Messungen in Abbildung 44 und Abbildung 45 sind Druckschwankungen in der Fluidik geschuldet, fallen aber bei der AUC Auswertung nicht weiter ins Gewicht. Die ausgewerteten Flächen aus Abbildung 44 und Abbildung 45 sind in Abbildung 46 als Säulendiagramme dargestellt.

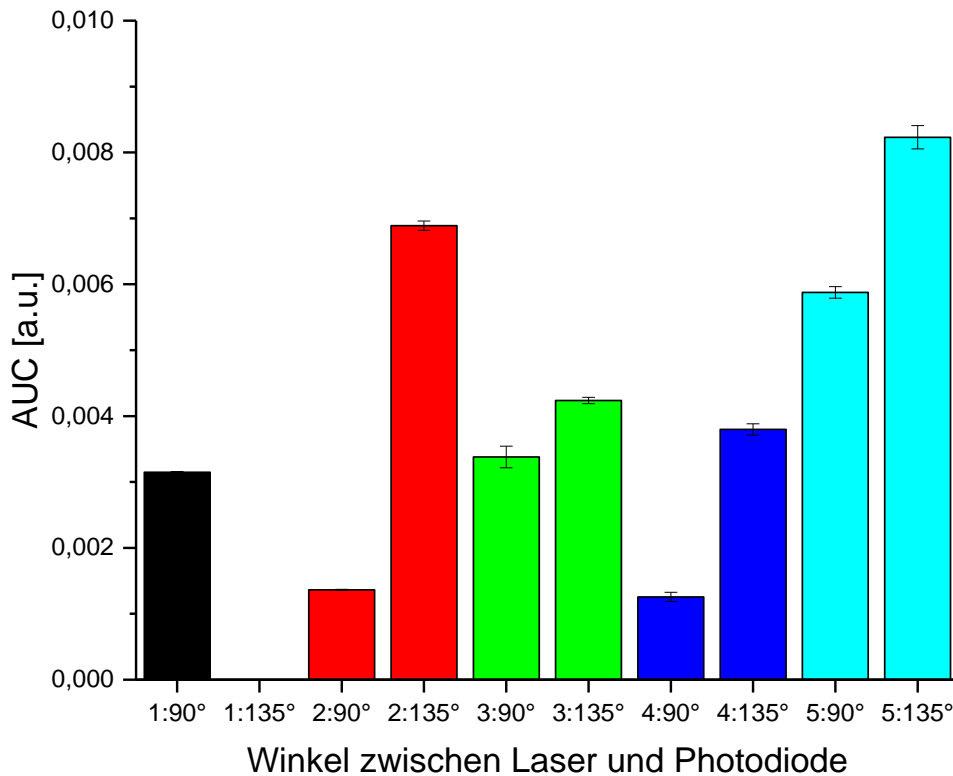


Abbildung 46: Die AUC der Messungen aus Abbildung 44 und Abbildung 45. x-Achse: Die Ziffer 1 steht für die Flusszelloberseite Variante 1, die Zahl in Grad steht für den Neigungswinkel zwischen Anregungslichtlinie und Photodiode. Bei **Variante 1** handelt es sich um den Siliziumwafer als Flusszelloberseite. **Variante 2** ist ein PMMA-Block ohne Einfräsungen. **Variante 3** verfügt über eine viereckige Vertiefung und damit Vergrößerung des Flusskanals. **Variante 4** über eine über dem Flusskanal liegende Schräge zur Lichteinkopplung und **Variante 5** über eine rechteckige Einfräsung.

Detektion mit 90° zwischen Lichtquelle und Detektor:

Wie aus Abbildung 46 ersichtlich, wurden bei dem Winkel von 90° Neigung zwischen Laser und Messphotodiode unterschiedliche Signale für die verschiedenen Varianten erhalten. Wie erwartet zeigt Variante 1 bei der Detektion mit 90° hohe Signale, da der Wafer zusätzlich reflektiert. Die Varianten 2 und 4 zeigen ziemlich niedrige Signale. Das Signal von Variante 2 ist deutlich niedriger als Variante 1, da sie praktisch gleich ist, aber keine reflektierenden Eigenschaften hat. Variante 4 ist im Signalverlauf praktisch gleich wie Variante 2, bei der Einkopplung mit 90° durch das Doppelklebeband wird die eingefräste Schräge nicht vom Strahlengang beleuchtet und liefert wie erwartet fast dasselbe Signal, da die beleuchteten Strukturen dieselben sind. Die Varianten 3 und 5 zeigen mit den Einfräsungen höhere Signale. Variante 5 hat durch den abgeschrägten Winkel mehr Licht Richtung Flusskanal reflektiert und hat ein höheres Signal als Variante 3.

Es sind also die Varianten 1, 3 und 5 den Varianten 2 und 4 in dieser Ausrichtung deutlich überlegen. Variante 1 kann in dieser Anordnung wegen der Einfachheit und trotzdem hohen Signale als gut angesehen werden. Leider ist sie, wie im Vorangehenden erwähnt, fluidisch

gesehen nicht sehr zuverlässig. Variante 5 ist im Vergleich dazu fluidisch zuverlässig. Es stellte sich jedoch bei Messungen mit der Flusszelloberseite heraus, dass oftmals Luftblasen oder Partikel in der Dreiecksfräsung hängen bleiben. Wegen dieser Nachteile wurden die Varianten 2 bis 5 zusätzlich in der 135° Winkelanordnung untersucht.

Detektion mit 135° zwischen Lichtquelle und Detektor:

Mit dem Winkel von 135° Neigung zwischen Laser und Messphotodiode zeigen Variante 2 und 4 denselben Signalverlauf, wie in Abbildung 45 zu sehen ist. Sie haben beide keine Einfräsung und ähneln sich deswegen. Vermutlich ist das Signal von Variante 2 höher, da die plane Fläche des PMMA-Blockes besser poliert werden konnte als die aus Herstellungsgründen leicht matte Schräge von Variante 4. Variante 3 und 5 verhalten sich ebenfalls ähnlich, da Sie über eine Einfräsung verfügen. Variante 5 zeigt ein größeres Signal als Variante 3, was vermutlich daran liegt, dass der eingefräste Winkel etwas günstiger ist, da weniger Streuung in der Flusszelle auftritt und das Licht in Richtung Flusskanal/ Detektor gebrochen wird.

Zusammenfassend kann Variante 2 und 5 am meisten von der 135° Winkelanordnung profitieren. Variante 2 muss allerdings vorgezogen werden, da sie keine zusätzliche Kavität besitzt, in der Partikel oder Luftblasen hängen bleiben können.

4.4.3.7. Zusammenfassung:

Aufgrund des Mess- und Auswertungsprinzips der AUC im Durchfluss kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen Flusskanalvolumina eine untergeordnete Rolle auf das in Abbildung 46 ausgewertete Signal haben. Es ließ sich also kein Trend dahingehend erkennen, dass sich in einem zeitgleich größeren detektierten Volumen größere Signale erzielen lassen. Folglich wurde bei den folgenden Messungen Variante 2 mit 135° Neigung bevorzugt, da hierbei ein guter Kompromiss zwischen praktischer Anwendbarkeit, optischer Streuung und Signalintensität gefunden wurde.

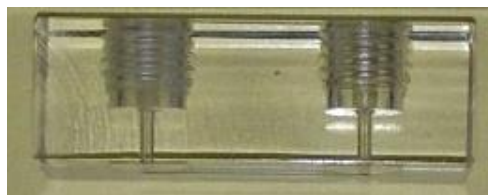


Abbildung 47: Foto der in den folgenden Messungen verwendeten Flusszelloberseitenvariante 2.

4.4.4. Vergleich unterschiedlicher Flusszellwandmaterialien

Das Material, aus dem die Flusszelle und die Flusszellwände bestehen, muss vielen Anforderungen gerecht werden. Dadurch beschränkt sich die Auswahl an Materialien auf Wenige. Am häufigsten werden Glas, PMMA, Mylar, Zeonor® oder PDMS verwendet.

Glas:

Die klassischen Flusskanäle und Küvetten wurden aus Glas gefertigt, da es aufgrund seiner chemisch inerten Eigenschaften ein sehr gut geeignetes Material ist. Allerdings ist es sehr

aufwändig, mittels Ätztechniken und Lithographie ein Glas zu strukturieren und zu einem Flusskanal zu verschließen. Die Massenproduktion ist sehr aufwändig und teuer in Bezug auf Einwegflusszellen. Ein schnelles Anpassen und Verändern der Form wäre sehr aufwändig und kostenintensiv.

PDMS:

Aus PDMS können problemlos im Labormaßstab individuell angepasste Flusszellen hergestellt werden [76]. Es lässt sich nach einer Aktivierung im Plasma sehr gut an Glas anpressen und bildet dadurch einen dichten Hohlraum, die Flusszelle, aus. Jedoch ist es in einer industriellen, automatisierten Fertigung schwer, diese mit gleichbleibenden Parametern zu produzieren [1].

PMMA:

PMMA ist für die Massenproduktion geeignet, da man es durch Prozesse wie Prägen, Spritzguss oder Fräsen einfacher als Glas bearbeiten kann. Man benötigt jedoch sehr gute und teure Werkzeuge, um PMMA genau und reproduzierbar zu bearbeiten. Außerdem muss für jede neue Form eine neue teure Spritzgussform gefertigt werden, was die Kosten für verschiedene Laborprototypen zu teuer macht.

Doppelklebebänder:

Mittels eines Lasers können Doppelklebebänder in jede beliebige Geometrie zugeschnitten werden. Diese formen die Wände von Flusskanälen zur Bildung der Flusszelle aus. Dadurch können problemlos viele verschiedene Flusskanalformen für experimentelle Laboraufbauten oder hochskalierte Massenproduktionen umgesetzt werden.

Fazit:

In der entwickelten Flusszelle wurde Doppelklebeband zur Ausbildung der Flusszellwände verwendet. Die Flexibilität, Massenproduzierbarkeit, Reproduzierbarkeit und der günstige Preis stellen gute Parameter für eine Einwegflusszelle in einem POCT-Gerät dar.

4.4.4.1. Anforderungen an Doppelklebeband und Klebstoffe:

Es wurden verschiedene Klebstoffe auf ihre Eignung als Wandmaterial für die Flusszelle hin charakterisiert und untersucht. An das Material der Doppelklebebänder werden viele Anforderungen gestellt. Das Kleben und Ausbilden des Flusskanals soll reproduzierbar und zuverlässig erfolgen. Bezüglich der optischen Eigenschaften soll es transparent sein und eine möglichst geringe Absorption, Eigenfluoreszenz und Streuung oberhalb der Anregungswellenlänge von 589 nm zeigen. Das Material soll Temperaturen im Arbeitsbereich (Raumtemperatur bis ca. 40°C) aushalten und wasserfest, säure- und basenresistent sein. Es soll am Rand, wo es die Flusskanalform ausbildet, möglichst inert sein. Es wurden sehr flache Flusskanäle entwickelt, um die magnetischen Partikel in einem homogenen Immunoassay im Volumenstrom möglichst quantitativ an Magnetfallen festhalten zu können.

Die hier getesteten und verwendeten Doppelklebebänder sind ursprünglich nicht zur Verwendung als Flusszellwand vorgesehen worden. Folgende Doppelklebebänder wurden

getestet: 3M 468MP 200MP, 3M 9469 PC, 3M 300 LSE, mfcs und weitere nicht aufgeführte Klebebänder und Klebstoffe. Einige nicht aufgeführte Doppelklebebänder sind weder wasserfest noch säurefest, weswegen alle Ansätze mit diesen wieder verworfen wurden. Außerdem sind Doppelklebebänder mit Träger besser geeignet, da sie leichter zu verarbeiten sind (kein Verziehen) und unter leichtem Andruck formstabil bleiben und nicht verlaufen und dadurch den Flusskanal verschließen. Nachdem eine Auswahl an brauchbaren Lösungen getroffen wurde, wurde darauf der Fokus gelegt und diese ausführlich untersucht und ihre Eigenschaften erforscht.

4.4.4.2. [Eigenschaftenvergleich:](#)

Es werden die beiden favorisierten Doppelklebebänder und der am besten geeignete Kleber in Tabelle 7 verglichen.

Tabelle 7: Vergleich der Eigenschaften der Doppelklebebänder und eines Klebstoffes.

Hersteller		
mfcs	3M 9629PC	NOA 68 Optical Adhesive
Klebeart		
Doppelklebeband	Doppelklebeband	Flüssigkleber
Klebeträger Material		
PET (25 µm)	PE (13 µm)	-
Klebstoffe		
Acrylat (60 µm)	Acrylat (43,5 µm)	Mercaptoester & Tetrahydro-furfuryl
Gesamtdicke		
140 µm	100 µm	Variabel, schlecht reproduzierbar
Brechungsindex		
1,49	1,47-1,5	1,54
Optische Qualität		
Sehr gut	Gut	Gut

Im Folgenden wird auf die weiteren Eigenschaften Säureresistenz und optische Eigenschaften eingegangen.

Säuretestzyklen:

Zunächst werden die erfolgreich durchgeführten Säuretestzyklen genauer erläutert. Der zusammengebaute Flusskanal wurde auf Säureresistenz in Verbindung mit Regenerationsmitteln getestet. Es wurden 30 Zyklen mit SDS 0,5 % pH= 2 und 30 Zyklen mit GndHCl 6M pH= 1,5 getestet, danach zeigten beide Klebebänder aus Tabelle 7 weder sichtbare Degradation noch Undichtigkeiten. Sie sind somit zum Einsatz mit aggressiven Regenerationsmitteln bestens geeignet.

Optische Eigenschaften:

Der Fluoreszenz-Plate-Reader:

Um die Eigenfluoreszenz der verschiedenen Doppelklebebänder und des Klebers zu erforschen, wurden mit einem Fluoreszenz-Plate-Reader Untersuchungsmessungen durchgeführt. Bei einem Fluoreszenz-Plate-Reader handelt es sich um einen hochauflösenden Scanner, welcher maximal die Größe eines Standard Objektträgers abscannen kann. Für die Untersuchungen der Doppelklebebänder wurde ein Spezialhalter entworfen und gebaut, um die 1 · 2 cm großen Ausschnitte zu charakterisieren. Die Fluoreszenzanregung erfolgt bei den durch die verbauten Laser vorgegebenen Wellenlängen 532 und 625 nm. Detektiert wird mittels eines Photomultipliers und den jeweils passenden Filtersätzen in den Bereichen: 558 – 593 nm und 660 – 690 nm. Mittels der Gain Einstellung lässt sich die Vorspannung des Photomultipliers und somit dessen Sensitivität einstellen und an die zu detektierenden Signalintensitäten anpassen.

Ergebnisdiskussion:

Der Fluoreszenz-Plate-Reader weist keinen Laser bei der im Aufbau verwendeten Wellenlänge von 589 nm auf. Trotzdem ermöglichen die beiden Laser im Fluoreszenz-Plate-Reader eine ausreichende Einschätzung der Eigenfluoreszenz, da die Anregungswellenlänge ($\lambda = 589 \text{ nm}$) zwischen den Lasern des Gerätes (532 nm und 625 nm) liegt und die Abstände der Anregungswellenlängen nicht zu groß und somit nicht zu weit entfernt sind. Die detektierten Signale setzen sich aus Lichtstreuung, insbesondere an den Substratkanten, und Eigenfluoreszenz der Materialien zusammen. Ein geringer Streuungsunterschied der Materialfläche kann mit den unterschiedlichen Herstellungsprozessen zusammenhängen. Beim Spin-Coating wird der Klebstoff mittels dünner Fäden auf das Trägermaterial bei der Herstellung aufgebracht. Die verschiedenen Faserdicken beim Spin-Coating von Doppelklebebändern führen zu unterschiedlichen optischen Qualitäten. Des Weiteren dürfen beim Aushärten keine Gasblasen, wie bei einem getesteten auf Epoxidharz basierenden Klebstoff, entstehen. Die zu verbindenden Materialien dürfen nicht durch den Klebstoff und dessen chemische Eigenschaften beeinträchtigt werden, zum Beispiel blind werden oder schneller altern.

Bei den beiden Doppelklebebändern ist der Unterschied in der Eigenfluoreszenz bzw. Streuung deutlich bei der Anregungswellenlänge von 532 nm zu sehen. Bei einer Anregung mit 625 nm zeigen beide Doppelklebebänder kaum noch Eigenfluoreszenz bzw. Streuung. Der optische Spezialkleber NOA 68 (Norland Optical Adhesive) zeigt bei beiden Wellenlängen eine geringe Eigenfluoreszenz, allerdings sieht man eine leichte Welligkeit, obwohl mit höchster Sorgfalt gearbeitet wurde. Dies liegt mit daran, dass der Kleber kein Trägermaterial besitzt und durch einfache Methoden (Klebestreifen zur Ausbildung des Flusskanalhohlraumes) während des Klebens in Form gehalten wurde.

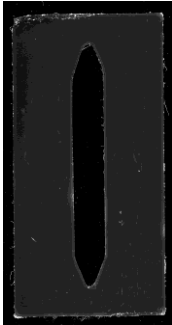
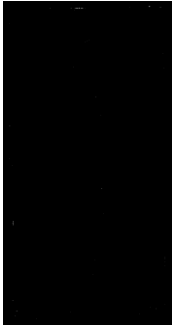
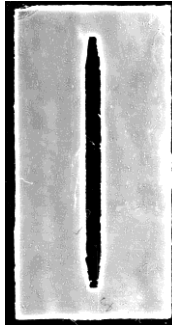

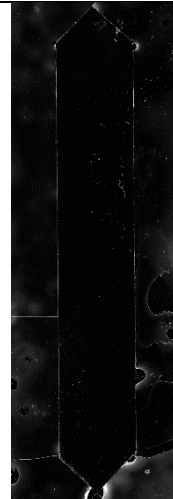

					
mfcs Ex.: 532 nm Em.: 558-593 nm Gain: 600	mfcs Ex.: 625 nm Em.: 660-690 nm Gain: 600	3M Ex.: 532 nm Em.: 558-593 nm Gain: 600	3M Ex.: 625 nm Em.: 660-690 nm Gain: 600	NOA 68 Ex.: 532 nm Em.: 558-593 nm	NOA 68 Ex.: 625 nm Em.: 660-690 nm

Abbildung 48: Ex.: Anregungswellenlänge, Em.: detektierter Emissionsbereich, Gain: Photomultiplier Vorspannung. Um die Eigenfluoreszenzen zu detektieren, wurden die Doppelklebebander auf Objektträger aufgeklebt und gescannt. Hierbei hatten die Doppelklebebander die Bemaßung 1 · 2 cm und der mit NOA 68 geklebte Testkanal Objektträgergröße (7,6 · 2,6 cm).

Fazit:

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zwei gut verwendbare Doppelklebebander (mfcs und 3M 9629 PC) gefunden wurden. Viele gute Alternativen (zum Beispiel der Klebstoff NOA 68) scheiterten an der Verarbeitbarkeit (viele Doppelklebebander ohne Kunststoffträger) und andere an der Beständigkeit. Die beiden in der Arbeit verwendeten und in Kapitel 4.5.4 in der Flusszellbreite verglichenen Doppelklebebander wurden optisch und chemisch auf ihre Eignung im Flusskanal hin untersucht und für geeignet befunden.

4.4.5. Vergleich unterschiedlicher Flusszellböden

Es wurden verschiedene Flusszellböden getestet und verglichen. Glas kann als etablierte Oberfläche für Immunoassays und Flusszellen angesehen werden. Zeonor® Folie wurde noch nicht oft im Zusammenhang mit Immunoassay Flusszellen verwendet und wurde deswegen ausführlicher charakterisiert.

4.4.5.1. Zeonor® Folie:

Es wurden Tests dahingehend durchgeführt, ob Zeonor® Film ZF14 – 050 (50 µm) und ZF14 – 100 (100 µm) sich für den NANODEM Flusskanal eignet oder nicht. Die Tests wurden mit verdünntem Humanserum (HS) (1:1 verdünnt mit Reinstwasser) durchgeführt. Zeonor® Film wurde in eine Materialtestflusszelle eingebaut. Das Material wurde die ganze Zeit über mit einer 12 V, 20 W Halogenlampe beleuchtet und war die ganze Zeit mit verdünntem HS in Kontakt. Die Testlösung wurde an den Tagen 1, 2, 4, 8, 9 und 10 ausgetauscht. An den Tagen 4 und 10 wurde die Materialtestflusszelle geöffnet und auf Transparenz und Rigidität

getestet. An beiden Tagen konnte keine Eintrübung oder Brüchigkeit festgestellt werden. Bei den Tests mit PBS wurde wie bei den Tests mit der verdünnten HS Lösung verfahren. Die Testlösung wurde an den Tagen 1, 2, 7 und 13 ausgetauscht. An Tag 13 wurde die Testzelle geöffnet und auf Transparenz und Rigidität getestet. Der Zeonor® Film war klar, aber hatte an der Stelle, an der ein handelsüblicher Dichtungsring die Folie berührt hat, brüchige Stellen. Vermutlich hat ein im Dichtungsring enthaltener Stoff die Folie angegriffen. Deswegen wurde in der später realisierten Flusszelle kein Dichtungsring verwendet.

Die optischen Eigenschaften sind laut Herstellerangaben sehr gut. Laut Hersteller zeigt Zeonor® die geringste Eigenfluoreszenz aller Plastiksorten, welche für Spritzgießverfahren geeignet sind. Bei den verwendeten Wellenlängen ist in der Herstellergrafik kein Signal zu sehen. Außerdem beträgt die Durchlässigkeit bei den verwendeten Wellenlängen konstant 90 %.

Fazit:

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Zeonor® Folie ein brauchbares Material für den Flusszellboden darstellt. Laut Herstellerangabe ist die Glasübergangstemperatur ($T_g = 136$ °C). Somit treten auch bei normalen thermischen Belastungen keine Probleme auf. Als geringer Nachteil stellte sich in späteren Messungen heraus, dass dünne Folien manchmal auf schwankende Drücke im Flusszellinneren reagieren und sich bei dem Beginn eines Pumpzyklus leicht ausdehnen, was zu einer Zunahme der Streuung im Messsignal führt (ausführlich in Kapitel 4.4.3, Variante 1). Glastransducer zeigen im Vergleich dazu diese Streusignale nicht. Dafür hat Zeonor® in der Herstellung gegenüber Glas einige Vorteile.

4.5. LIF-Messaufbau Optimierung

In Kapitel 4.5.1 werden allgemeine Optimierungen vorgestellt, in den Kapiteln 4.5.2 bis 4.5.3 die wichtigsten Messaufbauoptimierungen in einzelnen Unterkapiteln vorgestellt und diskutiert. Bei der Entwicklung einer Mikrofluidik für einen LIF-Messaufbau gibt es viele Materialien, Fluoreszenzfarbstoffe, Detektortypen, Anregungslichtquellen, optische Filter und Winkelausrichtungen, zwischen denen ausgewählt und abgewogen werden muss.

4.5.1. Allgemeine Optimierungen des LIF-Messaufbaus

Es wurden viele Optimierungen an verschiedenen Teilen des Messaufbaus vorgenommen. Schwerpunkte der Arbeiten waren die Bereiche Fluidik, Optik, Abschirmung und Kabelführung. Es wurden umfangreiche Weiterentwicklungen und Optimierungen durchgeführt und die Komponenten an die Anforderungen des LIF Messaufbaus angepasst.

4.5.1.1. Allgemeine Optimierung der Fluidik:

Es wurde jeder einzelnen Immunoassayreagenz ein eigener Probenschlauch zugeordnet. Die Flussraten jedes Assayschrittes wurden angepasst, die maximalen Flussraten der verschiedenen Flusskanalvarianten im Experiment ermittelt. Die Flussraten wurden an die verschiedenen Assayschritte angepasst. Der Schlauch am Auslass der Fluidik wurde im Durchmesser vergrößert, um eventuellen Rückstau zu vermeiden.

4.5.1.2. Allgemeine Optimierung der Optik:

Ausrichtung: Winkel zwischen Laser und Photodiode:

Für den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten LIF-Messaufbau wurden verschiedene Varianten des Strahlenganges erforscht und optimiert. Hierzu wurde von einem klassischen, wie dem vorgestellten, Fluoreszenzspektrometernaufbau ausgegangen. Seine Vorteile wurden genutzt, seine Nachteile modifiziert und verbessert. Die Ausrichtung zwischen Anregungslicht und Detektor ist im klassischen Fluoreszenzspektrometer orthogonal, sie wurde für die meisten realisierten und getesteten Varianten, welche in Kapitel 4.4.1 vorgestellt werden, beibehalten.

Außerdem ist die Unterdrückung des Anregungslichtes auf den Detektoren essentiell für alle LIF-Messaufbauten. Die Orientierung der Ausbreitungsrichtung der Anregungslichtquelle zum Fluoreszenzdetektor muss für jeden LIF-Messaufbau angepasst werden. In der Veröffentlichung von Fu et al. werden die unterschiedlichen optischen Ausrichtungen vorgestellt und ausführlich diskutiert [62]. Der größte Teil der veröffentlichten Arbeiten weist eine orthogonale Ausrichtung zwischen Anregungslichtquelle und Detektor auf [45, 62, 77-79]. Seltener werden 60° [80] oder 0° [44] zwischen Detektor und Lichtquelle gewählt. Einige Forschergruppen haben mögliche Orientierungswinkel getestet, um ein individuelles Optimum für ihren Messaufbau zu finden. Von den meisten Forschergruppen wird die orthogonale Orientierung von Detektor und Lichtquelle als optimal angesehen.

Jedoch kann eine sorgsam ausgewählte Orientierung zwischen Detektor und Lichtquelle allein nicht ausreichend das parasitäre Anregungslicht, welches den Detektor erreicht, vermeiden. Deswegen benötigen alle diskutierten Konzepte zusätzliche optische Filter, um das Blocken des Anregungswellenlichtes zu verbessern und verstärken. Zusätzlich zur orthogonalen Ausrichtung wurden noch weitere Winkel erfolgreich getestet. In Kapitel 4.8.4 werden Vergleichsmessungen mit den beiden ähnlichen Aufbauten durchgeführt.

Außerdem nutzt der untersuchte LIF-Messaufbau das horizontale Messprinzip, wie es in modernen Fluoreszenzspektrometern Verwendung findet. Somit wird der Flusskanal im LIF-Messaufbau ähnlich einem klassischen Fluoreszenzspektrometer mit einer Lichtlinie beleuchtet, jedoch in horizontaler Form.

Photodioden:

Vorversuche, welche beim Projektpartner IPV mit Marcel Berner durchgeführt wurden, zeigten, dass eine Biasspannung von 0 Volt zu einem sehr niedrigen Dunkelstrom führt. Ist der Dunkelstrom niedrig, ist auch der Umgebungsstrom niedrig und man kann sehr kleine Signale detektieren. Mit einer höheren Biasspannung würde somit der Umgebungsstrom höher und der Detektor würde schneller und empfindlicher werden (maximal 10 %), der gleichzeitig drastisch erhöhte Dunkelstrom würde aber dazu führen, dass für den Gewinn an Reaktionsgeschwindigkeit viel an Sensitivität verloren gehen würde.

Laser:

Der Laser ist mittels einer Peltiereinheit temperiert. Zu Beginn eines Messzyklus ist eine deutliche Intensitätsdrift des Lasers sichtbar, bis sich die Temperatur stabilisiert hat. Es wurden Messungen durchgeführt, um den Zeitpunkt zu finden, von dem an stabile Messungen ohne Drift durchgeführt werden können. Abbildung 49 zeigt eine Messung, bei der mit 2 $\mu\text{L}/\text{sec}$ mit Puffer durch die Flusszelle gepumpt wurde.

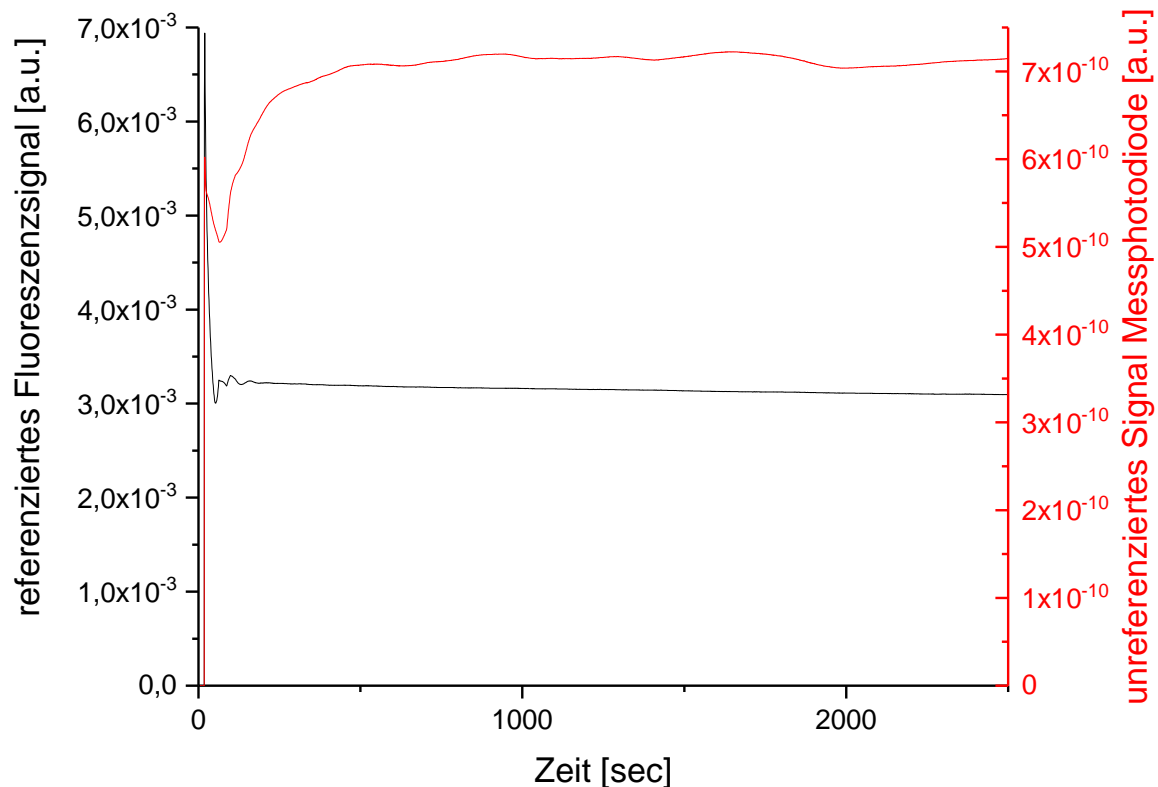


Abbildung 49: Messung der Laserdrift: Rot: unreferenziertes Signal der Messphotodiode. Schwarz: mittels der Referenzphotodiode referenzierte Messsignal. Während der Messung wurde PBS Puffer mit einer Flussrate von 2 $\mu\text{L}/\text{sec}$ durch die Flusszelle gepumpt.

Wie in Abbildung 49 deutlich zu erkennen ist, ist nach ca. 15 min das referenzierte Signal stabil und nur noch eine sehr geringe Drift zu sehen. Es kann mit der Messung begonnen werden. Bei Messungen mit zu erwartenden geringen Signalen wurde der Laser statt 15 min 30 min lang zur Stabilisierung eingeschaltet. Die Stabilität der Anregungslichtquelle hat einen direkten Einfluss auf die Nachweisgrenze der durchgeführten Messungen.

Ausrichtung Referenzphotodiode:

Das Ausrichten der Referenzphotodiode muss mit Vorsicht erfolgen. Bei deutlich unterschiedlichen Ausrichtungen der Referenz kann die absolute Vergleichbarkeit der Messungen nicht mehr gegeben sein. Deshalb wurde bei einer Neuausrichtung der Referenzphotodiode immer darauf geachtet, die Referenzphotodiode auf das Intensitätsmaximum auszurichten, um ein geringes Rauschen im Signal zu erhalten und die Messungen dadurch besser untereinander vergleichen zu können.

Außerdem wurde die Neuausrichtung so selten wie möglich und nur falls erforderlich vorgenommen, um Messungen mit derselben Problemstellung vergleichen zu können. Die Einstellung der beiden verschiedenen Installationsorte der Referenzdiode werden in Kapitel 4.5.6 genauer erläutert.

Signalglättung Referenzdiode:

Die Ausleseelektronik der verwendeten Referenzphotodiode erhält über das USB Datenkabel des PCs den Strom. Um zu ermitteln, ob das Netzteil des PCs einen Teil des Signalrauschens verursacht, wurde ein AQ Ortho Vox Gerät zur Glättung und Signalentkopplung der USB Ströme zwischengeschaltet.

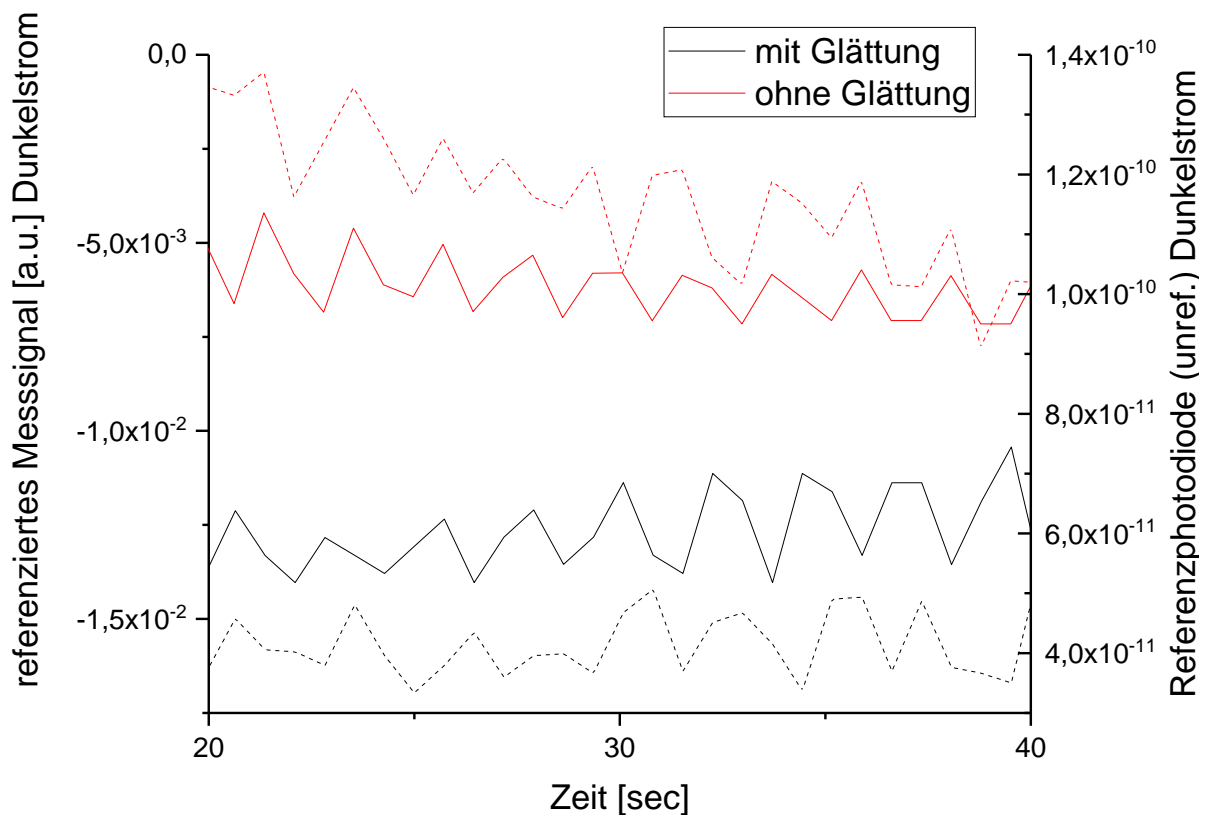


Abbildung 50: Gestrichelte Linien: Dunkelstörme der unreferenzierten Referenzphotodiode mit und ohne zwischengeschaltetes Gerät zur Glättung. Durchgezogene Linien: Dunkelströme des nach Kapitel 4.3 referenzierten Messsignals mit und ohne Glättungsgerät der Referenzphotodiode.

Die Messungen zeigen, dass die Glättung des AQ Ortho Vox Gerätes keinen Einfluss auf das Rauschen der Referenzphotodiode hat. Deswegen wurde es bei den Messungen der Arbeit nicht verwendet.

Shutter:

Marcel Berner vom IPV Stuttgart hat einen Shutter, bestehend aus einer Arduino® Steuereinheit und einem mit einer schwarzen Plastikplatte versehenen Modellbauservomotor gebaut. Dieser kann, durch das Fluidikprogramm Measure®

angesteuert, das Laserlicht zu jedem beliebigen Zeitpunkt im Messablauf fast vollständig auf ca. 8% des Signals einer Blank Messung ohne Fluorophor blocken. Dieser Wert erscheint relativ hoch, ist aber sehr niedrig, da der Absorptionsfilter sehr gut passend gegen Anregungslicht auf dem Detektor ausgewählt wurde und beide Werte sehr niedrig sind.

Das Verwenden eines Shutter ist deutlich besser, als den Laser dauernd an und aus zu schalten. Zu häufiges An- und Ausschalten eines Lasers verkürzt dessen Lebensdauer und führt dazu, dass der Laser nicht thermisch stabil ist, wofür er im Normalfall 15 min im Dauerbetrieb sein muss. Durch das einprogrammierte Verdunkeln des Lasers zwischen den Messungen konnte eine übermäßige Erhitzung des Flusskanals vermieden werden. Erfahrungswerte von Marcel Berner zeigten, dass der Shutter nicht orthogonal zum Laser ausgerichtet sein darf, da eventuell in den Laser zurück reflektiertes Licht den Laser schädigen kann (Abbildung 22 in der Anfang dieses Kapitels).

4.5.1.3. Allgemeine Optimierung am LIF-Messaufbau:

Black Box:

Der Messaufbau wurde in einer Black Box, welche am IPV Stuttgart durch Marcel Berner entwickelt und gebaut wurde, untergebracht. Sie dient dazu, den Messaufbau vor störenden elektromagnetischen Feldern (zum Beispiel durch Wechselstromquellen) und parasitären Lichtquellen abzuschirmen. In der Black Box wurden deswegen nur Gleichstrom- oder abgeschirmte Kabel und Geräte verwendet. Das große Volumen der Black Box dient dazu, möglichst flexibel im Messaufbau zu sein, ein übermäßiges Erhitzen des Messaufbaus zu vermeiden und die gesamte Mikrofluidik mit Pumpen und Sampler unterzubringen. Die Spritzenpumpe, der Ventilblock und der Sampler finden alle in der Black Box Platz. Sie wurden in die Black Box gebaut, um durch kurze Schlauchlängen möglichst kleine Totvolumina und dadurch kurze Messzeiten zu ermöglichen. Außerdem altern die Fluorophore in den Proben in der dunkeln Black Box nicht. Die Black Box ist mit einem Sicherheits-Not-Aus Schalter versehen, welcher den Laser ausschaltet, sobald eine Türe des Messaufbaus geöffnet wird.

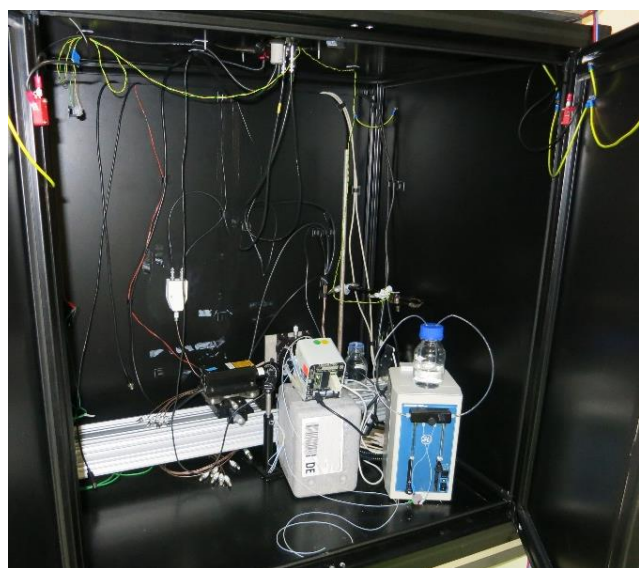


Abbildung 51: Links: Die Black Box im Labor, welche den Messaufbau beinhaltet mit geöffneten Türen. Auf der rechten Seite sind die Spritzenpumpe und der Ventilblock (von Hinten) im Inneren zu sehen. Vorne links ist Platz für einen Sampler.

Erdung der Messschiene:

Intensives Messen am Aufbau zeigte, dass die Schiene, auf der die Komponenten Laser, Shutter und Detektionseinheit mit Flusszelle befestigt sind, geerdet werden muss. Wenn die Schiene nicht geerdet ist, erhöht sich nach ca. 15 - 20 Messungen das Rauschen, welches vermutlich von einer statischen Aufladung herrührt.

Kabelführung:

Zu Beginn der Messungen stellte sich heraus, dass alle Kabel, insbesondere die Messkabel fest an der Wand der Black Box befestigt werden müssen. Es zeigte sich, dass das Öffnen und Schließen der Türe bei frei hängenden Kabeln zu leichten Bewegungen führt, die als mäandrierendes Signal im Dunkelstrom zu sehen sind.

4.5.2. Verschiedene Halter für Flusszelle und Detektionseinheit

Marcel Berner beim Nanodem Partner Universität Stuttgart, Institut für Photovoltaik (IPV) hat für den Messaufbau zwei verschiedene Halter für die Flusszelle, den Absorptionsfilter und die Photodioden realisiert. Zunächst wurde ein Aufbau mit einem 1 · 2 cm großen Filterglas realisiert. Die zweite Version des Halters ist in Abbildung 22 in Kapitel 4.1 auf der rechten Seite im Foto zu sehen und in Abbildung 34 in Kapitel 4.4.1 als Skizze in Seitenansicht gezeigt. Die Optimierung zur ersten Version besteht darin, den Absorptionsfilter flächig (5 · 5 cm) einzusetzen. Dadurch kommt weniger parasitäres Anregungslicht an die Photodioden.

Diese Variante zeigte ein deutlich niedrigeres Rauschen durch Streulicht und eine einfachere Austauschbarkeit der Fluidik. Außerdem konnte durch das Vergrößern des Filterglases das parasitäre Anregungslicht auf der Photodiode verringert werden. Sie ist schon sehr früh in der Arbeit entwickelt worden und wurde bei fast jeder gezeigten Messung verwendet.

4.5.3. Vergleich verschiedener Winkel zwischen Laser und Detektor

Zur Optimierung der erhaltenen Signalhöhe wurde die gesamte Fluidik inklusive der Detektionseinheit, wie in Abbildung 52 dargestellt, in verschiedenen Winkeln geneigt und getestet. Hierbei wurden der Laser, der Strahlteiler und die Referenzphotodiode nicht bewegt. Es sollte ein Kompromiss zwischen der optimierten Lichtemission der Fluorophore im Flusskanal und einer möglichst geringeren parasitären Beleuchtung der Photodioden durch den Absorptionsfilter hindurch gefunden werden. Diese parasitäre Beleuchtung bedingt ein höheres Hintergrundsignal. Ein Kompromiss zur Überwindung dieser Schwierigkeiten kann durch eine Optimierung der Ausleuchtung des Flusskanals gefunden werden.

Wie in Abbildung 52 gezeigt, kann über die Winkelneigung die Flusszelle mitsamt den Messphotodioden als Einheit um die eigene Achse gedreht werden. Der Drehmittelpunkt ist hierbei konstruktionsbedingt der über dem Flusskanal befindliche PMMA-Block. Deswegen

wurde nach Winkelneueinstellungen die Höhe des Messblockes neu ausgerichtet. Des Weiteren kann die Höhe und Position der Einheit mittels Stellschrauben verändert werden. Der Abstand des Lasers kann in bestimmten Grenzen variiert werden, um die Aufweitung der Anregungslinie zu verändern.

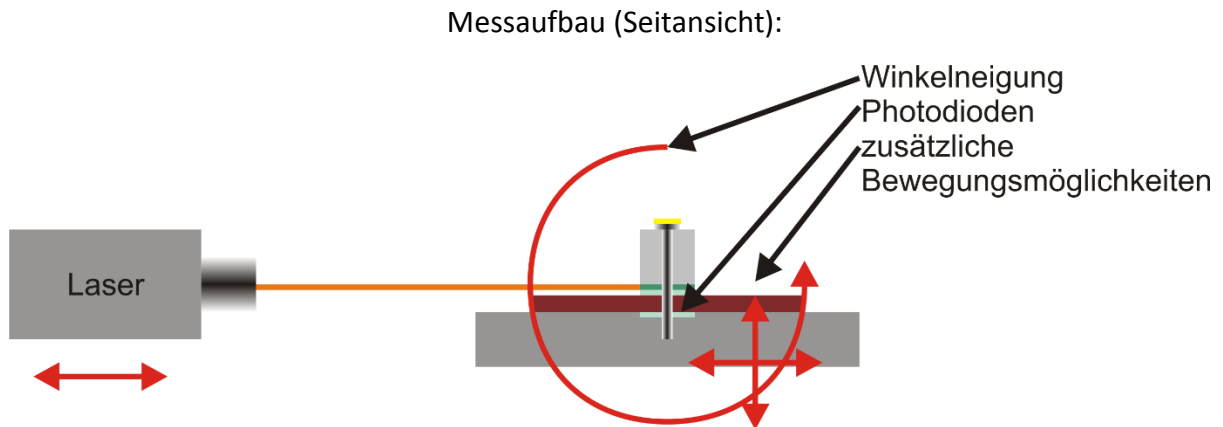


Abbildung 52: Bewegungsmöglichkeiten des realisierten LIF-Messaufbaus. Die roten Pfeile stellen sie dar.

Im Folgenden werden verschiedene Winkel zwischen Laser und Messphotodioden getestet. In Abbildung 52 ist die orthogonale Ausrichtung mit 90° zwischen Laser und Messphotodiode gezeigt. Der Aufbau wurde nun um die eigene Achse gegen den Uhrzeigersinn gedreht, bis 180° (Laser zeigt direkt auf die Photodiode) erreicht wurden. Hierbei ist zu beachten, dass sobald der Winkel $> 90^\circ$ beträgt, nicht mehr durch das Doppelklebeband, sondern durch den PMMA-Block der Flusskanal von der Laserlinie beleuchtet wird und dass dadurch optisch gesehen einige Parameter verändert werden. Für die folgenden Vergleichsmessungen wurde Flusszelloberseite Variante 2 verwendet, da dieser Kanal die wenigsten Streuquellen aufweist und einen sehr guten Kompromiss aus den in Kapitel 4.4.3 diskutierten Gründen darstellt.

Bei jedem Winkel wurde die Flusszellhöhe neu auf das Maximum ausgerichtet, um die jeweils höchstmögliche Intensität zu detektieren und die Messungen besser vergleichen zu können. Die Messungen wurden alle mit derselben Photodiode mit 1 mm^2 Fläche auf einem vierer Photodiodenchip durchgeführt. Um den Winkel von 180° jedoch detektieren zu können, musste eine mittlere Photodiode verwendet werden. Um die Werte vergleichen zu können, wurde mit der Mittleren auch der Winkel von 157° gemessen, ein Korrekturfaktor gebildet und bei der 180° Messung mit eingerechnet. Dies war auf diese Weise möglich, da die EQEs der einzelnen Photodioden auf einem Chip sehr ähnlich sind.

Die genannten Verstellmöglichkeiten wurden von Marcel Berner am IPV realisiert und vom Verfasser dieser Arbeit ausführlich getestet und charakterisiert.

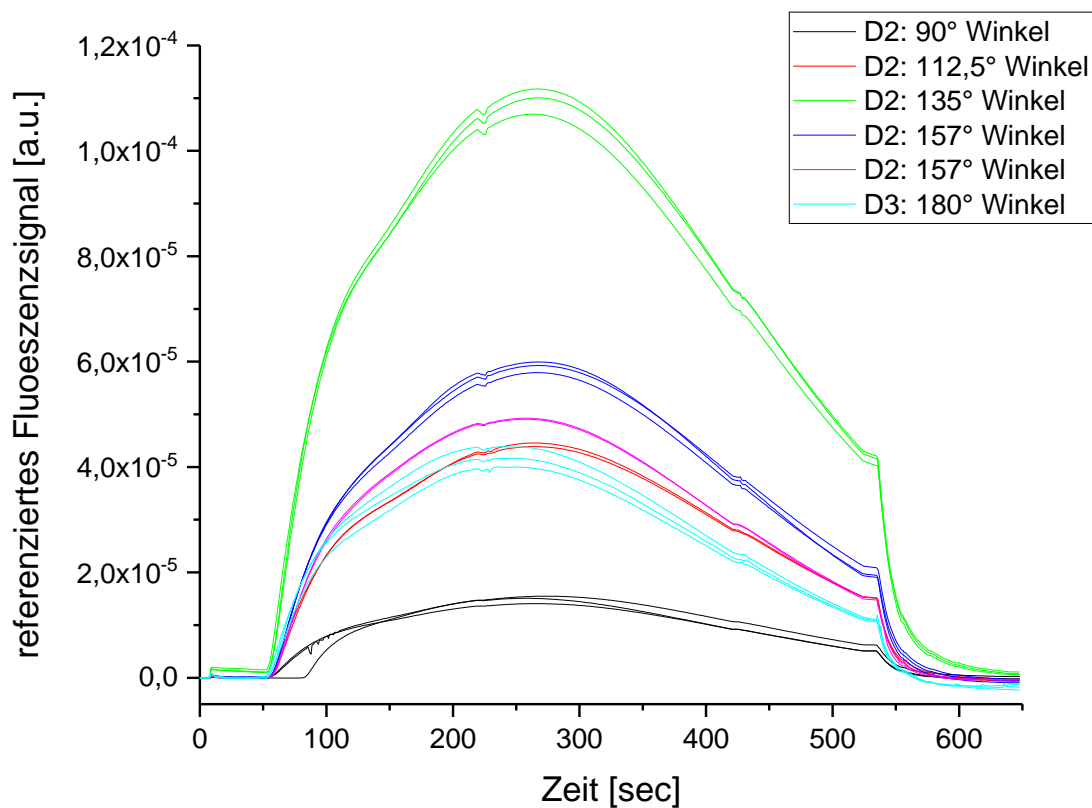


Abbildung 53: Es wurden verschiedene Neigungswinkel experimentell untersucht. Der starke Signalabfall bei $t=540$ sec ist durch eine schnellere Flussrate zum Leerspülen der Flusszelle bedingt. Die Schwankungen bei 250 und 420 sec rühren vom Umschalten des Ventils an der Spritzenpumpe her. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen. D2 steht für Messphotodiode 2 usw. Die Messungen wurden alle mit derselben Konzentration Fluorophor DY636 ($c=1,3 \mu\text{mol/L}$) durchgeführt.

In Abbildung 53 ist der Neigungswinkel zwischen Photodiode und Laser dargestellt und wird mit 90° beginnend (wie in Abbildung 52 dargestellt) in der in Pfeilrichtung schrittweise vergrößert. Es wurden die AUC der Messungen aus Abbildung 53 gebildet und in Abbildung 54 dargestellt. Die Auswertung wurde analog Kapitel 4.3 für Messungen im Durchfluss durchgeführt.

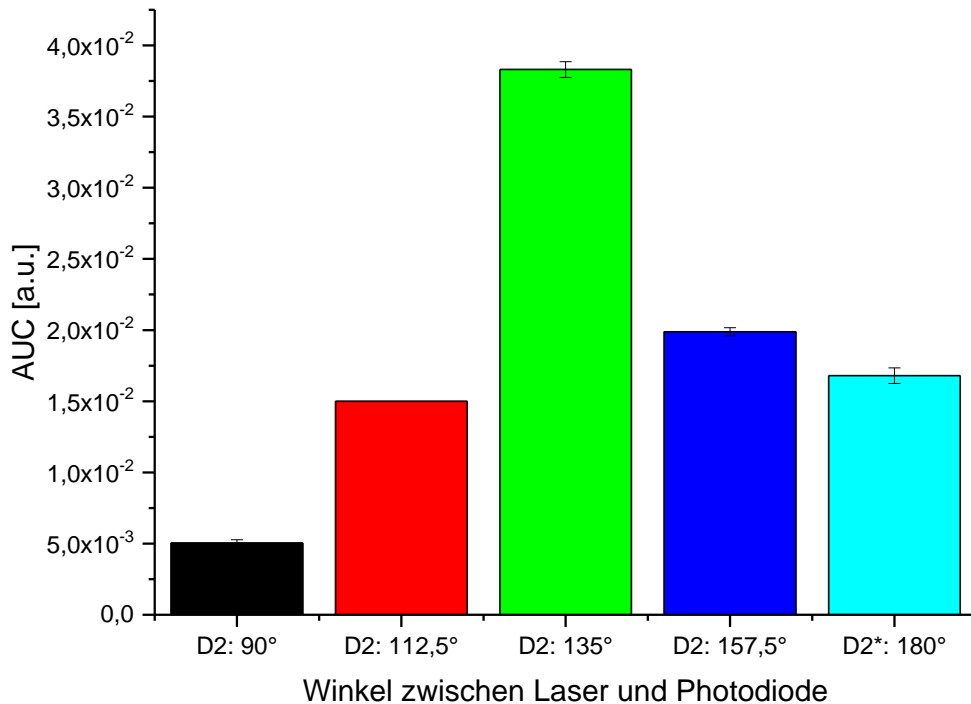


Abbildung 54: Die aus Abbildung 53 ausgewertete AUC [a.u.] der getesteten Neigungswinkel wurde gegen die Neigungswinkel [°] aufgetragen. Der Winkel 180° wurde mit der Diode 3 aufgenommen und mittels des Winkels D2: 157,5° ausgerechnet. D2 steht für Messphotodiode 2 usw.

Das Signal erreicht bei einer Winkelneigung von 135° ein Maximum (Abbildung 54). Mit dieser Neigung und mit der Flusskanalbeleuchtung durch den polierten PMMA-Block können die größten Signale erhalten werden. Aufgrund dieser Erkenntnis bezüglich der Optimierung des Einstrahlwinkels werden die Flusskanaloberseiten 4 und 5, welche einen entsprechenden Winkel im PMMA-Block aufweisen, entworfen. Allerdings stellte sich heraus, dass diese fluidisch und herstellungstechnisch nicht so gut geeignet sind. In Kapitel 4.4.3 wird dies ausführlich diskutiert. Zur Berechnung des benötigten Winkels kann man das in Kapitel 2.1 eingeführte Snelliussche Brechungsgesetz anwenden.

Zusammenfassend kann der Winkel von 135° als Optimum der Fluoreszenzausbeute und guter Kompromiss gelten. Das Blocken des Anregungslichtes durch den Absorptionsfilter ist auch in dieser Neigung ausreichend gewährleistet. Die Fluoreszenz kann im Flusskanal mit der Flusszelloberseite 2 effektiv durch die polierte Seite des PMMA-Blockes hindurch angeregt werden.

4.5.4. Vergleich verschiedener Flusszellbreiten

Zielsetzung:

Um den Einfluss der Flusszellbreiten auf die Messsignalhöhe zu untersuchen wurden Messungen mit vier verschiedenen Breiten durchgeführt. Die optimale Breite soll ein hohes Signal aufweisen und für die späteren Immunoassaymessungen verwendet werden. Außerdem soll der Volumenstrom so breit sein, dass möglichst keine Luftblasen im

Flusskanal hängen bleiben können. Die untersuchten Flusszellbreiten wurden beim vermuteten Messsignalmaximum, Nahe den Photodiodenbreiten, gewählt. Die Flusszellhöhen sind so niedrig, damit die in den homogenen Immunoassays verwendeten magnetischen Partikel an Magneten festgehalten werden können. Wären die Flusszellen höher, wären die magnetischen Partikel aus dem Volumenstrom heraus quantitativ nicht fang- und festhaltbar.

Eigenschaften und Herstellung:

Es wurden vier verschiedene Flusskanalbreiten und -geometrien mit einem Laser aus Doppelklebeband ausgeschnitten. Projektpartner IPV und mfcs haben Zuschnitte aus 3M (9629 PC) und mfcs eigenem Doppelklebeband hergestellt. In Kapitel 4.4.4 ist die Charakterisierung der Doppelklebebandmaterialien ausführlich dargestellt. Das Schneiden mittels Laser führt zu guten, reproduzierbaren Ergebnissen. Das Schneiden mittels Messern und Cuttern war in dem vorliegenden Fall ungeeignet, da Trägerfolie und Doppelklebeband durch die mechanische Belastung zueinander verzogen werden.

Die Flusskanäle unterscheiden sich in der Flusskanalbreite und in den jeweils angepassten, trichterförmigen Stellen bei den Einlass- und Auslassanschlüssen der Fluidik. Aus den verschiedenen Abmessungen resultieren unterschiedliche Flusskanalvolumina. Außerdem haben die beiden getesteten Doppelklebebänder unterschiedliche Dicken, was zu unterschiedlichen Volumina führt. Flusskanalgeometrie A mit der Breite 0,5 mm hat eine Fläche von 8 mm² und ein Volumen von 1,16 µL (mfcs) bzw. 0,8 µL (3M). Flusskanalgeometrie B mit der Breite 1 mm hat eine Fläche von 15 mm² und ein Volumen von 2,175 µL (mfcs) bzw. 1,5 µL (3M). Flusskanalgeometrie C mit der Breite 2 mm hat eine Fläche von 29 mm² und ein Volumen von 4,205 µL (mfcs) bzw. 2,9 µL (3M). Flusskanalgeometrie D mit der Breite von 3 mm hat eine Fläche von 43 mm² und ein Volumen von 6,235 µL (mfcs) bzw. 4,3 µL (3M).

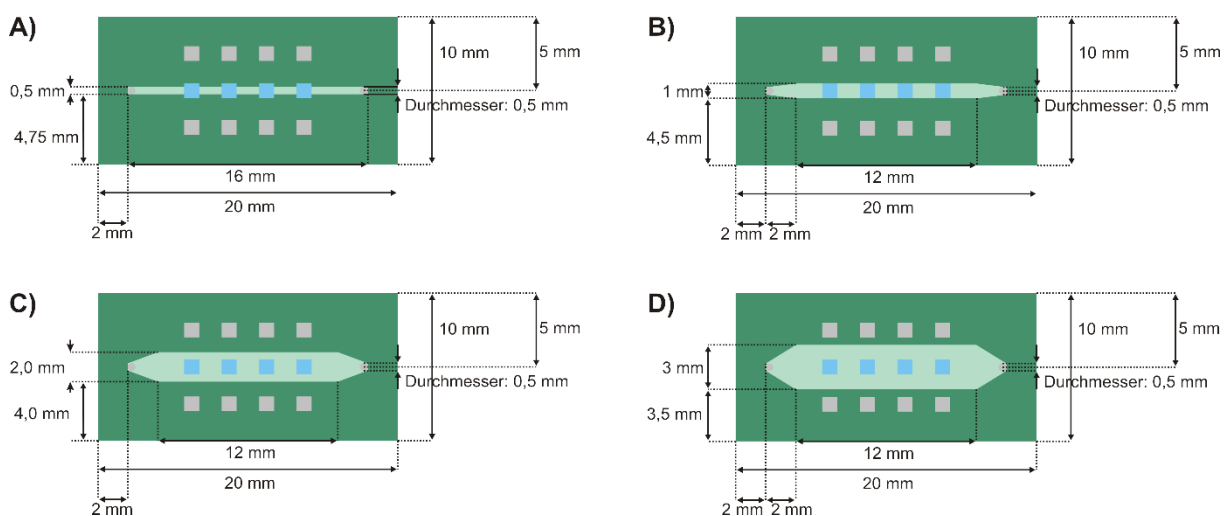


Abbildung 55: Verschiedene Flusskanalbreiten- und -geometrien des mit Laser ausgeschnittenen Doppelklebebandes, welches den Flusskanal ausformt. Das Doppelklebeband ist dunkelgrün gezeigt, der Flusskanal hellgrün, die Messphotodioden als hellblaue Quadrate, die Anschlüsse der Messphotodioden als

graue Quadrate. Die Messphotodioden und deren Anschlüsse befinden sich einige Ebenen unter dem Flusskanal und sind zur besseren Orientierung mit eingezeichnet.

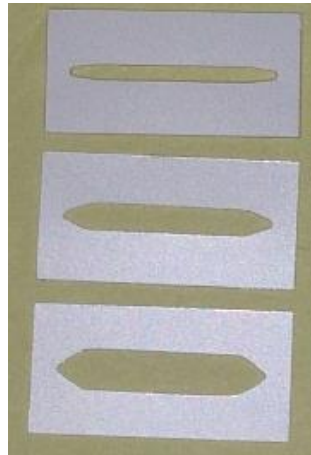


Abbildung 56: Foto der verschiedenen Doppelklebebandzuschnitte (weiß). Von oben nach unten: 1 mm, 2 mm und 3 mm Breite.

Praxistauglichkeit:

Die Volumina aller Flusskanäle befinden sich somit im Bereich von ca. 1 – 6 μL . Diese Dimensionierung wurde gezielt auf diesen Größenbereich abgestimmt, da eine Probenmenge von 10 μL zu erwarten ist. Zudem wird bezüglich der Größe eine Miniaturisierung für ein Benchtop-Gerät angestrebt. Dies kann mit dem gezeigten Aufbau problemlos erreicht werden.

Die Flusszelle im realisierten Aufbau hat eine Fläche von ca. 1 · 2 cm und eine Höhe von 0,1 mm bei Zeonor® Folie - 3 mm bei Glas und 0,1 - 0,14 mm für Doppelklebeband und 3 mm hohe Wafer - 1 cm hohen PMMA Block. Es ergibt sich also eine Gesamthöhe von 0,32 - 1,314 cm für die zusammengebaute Flusszelle.

Die verschiedenen Volumina der Flusskanäle bieten jeweils unterschiedliche Vor- und Nachteile. Bei den sehr kleinen Volumina wird nur ein geringes Probenvolumen benötigt, die Probe muss nicht zusätzlich verdünnt werden. Der Nachteil hierbei ist aber, dass bei der schmalsten Flusskanalgeometrie A nicht die gesamte Fläche der Messphotodioden zur Detektion genutzt wird. Ab Flusskanalgeometrie B kann davon ausgegangen werden, dass die gesamte Messphotodiodenfläche genutzt wird, bei Kanalgeometrie C sind sogar 0,5 mm auf beiden Seiten der Messphotodioden Platz, falls die Positionierung der Fluidik oberhalb der Photodioden nicht optimal sein sollte. Bei Flusskanal D kann als Vorteil das für manche Proben (mit großem Volumen) notwendige größere Flusskanalvolumen gesehen werden. Ein Nachteil von Geometrie D ist, dass sich der Volumenstrom nicht über die gesamte Breite ausweitet.

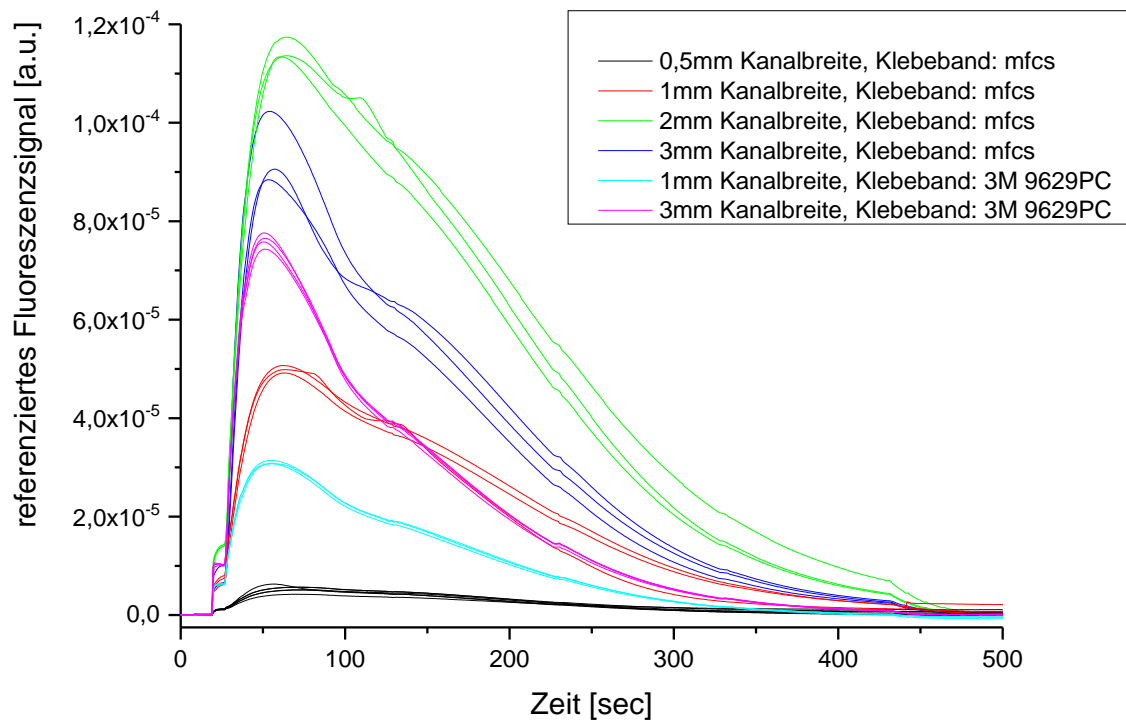


Abbildung 57: Vergleich der verschiedenen realisierten Flusskanalbreiten und Doppelklebebänder. Das aus Referenz- und Messphotodiode ausgewertete, referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] ist gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Die Messungen wurden alle mit derselben Konzentration Fluorophor DY636 ($c = 1,3 \mu\text{mol/L}$) durchgeführt. Es wurde die Flusszelloberseite 2 mit einer Neigung von 135° bei allen Messungen verwendet.

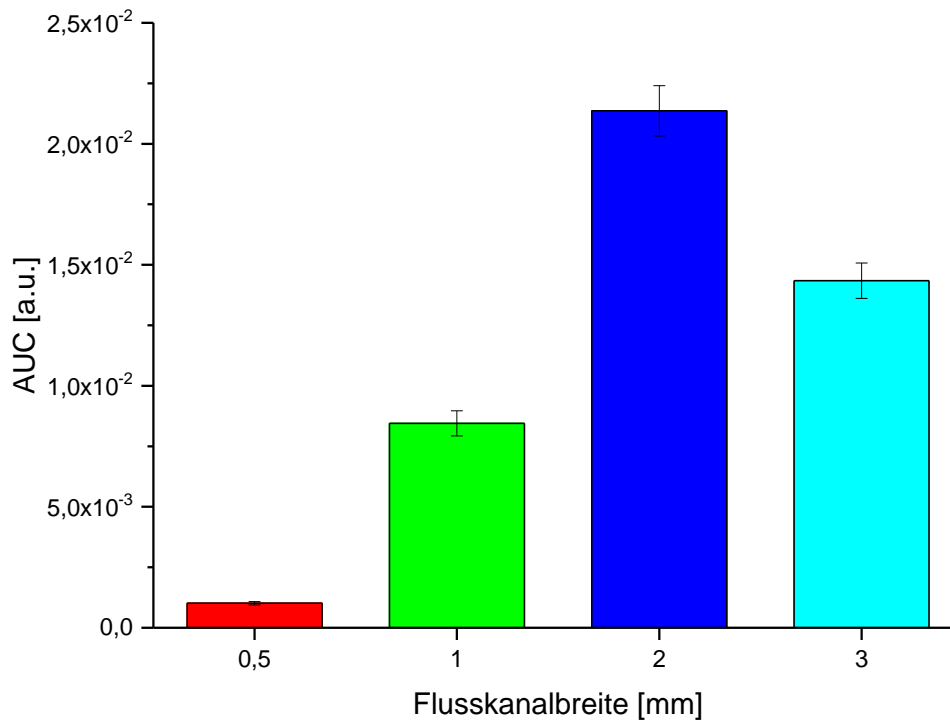


Abbildung 58: Vergleich der verschiedenen Flusskanalbreiten mit mfcs Doppelklebeband. Die ausgewertete AUC [a.u.] ist gegen die verschiedenen Flusskanalbreiten [mm] aufgetragen.

Bei unterschiedlichen Flusskanalbreiten kann ein unterschiedliches Signal erwartet werden, da der Volumenstrom unterschiedlich laminar, je nach Flusskanalbreite, verläuft und unterschiedliche Flächenanteile der Messphotodioden genutzt werden. Wie zu erwarten war, zeigt der Kanal mit nur 0,5 mm Breite ein sehr geringes Signal, da nicht die gesamte Messphotodiodenfläche genutzt wird. Die Messung mit 1 mm Breite ist ebenso niedriger als 2 mm, da seitlich aus dem Kanal ausgestrahlte Fluoreszenzemission an der streuenden und brechenden Flusskanalwand schlecht detektiert werden kann. Außerdem wird eine leichte Fehlausrichtung der Fluidik bei 2 mm Flusskanalbreite vom LIF-Messaufbau durch die Überlappung über die Messphotodioden besser toleriert. Bei 2 mm Flusskanalbreite ist die Photodiodenfläche ideal genutzt. Die Photodioden haben zum Vergleich eine Breite von 1 mm. Bei 3 mm Breite fließt zu viel undetektiertes Fluorophor an den Photodioden undetektiert vorbei, weswegen das Signal im Vergleich wieder abfällt und kleiner ist als bei 2 mm Breite. Bei den im Ergebnissteil in Kapitel 4.8 gezeigten Messungen wurde deswegen hauptsächlich eine Flusskanalbreite von 2 mm verwendet.

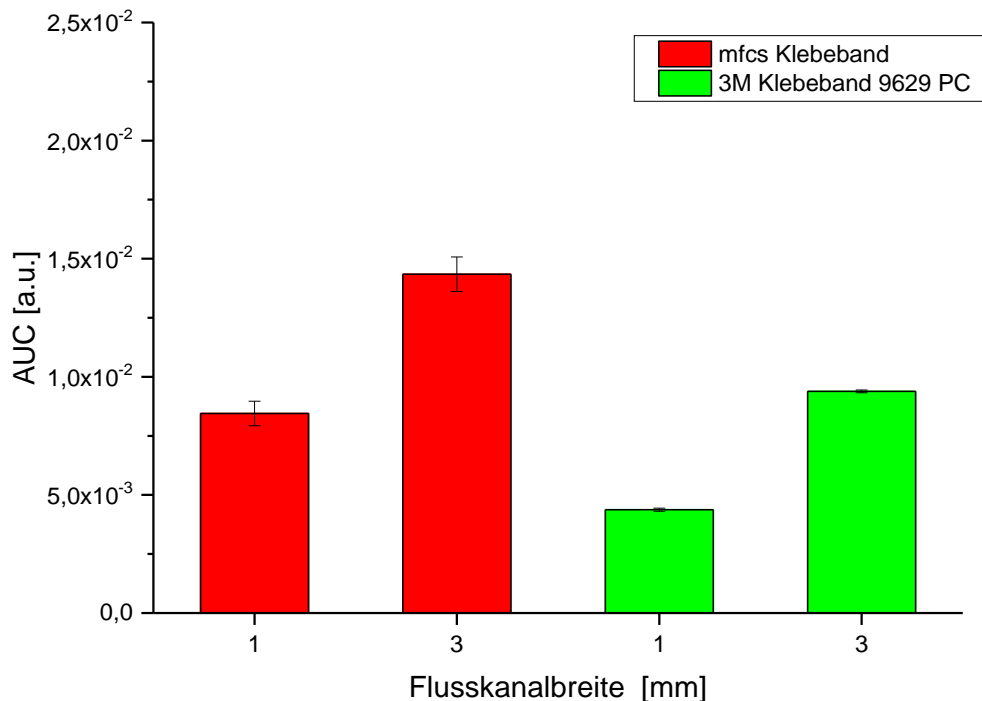


Abbildung 59: Vergleich der verschiedenen realisierten Flusskanalbreiten und Doppelklebebänder. Die standardgemäß ausgewertete AUC ist gegen die verschiedenen Flusskanäle- und breiten aufgetragen.

Zielsetzung:

Zusätzlich zu den vier Flusskanalbreiten mit demselben Doppelklebeband als Flusszellwand werden nun 2 verschiedene Doppelklebebänder mit den jeweils gleichen Breiten und Geometrien aber unterschiedlichen Höhen und optischen Qualitäten verglichen.

Ergebnisdiskussion:

In Abbildung 58 und Abbildung 59 wurde die y-Achse gleich skaliert, damit die Messungen besser verglichen werden können.

Die gleich breiten Flusskanäle müssten trotz der unterschiedlichen Flusskanalhöhe ein sehr ähnliches Signal zeigen, da bei der AUC-Auswertung im Durchfluss in derselben Zeit annäherungsweise dieselbe Menge an Fluorophor an den Messphotodioden „vorbei“ gepumpt wird. Sie besitzen unterschiedliche Flusskanalhöhen und daraus resultierend Flusskanalvolumina. Sie sind bei 1 mm Breite 2,175 μL (mfcs) und 1,5 μL (3M), bei 3 mm Breite 6,235 μL (mfcs) und 4,3 μL (3M). Das Material der Doppelklebebänder hat unterschiedliche optische Eigenschaften. Ein weiterer Effekt kann sein, dass die Doppelklebebänder unterschiedlich geschnitten wurden. Das mfcs Klebeband wurde von mfcs selbst lasergeschnitten. Das 3M Klebeband wurde am IPV von Marcel Berner auch lasergeschnitten. Eventuell müssten noch weitere Schneideparameter optimiert werden. Die Flusszellneigung von 135° spricht allerdings gegen einen direkten Einfluss der optischen Qualität und Schneidegüte der Doppelklebebänder. Bei dieser Neigung wird nämlich durch den PMMA-Block hindurch angeregt. Indirekt können die genannten Parameter allerdings

durch Reflektionen und verschieden ausgeprägtes Streulicht an Schnittkanten Einfluss haben. Für die Qualität der Messungen spricht, dass der ähnliche Effekt bei zwei verschiedenen Flusskanalbreiten ähnlich ausgeprägt gefunden werden konnte. Somit hat die Ausrichtung, welche wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben durchgeführt wurde, bei diesen Messergebnissen nur eine untergeordnete Rolle.

4.5.5. Vergleich verschiedener Messphotodiodendimensionen

Bei dem Projektpartner, dem Institut für Photovoltaik (IPV) der Universität Stuttgart wurden durch Marcel Berner Messphotodioden hergestellt und entwickelt.

Zielsetzung:

Der Größenbereich der Photodioden wurde gemeinsam bei Projekttreffen diskutiert und festgelegt. Es wurden verschiedene Dimensionen in verschiedenen Batches an Photodioden gefertigt, um eventuell ein Optimum für den Messaufbau zu finden.

Eigenschaften und Herstellung:

Zu Beginn waren auf einem Chip meist nicht alle Photodioden intakt. Im Falle des Defektes einer Photodiode ist dies durch ein deutlich erhöhtes Rauschen im Messsignal zu sehen. Außerdem kommt es zu Fluktuationseffekten des Stromes und zu starken Drifts gegen bestimmte Werte außerhalb der üblicherweise zu erwartenden Ströme. Allerdings konnte durch Optimierungen im Herstellungsprozess die Ausfallquote entscheidend verringert werden. Des Weiteren wurde eine Kapselung für die Photodioden entwickelt, um ihre Störanfälligkeit durch Luftfeuchte entscheidend zu verringern. Die zuletzt hergestellten und in den Versuchen verwendeten Batches sind robust gegenüber Feuchtigkeit und langlebig.

Mit größerer Photodiodenfläche nimmt die external quantum efficiency (EQE) zu. Die EQE ist das Verhältnis der durch die Photodiode detektierten Photonen zu den absolut vorhandenen Photonen. Sie sind im Wellenlängenbereich von 400 – 740 nm sensitiv. Weitere Details zu den Photodioden können dem Artikel von Berner et al. [48] entnommen werden.

Die Grundfläche des Chips von 1 · 2 cm wurde für alle drei Varianten beibehalten. Die Messphotodioden auf dem Chip mit vier Messphotodioden besitzen die Abmessungen 1 · 1 mm (je $A = 1 \text{ mm}^2$; $\sum(A) = 4 \text{ mm}^2$) (Variante A), die mit zwei Messphotodioden 1 · 3,5 mm (je $A = 3,5 \text{ mm}^2$; $\sum(A) = 7 \text{ mm}^2$) (Variante B) und die mit einer Messphotodiode 1 · 8,5 mm ($\sum(A) = 8,5 \text{ mm}^2$) (Variante C). In Abbildung 60 sind außerdem zur besseren Orientierung der Flusskanal, dessen Ein- und Auslass rote Punkte bei den blauen Pfeilen der Flussrichtung und die Kontaktierpads der Messphotodioden zusätzlich dargestellt. Zwei Kontaktierpads dienen jeweils dazu, eine Messphotodiode an das Messgerät anzuschließen. Die fluidischen Komponenten befinden sich nicht direkt auf den Messphotodioden, sie sind im zusammengebauten LIF-Messaufbau an der gezeigten Stelle über den Messphotodioden angebracht.

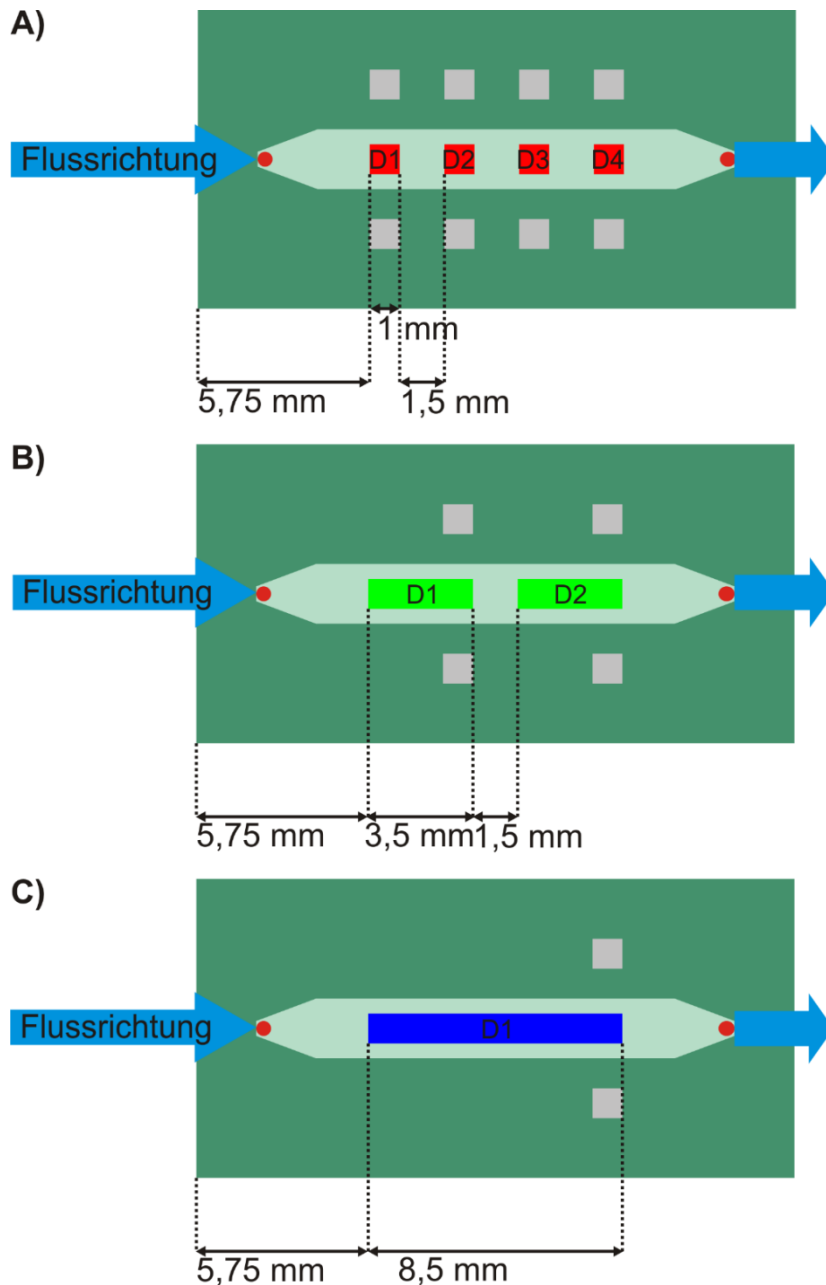


Abbildung 60: Die roten, grünen und dunkelblauen Flächen entsprechen der Größe der verschieden dimensionierten Messphotodioden. Die grauen Vierecke zeigen die Position der Kontaktpads. Die hellgrüne Fläche zeigt die Umriss des Flusskanals. A) zeigt den Chip mit vier Messphotodioden, B) den mit zwei Messphotodioden und C) den mit einer Messphotodiode. D1 steht für Messphotodiode 1, D2 für Messphotodiode 2 usw. Die blauen Pfeile geben die Flussrichtung an, die roten Punkte sind der Ein- und Auslass der Fluidik.

Abbildung 61 zeigt Fotos der in Abbildung 60 dargestellten Photodioden. Die in der Skizze nicht gezeigten Kontakte hin zu den Photodioden, dienen dazu, die Photodioden an die Kontaktierpads anzuschließen. Die überbrückten Kontakte links und rechts der Photodioden sind da um, die korrekte Positionierung und Ausrichtung der Photodioden mittels einer Kurzschlussmessung zu überprüfen.

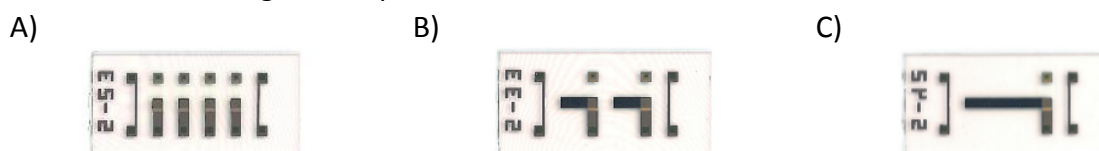


Abbildung 61: Fotos der durch den Projektpartner IPV hergestellten Photodioden.

4.5.5.1. Vergleichsmessungen im LIF-Messaufbau:

Die folgenden Vergleichsmessungen der Photodioden im Messaufbau durch die Detektion von Fluorophoren im Flusszellvolumen wurden durch den Verfasser durchgeführt.

Die Nummerierung der Photodioden und Flussrichtung entspricht der Skizze in Abbildung 60. Alle Messungen wurden dreifach, immer mit derselben fluidischen Ablaufsequenz und derselben Farbstoffkonzentration, durchgeführt. Es wurde im Volumen und Durchfluss gemessen und wie in Kapitel 4.3 beschrieben die Fläche unter der Kurve integriert und ausgewertet. Die Messungen wurden mit Flusszelloberseite Variante 2 (siehe Kapitel 4.4.3) und einem Neigungswinkel von 135° zwischen Laser und Messphotodiode gemessen. Zwischen den jeweiligen Messphotodioden und nach Einbau eines anderen Photodiodenchips wurde jeweils die Flusszellhöhe neu auf ein im Photodiodensignal sichtbares Maximalsignal bei einem nur mit Puffer gefüllten Flusskanal der Messphotodiode eingestellt. Dadurch können die Messungen untereinander verglichen werden.

In Abbildung 62 sind Messkurven des referenzierten Fluoreszenzsignals aus Mess- und Referenzphotodiode gegen die Zeit aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kurven der Dreifachmessungen schön aufeinanderliegen und am Schluss einer Messung nur bei sehr wenigen Messungen noch Fluorophor oder eventuell etwas Luft im Flusskanal verbleibt.

Die erhaltenen Signale hängen mit den unterschiedlichen Photodiodengrößen auf den Chips zusammen. Deswegen sind die Signale des 1er Chips am Größten, gefolgt von dem 2er Chip und den kleinsten Signalen des 4er Chips.

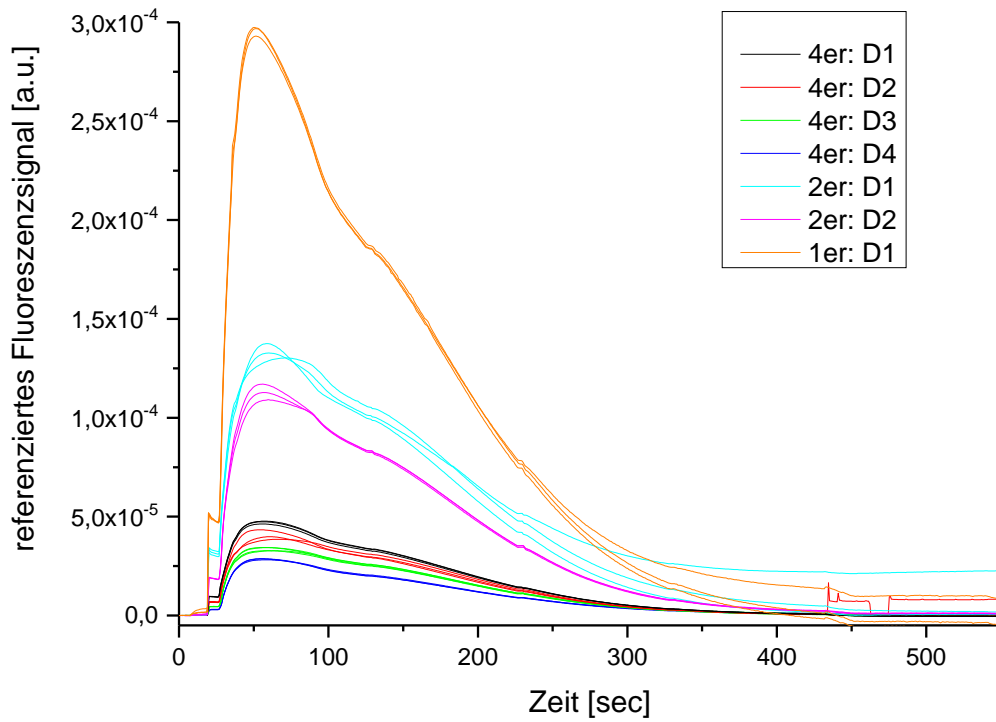


Abbildung 62: Messungen der verschiedenen Photodioden-Chips. 4er steht für einen Chip mit vier Photodioden, D1 für Photodiode 1 auf Chip, usw. Die Messungen wurden alle mit derselben Konzentration Fluorophor DY636 ($c = 1,3 \mu\text{mol/L}$) durchgeführt. Das aus Referenz- und Messphotodiode errechnete Fluoreszenzsignal [a.u.] ist gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

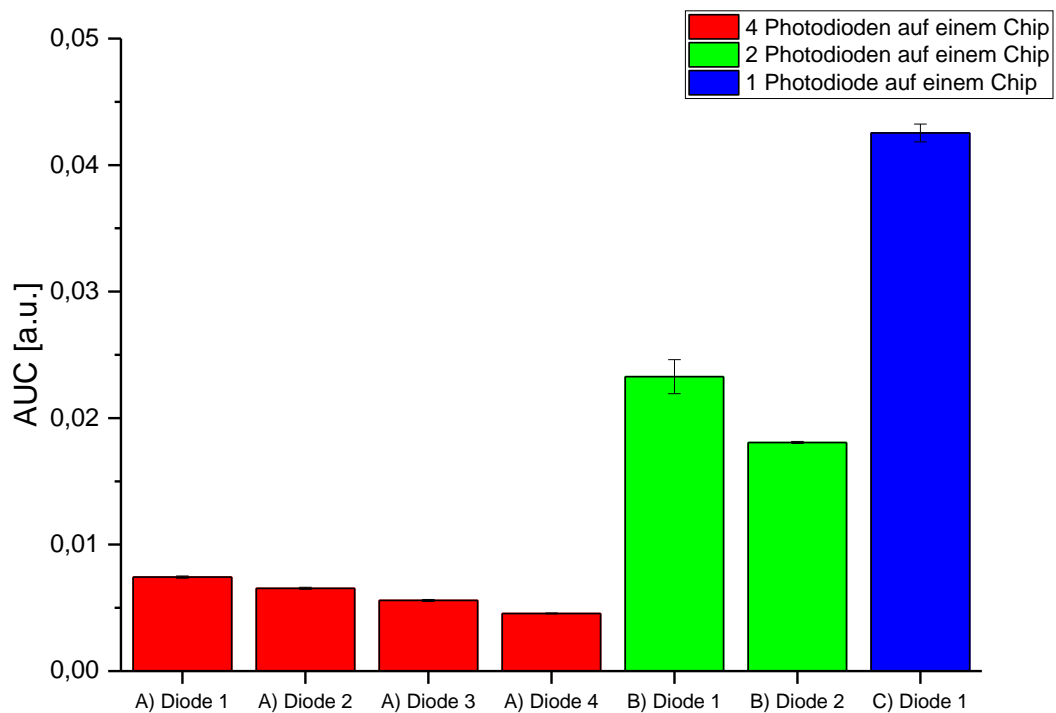


Abbildung 63: Die Photodiodennummerierung entspricht der Flussrichtung im Flusskanal. Die Fluoreszenzintensität nimmt von Diode zu Diode entlang des Flusskanals ab, dies könnte durch Photobleaching oder das teilweise Anhaften an der Flusszellwand geschehen sein.

4.5.5.2. Ergebnisvergleich 1:

In Abbildung 60 ist die Flussrichtung vom Einlass zum Auslass im Flusskanal eingezeichnet. Entlang des Flusses durch den Kanal konnte eine Signalabnahme, wenn Photodiode 1 - 4 eines Viererchips verglichen wird, detektiert werden. Anhand der Vergleichsmessungen der ersten sechs Messungen (Photodiode 1 - 4 rot und Photodiode 1 - 2 grün in Abbildung 63) kann man das Ausmaß der Signalabnahme bei den Chips mit 4 Photodioden und 2 Photodioden entlang des Flusskanals berechnen und vergleichen.

Tabelle 8: Vergleich der AUC der verschiedenen Photodioden und des Photobleachings entlang des Flusskanals

Photodioden auf Chip/ Photodiode Nr.	Photodiodenfläche [mm ²]	AUC [a.u.]	AUC [rel. in %] bezogen auf je D1
4/ 1	1	0,0074273	100
4/ 2	1	0,0065443	88,11
4/ 3	1	0,00558375	75,18
4/ 4	1	0,00501575	67,53
2/ 1	3,5	0,02327667	100
2/ 2	3,5	0,01807	77,63
1/ 1	8,5	0,042537	100

Setzt man die AUC der Photodiode 1 (rote Säulen) auf 100 %, so detektiert man bei Photodiode 2 eine Signalabnahme von 12 %, bei Photodiode 3 von 13 % und bei Photodiode 4 von 8 %, in Bezug auf die jeweils vorige Photodiode. Im Mittel nimmt das Signal also stetig um 8-13 % von Photodiode 1 - 4 ab.

Bei dem Chip mit zwei Photodioden (grüne Säulen) konnte eine Abnahme des AUC Signales um 22 % gemessen werden. Vergleicht man den Signalabfall an Photodiode 3 (75 %) auf dem Chip mit vier Photodioden mit Photodiode 2 (77 %) auf dem Chip mit 2 Photodioden, sieht man fast dieselbe Ausprägung der Signalabnahme.

4.5.5.3. Ergebnisvergleich 2:

Alternativ kann die relative Photodiodenfläche mit der mittleren AUC der Messungen verglichen werden, wie in Tabelle 9 geschehen. Hierbei wird jeweils die größte Photodiode auf 100 % gesetzt.

Tabelle 9: Vergleich der Mittelwerte (MW) der Signale in Bezug auf die Photodiodenfläche.

Photodioden auf Chip/ Photodiode Nr.	Photodiodenfläche [mm ²]	Photodiodenfläche [%]	AUC [a.u.]	AUC [%] MW bezogen auf D1, 1er Chip
4/ 1	1	11,76	0,0074273	14,44
4/ 2	1	11,76	0,0065443	
4/ 3	1	11,76	0,00558375	
4/ 4	1	11,76	0,00501575	
2/ 1	3,5	41,18	0,02327667	48,60
2/ 2	3,5	41,18	0,01807	
1/ 1	8,5	100	0,042537	100

Setzt man die AUC der größten Photodiode auf 100 % und errechnet die Mittelwerte der zweier und vierer Chips, kann man die Signale mit dem jeweiligen Photodiodenflächenanteil vergleichen. Die errechneten Mittelwerte der AUCs liegen etwas über den Flächenanteilen, obwohl sie etwas unter den Flächenanteilen liegen sollten. Für die verwendeten Photodioden gilt, laut den Forschungspartnern des IPV Stuttgart, dass die gleiche Menge an Fluorophor mit größeren Photodioden zu größeren Signalen führen sollte.

4.5.5.4. Zusammenfassung Vergleich 1 und 2:

Beim Ergebnisvergleich 1 wird das Signal der Photodioden entlang des Flusskanals bei Fluorophormessungen verglichen. Ein Grund für die Signalabnahme im Verlauf des Kanals dürfte hauptsächlich das Photobleaching sein, oder dass ein geringfügiger Anteil der Fluorophore an den Flusskanalseiten hängen bleiben könnte. Der Anteil ist aber, wie in Abbildung 62 gezeigt, zu vernachlässigen. Außerdem könnten die Photodioden leicht unterschiedlich sein, oder die Neuausrichtung der Photodioden bei jeder neuen Photodiode einen Einfluss haben.

Bei Variante 2 ist der Auswertungsschwerpunkt auf den Vergleich der verschieden dimensionierten Photodioden gelegt. Hierbei wird nicht die Position der Photodiode im

Flusskanal berücksichtigt. Die Ergebnisse entsprechen hier nur tendenziell den Vermutungen. Die relativen AUCs in der letzten Spalte von Tabelle 9 sollten leicht unter den Photodiodenflächenanteilen liegen. Dies könnte am in Vergleich 1 gefundenen Photobleaching liegen, oder daran, dass vor jeder Messung manuell neu und optimiert auf die nächste Photodiode ausgerichtet wurde. Außerdem haben die größeren Photodioden eine etwas höhere EQE, was das Signal verfälschen könnte.

4.5.6. Optimierung der Platzierung der Referenzdiode

Es wurde eine Referenzphotodiode in den Messaufbau integriert, um mögliche Schwankungen der Laserintensität zu erkennen und auszugleichen. Der Laser MLL-H-593.5 hat laut Datenblatt eine Langzeitschwankung von $< 2\%$. Wie in Kapitel 4.5.1 gezeigt, wird eine Referenzphotodiode benötigt. Um mehrere in Reihe hintereinander gemessene Messungen untereinander vergleichen zu können, wird das Signal der Messphotodiode auf das der Referenzphotodiode bezogen. Außerdem wird es bei einem Flusskanal- oder Messphotodiodentausch auf ein Maximum im Messphotodiodensignal ausgerichtet, um die Messungen untereinander vergleichen zu können. Die Referenzphotodiode wird ebenfalls bei aufwändigen und für die Referenzausrichtung relevanten Umbauten neu auf ein Maximum ausgerichtet, ebenfalls um die Messungen besser vergleichen zu können.

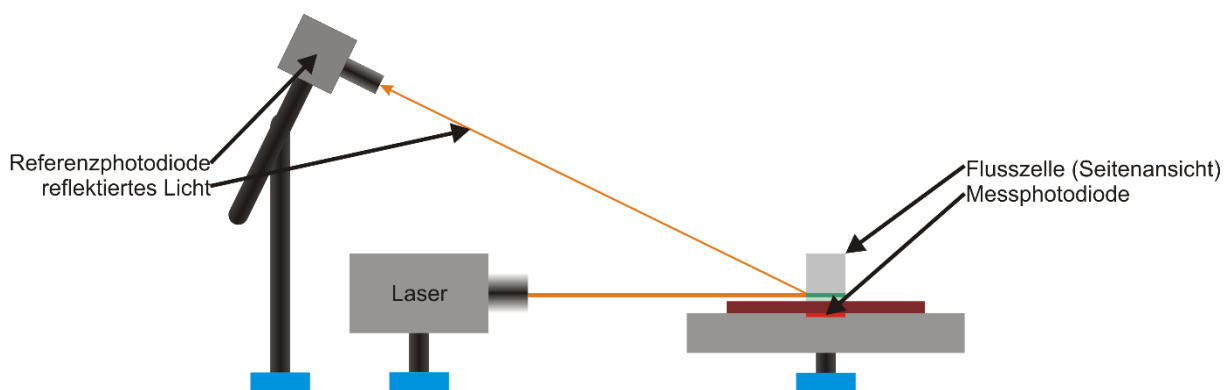


Abbildung 64: Platzierung der Referenzphotodiode, Variante A)

Bei dem zunächst realisierten Messaufbau wurde die Referenzphotodiode an einem Stativ hinter dem Laser platziert und auf die Stelle gerichtet, an der der Laser in die Fluidik eingekoppelt wird (Abbildung 64). Mit dieser Variante wurden viele erfolgreiche Messungen durchgeführt, allerdings stellte sich bei Kalibriermessungen von Fluorophoren heraus, dass die Referenz bei geringen Konzentrationen noch nicht hinreichend genau arbeitet. Außerdem kann mit dieser Einbindung der Referenzphotodiode nicht erkannt werden, ob sich Luft in einer Messung befindet oder nicht. Des Weiteren kann die Referenzphotodiode in dieser Ausrichtung ein „Atmen“ der Bodenfolie bei hohen Flussraten mitdetektieren und diese Signalstörung zusätzlich verstärken. In späteren Fluidikvarianten konnte das „Atmen“ der Bodenfolie größtenteils auf anderem Wege beseitigt werden, zusätzlich wird es nicht mehr verstärkt dem Signal durch die neu platzierte Referenz hinzugefügt.

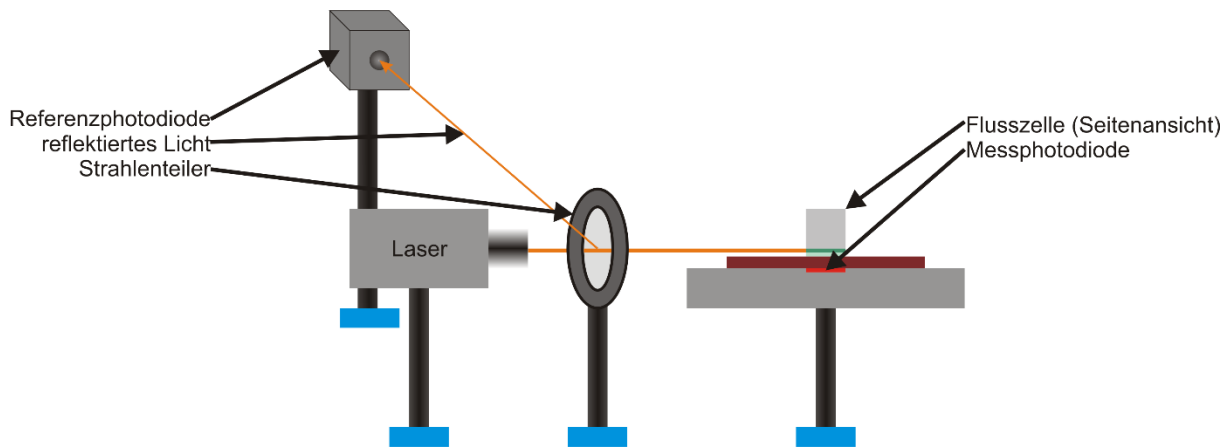


Abbildung 65: Platzierung der Referenzphotodiode, Variante B)

Eine neue und verbesserte Implementierung der Referenzphotodiode ist in Abbildung 65 gezeigt. Zwischen Laser und Flusszelle wurde ein Beamsplitter (Strahlenteiler) (BSN10, 1“) der Firma Thorlabs eingebaut. Er teilt den Strahl zwischen Flusszelle und Referenzphotodiode auf. Die Referenzphotodiode ist auf den partiell reflektierten Strahl ausgerichtet. Die Reflektions- und Transmissionseigenschaften sind im Bereich von 400 - 700 nm für diesen Strahlenteiler wenig von der Wellenlänge abhängig, jedoch aber von der Polarisation des Lichtes. Er reflektiert 10 % des Lichtes Richtung Referenzdiode und transmittiert 90 % in Richtung Flusszelle. Diese Werte gelten für unpolarisiertes Licht, P-polarisiertes Licht wird um 8 % besser transmittiert, S-polarisiertes Licht um 8 % schlechter. Die Reflektionswerte verhalten sich entsprechend invers.

Der Strahlenteiler ist in einen drehbaren Halter eingebaut, um die Verhältnisse der Intensitäten der aufgeteilten Strahlen zu variieren. Es stellte sich heraus, dass eine maximale Beleuchtung der Flusszelle und eine minimale Reflektion in Richtung Referenzphotodiode ausreichende Intensitäten für die Referenz und möglichst geringe Signalverluste für die Messung zeigten. Durch Drehen des Filters konnten die Werte unter 10 % auf einen Wert von ca. 5 % für reflektiertes Licht, von der Referenzphotodiode detektiert, eingestellt werden.

Ein entscheidender Vorteil dieser Positionierung der Referenzphotodiode ist, dass ausschließlich die Laserintensität ohne zusätzliche Streuung durch die Reflektion an der Flusszellkante von der Referenzphotodiode überwacht wird. Zusätzlich kann bei größeren Störungen durch Luftblasen in der Flusszelle eine Messung mit Luft besser erkannt und abgebrochen werden. Außerdem muss bei der neuen Platzierung der Referenzphotodiode diese praktisch nicht mehr neu ausgerichtet werden, da der Strahlenteiler praktisch nicht verändert wird. Die Referenzphotodiode wurde im optimierten Messaufbau analog der in Abbildung 3 vorgestellten Anordnung des LS-50B Fluoreszenzspektrometers von Perkin Elmer® eingebunden.

4.5.7. Verschiedene Optimierungen an der Optik

4.5.7.1. Zylinderlinse vor Flusszelle eingefügt:

Wie in Kapitel 4.6.3 gezeigt und diskutiert, wurde eine Zylinderlinse zur Fokussierung der Anregungslaserlinie getestet. Diese führte leider nicht zu höheren Signalen.

4.5.7.2. FES0600 - Kurzpassfilter, cut-off Wellenlänge 600 nm:

Ein Kurzpass Filter wurde getestet und zwischen Laser und Flusszelle gebaut, um festzustellen, ob der Laser Wellenlängen im Bereich von über $\lambda = 600$ nm ausstrahlt. Es wurde eine Baseline mit und ohne Filter aufgenommen, um die tatsächlichen Intensitätsverluste im Aufbau durch den Filter zu ermitteln. Der Vergleich wurde während einer Basislinienmessung mit PBS bei einer Flussrate von $5 \mu\text{L}/\text{sec}$ durchgeführt. Die Messungen wurden hierbei am Zeitpunkt von 10 min verglichen. Die Basislinienhöhe ohne Filter wurde auf 100 % gesetzt. Die Basislinie der Messung mit Filter zeigt nur noch eine Höhe von 78 %. Vermutlich wird ein Teil des Laserlichtes am Filter reflektiert und ein sehr kleiner Teil vom Filter absorbiert. Die Intensitätseinbußen sind auf jeden Fall zu hoch, um den zusätzlichen Filter im Messaufbau zu verwenden.

Um zu ermitteln, ob der Laser Wellenlängen im Bereich über 600 nm ausstrahlt, wurde mittels eines Diodenarrayspektrometers das Spektrum des Lasers aufgenommen. Wie in Abbildung 66 gezeigt, liegt der Peak deutlich unter den 600 nm. Somit ist gezeigt, dass der Laser keine Wellenlängen signifikanter Intensitäten über 600 nm ausstrahlt.

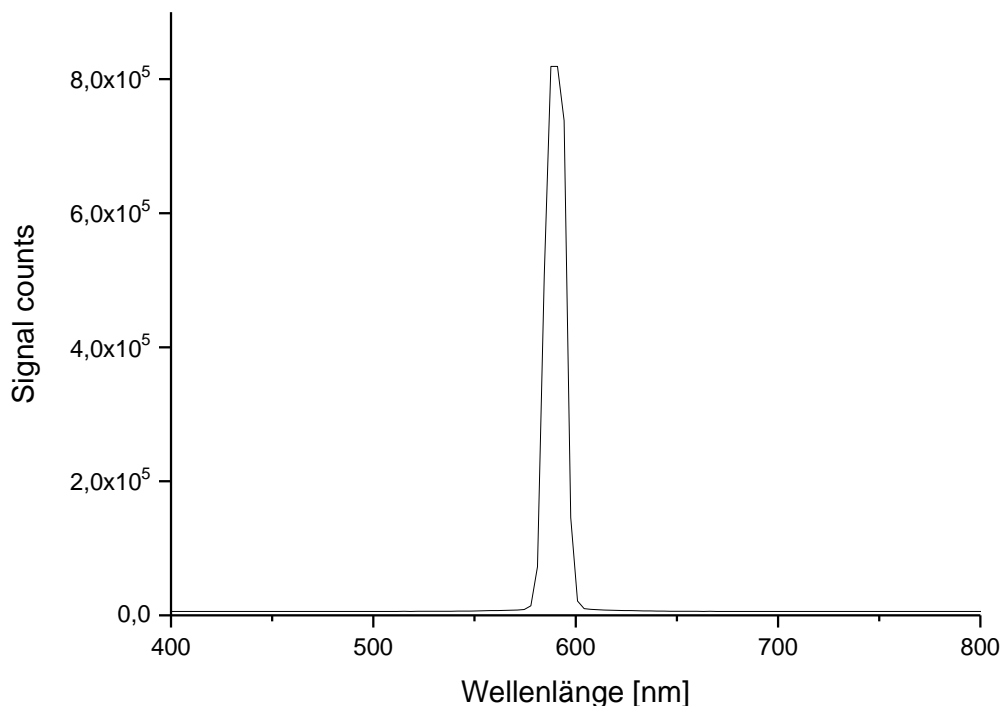


Abbildung 66: Das Spektrum des Lasers wurde mittels eines Photodiodenarrayspektrometers aufgenommen. Die Breite des Peaks liegt an technischen Limitierungen des Spektrometers und der sehr einfach gehaltenen Einkopplungsoptik. Es sind die Signal counts des Spektrometers gegen die Wellenlänge [nm] aufgetragen.

4.6. Messaufbaucharakterisierung mittels Fluorophormessungen

Der LIF-Messaufbau wurde mittels Messungen im Volumen der Flusszelle und auf der Oberfläche (Bodenseite des Flusskanals) charakterisiert. Im Volumen wurde hierbei das Fluorophor DY636 COOH in Reinstwasser gelöst und eine Kalibriergerade im Messaufbau detektiert. Das Fluorophor DY634 wurde verwendet, um ihn auf einer Folie anzubinden und im LIF-Messaufbau zu detektieren. Diese beiden Messvarianten wurden durchgeführt, um die Fluoreszenzdetektion im Volumen und auf einer Oberfläche zu untersuchen und um ein Proof-of-Principle Versuch durchzuführen.

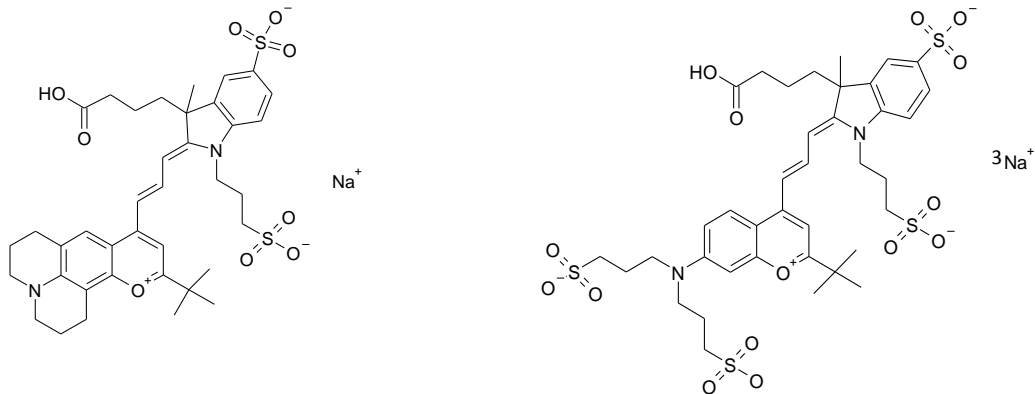


Abbildung 67: Rechts: Strukturformel Fluorophor DY636, links: Strukturformel Fluorophor DY634

4.6.1. Kalibrierkurve mit DY636 im Flusszellvolumen:

Der Flusskanal wurde für die Detektion im Volumen mittels Fluorophormessungen im Durchfluss getestet. Mit dem Fluorophor DY636 COOH wurde eine Kalibrierung in Reinstwasser mittels Dreifachmessungen von sechs Konzentrationen aufgenommen.

Messaufbau:

Es wurden die Flächen unter der Kurve (AUC) von Messungen im Durchfluss, wie in Kapitel 4.3 gezeigt, ausgewertet. Jede Konzentration der Verdünnungsreihe wurde in einem großen Volumen pipettiert und dann auf mehrere Cups verteilt in den Sampler gestellt. Im Sampler wurden dann für jede Konzentration drei Eppendorf® Cups gekühlt bereitgestellt. Die komplette Kalibriergerade wurde, ohne die Black Box zu öffnen, am Stück und automatisiert gemessen. Um die Samplernadel zur Probenentnahme zwischen den Probenwechseln zu spülen, wurde jeweils in den verwendeten Cup rückgespült. Es wurde die Flusszelloberseite Variante 1 und ein lasergeschnittenes Doppelklebeband Typ mfcs mit 3 mm Breite verwendet. Als Flusszellboden wurde eine 100 µm dicke Zeonor® Folie verwendet. Der Farbstoff DY636 COOH wurde in Reinstwasser verdünnt und detektiert.

Assay Ablauf:

Die Farbstoffdetektion fand analog Abbildung 25, Kapitel 4.3, Unterkapitel: „Messungen im Durchfluss“ statt. Die in der Abbildung gezeigte Messung ist eine Messung der höchsten Konzentration dieser Kalibriergerade. Der eingezeichnete Messablauf wurde genauso durchgeführt. Zur Säuberung der Flusszelle wurde zwischen den Messungen schnell zur

Durchspülung gepumpt. Die Blank Messungen wurden bei der Kalibriergerade an verschiedenen Tagen gemessen.

Ergebnisdiskussion:

In Tabelle 10 sind die Konzentrationen und detektierten AUCs mit den Standardabweichungen des Fluorophors DY636 COOH der Kalibriergerade dargestellt.

Tabelle 10: Messdaten und Ergebnisse der Kalibriergerade

Konzentration des Farbstoffes [$\frac{mg}{l}$]	Konzentration des Farbstoffes [$\frac{\mu mol}{l}$]	mittlere AUC [a.u.]	Standardabweichung
1	1,31	0,25762	0,0014
0,34	0,44	0,08214	0,00165
0,2	0,26	0,05165	5,3897E-4
0,1	0,13	0,01668	6,87136E-4
0,02	0,026	0,00197	2,37627E-4
0	0	1,92403E-4	2,06245E-4

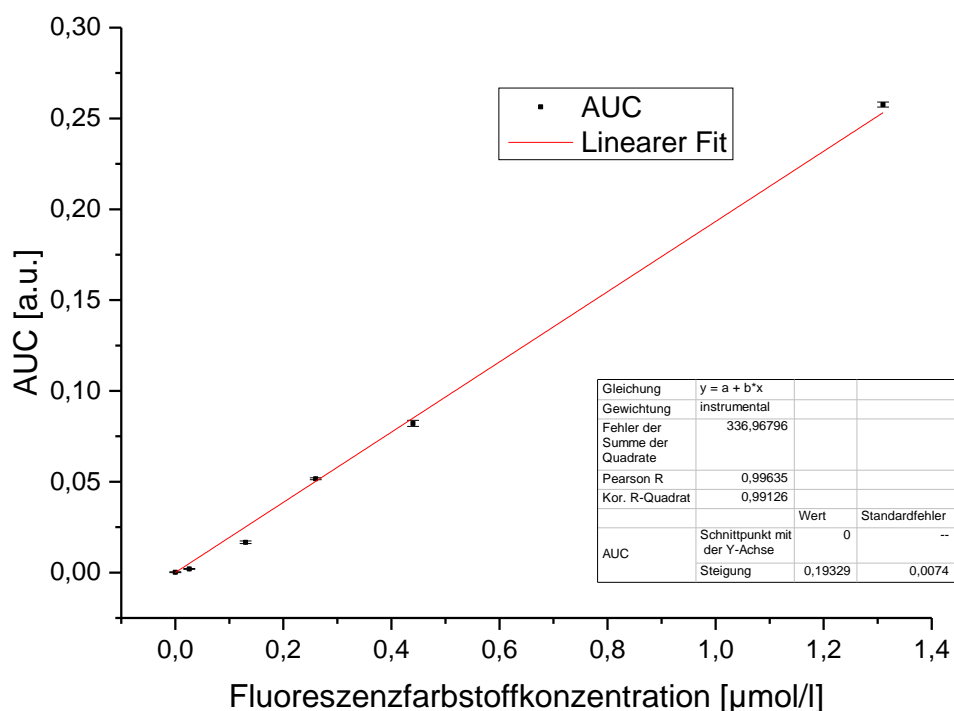


Abbildung 68: Kalibriergerade mit Fluorophor DY636 COOH. Es wurden die in Tabelle 10 gezeigten Konzentrationen gemessen. Es ist die AUC [a.u.] gegen die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration [$\mu mol/L$] aufgetragen.

Zur Bestimmung des Limit-of-Detection der Kalibriergerade aus Abbildung 68 kann nach dem Orange Book der IUPAC [81] gelten: $AUC_{LOD} \geq AUC_{blank} + 3 \cdot \sigma_{blank} = 8,11 \cdot 10^{-4}$. Diese errechnete AUC ist der tatsächliche gemessenen AUC von $1,97 \cdot 10^{-3}$ für die Konzentration

von 26 nmol/L am Nächsten. Deswegen wird dieser Wert als Level-of-Detection für den LIF-Messaufbau angegeben: $c(\text{DY636}) = 26 \text{ nmol/L}$.

In der Blank Messung ohne Fluorophor mit ausschließlich Puffer wird das Hintergrundsignal detektiert. Bei Fluorophormessungen wird immer die Summe aus dem Fluoreszenz- und Hintergrundsignal detektiert. Das Rauschen beider Signale wird vom Rauschen des Lasers (0,5 %) dominiert. Dieses Rauschen wird stark durch das Sampeln von Mittelwerten direkt durch das Elektrometer reduziert.

Trotzdem ist bei niedrigen Konzentrationen das Rauschen stärker ausgeprägt. Das durch den Laser hervorgerufene Rauschen des Fluoreszenzsignals verändert sich proportional zur Größe des detektierten Signals. Dies gilt allerdings nicht für das vom Laser abhängige Rauschen des Hintergrundsignals. Deshalb ist das Rauschen bei niedrigen Konzentrationen stärker ausgeprägt, da es immer gleich stark vorhanden ist und bei niedrigen Konzentrationen deutlich stärker ins Gewicht fällt. Weitere Ausführungen werden in dem Artikel zum LIF-Messaufbau mit Marcel Berner diskutiert [74]. Das absolute Hintergrundsignal kann durch die Reduktion der Lichtstreuung am Doppelklebeband reduziert werden. Außerdem kann eine mögliche weitere Optimierung des Absorptionsfilters vor den Messphotodioden des Hintergrundsignal weiter reduzieren. Das Testen anderer Fluorophore kann zu Kalibriergeraden mit einer verbesserten Linearität führen und dadurch zu niedrigeren Levels-of-Detection. Andere Fluorophore können evtl. geringeres Photobleaching oder Ankleben an die Flusskanalwände aufweisen.

Die gemessene Kalibriergerade zeigt, dass die vom Partner IPV für den Messaufbau entwickelten Photodioden reproduzierbare und konzentrationsabhängige Messsignale für den Beispielfluorophor DY636 zeigen. Die Mikrofluidik und das optische Detektionssystem sind sehr gut geeignet.

4.6.2. Vergleichsdiskussion mit anderen Messaufbauten:

Es ist sehr schwierig, den in der Arbeit entwickelten Messaufbau mit anderen LIF-Messaufbauten zu vergleichen. Die gefundenen Nachweisgrenzen können nur bedingt verglichen und diskutiert werden, da unterschiedliche Messaufbauten, Anregungswellenlängen, Lichtquellen (Laser oder LEDs), Optiken (mit Lichtleiter oder Freistrahler), Fluidiken, Fluoreszenzfarbstoffe, Pufferlösungen, Anreicherungstechniken und Detektoren verwendet werden. Diese Faktoren beeinflussen direkt und indirekt die gefundenen Nachweisgrenzen. Bei vielen Immunoassaymessungen und der Kapillarelektrophorese führt die Anreicherung des Analyten an einer Stelle zu einer kurzen Messdauer in Form eines Messpunktes, wohingegen Durchflussmessungen (wie bei dem vorgestellten Messaufbau) mehrere Minuten Messdauer benötigen. Es sind also Messdauer und Auswerteprinzip bei jedem der Messaufbauten unterschiedlich. Sie beeinflussen auf unterschiedliche Art und Weise zusätzlich deren Nachweisgrenze.

In der Publikation des in der Arbeit vorgestellten Messaufbaus [74] wurde dennoch eine Vergleichstabelle zur Einordnung von grob vergleichbaren LIF-Messaufbauten vorgestellt. Einige Messaufbauten verwenden Fluoreszein und können dadurch untereinander verglichen werden. Der vorliegende LIF-Messaufbau verwendet aber zu langewelliges

Anregungslicht, um Fluoreszenz zu detektieren zu können und daher kann kein direkter Vergleich vorgenommen werden.

4.6.3. Detektion von DY634 auf der Oberfläche

Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um den Messaufbau umfassend zu erforschen. Die Fähigkeit Fluoreszenz an der Oberfläche (Flusszellboden) zu detektieren, wurde wie folgt untersucht.

Messaufbau:

Es wurde eine Zeonor® Folie auf einer Seite mit einem Fluorophor (DY634 COOH) funktionalisiert, auf der anderen Seite wurde sie unfunktionalisiert gelassen. Dies wurde mittels einer speziellen Halterung realisiert, durch welche nur die über Photodiode zwei befindliche Folie funktionalisiert wurde. Der Fluorophor wurde mittels Standard NHS/DIC Chemie kovalent an die Folie angebunden [49-51].

Detektion mittels des Fluoreszenz-Plate-Readers:

Zur Überprüfung, ob die Immobilisierung wie gewünscht erfolgt ist, wurde die Immobilisierung der Folie mittels eines Fluoreszenz-Plate-Readers untersucht. Das durch die Messung mit dem Fluoreszenz-Plate-Reader erhaltene Bild ist in Abbildung 69 gezeigt. Die Flusszelle und die Photodioden sind maßstabsgetreu eingezeichnet. Wie gewünscht konnte auf einer Seite sehr viel Fluorophor immobilisiert werden, wohingegen auf der anderen Seite kaum Farbstoff immobilisiert wurde. Um der mittigen Teilung Rechnung zu tragen, wurde ein Photodioden-Chip mit nur zwei Photodioden ausgewählt.

Ergebnisdiskussion:

Obwohl die Färbung keine scharfe Trennung zeigt, konnten mit den Photodioden eindeutige Signale detektiert und zugeordnet werden. Somit kann mit dem Messaufbau auch auf der Oberfläche gemessen werden.



Abbildung 69: Die Photodioden sind hellblau angedeutet, der Flusskanal hellgrün, die Umriss der Außenkante der Flusszelle dunkelgrün. Die helle Fläche zeigt die Hälfte, bei der Fluorophor immobilisiert wurde, die dunkle Seite zeigt die Seite ohne Fluorophor. Die Folie wurde im Fluoreszenz-Plate-Reader mit einem Signal-Gain von 600 und einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 625 \text{ nm}$ untersucht. Die Emissionsmessung erfolgte im Bereich 660 - 690 nm.

4.6.4. Detektion auf der Oberfläche mit Zylinderlinse und verschiedenen Neigungen

Um die beiden verschiedenen Bereiche auf der Folie mit dem LIF-Messaufbau zu detektieren, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Die Folie wurde durch die Flusskanaloberseite Variante 2 fest auf den Absorptionsfilter angepresst.

Messaufbau:

Es wurden Flusszellneigungen von 90° und 135° getestet. Außerdem wurde eine Zylinderlinse vor der Flusszelle eingebaut, um zu testen, ob bei der Detektion an der Oberfläche eine Fokussierung der Anregungslaserlinie zu höheren Signalintensitäten führt. Zunächst wurde die mit Farbstoff funktionalisierte Seite unter Messphotodiode 1 eingebaut. Danach wurde die Folie gedreht und die Seite mit dem Farbstoff unter Messphotodiode 2 verbaut. Beide Orientierungen der mit Farbstoff funktionalisierten Seite ergaben beim Vergleich der beiden Messphotodioden dieselbe Aussage.

Ergebnisdiskussion:

Die Messungen stimmen bzgl. der Flusszellneigungswinkel mit den in Kapitel 4.5.3 gewonnenen Aussagen überein. Bei 135° konnten deutlich höhere Signale als bei 90° Flusszellneigung detektiert werden. Die Fokussierung des Anregungslichtes mittels einer Zylinderlinse war kontraproduktiv, da durch die Fokussierung vermutlich weniger funktionalisierte Folie beleuchtet wurde. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Signal bei einer Flusszellneigung von 135° am höchsten ist, das Signal des 90° Winkels in der Mitte liegt und das kleinste Signal mit 135° und Zylinderlinse gemessen wurde. Es wurden jeweils die Signale der beiden Messphotodioden, mit und ohne funktionalisierte Seite, relativ zueinander ausgewertet. Mit einer 90° Ausrichtung und Zylinderlinse wurden keine Messungen durchgeführt, da dies für das Messsignal kontraproduktiv ist.

4.7. Weitere Messaufbaubestandteile

Es wurden weitere Messaufbaubestandteile entwickelt, um die Messungen mit den neuartigen homogenen Immunoassays zu ermöglichen und vereinfachen. Außerdem sollen sie die Implementierung des Messaufbaus in ein POCT-Gerät vereinfachen und automatisierte Messungen ermöglichen.

4.7.1. Magnetfallen für magnetische Nanopartikel

Die Benutzung von Magnetpartikeln (MPs) in Immunoassayanwendungen birgt einige Vorteile und wird in Zukunft häufiger anzutreffen sein. Zum Festhalten der MPs werden speziell Permanentmagnete häufig benutzt, da sie einfach in der Anwendung sind und ein starkes Magnetfeld haben. Außerdem weisen sie keine Erhitzung im Betrieb und somit keine Temperaturproblematik auf. Trotzdem haben sie einige bedeutende Nachteile. Ein Permanentmagnet ist nicht Mittel der Wahl, wenn die Magnetfeldstärke variabel an die Partikelgröße oder Magnetfalleneigenschaften angepasst werden soll. Er muss im Messaufbau umplatziert oder mechanisch bewegt werden, um die Magnetfalleigenschaften zu verändern. Wie Permanentmagnete in gewissem Umfang dennoch genutzt werden können und zum Beispiel durch rasches Wegspülen nicht bewegt werden müssen ist in Kapitel 4.7.1.2 weiter ausgeführt. Durch Elektromagneten kann man einfach die

Magnetfalleigenschaften verändern, indem man die Spannung verändert oder den Magnet pulsieren lässt. Elektromagnete können an- und ausgeschaltet werden, um die Partikel loszulassen oder zu mischen. Sie können außerdem in Kombination mit einem Permanentmagnet sogar dazu verwendet werden, Partikel abzustößen, da der Permanentmagnet den Magnetpartikeln eine Orientierung vorgibt und diese dann durch eine Feldumkehr des Elektromagneten mit aufgezwungener Orientierung sowohl angezogen als auch nach Feldumkehr abgestoßen werden können.

4.7.1.1. Magnetfallen, basierend auf Elektromagneten:

Eigenschaften und Ansteuerung:

Die entwickelten Magnetfallen bestehen aus handelsüblichen Elektromagneten, auf die Mikrofluidikschläuche mit Klebstoff (Epoxidharzklebstoff) fest verklebt wurden. Ihr Zweck ist es, magnetische Partikel in einem PTFE Fluidik Schlauch im Fluss festzuhalten, loszulassen und bei Bedarf zu mischen. Wie stark, bzw. wie lange und wo die Partikel festgehalten werden, kann durch das Variieren einiger Parameter bestimmt werden. Um Partikel zwischen dem oberen und unteren Teil der Magnetfalle zu bewegen und zu vermischen, werden zwei Elektromagneten einander gegenüber angeordnet (Abbildung 70 C). Eine Arduino® basierte Ansteuereinheit pulst beide Elektromagnete. Diese Ansteuereinheit wurde von Marcel Berner am IPV realisiert und entwickelt. Die Magnetfallen, fluidische Aufbauten und alle Experimente dazu wurden vom Verfasser durchgeführt. Die Ansteuereinheit kann mittels eines Arduino® Programmes beliebig programmiert werden. Es sind verschiedene Pulspattern und Wiederholungsschleifen möglich. Die für die Magneten benötigte Spannung wird an einen Eingang der Ansteuereinheit von einem externen Netzteil angelegt. Mittels dieses Netzteils kann durch eine Spannungsveränderung die Haltekraft der Magneten variiert werden. Des Weiteren kann mittels der USB Schnittstelle der Arduino® in einen Messablauf implementiert werden. Es könnten zum Beispiel magnetische Partikel während des Signalausdifferenzierungsschrittes festgehalten und während des Detektionsschrittes losgelassen werden.

Messaufbau:

Wie in Abbildung 70 zu sehen ist, wurden verschiedene Aufbauvarianten realisiert. Bei Variante A) wurde ein simples Proof-of-Concept angestrebt, bei der ein einfacher PTFE-Schlauch mittels Epoxidharzkleber auf einen Elektromagneten geklebt wurde. Variante B) zeigt eine Weiterentwicklung, bei der ein Loch in die Mitte des Magneten gebohrt wurde, um den Auslass durch die Mitte des Magneten auszuführen. Der Vorteil im Vergleich zu Variante A) besteht darin, dass keine zwei Lagen an Schläuchen übereinander geführt werden müssen und sich die Schläuche somit dichter am Elektromagneten befinden, was zu einer höheren Festhalteeffizienz führt, da das Magnetfeld mit zunehmendem Abstand an Haltekraft verliert. Außerdem ist Variante B) eine gute Vorentwicklung für Variante C), bei der die Schläuche zwischen den beiden Elektromagneten in einer Ebene und flach liegen müssen, um nah an den Elektromagneten zu sein und ein planes und paralleles Aneinandergrenzen der Magneten zu ermöglichen.

Variante A)

Variante B)

Variante C)



Abbildung 70: Drei verschiedene Magnetfallvarianten, basierend auf Elektromagneten. Variante A) einzelner Elektromagnet; Variante B) einzelner Elektromagnet mit Schlauchausführung in der Mitte; Variante C) doppelter Elektromagnet.

Um die Temperatur der Elektromagnete möglichst stabil zu halten, wurde ein Aufbau mit aktiven Lüftern realisiert. Diese ziehen die Luft von unten an und führen Sie nach oben ab, an der Magnetfalle vorbei. Abgesehen davon, dass zu hohe Temperaturen von über 37°C bei Biomolekülen in Immunoassays zu Denaturierungen führen, entstehen bei höheren Temperaturen und Wärmequellen auch mehr Luftblasen in der Fluidik, welche das Festhalten von Magnetpartikeln verhindern und diese vor sich herschieben. Außerdem können bei zu großen Temperaturschwankungen unterschiedliche Festhalteeffizienzen oder sogar die Zerstörung der Schläuche beobachtet werden.

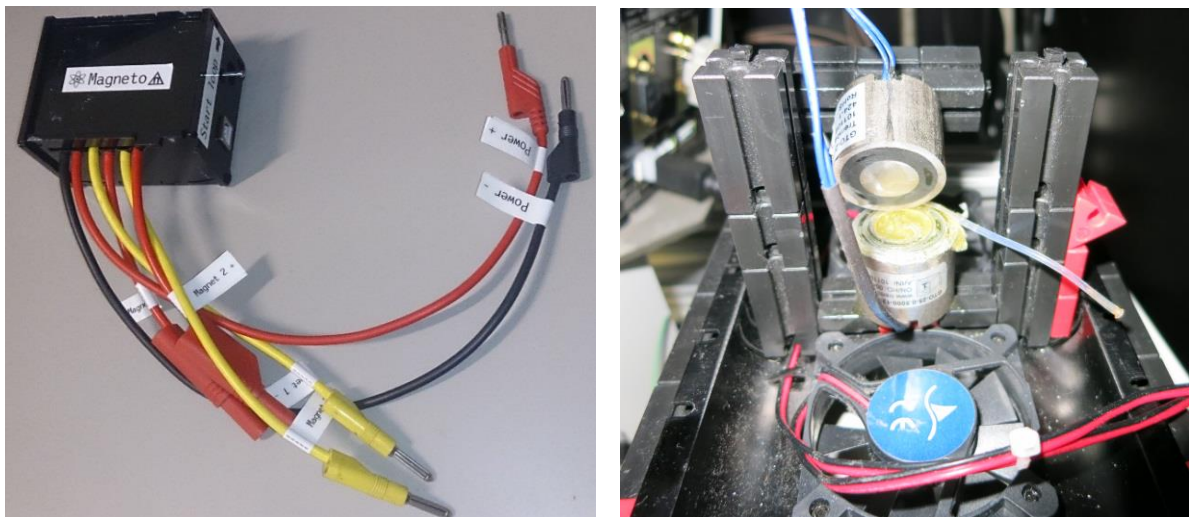


Abbildung 71: Links: Arduino® Ansteuereinheit für die Elektromagneten, rechts: Kühler für Elektromagnetfallenaufbau mit Doppelmagnetfalle (Variante C) (geöffnet).

Untersuchung und Charakterisierung des Messaufbaus:

Die Fähigkeit der Magnetfallen Partikel festzuhalten wurde mittels Versuchen erforscht. Diese wurden alle nach demselben Pumpablauf und mit derselben Konzentration an Magnetpartikeln durchgeführt, um die Signale vergleichen zu können.

Die Konzentration der micromod® Magnetpartikel mit 250 nm Durchmesser wurde auf 0,3 g/L gesetzt. Zunächst wurde die eingeschaltete Magnetfalle mittels stetigem, langsamen Durchpumpen (im Fluss von 60 $\mu\text{L}/\text{min}$) beladen. Im Anschluss an das Beladen der Magnetfalle wurde mit derselben Pumpgeschwindigkeit nochmals dasselbe Probenvolumen über die Flusszelle mit den festgehaltenen Magnetpartikeln gepumpt. Dieses zusätzliche Volumen wurde injiziert, um die Haltekraft der Magnetfalle zu testen. Im nächsten Schritt

wurde die Magnetfalle ausgeschaltet und ein definiertes Volumen schnell (mit 600 $\mu\text{L}/\text{min}$) durch die Magnetfalle gepumpt. In diesen ersten Versuchen wurden weder die Fluidik noch die Elektromagnetfallen speziell geblockt. Dies war aber für diesen einfachen Proof-of-Principle Versuch nicht weiter von Belang, da keine Biooberflächen zum Einsatz kamen und die Magnetfallen durch häufige Benutzung mit MPs in Vorversuchen schon gut geblockt worden waren. Außerdem sind die Oberflächen der magnetischen Partikel zusätzlich durch nicht aktivierte PEG(NH₂)₂ Gruppen abgeschirmt.

Das Volumen wurde in einem Eppendorf® Cup aufgefangen und die Absorption, und somit die Halteeffizienz der Magnetfallen, mit einem UV/VIS Spektrometer gemessen. Die Proben wurden alle verdünnt und rückgerechnet, um im linearen Absorptionsbereich zu messen.

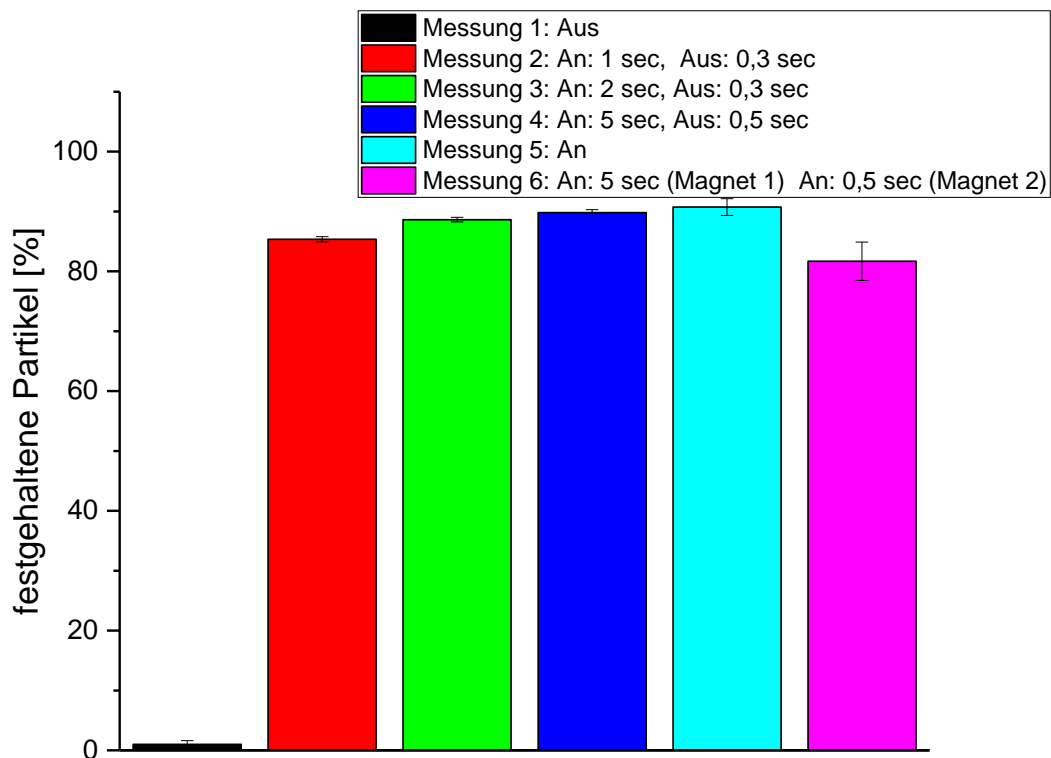


Abbildung 72: Messungen mit Variante A) und Variante C). Messung 1 - 5 sind Messungen mit Variante A), Messung 6 wurde mit Variante C) durchgeführt. Messung 1 wurde mit dauerhaft ausgeschaltetem Magneten durchgeführt, Messung 5 mit dauerhaft angeschaltetem Magneten.

Ergebnisdiskussion:

Messungen 1 und 5 mit der Magnetfallenvariante A) in Abbildung 72 zeigen, dass der Messaufbau und Pumpablauf passend für die Problemstellung entwickelt wurde. Es wurde Messung 1 mit ausgeschalteter Magnetfalle durchgeführt, um auszuschließen, dass Magnetpartikel in der Falle lediglich sedimentieren oder absorbieren. Es bleiben nur wenige Partikel in der Magnetfalle, aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen, haften. Bei Messung 5 war der Magnet dauerhaft an, es konnten wie erwartet die meisten Magnetpartikel festgehalten werden. 100 % der Skalierung in Abbildung 72 stehen für die

direkt im UV/VIS Spektrometer vor der Verwendung in der Magnetfalle gemessene Konzentration der eingesetzten Lösung. Bei Messung 5 konnten 90% der Partikel im Volumenstrom festgehalten werden, da vermutlich nicht alle eingefangen und festgehalten werden konnten, durch Absorption und unspezifische Wechselwirkung geht ein weiterer geringer Anteil an Partikeln verloren.

Die Magnetfalle kann mehr Magnetpartikel festhalten, je länger das Zeitintervall ist, in dem sie eingeschaltet ist. Diese logische Tatsache konnte auch im Versuch gezeigt werden. Die zwei Magneten der Doppelmagnetfalle (Variante C) sind alternierend angeschaltet. Sie halten weniger Partikel fest, da sie diese durch das Volumen während des Festhaltens bewegen müssen. Allerdings sind die mit einer Doppelmagnetfalle festgehaltenen Partikel nicht so stark agglomeriert und lockerer, wenn sie aus der Falle nach dem Versuch gepumpt werden. Die erhaltenen Halteeigenschaften der Magnetfallen sind sehr gut reproduzierbar. Sie sind allerdings etwas störanfällig, wenn Luft in die Fluidik gelangt oder ausgast, da Luftblasen die MPs vor sich herschieben. Um die Magnetfallen in magnetpartikelbasierenden Immunoassays einzusetzen, müssen noch weitere Optimierungen vorgenommen werden. Die Magnetfallen müssen mit niedrigeren Konzentrationen getestet werden, ihre Inertheit und Mischfähigkeiten getestet und quantifiziert werden. Wegen der Luftblasenproblematik wurden weitere, im Folgenden diskutierte Ansätze, verfolgt.

4.7.1.2. Magnetfallen, basierend auf Permanentmagneten:

Wie zu Beginn des Kapitels erwähnt, haben Permanentmagnete einige Nachteile. Es wurden einige Vorversuche durchgeführt, welche die negativen Eigenschaften bezüglich der schlechten Wiederablösbarkeit von Partikeln aus Magnetfallen und der Notwendigkeit den Magneten mechanisch zu bewegen, zunächst bestätigen.

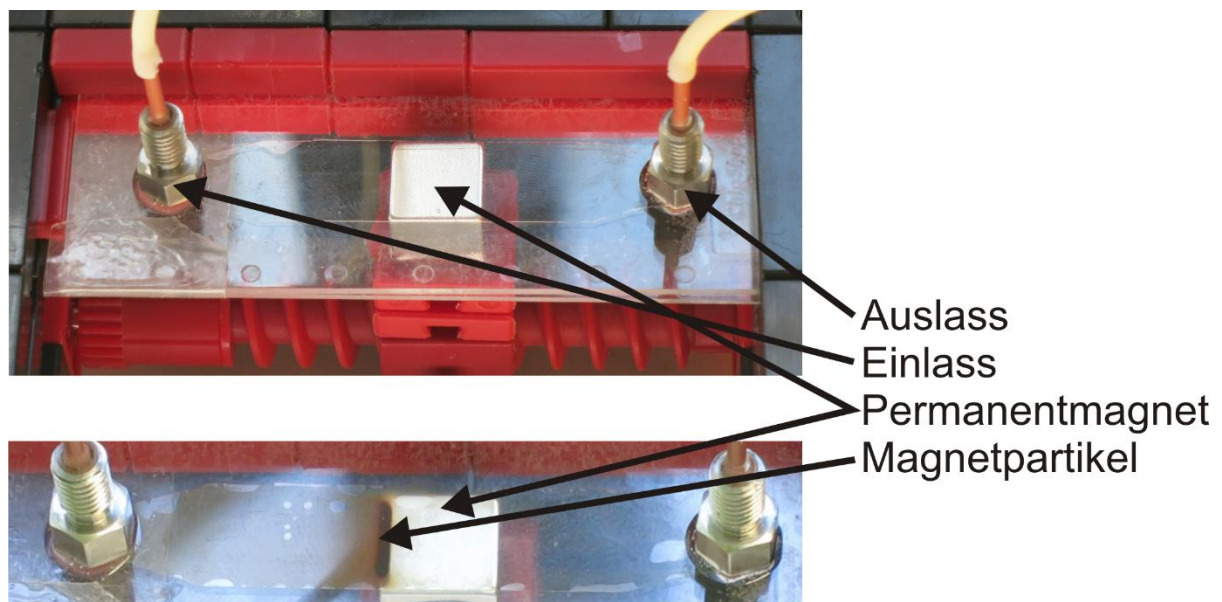


Abbildung 73: Zu starker und mechanisch nur ungenau bewegbarer Permanentmagnet. Dies wurde in Vorversuchen herausgefunden, welche in größeren Flusskanälen in Objektträgergröße durchgeführt wurden.

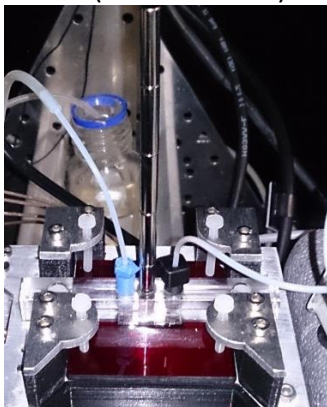
Wie in Abbildung 73 zu sehen ist, zeigte sich, dass die Permanentmagneten entweder zu stark sind und die Partikel agglomerieren und dadurch Schlieren, durch die Fluidik ziehen oder zu schwach sind (nicht gezeigt) und nichts fest gehalten wird.

Innovativer Einsatz von Permanentmagneten:

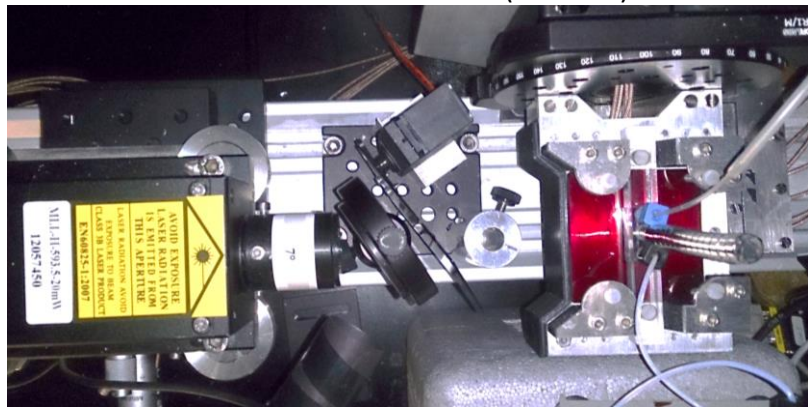
Weitere Versuche und Überlegungen zeigten jedoch Lösungen auf, bei denen die Nachteile in gewissem Umfang überwunden werden. Dadurch, dass mit den neuesten Varianten der Flusszellen sehr hohe Flussraten durchführbar sind, können Magnetpartikel nach dem Festhalten durch einen Permanentmagneten wieder weggespült werden. Hierfür muss der Permanentmagnet weder entfernt, noch mechanisch bewegt werden. Außerdem können mit Hilfe einer Luftblase fast alle Partikel wieder von dem Permanentmagneten einer Falle gelöst werden. Die Stärke einer Falle lässt sich durch das Stapeln mehrerer Permanentmagnete in Grenzen variieren. Um diese Möglichkeit zu nutzen, platziert man den dem Flusskanal am untersten Magneten etwas weiter weg vom Flusskanal und kann dann durch zusätzliche Magnete die Stärke der Falle verstärken und dadurch einstellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Gleichgewicht zwischen der magnetischen Haltekraft und der hydrodynamischen Kraft eines Volumenstroms in Grenzen verändert werden kann und dadurch ein Festhalten oder Loslassen von Magnetpartikeln in einer Permanentmagnetfalle realisiert werden kann. Wenn jeder Assayschritt in seiner Magnethalte- und Ablöseeffizienz angepasst wird, kann ein Assay mit Permanentmagneten optimiert und angepasst werden.

Flusszelle im Halter
(Seitenansicht):



Messaufbau auf Schiene (Aufsicht):



Flusszelloberseite Variante 2 mit Permanentmagneten (Seitenansicht):

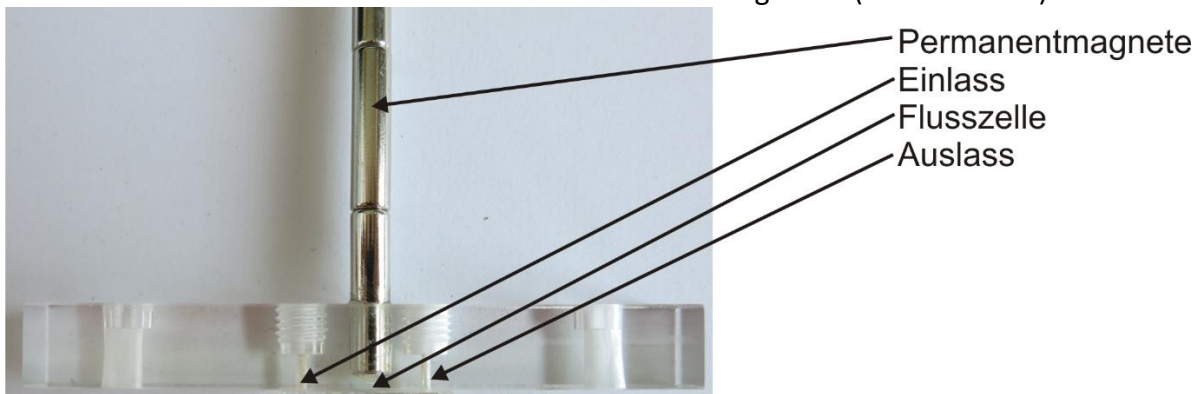


Abbildung 74: Flusszelloberseite Variante 2 mit Permanentmagneten aus verschiedenen Perspektiven.

Im Ergebnisteil werden in Kapitel 4.8.4.5 die beschriebenen Permanentmagnete verwendet und bilden quantitativ auswertbare Signale aus. Die Partikel können, wie gut am Ende der Messungen zu sehen ist, auch wieder durch hohe Flussraten weggespült werden.

4.7.2. Aufbauten zur Homogenisierung von magnetischen Nanopartikeln

Werden größere, funktionalisierte, magnetische Partikel in Immunoassays eingesetzt, sedimentieren diese nach einer gewissen Zeit. Messungen homogener Immunoassays zeigten, dass die Sedimentation während der Inkubationszeiten des Assays und im Vorratsgefäß dazu führen kann, dass die Reproduzierbarkeit der Assaymessungen nicht mehr gegeben ist, da die Reaktionen während der Inkubation beeinflusst oder nicht mehr dieselbe Menge an Partikeln vom Vorratsgefäß entnommen wird. Um die Ausmaße der Problematik zu verstehen und zu lösen, wurden zunächst Sedimentationsmessungen ohne Bewegung des Vorratsgefäßes durchgeführt (Kapitel 4.7.2.1). Daraufhin wurden zwei Mischaufbauten gegen Partikelsedimentation entwickelt (Kapitel 4.7.2.2 bis 4.7.2.4).

4.7.2.1. Sedimentationsmessungen in Ruhe

Es wurden zunächst Voruntersuchungen zu den Sedimentationszeiten in einer einfachen Küvette durchgeführt, um in Abhängigkeit der Partikelkonzentration und der Pufferzusammensetzung die Sedimentationsdauer zu bestimmen.

Messaufbau:

Im Versuch wurde eine homogenisierte Suspension in ein UV/VIS Absorptionsspektrometer in einer Küvette gestellt. Die Messung wurde in einer bewegungslos stehenden Standardeinwegküvette mit Strahlengang von 1 cm Kantenlänge durchgeführt. Für die Sedimentation wurde ein Zeitraum von 10 - 11,5 min als Startpunkt und 58,5 – 60 min als Endpunkt festgelegt, gemittelt und ausgewertet. Es wurde die Absorption bei der Wellenlänge von $\lambda = 670$ nm gemessen, da hier ab einer ausreichenden Verdünnung ein annähernd linearer Messbereich gefunden werden konnte. Die Anfangskonzentration (linke Säule jeder Farbe bei A und B in Abbildung 75) wurde jeweils auf 100 % gesetzt und die Endwerte jeweils im Bezug dazu (rechte Säule jeder Farbe bei A und B in Abbildung 75).

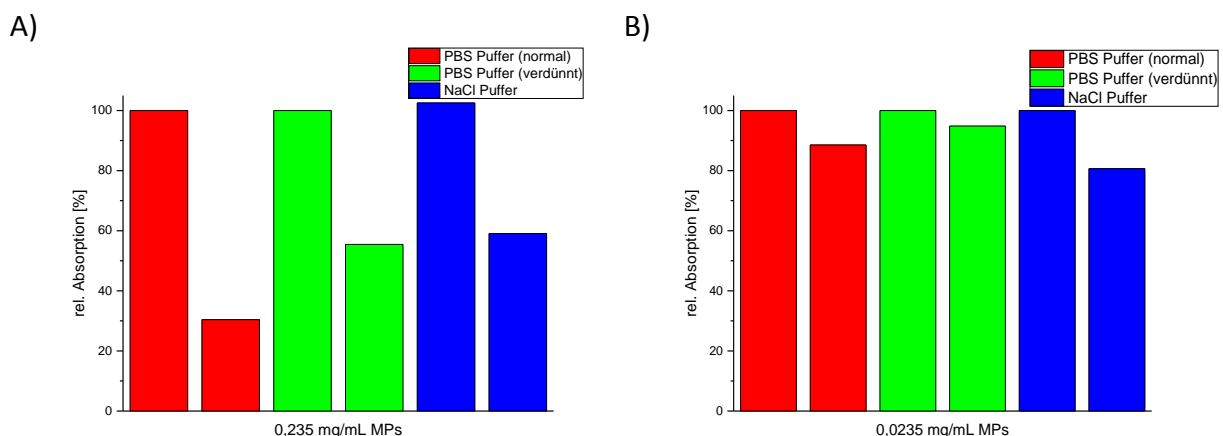


Abbildung 75: Sedimentationsmessungen in einer Standardküvette mit unfunktionalisierten magnetischen Partikeln. Die Anfangswerte jeder Konzentration und jedes Puffers wurden jeweils auf 100 % gesetzt und sind jeweils die linke Säule des Paares. Auf der rechten Seite ist jeweils die Messung der sedimentierten Partikel gezeigt. Es wurde jeweils in PBS normal, PBS verdünnt und NaCl 0,9 % mit unterschiedlichen Magnetpartikelkonzentrationen (x-Achse) gemessen. Zusammensetzungen der Puffer stehen in Kapitel 3.1.1.

Magnetpartikel (Estapor®) mit einem Durchmesser von 360 nm wurden verwendet und in drei verschiedenen Puffern verglichen. In Abbildung 75 wurden unter A und B die Konzentrationen 0,235 mg/mL und 0,0235 mg/mL untersucht. Bei der höchsten Konzentration musste wegen der hohen Absorption stark verdünnt werden, um im linearen Bereich messen zu können. Die niedrigste Konzentration konnte im oberen linearen Bereich ohne Verdünnung detektiert werden. Die Anfangskonzentrationen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und Verdünnungen bei den Absorptionsmessungen rückgerechnet.

Der Vergleich der Konzentrationen zeigt, dass abhängig vom Lösungsmittel die Partikelkonzentration in der Vorratslösung von Bedeutung ist. So ist bei einer niedrigen Konzentration eine wenig ausgeprägte Sedimentation und bei einer hohen Konzentration eine starke Sedimentation zu sehen. Wird PBS in Standardzusammensetzung verwendet, ist in der hohen Konzentration die Sedimentation am stärksten ausgeprägt. Vermutlich führt die hohe Anzahl an geladenen Ionen zu einer verstärkten Partikelagglomeration und dadurch zur Sedimentation. Bei verdünntem PBS und NaCl Lösung ist in konzentrierter Partikellösung eine nur halb so starke Sedimentation wie mit PBS (normal) zu beobachten. In der niedriger konzentrierten Partikellösung zeigen alle Lösungsmittel eine geringere Sedimentation außer NaCl, welches eine etwas stärkere als die anderen zeigt.

4.7.2.2. Verschiedene Partikelmischer:

Um die Partikel am Sedimentieren zu hindern, wurden ein Vortexer und ein Schütteltisch entwickelt. Bei allen Aufbauten musste ein Optimum der Stärke und Dauer der Bewegungen gefunden werden. Zu starke Bewegungen können die Oberflächenfunktionalisierung beschädigen oder zum Schäumen bringen, zu schwache Bewegungen können eine (teilweise) Sedimentation nicht verhindern. Ein Schäumen ist immer ein schlechtes Zeichen, in biochemischen Experimenten deutet es immer auf eine ungewollte Proteindenaturierung hin. Die vorgestellten Aufbauten wurden vollständig vom Verfasser entwickelt, gebaut und getestet.

4.7.2.3. Arduino® Vortexer für magnetische Partikel

Messaufbau:

Zwei Vibrationsmotoren aus Smartphones sind orthogonal zueinander an den Boden eines Glasvials geklebt, um unregelmäßige Vibrationsmuster zu generieren. Ein Motor hat die Größe zweier aufeinander gestapelter 10-Cent-Stücke. Der andere ist länglich wie ein 2 cm langes Bleistiftstück. Das Vortexer Setup beinhaltet ein Vial aus Glas, welches an der Verschlusskappe am Aufbau befestigt ist. In der Verschlusskappe ist ein Loch für einen Schlauch, welches erlaubt, automatisch Proben mittels einer Ismatec® Peristaltik Pumpe zu nehmen. Die Verschlusskappe ist mit zwei Bewegungsmöglichkeiten in

Orientierungsrichtung der x- und y-Achsen befestigt, damit die Vibration durch die Motoren möglichst ungehindert erfolgen kann.

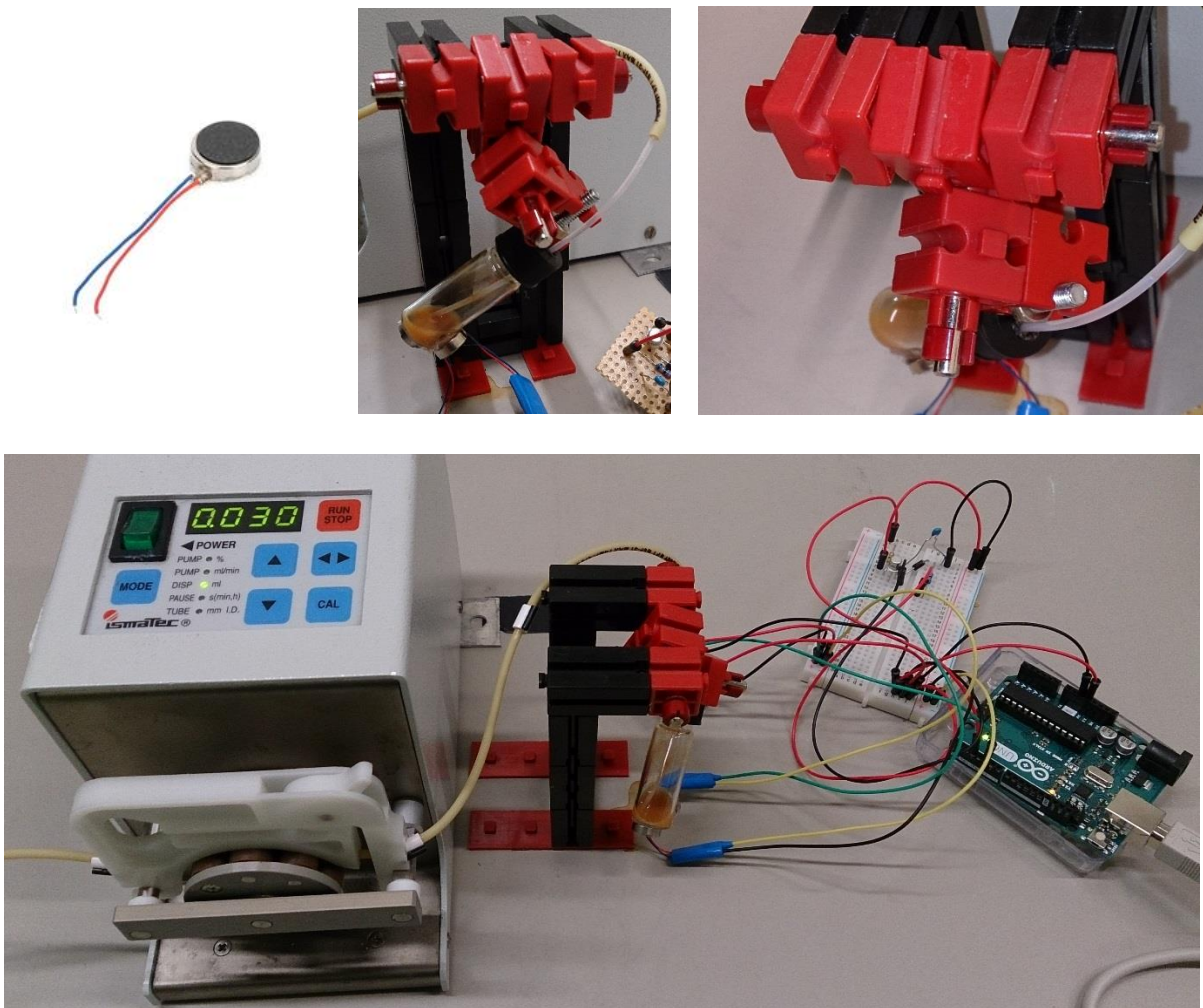


Abbildung 76: Im unteren Teil der Abbildung ist das komplette Messsetup, mit der Ismatec® Peristaltikpumpe links, dem Vorratsbehälter in dem Spezialhalter in der Mitte und dem Arduino® mit der Motorsteuerplatte auf der rechten Seite zu sehen. Oben links ist ein einzelner Vibrationsmotor, wie er in Smartphones verbaut wird, gezeigt. Oben in der Mitte ist ein Detail des Halters für das Vorratsgefäß zu sehen, welcher zwei Bewegungsmöglichkeiten aufweist. Oben rechts ist die Verschlusskappe des Vorratsgefäßes zu sehen, welche zum einen die Befestigung der Kappe mittels einer Schraube am Rüttler und die Verwendung eines Schlauchs zur Probenentnahme aus dem Vorratsgefäß ermöglicht.

Sedimentationsmessungen im Arduino® Vortexer:

Im Vorratsgefäß des Vortexers wurde ein weiteres Sedimentationsexperiment durchgeführt. Ein Volumen von 2 mL Estapor® Magnetpartikeln mit einem Durchmesser von 360 nm und einer Konzentration von 0,235 mg/mL in Reinstwasser wurden für 8 h gevortext. In den Vorversuchen war das Sedimentationsproblem bei der hohen Konzentration deutlich signifikanter (Abbildung 75), weswegen sie mit dem Vortexer getestet wurde. Die Konzentration und Zeitdauer wurden beispielhaft für eine Vorratslösung einer Immunoassaymessung mit Partikeln gewählt. Es wurde stündlich eine Probe von 20 µL entnommen, dies entspricht in etwa der Menge an Partikeln, die für eine Immunoassaymessung benötigt werden.

Um die Partikel am Sedimentieren zu hindern, vibrieren die beiden Motoren wiederholt in einem programmierten Muster. Sie können unabhängig voneinander angesprochen werden. Es wurde ein Ablauf für eine effiziente Durchmischung entwickelt. Die beiden Vibrationsmotoren werden im optimierten Muster, in folgender Sequenz angesteuert: Motor 1 an: 500 ms, Pause: 50 ms, Motor 2 an: 500 ms, Pause: 50 ms, Motor 1 an: 500 ms, Pause: 50 ms, Motor 2 an: 500 ms, Pause: 50 ms, Motor 1 und 2 an: 500 ms, Pause: 17750 ms, dann startet die Schleife wieder von Anfang.

Die stündliche Probennahme wurden mittels einer Ismatec® Peristaltik Schlauchpumpe aus dem Vorratsgefäß im Vortexer durchgeführt. Der Schlauch der Pumpe befand sich die ganze Zeit über im Vorratsgefäß, um die Probenzusammensetzung nicht zu verfälschen. Um die geringe Ungenauigkeit der Peristaltikpumpe zu entfernen, wurden die Eppendorf® Cups vor und nach der Probennahme gewogen und dadurch auf ein standardisiertes Probenvolumen zurückgerechnet. Die geringen Dichteunterschiede der Suspension wurden hierbei vernachlässigt. Die Menge an entnommenen Magnetpartikeln wurde mittels UV-VIS-Absorptionsmessungen bestimmt. Die Absorption der Magnetpartikel bei den Wellenlängen zwischen 660 und 670 nm wurde gemittelt und ausgewertet, der Wert zum Zeitpunkt 0 wurde als Bezugspunkt auf 100 % gesetzt.

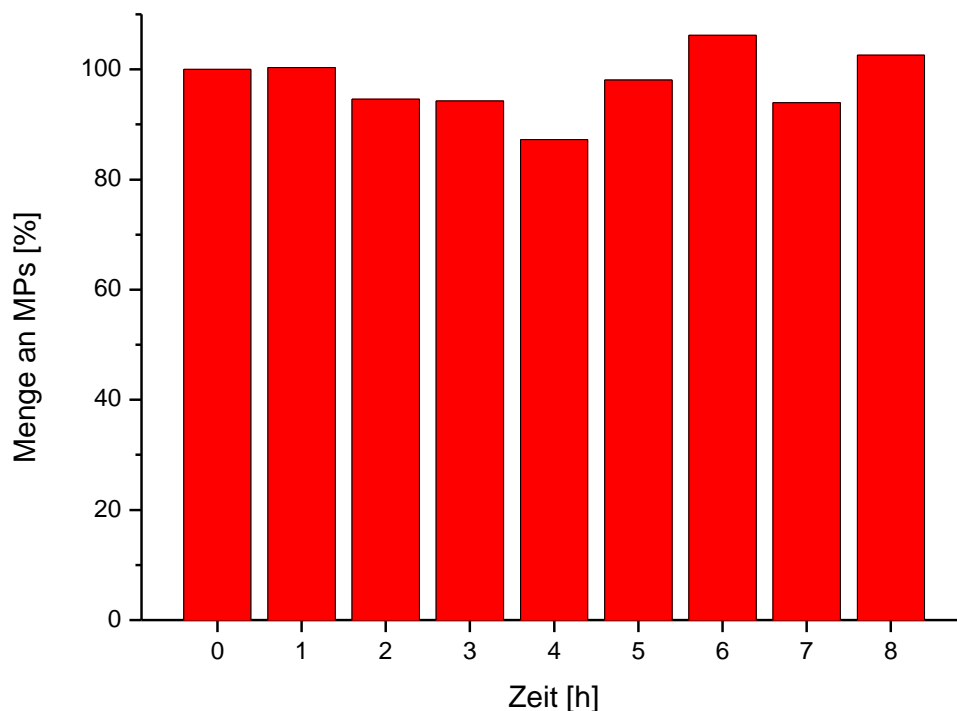


Abbildung 77: Menge an Magnetpartikeln, die stündlich einer gevortexten Vorratslösung entnommen wurden. Es wurde die Absorption der ersten Messung ($t=0$ h) auf 100 % gesetzt und die folgenden Messungen darauf bezogen. Es wurde die Menge an magnetischen Partikeln [%], bezogen auf die Anfangskonzentration, gegen die Zeit [h] aufgetragen.

Das Verhalten der magnetischen Partikel ist stark vom Puffer und dem pH-Wert des Puffers abhängig in dem sie gelöst sind. Bei den durchgeführten Experimenten wurde Reinstwasser verwendet.

Ergebnisdiskussion:

Die Konzentrationsschwankungen der Messungen nach den Zeitintervallen aliquotierten Proben sind nur gering ausgeprägt (Abbildung 77), sie können jedoch noch weiter verringert werden. Durch das Verwenden einer Spritzenpumpe anstatt einer Peristaltikpumpe wäre eine Verbesserung zu erwarten. Außerdem kann das Vortexpattern optimiert werden.

Die Vorratslösung, welche die magnetischen Nanopartikel für die Immunoassays enthält, besteht aus einer wässrigen Lösung mit Ionen, um die auf der Oberfläche immobilisierten Antikörper möglichst lange und stabil lagern zu können. Im gelabelten Zustand und im Puffer können sich die Partikel anders verhalten als in Reinstwasser, wie auch schon bei den Intervallmessungen an gevortexten Magnetpartikeln (Abbildung 75) deutlich wird.

4.7.2.4. Schütteltisch

Der Schütteltisch kann bis zu acht Eppendorf® Cups gleichzeitig schütteln, wie auch beim Vortexer können verschiedene Ablaufprogramme die Intensität des Mischvorganges festlegen. Durch die vielen Halter können verschiedene Immunoassays oder Messungen parallel unter denselben Bedingungen geschüttelt werden. Er wurde hauptsächlich zum Schütteln während Inkubationsschritten der Immunoassays entwickelt.

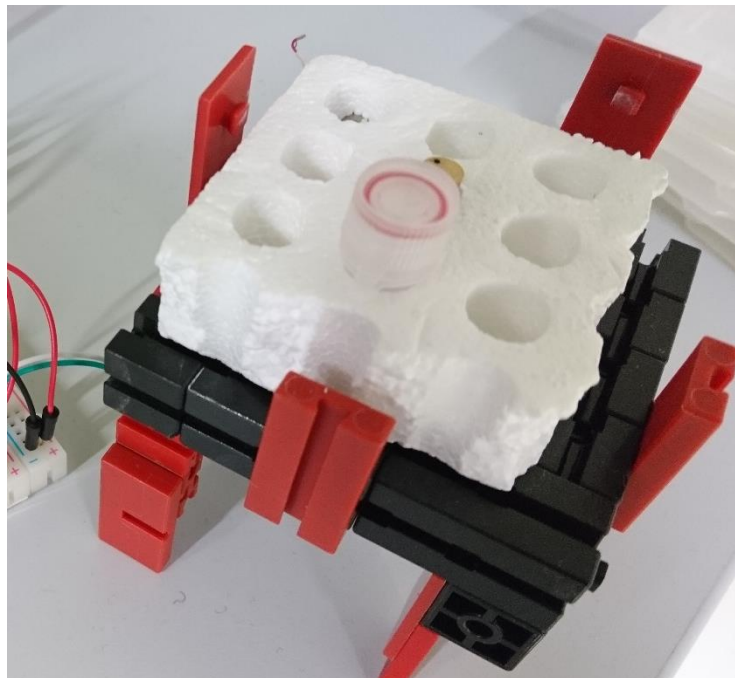


Abbildung 78: Das Styropor® Teil des Schütteltisches wird durch den Vibrationsmotor in der Mitte zum Vibrieren gebracht. Die roten Bauteile an jeder Seite halten das Styropor® Teil auf dem Schütteltisch (schwarze Bauteile). Im Styropor® Teil ist beispielhaft ein Cup durch den roten Dichtungsring zu erkennen.

Im Laufe der Experimente zeigte sich jedoch, dass zwar die Signale nach der Inkubation auf dem Schütteltisch größer werden (Abbildung 103), aber auch die Standardabweichungen.

Deswegen wurde er nur für die Messungen aus Abbildung 103 verwendet und danach verworfen.

4.8. Messungen zum MPA-Immunoassay im LIF-Messaufbau

4.8.1. Charakterisierung der Fluoreszenz Sekundärantikörper

Zielsetzung:

Ziel der Versuchsreihe war es, Sekundärantikörper, welche an Antikörper aus dem Schaf binden (MPA-AKs in der Arbeit), mit untereinander angeglichenen Antikörperkonzentrationen bezüglich ihrer Signalintensität im LIF-Messaufbau zu vergleichen. Dieser Vergleich sollte dazu dienen, die am besten geeigneten Sekundärantikörper für den homogenen Mycophenolsäure Immunoassay zu finden.

Messaufbau:

Für die Messungen wurde eine Flusszelloberseite Variante 2 verwendet. Es wurde ein 1 mm weiter Flusskanal verwendet. Als Flusszellboden wurde Zeonor® Folie mit Aminogruppen zur Abschirmung auf der Oberfläche verwendet. Es wurde Messphotodiode 2 eines vierer Chips verwendet. Bei den Vergleichsmessungen wurden alle Messaufbauparameter unverändert gelassen, um die verschiedenen Antikörper untereinander vergleichen zu können.

Eigenschaften der verschiedenen Antikörper:

Um die spektrale Eignung und Eigenschaften der Sekundärantikörper für einen heterogenen oder homogenen Immunoassay zu untersuchen, wurden fünf verschiedene Sekundärantikörper mit unterschiedlichen, für den Messaufbau spektral passenden, Fluorophoren verglichen. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Daten der verglichenen Sekundärantikörper.

Sekundär-AK Nr.:	Fluorophor:	AK erkennt:	Antikörperkonzentration [mg/mL] / Labellinggrad:	Stock Konzentration [mg/mL]:	Gemessene Konzentration [mg/mL]:
1	Alexa Fluor 647	Anti-Schaf IgG, Fc-Teil spezifisch	1,4 / 4,7	1,4	0,051
2	Alexa Fluor 647	Anti-Schaf IgG (H+L)	1,5 / 4,9	1,5	0,05
3	Alexa Fluor 647	Anti-Schaf IgG (H+L)	1,5 / 4,4	1,5	0,05
4	Alexa Fluor 594	Anti-Schaf IgG (H+L)	1,5 / 1,0	1,5	0,05
5	DyLight 650	Anti-Schaf IgG (H+L)	0,5 / keine Angabe	0,5	0,051
6	Alexa Fluor 633	Anti-Schaf IgG (H+L)	2 / keine Angabe	2	0,051

Die Antikörper wurden in unterschiedlichen Stockkonzentrationen geliefert, bzw. nach den Vorgaben der Hersteller resubstituiert, um optimale Lagerbedingungen der Vorratslösungen zu erhalten. Der Labellinggrad unterscheidet sich bei den sekundären Antikörpern 1 bis 3

kaum. Antikörper 4 unterscheidet sich deutlich. Bei den Antikörpern 5 und 6 wurden vom Hersteller keine Werte angegeben.

Bei den Nummern 1, 2 und 3 handelt es sich um Antikörper mit demselben Label. Bei den Antikörpern 2 und 3 handelt es sich um dieselben Antikörper verschiedener Batches. Da sie polyklonal sind, ist von einer zusätzlichen Varianz zur Herstellungsvarianz verschiedener Batches (verschiedene Labellinggrade), bezüglich ihrer Reaktivität, auszugehen. Die Sekundär-Antikörper 4 - 6 unterscheiden sich zu den vorhergehenden Antikörpern und untereinander bezüglich ihrer Fluorophore.

Vergleichsmessungen:

Der Parameter Antikörperkonzentration ist für den Immunoassay von entscheidender Bedeutung, da der Sekundärantikörper an den aus dem Schaf stammenden Antikörper binden und dadurch ein Fluoreszenzsignal generieren soll. Die Fluoreszenzsignalintensität der Bindungskurve der fluoreszierenden Sekundärantikörper wird also bei gleicher Konzentration der Antikörper bestimmt.

Es gilt dabei aber zu bedenken, dass die Fluorophore unterschiedlich gut für die Laserwellenlänge, den Absorptionsfilter und die Photodioden geeignet sind und ein hoher Labellinggrad zwar zu einem hohen Signal führt, die Affinität des Antikörpers zum Zielmolekül sich aber dadurch auch verringern kann. Außerdem fällt zusätzlich die Affinität der sekundären Antikörper generell unterschiedlich aus. Es kann also ein sich hier als weniger gut erscheinender Antikörper in einem anderen Messaufbau als sehr gut geeignet erweisen. Zusätzlich muss die große Varianz zwischen Antikörper Chargen bedacht werden und die Tests bei anderen Chargen evtl. wiederholt werden.

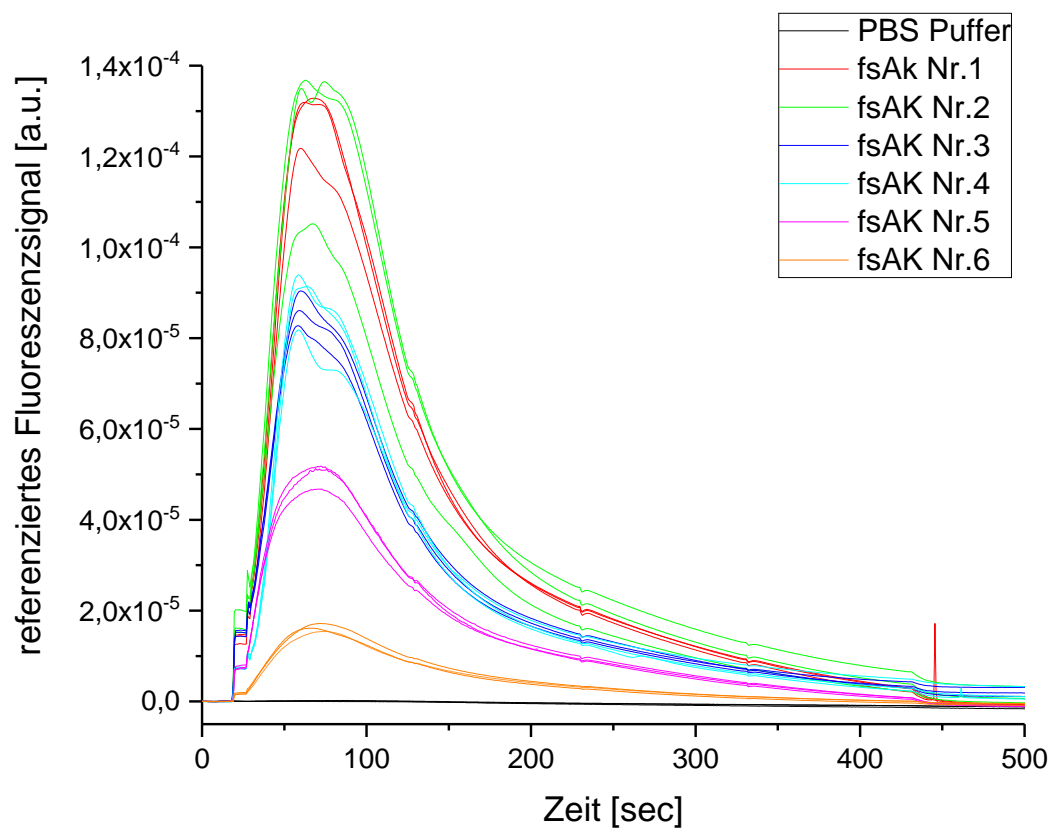


Abbildung 79: Messkurven der verschiedenen fluoreszierenden Sekundärantikörper. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Zunächst wurde Puffer über die Flusszelle gepumpt, dann die Probe mit den fluoreszierenden Antikörpern langsam. Ab $t = 430$ sec wurde der Flusskanal möglichst schnell leer gepumpt, um bei $t = 450$ sec wieder die Basislinie zu erreichen.

Ergebnisdiskussion:

Alle Antikörper weisen ein deutliches Fluoreszenzsignal auf (Abbildung 79). Deren Intensität ist, obwohl sich spektral gesehen alle eignen, sehr unterschiedlich ausgeprägt.

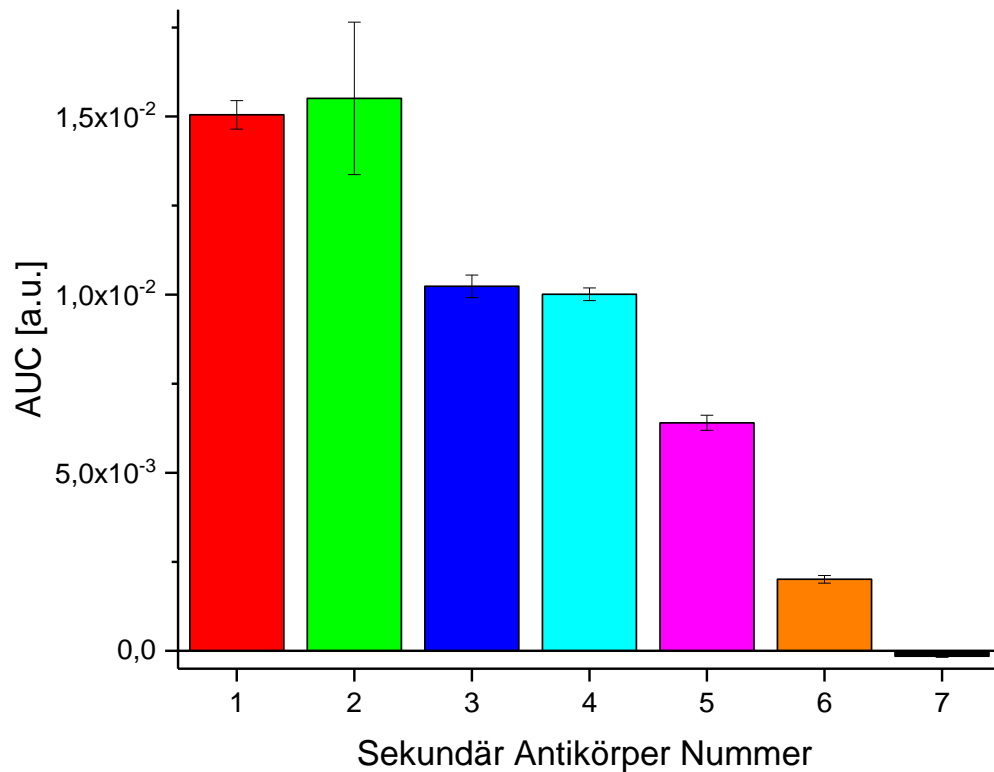


Abbildung 80: Vergleich der AUCs der verschiedenen Anti-Schaf Sekundärantikörper 1 bis 6 (Messung Nummer 1 bis 6) und der Blank Messung (Messung 7). Es ist die AUC (Fläche unter der Kurve) [a.u.] gegen die Nummer des Sekundärantikörpers aufgetragen. (vgl. Tabelle 11)

Die Sekundärantikörper mit dem Fluorophor Alexa Fluor 647 weisen die größten Signale (Abbildung 80, Messung Nummer 1 - 3) auf. Die Unterschiede zwischen zwei Batches lassen sich bei Messung 2 und 3 deutlich erkennen. Wie Tabelle 11 zu entnehmen ist, ist der Labellinggrad bei Messung 2 etwas höher, was sich im Signal deutlich zeigt.

Tabelle 12: Vergleich der Absorptions- und Emissionsmaxima. Die Werte dienen zur groben Orientierung, sind teilweise in unterschiedlichen Lösungsmitteln ermittelt worden und können auch je nach Pufferzusammensetzung oder Anbindungsart an den Antikörper schwanken.

Fluorophor	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Alexa Fluor 647	650	665
Alexa Fluor 594	590	617
DyLight 650	652	672
Alexa Fluor 633	622	640
DY 636	645	671

DY636 ist in der Tabelle enthalten, jedoch leider nicht kommerziell an einem Antikörper mit oben genannten Eigenschaften erhältlich. Der Vergleich der Messwerte aus Abbildung 81 und der in Tabelle 12 dargestellten Spektralen Eigenschaften verdeutlicht, dass aufgrund der

Lagen der Anregungsmaxima der Fluorophore zur Anregungswellenlänge des Lasers ($\lambda = 593$ nm) nicht direkt auf eine hohe oder niedrige Fluoreszenzemission geschlossen werden kann. Es sind nämlich das Fluoreszenzemissionsmaximum und die Lage der Schultern und die Steile der Peaks zusätzlich von entscheidender Bedeutung (Abbildung 81).

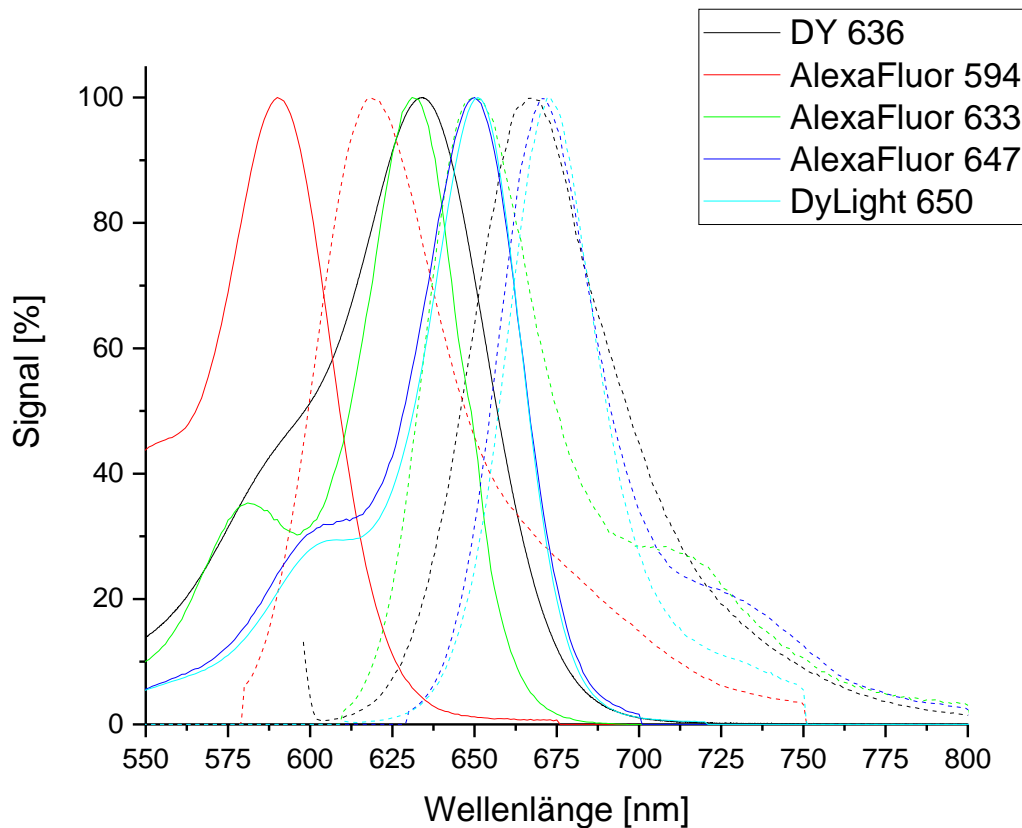


Abbildung 81: Es sind die Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore gezeigt. DY636 wurde in Reinstwasser gemessen, die anderen Fluorophore in Ethanol. Im Puffer ist bei allen Fluorophoren eine Shift der Absorptions- und Emissionsbanden zu erwarten. Die spektralen Daten stammen für den DY636 von Dyomics und der Rest vom Spektral Viewer der Firma Thermofisher (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>). In der Thermofisher Datenbank wird der DyLight 650 als 649 gelistet. Es handelt sich vermutlich um einen Tippfehler, da die Maxima exakt übereinstimmen.

Nimmt man an, dass die Drift aufgrund unterschiedlicher Lösungsmittel (DY636 in Wasser, andere Fluorophore in Ethanol) gering ausgeprägt ist, lässt sich aus Abbildung 81 folgendes ablesen. Für alle Fluorophore ist die Anregungswellenlänge von 593 nm in etwa passend, besonders scheint sie für AlexaFluor 594 geeignet zu sein, da sie einen hohen Absorptionwert aufweist. Die Detektion findet ab ca. 650 nm statt. Hier unterscheiden sich die Fluorophore deutlich. AlexaFluor 647 und DY636 liegen mit ihrer Emissionsbande sehr günstig, da die Sensitivität der Photodioden im langwelligen Bereich immer weiter abnimmt. AlexaFluor 594 und AlexaFluor 633 haben ein ungünstig liegendes Emissionsspektrum und zeigen niedrige Signale. DyLight 650 zeigt ein relativ niedriges Signal, obwohl das Spektrum günstig liegt. Dies kann an einer ungünstigen Shift, am Labeling, am Puffer oder vielen anderen Faktoren liegen.

Fazit:

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in allen getesteten Immunoassays die Sekundärantikörper 1, 2 und 3 sowohl die Anbindung im Assay als auch die Signalausbeute sehr gut war und sie daher für den LIF-Messaufbau geeignet sind.

4.8.2. MPA Immunoassaymessungen im LIF-Messaufbau

Die in der Praxis benötigte Nachweisgrenze, der im Folgenden entwickelten MPA Immunoassays, wird mit 0,2 mg/L angegeben [30]. Der therapeutische Bereich, in dem MPA eingesetzt wird, beträgt im Vollblut 1 - 3,5 mg/L. Viele der in den folgenden Kapiteln gezeigten Immunoassays können die benötigte Nachweisgrenze erreichen.

4.8.3. Heterogene Immunoassaymessungen

Der LIF-Messaufbau wurde für Messungen im Volumen entwickelt. Es stellte sich jedoch heraus, dass auch die Signaldetektion von an der Oberfläche angebondenen Fluorophoren möglich ist. Die folgenden Varianten wurden speziell um Projektpartnern im NANODEM Projekt zu helfen entworfen und um den entwickelten homogenen Immunoassay besser vergleichen zu können.

Zunächst wurde in Kapitel 4.8.3.1 ein Proof-of-Concept mit fluoreszierenden Partikeln und einer einfachen Biotin/ Streptavidin Wechselwirkung durchgeführt. In Kapitel 4.8.3.2 sind Versuche zu heterogenen Immunoassays auf ganzflächig funktionalisierten Oberflächen und in Kapitel 4.8.3.3 auf gespotteten, also teilweise funktionalisierten, Oberflächen gezeigt. Die heterogene Form des Immunoassays wurde mit RfS entwickelt und kalibriert [19, 82]. Dies geschah im Rahmen des Modulpraktikums von Celina Wortmann durch die Betreuung von Kathrin Freudenberger.

4.8.3.1. Detektion von fluoreszierenden Partikeln auf Flusszelloberflächen

Versuchsablauf:

Um ein Proof-of-Concept eines heterogenen Immunoassays in der Flusszelle durchzuführen, wurde ein Flusszellboden aus Glas mit GOPTS und AMD (mit 50 % NH₂ Gruppen) präpariert. Sie wurde, wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt, auf einem Glastransducer ohne speziellen Schichtaufbau (wie bei RfS) durchgeführt. Auf dem AMD 50 % wurde Biotin mittels NHS/ DIC – Chemie immobilisiert. Um im LIF-Messaufbau eine Anbindung von Partikeln nachverfolgen zu können, wurden fluoreszierende, mit Streptavidin funktionalisierte Partikel detektiert.

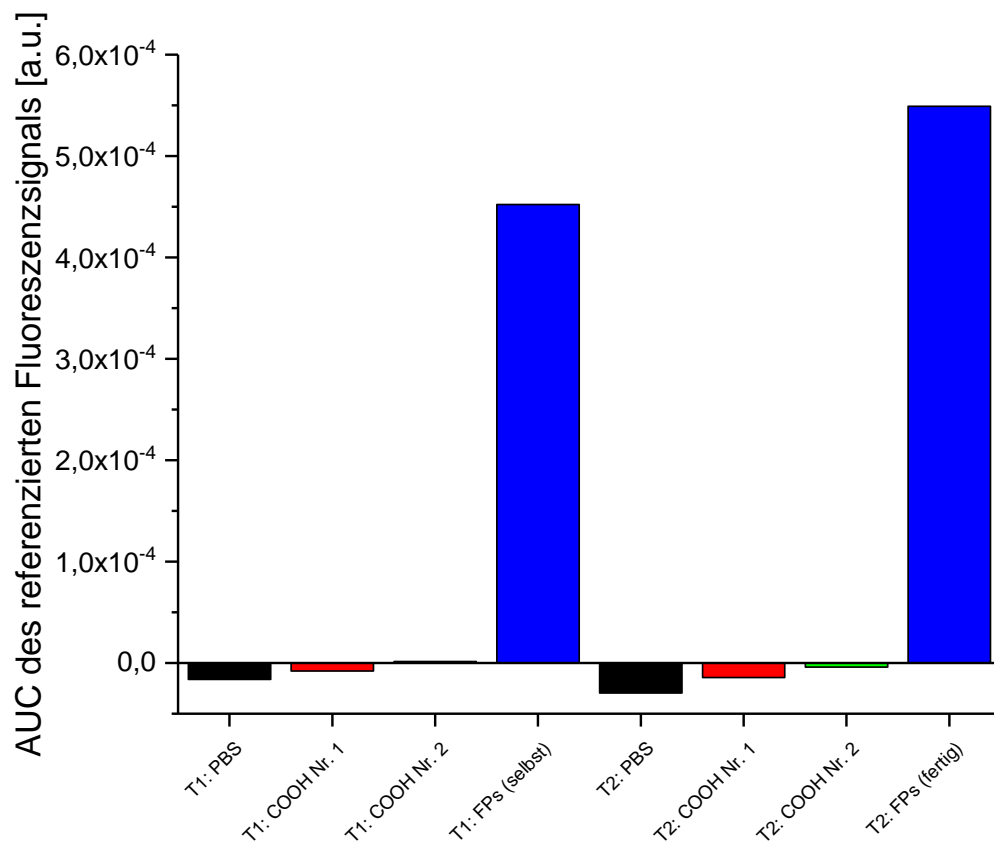


Abbildung 82: Vergleich der Anbindung von mit COOH Gruppen funktionalisierten, fluoreszierenden Partikeln mit selbst funktionalisierten fluoreszierenden Streptavidin Partikeln und gekauften funktionalisierten fluoreszierenden Partikeln. Es wurden zwei verschiedene Transducer verwendet, da die Oberfläche nur schwer regeneriert werden kann. T1 steht auf der x-Achse für Transducer 1 und T2 für Transducer 2. PBS steht für eine Puffermessung, COOH Nr.1 und Nr.2 jeweils für die erste und zweite Messung mit fluoreszierenden Partikeln mit COOH auf der Oberfläche. FPs (selbst) steht für selbst mit Streptavidin derivatisierte Fluoreszenzpartikel und FPs (fertig) für fertig gekaufte, mit Streptavidin derivatisierte Fluoreszenzpartikel.

Die AUC wurde im Zeitraum von 500 – 550 sec ausgewertet, da zu diesem Zeitpunkt die Probe komplett über den Transducer gegeben wurde. Im Flusskanalvolumen befindet sich zu diesem Zeitpunkt nur noch Puffer. Die Partikel konnten im Fluss anbinden. Die Affinitätskonstante der Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin zählt zu den höchsten zwischen Biomolekülen [83] ($K_d=4 \cdot 10^{-14}$ mol/L).

Wegen dieser hohen Affinitätskonstante ist es leider nur mit sehr großem Aufwand (Puffertemperaturen über 70°C) möglich, diese Anbindung mittels einer Regenerationslösung zu lösen [84]. Um Beschädigungen am Messaufbau auszuschließen, wurde dies nicht durchgeführt. Um die Tests dennoch durchzuführen wurden zwei verschiedene Transducer gewählt um die Partikel zu vergleichen.

In Abbildung 82 sind bei den Puffermessungen bei beiden Transducern negative Messwerte zu sehen. Dies deutet auf eine Signaldrift nach unten hin. Sie stammt von einer Abnahme der Streuung auf der Transduceroberfläche und resultiert vermutlich aus einer leichten Abtragung der funktionalisierten Oberfläche. Um die Spezifität der Anbindung zu zeigen,

wurden zunächst nur mit Carboxygruppen funktionalisierte Partikel über die Oberfläche geleitet.

Es wurden zwei verschiedene Sorten an fluoreszierenden, mit Streptavidin funktionalisierten, Partikeln getestet: im Labor eigens funktionalisierte Partikel und gekaufte funktionalisierte Partikel (Abbildung 82).

Ergebnisdiskussion:

Beide mit Streptavidin fluoreszierende Partikel wiesen wie erwartet deutliche Bindungssignale auf. Außerdem zeigten die käuflich erworbenen Partikel ein etwas höheres Bindungssignal, was eventuell auf einen etwas höheren Labellinggrad durch ein in diesem Fall optimiertes Funktionalisierungsprotokoll zurück zu führen ist.

Die Partikel mit den COOH Gruppen zeigten nur sehr geringe unspezifische Wechselwirkungen mit der biotinylierten Oberfläche. Sie gestalteten sich bei beiden Transducern gleich. Es ist eine geringer werdende Signaldrift nach unten zu sehen und wie vermutet keine Anbindung. Um Drifteffekte auszuschließen, wurde die Messung mit den fluoreszierenden Partikeln mit COOH zweifach gemessen.

4.8.3.2. Heterogene Immunoassays auf ganzflächig funktionalisierten Oberflächen

Im Folgenden werden die Vorversuche zu Beginn der Optimierungen am Immunoassay und Messaufbau dargestellt. Während der Messungen wurden viele Parameter und Teile am Messaufbau optimiert und verändert. Es sind nur die Messungen aufgeführt, welche problemlos miteinander vergleichbar sind und bei denen es keine technischen Störungen (Undichtigkeiten, Kurzschlüsse, Pumpen- oder Ventildefekte) gab, die die Messungen hätten in ihrer Aussage beeinflussen können.

4.8.3.2.1. Verschiedene Antikörperkonzentrationen:

Um zu testen, ob im Messaufbau nicht nur die Detektion von Partikeln im Volumen, sondern auch die Detektion von heterogenen Immunoassays auf dem Flusszellboden möglich ist, wurden zunächst Messungen auf ganzflächig mit MPA funktionalisierten Oberflächen durchgeführt. Zunächst wurde in Vorversuchen die Anbindung von fluoreszenzgelabelten MPA-AKs in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

Parameter:

Die Regeneration nach einer Messung wurde mit 6M GndHCl pH= 2 in einer separaten Messung durchgeführt. Die Flusszelloberseite Nummer 1 wurde mit einem 3 mm breiten Flusskanal verwendet. Die MPA-AKs wurden mit dem Fluorophor DY-652 gelabelt. Der Flusszellboden wurde mit PEG(NH₂)₂ auf der Oberfläche funktionalisiert und an die Aminogruppen die MPA kovalent angebunden.

Assay Ablauf:

Wie aus Abbildung 83 zu ersehen ist, wurde zunächst die Basislinie detektiert. Ab Sekunde 400 wurde die Probe mit einer langsamen Flussrate injiziert. Die Signalhöhe der Messungen

wurden im Zeitraum 730 bis 790 Sekunden ausgewertet (Abbildung 85). Es wurde dieser Zeitraum gewählt, da der folgende schnelle Pumpschritt offensichtlich zu stark gewählt wurde und viel gelabelter Antikörper wieder abgelöst wird. Ab Sekunde 800 erfolgt der zu schnelle Pumpschritt. Die Oberfläche wurde anschließend in einer separaten Messung mit GndHCl regeneriert.

Ergebnisdiskussion:

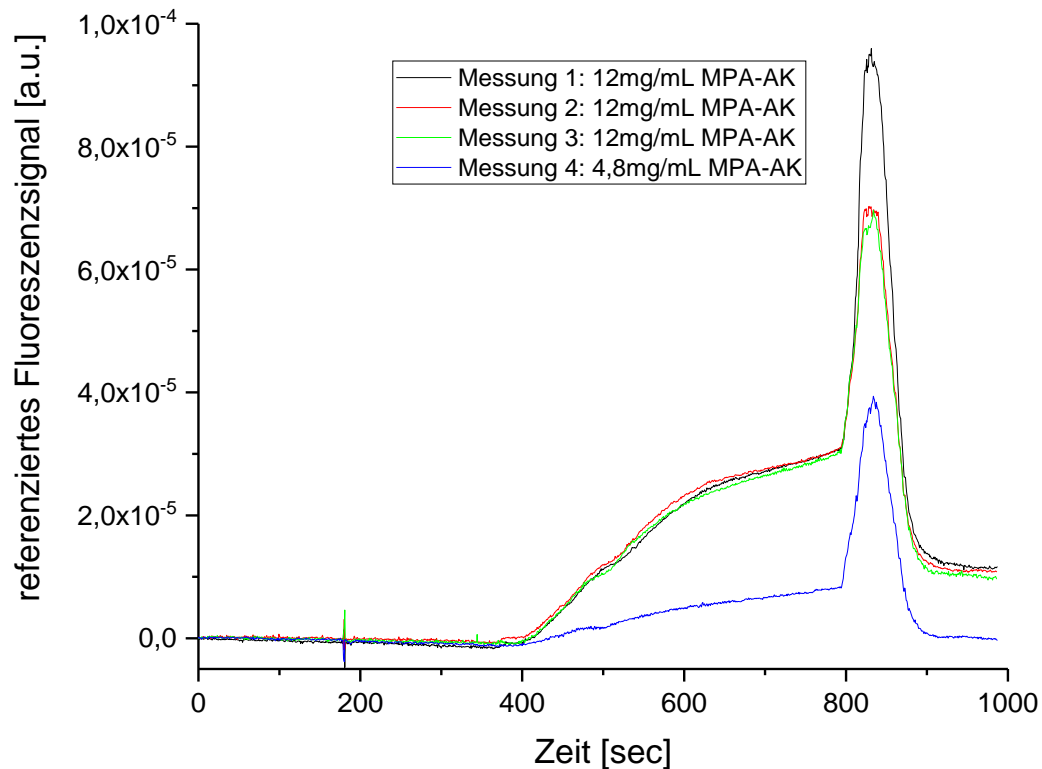


Abbildung 83: In der Messung sind Wiederholungsmessungen von mit einem Fluorophor gelabelten MPA-AK zu sehen. Außerdem wurde gezeigt, dass das Signal Konzentrationsabhängig verändert werden kann. Es ist die referenzierte Fluoreszenzintensität [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Bei Vorversuchen konnte die Konzentrationsabhängigkeit der Anbindung von fluoreszenzgelabelten MPA-AKs nachgewiesen werden. Außerdem konnten die Antikörper reproduzierbar detektiert werden (Abbildung 83, Messung 1 – 3). Die relevanten Signalabschnitte sind vor dem schnellen Pumpschritt zu sehen, die Signalhöhe entspricht den auf dem funktionalisierten Flusszellboden angebondenen fluoreszenzgelabelten MPA-AKs. Außerdem kann bei den Messungen, bei denen ausschließlich fluoreszenzgelabelte Antikörper detektiert werden, auch die Steigung ausgewertet werden. Bei den folgenden Immunoassaymessungen ist dies nicht der Fall, da hier die Signalausdifferenzierung erst zu Ende der Probeninjektion erfolgt und keine Signaldynamik zu Beginn zu erwarten ist. Die prozentuale Standardabweichung der Messungen mit 12 mg/mL beträgt nur 1,1 %. Bei der Messung von 4,8 mg/mL wurde mit dem verwendeten Signaltransducer ein geringes Signal erhalten. Dies ist ein geringes Signal für einen relativ hoch konzentrierten fluoreszenzgelabelten Antikörper. Die Regeneration wird in Abbildung 83 nicht gezeigt, bei

der Auftragung der Regeneration ist ersichtlich, dass die Regeneration durch GndHCl nicht dazu führt, dass das Signal am Ende der Messung wieder auf die Basislinie gelangt. Die Regeneration ist also unvollständig und die Oberfläche setzt sich von Messung zu Messung zu. Dies führt bei vielen Messungen in Folge, zum Beispiel im Rahmen einer Kalibration, zu einer signifikanten Signalabnahme. Um eine passende Regeneration für die fluoreszenzgelabelten MPA-AKs zu finden, wurden Versuche zur Regeneration (nicht gezeigt) im Rahmen des NANODEM-Projektes durchgeführt. In diesen wurde herausgefunden, dass die Regeneration mit SDS eine gute Alternative bei dem fluoreszenzgelabelten MPA Immunassay sein kann. Die weiteren Gründe der Signalabnahme während einer Messreihe werden ausführlich in der Ergebnisdiskussion der folgenden Immunoassaymessungen diskutiert.

4.8.3.2.2. Verschiedene MPA Konzentrationen:

Nachdem verschiedene Konzentrationen an fluoreszenzgelabelten MPA-AKs detektiert wurden, wurden Optimierungen am Fluidikprogrammablauf, den Pumpgeschwindigkeiten, der Regeneration und eine andere Messphotodiode gewählt. Es wurden Bindungsinhibitionstests durchgeführt, um verschiedene Konzentrationen an MPA zu detektieren. Die Antikörpermenge wurde gleichzeitig verringert, um den Verbrauch auf ein normales Maß zu senken und im Bindungsinhibitionstest in übliche MPA Analyt Konzentrationsbereiche zu gelangen.

Parameter:

Die Regeneration wurde mit einer 0,25 % SDS Lösung mit pH= 2,5 durchgeführt. Abgesehen von der Regeneration, dem Fluidikprogrammablauf, veränderten Pumpgeschwindigkeiten und Optimierungen an der Fluidik wurden die Messungen mit denselben Parametern wie bei den Vorversuchen durchgeführt.

Assay Ablauf:

Bei den Bindungsinhibitionsmessungen wurde 4,8 mg/L fluoreszenzgelabelter MPA-AK mit verschiedenen Konzentrationen an MPA 40 min lang vorinkubiert. Daraufhin wurde die Probe im Flusskanal detektiert. Der Assayablauf wurde, verglichen mit den Vorversuchen, modifiziert. Es wurden wieder unterschiedliche Pumpgeschwindigkeiten während der Probeninjektion verwendet, da eine bessere Signalausdifferenzierung, also bessere Entfernung der nicht angebotenen Antikörper aus dem Flusskanal, erhofft wurde. Generell sind mit der in den Versuchen verwendeten Flusszelle nur langsame Flussgeschwindigkeiten möglich. In späteren Versuchen und Messungen ist ein Vielfaches der hier verwendeten Pumpgeschwindigkeiten möglich. Die Regeneration ist ab Sekunde 1700 zu sehen.

Auswertung:

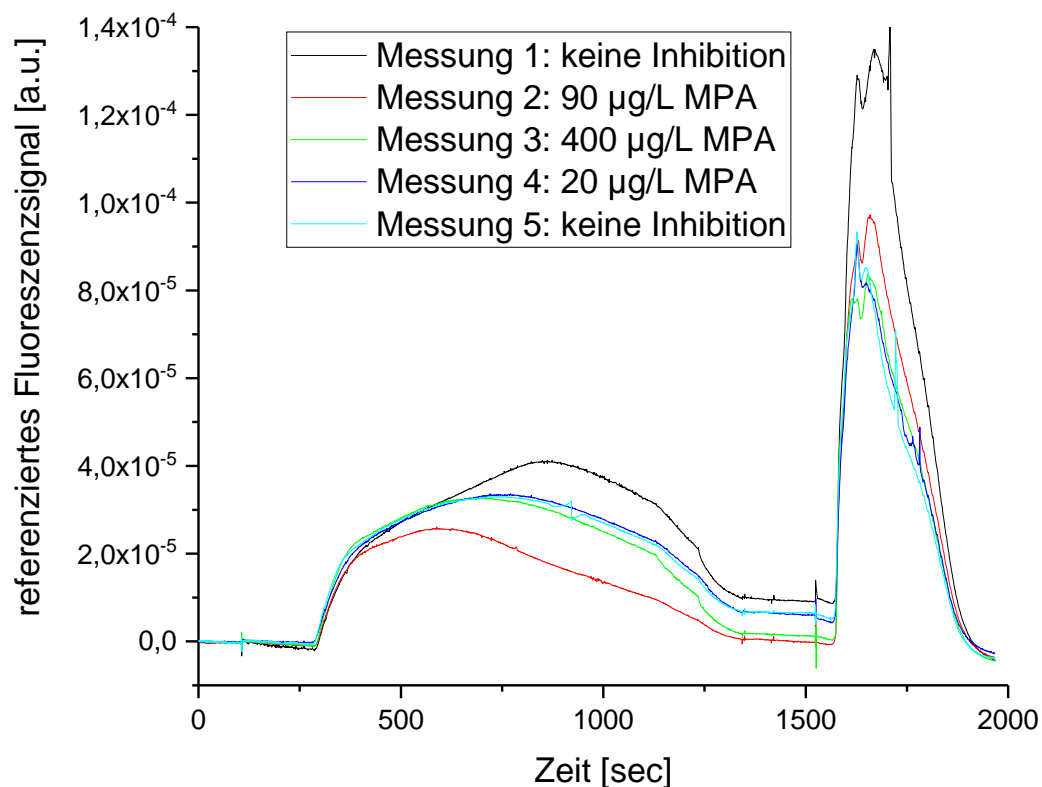


Abbildung 84: Es wurde zweimal uninhibiert mit ausschließlich gelabelten MPA-AKs gemessen. Das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] ist gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Wie in der Ergebnisdiskussion der vorangehenden Antikörperdetektion erwähnt, ist zu erwarten, dass die Anfangssteigung bei allen Messungen sehr ähnlich ist, da die selbe Menge an fluoreszenzgelabelten MPA-AKs eingesetzt wird und die Signalausdifferenzierung erst am Ende der Probeninjektion zu erwarten ist. Zu Beginn ist nämlich der Überschuss an gelabeltem Antikörper zu sehen, welcher nicht anbindet und weitergepumpt wird. Bei den Messungen 1 und 2 ist jedoch deutlich zu erkennen, dass sie im Zeitraum von 290 bis 1230 Sekunden von den folgenden Messungen deutlich abweichen. Eigentlich wäre zu erwarten, dass die Kurven in diesem Zeitraum, wie oben erwähnt, einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Besagter Zeitraum der Messungen 1 und 2 wurde integriert, um einen Korrekturfaktor für die Messungen untereinander durch die verschiedenen großen Flächen zu erhalten. Für die Auswertung aller Messungen wurde der Zeitraum von 1440 - 1500 Sekunden integriert und aufgetragen. Dies geschah analog den Ausführungen in Kapitel 4.3 heterogene Immunoassay Auswertung. Außerdem wurde versucht die Messungen 1 und 2 mit Korrekturfaktoren zu korrigieren, jedoch war dies, wie aus Abbildung 85 zu entnehmen, nicht erfolgreich.

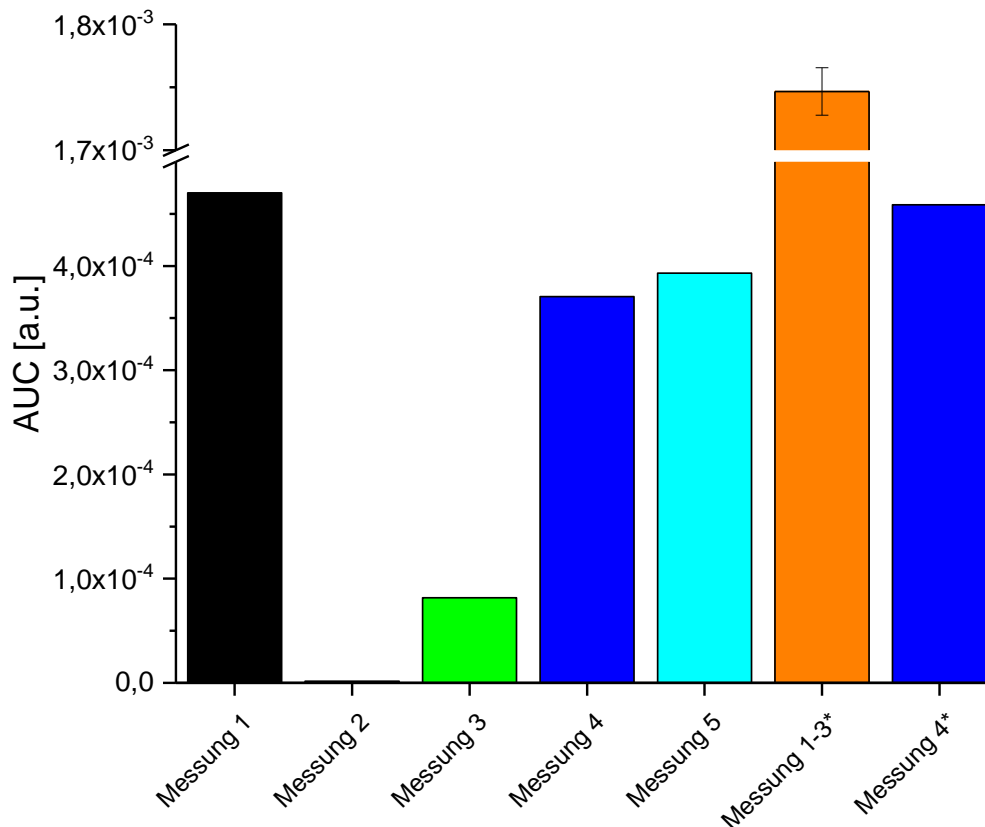


Abbildung 85: Messung 1 und 2 wurden mit Korrekturfaktor ausgewertet. Es wurde der Zeitraum von 1440 - 1500 Sekunden integriert. Bei Messung 1 und 5 fand keine Inhibition statt. Bei Messung 2 wurde mit 0,9 µg/L MPA inhibiert, bei Messung 3 mit 4 µg/L und bei Messung 4 mit 0,2 µg/L. Messung 1 - 3* sind die gemittelten Messungen aus Abbildung 83, Messung 4* stammt auch daraus. Hier wurde der Zeitraum, 730 – 790 sec mit der gleichen Zeitdauer ausgewertet, um die Messtage besser vergleichen zu können.

Ergebnisdiskussion:

Wie im Vergleich von Messung 1 und 5 zu sehen ist, nimmt die Sensitivität und damit das Signal von Messung zu Messung ab. Diese Signalabnahme kann daran liegen, dass die Oberfläche deutlich an Sensitivität verliert, da die Oberfläche noch nicht durch das Schließen des Shutters zwischen den, zu diesem Zeitpunkt noch sehr zeitaufwändigen Messungen, vor Laserlicht geschützt worden ist. Eine dauernde Beleuchtung kann zu Denaturierungseffekten auf der Oberfläche führen. Trotz der Alterung sind die Messungen 1 – 5 mit Ausnahme von Messung 2 in sich stimmig. Der direkte Vergleich von Messung 1 und 4* zeigt, dass die Messsignale gut auf verschiedenen Transducern reproduzierbar sind, da beide Messungen mit derselben Menge an gelabelten MPA-AKs durchgeführt wurden und fast zum selben Signal führten. Die Regeneration mit SDS, statt mit GndHCl wie in den Vorversuchen, führte dazu, dass am Ende der Messung die Basislinie wieder erreicht wurde. Leider wurde der Flusskanal mit der Flusszelloberseite Variante 1 oft undicht und es konnte in den Versuchen nur relativ langsam gepumpt werden. Langsames Pumpen führte zusätzlich dazu, dass während Messpausen in den Flusskanal gelangte Luftblasen nur schwer wieder entfernt werden konnten. Das verwendete Fluorophor DY652 eignet sich mit dem Absorptionsmaximum: 654 nm und Emissionsmaximum 675 nm (in Ethanol) gut für den LIF-

Messaufbau und wurde als Bestandteil eines Labeling Kits verwendet. Die verwendete Konzentration an gelabeltem MPA-AK ist verglichen mit der bei RfS Messungen relativ hoch, es handelt sich jedoch um erste heterogene Messungen, sie konnte bei den folgenden Messungen gespotteter Oberflächen deutlich reduziert werden.

Untersuchung mit dem Fluoreszenz-Plate-Reader:

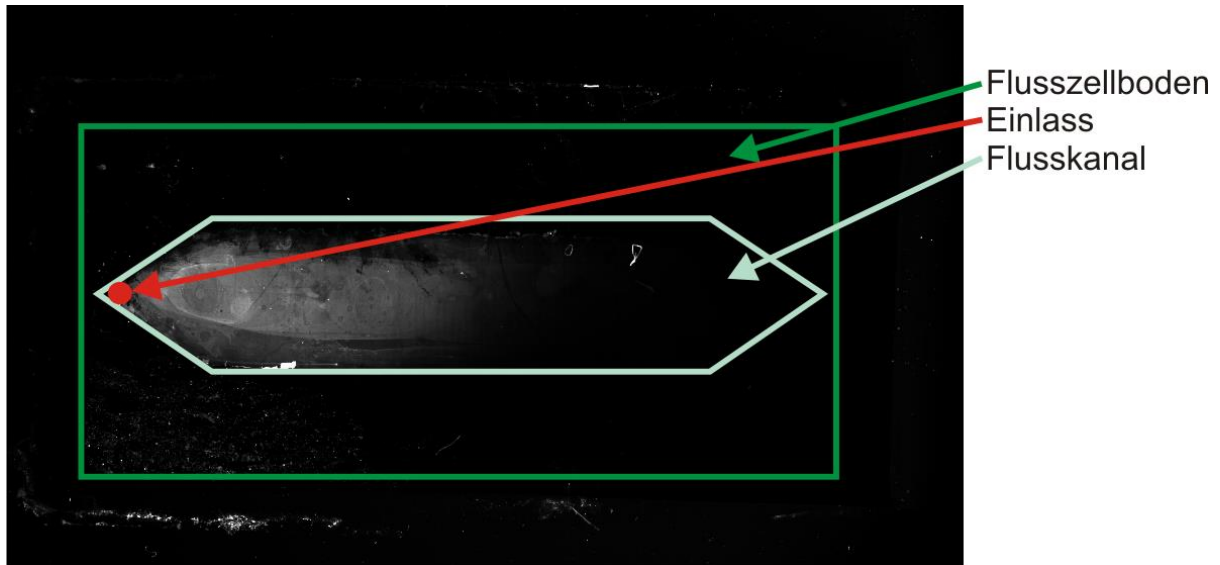


Abbildung 86: Nach den obigen Messungen im Flusskanal wurde der funktionalisierte Flusskanalboden ausgebaut und mit dem Fluoreszenz-Plate-Reader untersucht. Die Anregungswelle ist $\lambda = 625 \text{ nm}$, die Detektion im Bereich $660 - 690 \text{ nm}$.

Um die angebondenen fluoreszenzgelabelten MPA-AKs mit einer zusätzlichen Methode nachzuweisen, wurde eine Flusskanalunterseite aus Glas bei der letzten Messung nicht regeneriert und möglichst schonend ausgebaut. Wie in Kapitel 4.4.2 erwähnt, wird der Flusskanal bei dem Auseinanderbau von Ober- und Unterseite zerstört. Trotzdem konnte mit dem Fluoreszenz-Plate-Reader eine Messung, wie in Abbildung 86 gezeigt, durchgeführt werden.

Die Anbindungsfläche der Flusszelle ist etwas beschädigt worden, zeigt aber immer noch deutlich die angebondenen Fluorophore am Einlass der Fluidik. Die Beschädigung stammt vom Öffnen der Flusszelle, bei dem das den Flusskanal ausbildende Doppelklebeband mit Kraft entfernt werden musste. Außerdem ist der zungenförmige Hauptvolumenstrom zu sehen. Somit ist ein zusätzlicher Beweis dafür erbracht, dass die Fluorophore im Assay anbinden. Es wird aber auch sichtbar, weswegen im folgenden Kapitel der Flusskanalboden gespottet und dadurch die Fläche im Bereich des Einlasses nicht mehr funktionalisiert wird, da hier, wie deutlich zu sehen ist, viel Fluorophor verloren geht und aufgrund der Lage der Photodioden nicht detektiert werden kann.

4.8.3.3. Heterogene Immunoassays auf partiell funktionalisierten Oberflächen

4.8.3.3.1. Vorteile des Spottings für heterogene Messungen:

Im Gegensatz zur Funktionalisierung der gesamten Transduceroberfläche bietet das Spotten den Vorteil, dass der heterogene Assay nur über den Photodioden abläuft. Dadurch lassen

sich niedrigere Nachweisgrenzen realisieren, da kein Signal vor dem Detektor in der Einlassregion verloren geht, wo sich keine Photodiode befindet. Es kann also die Fluoreszenz genau dort detektiert werden, wo die bei dem Immunoassay beteiligten Fluorophore lokalisiert sind. Dieses Vorgehen kann deutlich besser als eine flächige- oder Onlineimmobilisierung sein. Außerdem kann auch der Analyt bei Bedarf durch diese Vorgehensweise genau an der Stelle angereichert werden, an der er auch später zum Beispiel in einem Sandwich Assay detektiert wird.

Das Spotten verschieden funktionalisierter Flächen ermöglicht zusätzlich die Detektion von mehreren Analyten in einem Array. Bei anderen Messaufbauten mit CCD Kamera wurde dies mit verschieden beladenen Spots realisiert [85]. Zusätzlich erlaubt das Vorgehen in Zukunft vier verschiedene Analyte zu detektieren.

Analog zu den Vorversuchen, welche auf der RfS-Plattform durchgeführt wurden (Kapitel 3.2.3), wurden Messungen mit gespotteten Transducern im LIF-Messaufbau durchgeführt. In Tabelle 13 werden die Parameter der drei vorgestellten Messreihen gezeigt.

*Tabelle 13: Vergleich der drei Messreihen bezüglich ihrer Spottingmuster Variante aus Abbildung 12, der Spotting Prozedur aus Tabelle 1 und Spotting Chemie aus Tabelle 2. *: die Regeneration und das Transduceralter waren anders, Details siehe Messreihenbeschreibung.*

	Messreihe 1:	Messreihe 2:	Messreihe 3:
Spottingmuster Variante:	C	A	B
Spotting Prozedur:	B*	D	D*
Spotting Chemie Prozedur:	B	C	C

4.8.3.3.2. Messreihe 1:

In Analogie zum Spottingmuster der Varianten A-C (Abbildung 12 und Tabelle 13) wurde gespottet und der Flusszellboden in den LIF-Messaufbau eingebaut. Die Versuche dieser Messreihe 1 beschränkten sich darauf, Signale zu detektieren, die Signaldynamik abzuschätzen und die Reproduzierbarkeit der Messungen zu untersuchen.

Parameter:

Die verwendete Flusszellbodenplatte wurde am Vortag gespottet und besteht aus Standardglas (zugeschnitten aus Objektträgern). Sie wurde mit AMD mit Aminogruppen nach Standardprotokoll funktionalisiert und passiviert. Das Spotting erfolgte analog Variante C) aus Abbildung 12 in Kapitel 3.2.3. Es wurde sofort ohne Inkubation gespottet und für das 2. Pattern eine neue Lösung angesetzt. Die Zusammensetzung der Lösung entspricht Prozedur B (Kapitel 3.2.3), allerdings wurde keine Inkubation wie bei Prozedur D durchgeführt. Die Kanalweite betrug 1mm. Es wurden die Alexa 647 Donkey Anti IgG Antikörper in der Konzentration $c = 0,055 \text{ mg/mL}$ als fluoreszierende Sekundärantikörper eingesetzt, sie entsprechen Nummer 2 aus Tabelle 11. Die Konzentration der MPA-Antikörper ist $c = 0,036 \text{ mg/mL}$. Es wurde Messphotodiode 4 eines vierer Chips verwendet. Vor dem Messen wurde der Signaltransducer mit DMF und Wasser gespült und in die Flusszelle eingeklebt. Es wurde mit 6 M GndCl pH= 1,8 regeneriert.

Assay Ablauf:

Zunächst wurden die MPA-AKs in einem eigenen Fluidikprogramm ohne Regenerationsmittel angebunden. Während dieses Schrittes wurde der Shutter geschlossen und es fiel kein Licht auf die Flusszelle. Danach wurden fluoreszierende Sekundärantikörper (fsAKs) angebunden und daraufhin regeneriert. Dieser Schritt wurde komplett mit geöffnetem Shutter durchgeführt, um ein uninhibiertes Messsignal (schwarze Messungen) sowie die unspezifische Wechselwirkung der Probe (rote Messungen) zu erhalten (Abbildung 87).

Es wurden Messungen (Abbildung 87, schwarze Linien) mit zuvor auf der Oberfläche angebundenen MPA-AKs, sowie ohne zuvor angebundene MPA-AKs (Abbildung 87, rote Linien) durchgeführt. Nach den Messungen mit fluoreszierendem Sekundärantikörper wurde immer regeneriert.

Ergebnisdiskussion:

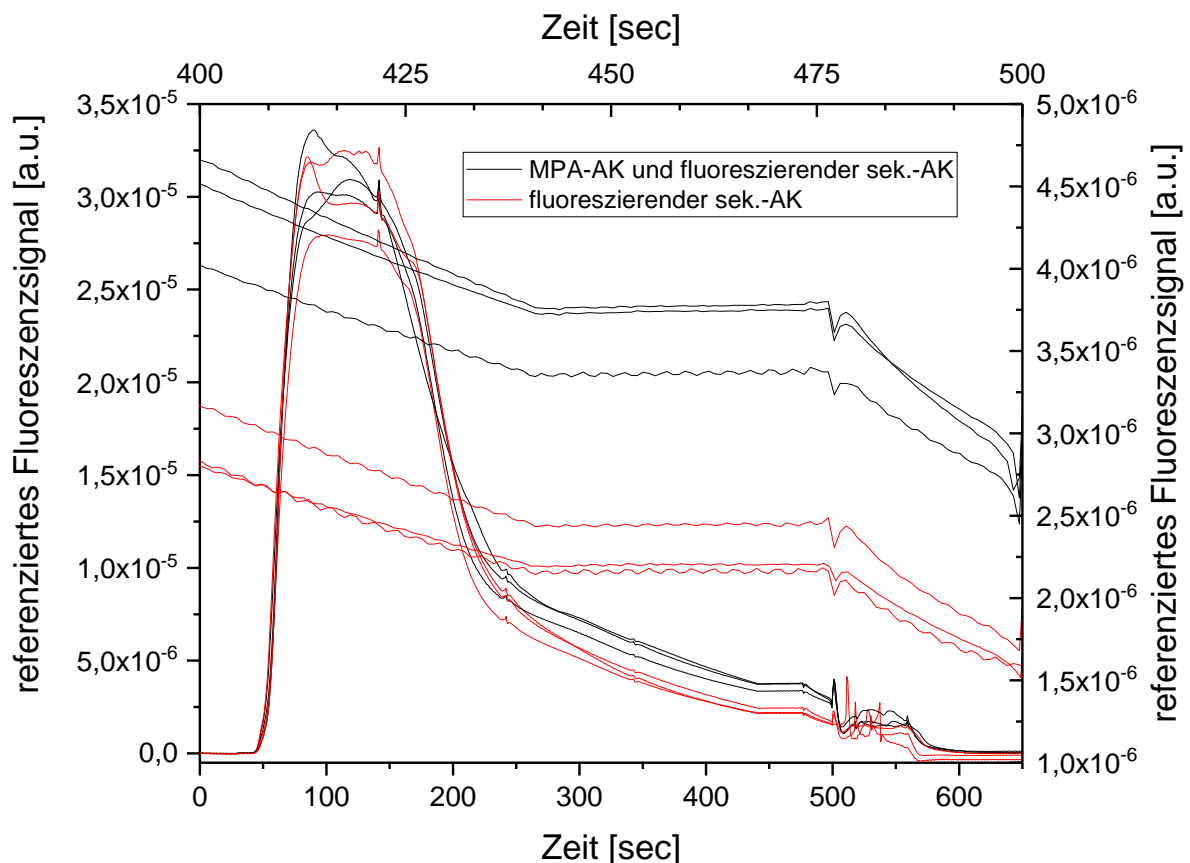


Abbildung 87: MPA-Assay uninhibiertes Signal und unspezifische Wechselwirkung des fluoreszierenden Sekundärantikörpers. Es ist der gesamte Signalverlauf mit Regeneration bei den unteren Kurven, welche bei $t=0$ und 650 Sekunden bei der Basislinie bei 0 sind. Sie sind der linken y-Achse und der unteren x-Achse zugehörig. Die oberen Kurven stehen mit der rechten y-Achse und oberen x-Achse in Zusammenhang. Es ist der Signalausschnitt 400 – 500 Sekunden vergrößert dargestellt, bei dem die Signalthöhe ausgewertet wird. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Aus Abbildung 87 geht hervor, dass das Signal und die Signaldynamik leider sehr gering sind und die unspezifische Wechselwirkung des fluoreszierenden Sekundärantikörpers mit der

gespotteten MPA Oberfläche relativ hoch ist. Allein die geringe Differenz des 100 % Signals (ohne Inhibition) und des Signals der Messung auf unspezifische Wechselwirkungen deuten auf eine für einen Immunoassay zu geringe Signaldynamik hin.

Offensichtlich war bei einzelnen Messungen die Oberfläche noch nicht ausreichend stabil und es trat demzufolge bei beiden Dreifachmessungen jeweils ein Messausreißer auf, welcher in beiden Fällen die Standardabweichung signifikant vergrößert hat und somit das Ergebnis dieser Messungen verschlechtert hat. Allerdings könnte auch Luft zwischen oder während der Messung durch die Flusszelle gepumpt worden sein, was zu einer beschleunigten Alterung der Oberfläche geführt haben könnte.

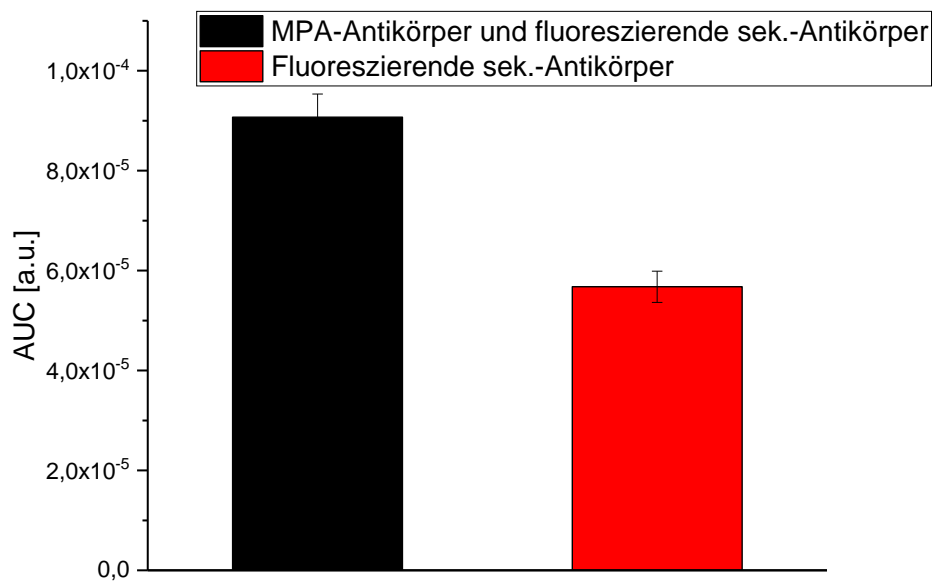


Abbildung 88: Die Fläche unter der Kurve im Zeitraum 450 - 475 sec.

Es wurde die Signalthöhe des Zeitraumes 450 - 475 sec integriert und ausgewertet (Abbildung 88).

Die Signaldynamik ist sehr gering. Die Messsignale eines Immunoassays müssten zwischen beiden gezeigten Signalen liegen. Die Standardabweichung erscheint tolerabel ist jedoch, bezogen auf die geringe Signaldynamik und hohe unspezifische Wechselwirkung des fluoreszierenden Sekundärantikörpers zu hoch.

Ausblick:

Um das Potenzial des Spotting auszunutzen und die erfolgte Optimierung der Spottingprozedur zu testen, wurde eine zweite Messreihe (2) durchgeführt. Da sich die fluoreszierenden Antikörper Alexa 647 Donkey Anti IgG (Nummer 2 aus Tabelle 11) in der Antikörpercharakterisierung als für den Messaufbau unpassend herausstellten, wurden in Messreihe 2 andere verwendet.

4.8.3.3.3. Messreihe 2:

In Messreihe 2 wurde der Flusszellboden analog vorangehender Tabelle 13 gespottet. Die Versuche dieser Messreihe sollen genau wie Messreihe 1 dazu dienen, Signale zu detektieren, die Signaldynamik abzuschätzen und die Reproduzierbarkeit der Messungen zu untersuchen. Mit den veränderten Spottingparametern wurden eine Verbesserung der Standardabweichung und Signaldynamik erwartet.

Parameter:

Es wurde ein 1 mm breiter Flusskanal und Messphotodiode 4 eines vierer Chips verwendet. Der Flusszellboden wurde mit AMD beschichtet und mit MPA gespottet. Die Spotting Pattern $4 \cdot 16$ und $4 \cdot 9$ wurden verwendet. Das Plättchen wurde 16 Tage zuvor gespottet und mit DMF, dann H_2O vor dem Einbau in den Messaufbau abgespült. Die Regeneration wurde mit 6M GndHCl pH= 1,8 durchgeführt und ist ab Sekunde 475 in Abbildung 89 zu sehen.

Es wurde ein anderer fluoreszierender Sekundärantikörper, als bei Messreihe 1, verwendet. Es handelt sich um den AlexaFluor 647 Anti-IgG Fc-Teil spezifischen Antikörper in der Konzentration $c = 0,051$ mg/mL. Die Spottingprozedur und Chemie wurde analog Tabelle 13 durchgeführt. Die Konzentration der MPA-AKs ist mit $c = 0,036$ mg/mL gleich hoch wie in Messreihe 1.

Assay Ablauf:

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen wurde der Assay Ablauf bei Messreihe 1 und 2 identisch durchgeführt.

Ergebnisdiskussion:

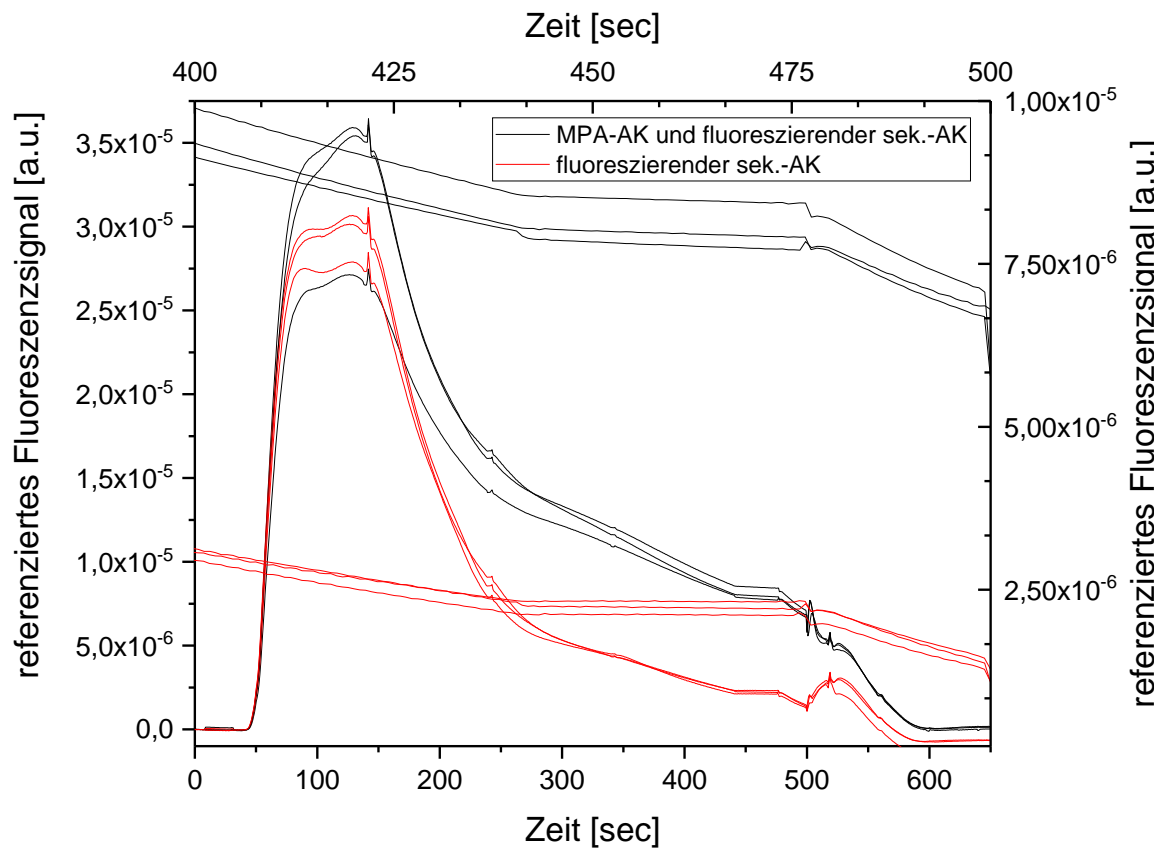


Abbildung 89: MPA Assay uninhibiertes Signal und unspezifische Wechselwirkung des fluoreszierenden Sekundärantikörpers. Es ist der gesamte Signalverlauf mit Regeneration bei den unteren Kurven, welche bei $t=0$ und 650 Sekunden bei der Basislinie bei 0 sind. Sie sind der linken y-Achse und der unteren x-Achse zugehörig. Die oberen Kurven stehen mit der rechten y-Achse und oberen x-Achse in Zusammenhang. Es ist der Signalausschnitt 400 – 500 Sekunden vergrößert dargestellt, bei dem die Signalhöhe ausgewertet wird. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Ebenso werden hier im Messablauf und der Signalauswertung analog den Messungen der Messreihe 1 verfahren. In der Messreihe 2 treten keine Ausreißer auf woraus eine deutlich geringere Standardabweichung der Dreifachmessungen der Messreihe 2 resultiert. Dies weist eine größere generelle Stabilität im Messvorgang, speziell auf das Fehlen von Luft im Flusskanal sowie auf eine stabilere Oberflächenchemie hin.

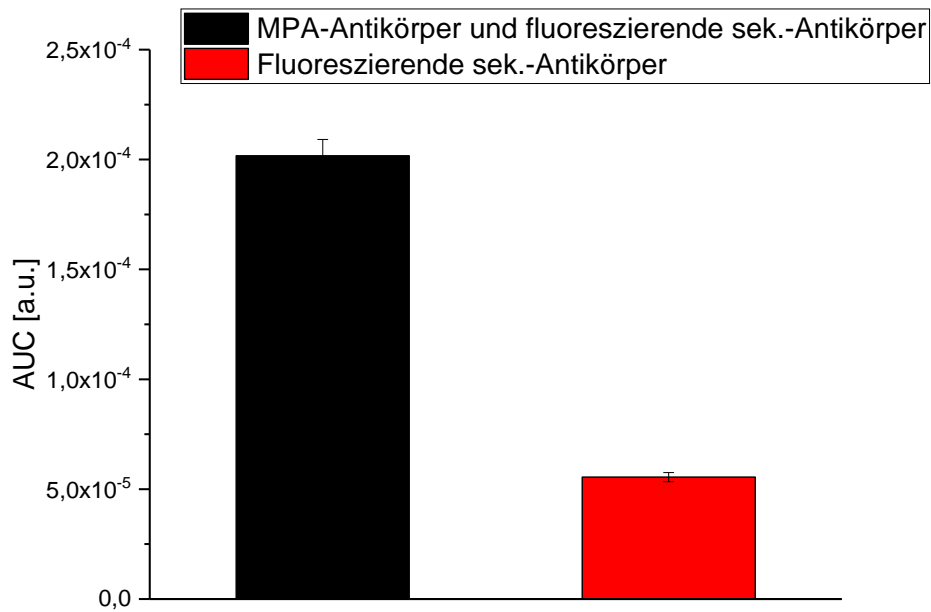


Abbildung 90: Die gemittelte Fläche unter der Kurve im Zeitraum 450 - 475 sec.

Analog den Messungen der Messreihe 1 wurde die Signalhöhe des Zeitraumes 450 - 475 sec integriert und ausgewertet. Das nicht inhibierte Signal (MPA-AKs und fsAKs) ist in etwa 2 mal größer als bei Messreihe 1, die unspezifische Wechselwirkung des fluoreszierenden Sekundärantikörpers mit der gespotteten MPA Oberfläche ist fast gleich hoch, wie bei Messreihe 1. Das deutlich größere Signal ist vermutlich auf den anderen fluoreszierenden Sekundärantikörper und eine verbesserte Oberflächenchemie zurückzuführen. Auch die deutlich geringeren Standardabweichungen sprechen dafür. Durch das deutlich größere, nicht inhibierte Signal könnte die Signaldynamik für die Detektion eines Immunoassays ausreichen und hat dazu veranlasst, in Messreihe 3 eine Kalibrierung durchzuführen.

4.8.3.3.4. Messreihe 3:

Bei Messreihe 3 wurden weitere Verbesserungen im Spotting vorgenommen, um die Signaldynamik und Reproduzierbarkeit der Messungen weiter zu verbessern, sie sind in Tabelle 13 am Anfang des Kapitels wiedergegeben. Es wurde der gleiche fluoreszierende Sekundärantikörper wie bei Messreihe 2 verwendet, da mit ihm eine vielversprechende Signaldynamik gefunden wurde. Bei Messreihe 3 wurde eine Kalibrierung durchgeführt, welche nur vier Konzentrationen aufweist, da danach die Oberfläche der Flusszellbodenplatte signifikant an Sensitivität verlor.

Parameter:

Bei diesen Messungen wurde ein mit PEG(NH₂)₂ (H₂O-Kammer) funktionalisierter Flusszellboden verwendet. Die Fläche der hinteren beiden Photodioden wurde gespottet, wie in Kapitel 3.2.3 Abbildung 12 B) ausgeführt. Sie wurde größer als die Messphotodiodenfläche leicht überlappend gespottet, indem 12 · 7 und 11 · 6 Punkte

gespottet wurden. Das Spotting mit MPA entsprach bezüglich der Zusammensetzung Prozedur C aus Kapitel 3.2.3. Vor dem Spotten wurde nicht inkubiert.

In dieser Messreihe wurde ein vierer Photodiodenchip verwendet und mit Messphotodiode Nummer 3 detektiert. Darüber hinaus wurde Flusskanaloberseite Nummer 2 mit einer Kanalweite von 2 mm und einer Neigung von 135° und mfcs Klebeband verwendet. Die Flusskanaloberseite wurde 1 h lang mit BSA in einer Wasserkammer geblockt. Regeneriert wurde mit SDS, pH= 2,5 und 0,25 %. Ohne vorheriges Spülen wurde das Plättchen direkt eingebaut. Jedoch wurden zuvor zwei Messtage darauf gemessen. Ein heterogener Assay kann auch von der Platzierung des Messpunktes an einer bestimmten Stelle mit anderen Strömungsverhältnissen im Flusskanal profitieren. Hierzu wurden Messphotodioden ausgelassen, um an einer Stelle mit möglichst laminarem Strom, abseits vom Einlass, zu detektieren. MPA-Antikörper mit der Konzentration von $c = 0,095 \text{ mg/mL}$ wurden verwendet. Als fluoreszierende Sekundärantikörper diente AlexaFluor 647 Anti-IgG Fc Teil $c = 0,025 \text{ mg/mL}$ (Antikörper Nummer 1 in Tabelle 11).

Assay Ablauf:

Bei dem Assay wurden jeweils im ersten Schritt MPA-AKs über die Oberfläche gepumpt und dann in einem nächsten Schritt fluoreszierende Sekundärantikörper, welche an den Fc Teil der angebundenen MPA-AKs binden, um das Signal für den LIF-Aufbau sichtbar zu machen. Nur der Schritt mit den fluoreszierenden Sekundärantikörpern wurde detektiert. Bei dem Schritt mit MPA und MPA-AKs war der Shutter stets geschlossen. Dadurch wurde die Oberfläche geschont, es konnte aber auch gleichzeitig kein Signal detektiert werden. Sobald mit MPA inhibiert wurde, wurde jeweils 15min vor der Probeninjektion inkubiert.

Auswertung:

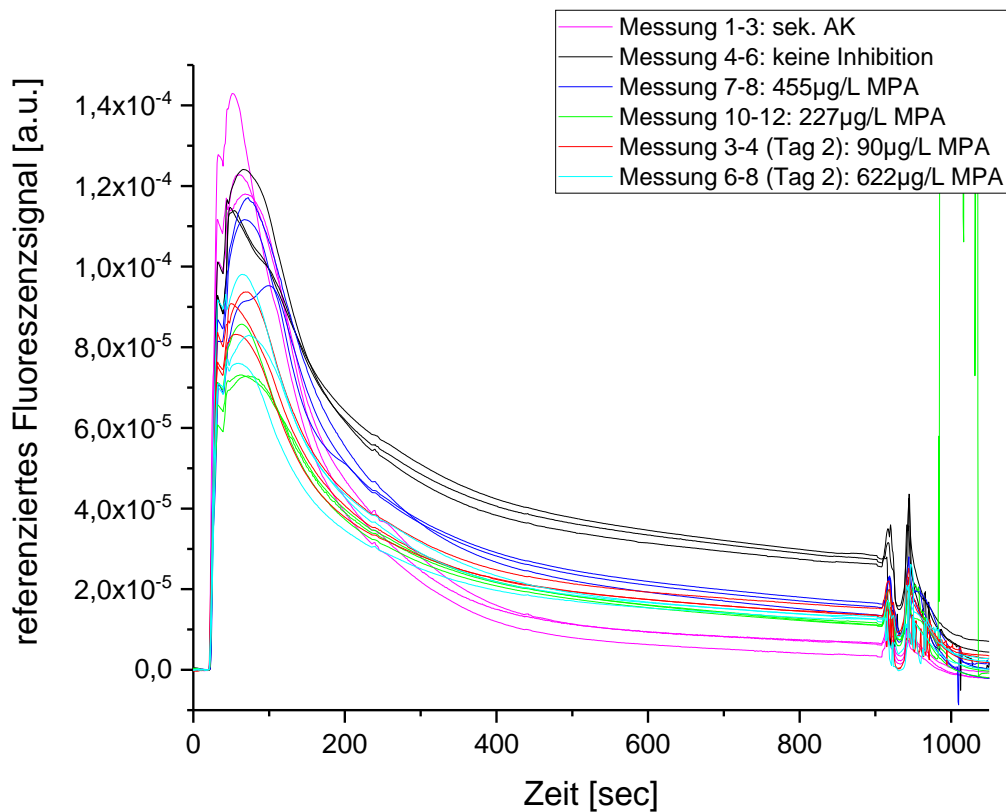


Abbildung 91: Messverläufe, welche noch nicht an die abnehmende Signalintensität angepasst wurden. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Zu Beginn jeder Messung ist zu sehen, wie auf die Basislinie mit 0 referenziert wurde (Abbildung 91). Danach tritt das Fluoreszenzsignal des Sekundärantikörpers auf. In der Zeitspanne zwischen 850 und 900 Sekunden kann das Signal ausgewertet werden. Nach 900 Sekunden wird regeneriert, bei 1100 Sekunden fällt das Signal wieder zurück auf die Basislinie.

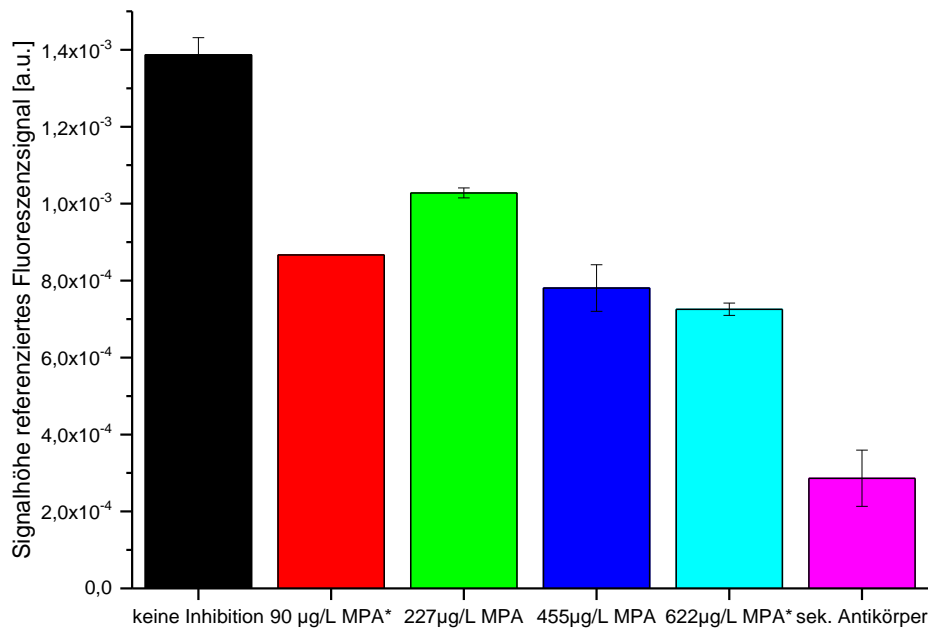


Abbildung 92: Die Messungen ohne Inhibition, 227 µg/L MPA, 455 µg/L MPA und sekundärer Antikörper wurden am ersten Messtag gemessen. Die mit Stern versehenen Konzentrationen 90 µg/L MPA und 622 µg/L MPA wurden am zweiten Messtag gemessen. Es ist die Signalthöhe referenziertes Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die verschiedenen Messungen aufgetragen.

Ergebnisdiskussion:

Um die verschiedenen Messungen ohne Inhibition, 90 µg/L MPA, 227 µg/L MPA, 455 µg/L MPA, 622 µg/L und sekundären Antikörpern besser vergleichen zu können (Abbildung 92) wurde die mittlere Signalthöhe am Ende einer jeden Messung ausgewertet ($\Delta t = 850 - 900$ sec). Es wurden immer drei gleiche Messungen hintereinander detektiert. Der Sekundär-Antikörper, die Messung ohne Inhibition und mit 455 µg/L MPA wurden zu Beginn der Messungen durchgeführt und nicht zusätzlich referenziert. Die darauffolgenden Messungen mit 227, 90 und 622 µg/L MPA wurden mittels uninhibierten Zwischenmessungen auf das anfängliche Signalniveau rückgerechnet und dadurch zusätzlich referenziert. Diese Referenzierung wurde notwendig, da die Oberfläche durch die Laserstrahlung stark und schnell altert und dies ausgeglichen werden muss. Diese schnelle Alterung könnte auch durch Luft im Kanal hervorgerufen worden sein. Am zweiten Messtag bei der Messung von 90 µg/L ist von einer nicht linearen Messabnahme auszugehen, da das Signal sich hier nicht mehr korrekt rückrechnen lässt.

Die Konzentrationen 90 µg/L und 622 µg/L wurden am zweiten Messtag gemessen und sind mit einem Stern versehen, da der Transducer an diesem Tag deutlich gealtert ist.

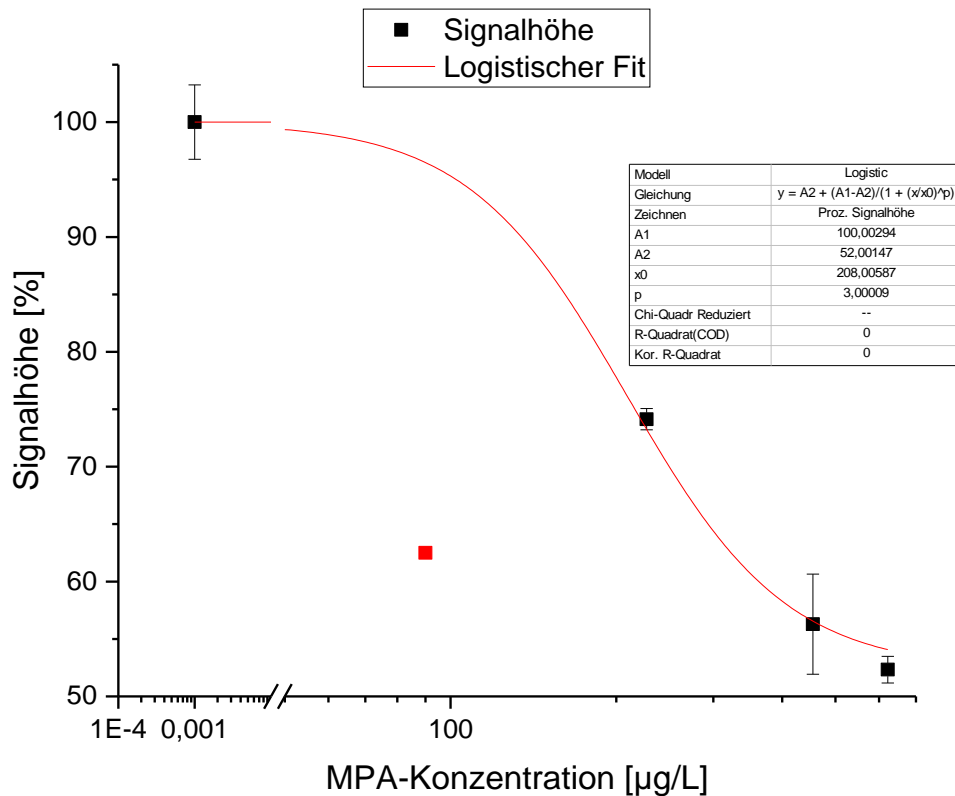


Abbildung 93: Kalibrierfunktion der Messungen aus Abbildung 91. Es wurde eine logistische Fitfunktion, wie für Immunoassays üblich, verwendet. Der rote Punkt wurde maskiert, da zu dem Messzeitpunkt die Flusszellbodenoberfläche schon stark gealtert war.

Die Kalibrierfunktion wurde mit einer logistischen Fit Funktion erstellt (Abbildung 93). Abgesehen von der maskierten Messung (rot) liegen die weiteren Konzentrationen gut auf der errechneten Funktion.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Signal bei den letzten Messungen am zweiten Messtag deutlich kleiner geworden ist und diese schnelle Alterung Langzeitmessungen und Kalibrierungen erschwert. Der Shutter am Aufbau könnte in einer weiter optimierten Variante das Laserbleaching (Oberflächenalterung durch Laser) verringern, allerdings birgt dies auch Probleme. So kann Luft in einer Messung schwer erkannt werden und die Referenz- und Messphotodiode könnten sich in einem nur kurzen Messzeitraum, bei einem nur kurzen Öffnen des Shutters, nur unzureichend eindriften.

Die im Folgenden erforschten homogenen Immunoassays haben keine mehrfach verwendete Oberfläche, die durch Bleaching und Regenerationsschritte abgenutzt wird. Mit jeder Messung werden neue, unter optimalen Bedingungen gelaberte Reagenzien verwendet.

4.8.4. Homogene Immunoassaymessungen

Es wurden verschiedene Varianten von homogenen Immunoassays im Aufbau getestet und detektiert. Alle Immunoassays haben einen pseudo-heterogenen Schritt, in dem die magnetischen Partikel durch einen Magneten festgehalten werden, um das Signal

auszudifferenzieren. Die Präparationsschritte sind außerhalb des Messaufbaus im Eppendorf® Cup erfolgt, da viele kritische Parameter zu beachten sind und die Durchführung hier einfacher und unproblematischer ist. Sämtliche Messungen wurden im LIF-Messaufbau detektiert. Alle Immunoassayvarianten wurden mit MPA als Analyt und MPA-Antikörpern durchgeführt.

Zunächst wurde der LIF-Messaufbau mit einem Fluoreszenzspektrometer LS-50B von Perkin Elmer als Referenz zur Validierung verglichen (Kapitel 4.8.4.1). In Kapitel 4.8.4.3 und 4.8.4.4 wurden MPA-AKs in Kombination mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern und gelabelten fluoreszierenden Nanopartikeln in Bindungsinhibitionstests detektiert. Im darauffolgenden, gezeigten Assay (Kapitel 4.8.4.5) wurde zusätzlich mit einem Permanentmagnet gegenüber der Photodiode die magnetischen Partikel im Fluss angereichert.

4.8.4.1. Vergleich LIF-Messaufbau und Fluoreszenzspektrometer

In Kooperation mit Kathrin Freudenberger wurden Validierungsmessungen eines homogenen Immunoassays in dem neu entwickelten LIF-Messaufbau und einem klassischen Fluoreszenzspektrometer als Referenz durchgeführt. Die verschiedenen Assayvarianten wurden mit einem großen Volumen hergestellt und derselbe Ansatz mit beiden Methoden zur besseren Vergleichbarkeit untersucht.

Parameter:

Im Fluoreszenzspektrometer wurde der Wellenlängenbereich: 655 - 750 nm detektiert und unter diesem angeregt. In diesen Versuchen wurde in einer Standard Einwegküvette mit definiertem Volumen gearbeitet. Im LIF-Messaufbau hingegen wird ein viel geringeres Volumen, nämlich das Flusszellvolumen über einer Photodiode betrachtet. Um ein höheres Signal zu erhalten wurde das vollständige Probenvolumen genutzt, die gesamte Probe während einer bestimmten Zeit im Fluss gemessen und die Fläche unter der Kurve anschließend integriert. Es wurde ein Summensignal der Wellenlängen von 625 - 680 nm gemessen. Die beschriebenen Versuche wurden zu Beginn der Versuche an einer frühen Version des LIF-Messaufbaus als Proof-of-Principle oder als Referenz im Sinne von Validierungsmessungen mit dem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Hier war die Referenzdiode noch nicht optimiert und die Flusszelloberseite entsprach Variante 1 aus Kapitel 4.4.3. Es wurden MPA Antikörper in der Konzentration von $c = 0,017 \text{ mg/mL}$ im Immunoassay eingesetzt. Die Konzentration der Alexa647 gelabelten Anti-IgG AKs beträgt $c = 0,025 \text{ mg/mL}$.

Assayablauf:

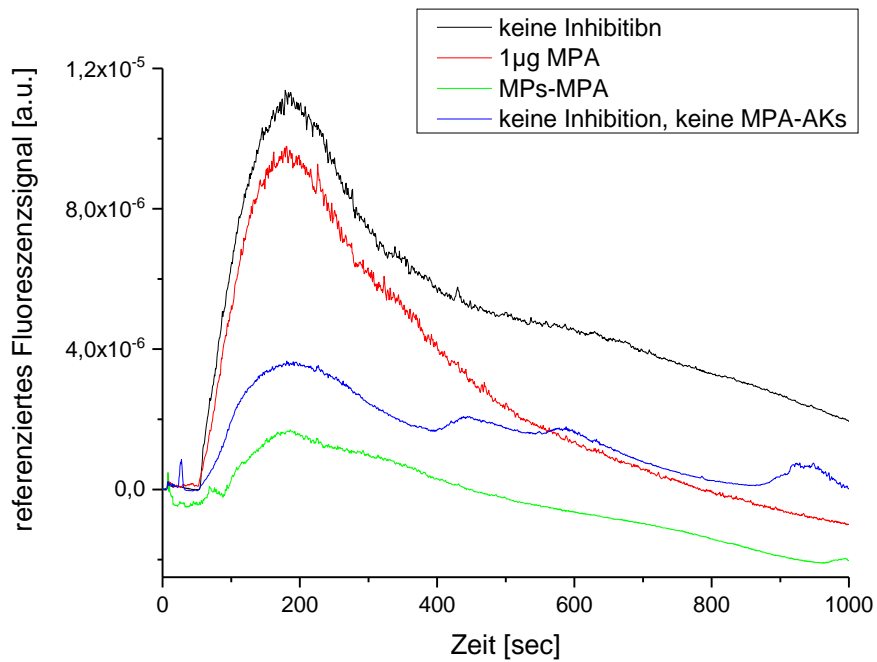
Bei dem homogenen Immunoassay handelt es sich um einen Bindungsinhibitionsassay, welcher zum Nachweis von MPA dient. Zunächst wurden MPA-AKs mit dem Analyten (MPA) vorinkubiert, daraufhin wurden magnetische Partikel mit MPA Liganden auf der Oberfläche zugegeben. Die magnetischen Partikel wurden extra hierfür mit MPA Liganden versehen. Anschließend wurde mit fluoreszenzgelabelten Sekundärantikörpern (Alexa647 gelabelte Anti-IgG AKs, Anti-Schaf IgG (H+L) Nummer 2 aus Tabelle 11) inkubiert und anschließend dreifach gewaschen, um nicht gebundene fluoreszenzgelabelte Sekundärantikörper

abzutrennen. Während den Waschsritten wurden die magnetischen Partikel mittels eines Permanentmagneten an der Wand eines Eppendorf® Cups festgehalten. Danach erfolgte die Detektion der angebundenen Fluorophore im Flusszellvolumen der Messaufbauten. Es ist ein inverses Signal, das heißt ein hohes Signal ist bei wenig MPA zu erwarten.

Die nach diesen Schritten erhaltenen Proben wurden dann mit beiden Methoden untersucht. Bei allen vier Messungen (Abbildung 94) handelt es sich bei beiden Methoden um die gleichen Proben.

Ergebnisdiskussion:

A)



B)

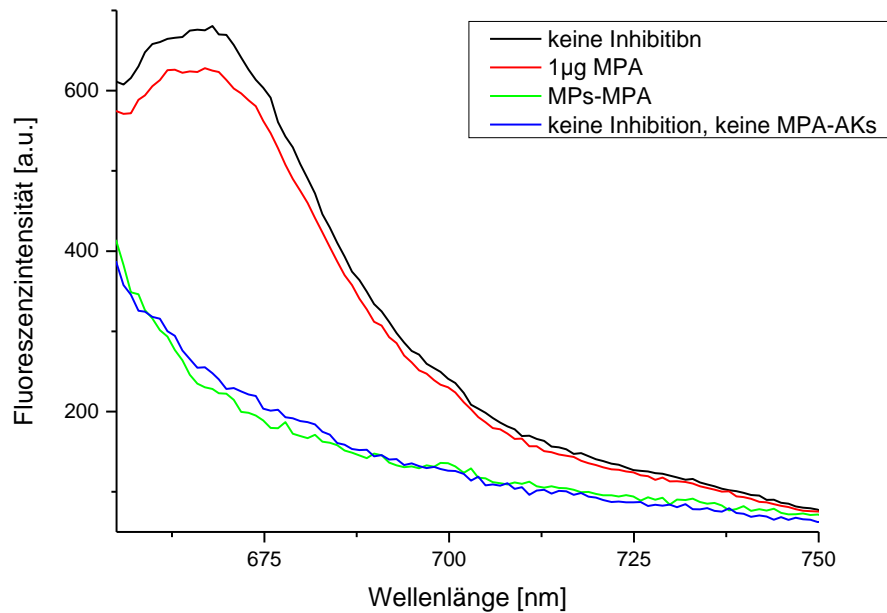
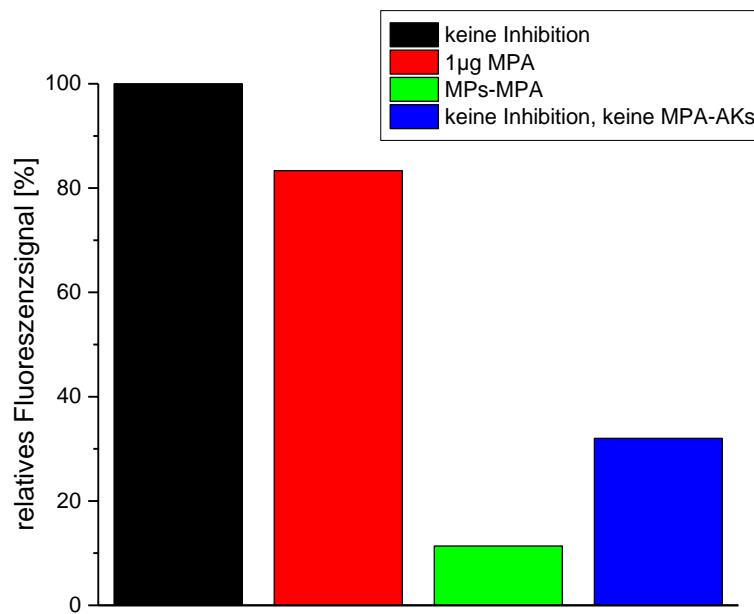


Abbildung 94: Die schwarze Kurve zeigt die Messung eines Immunoassays ohne Analyten (nicht inhibiert). Die rote Kurve zeigt einen mit 1 µg MPA inhibierten Immunoassays. Die grüne Kurve zeigt die Messung von ausschließlich mit MPA derivatisierten Magnetpartikeln (MPs-MPA). Die blaue Kurve zeigt die Messung von MPs-MPA und fluoreszenzgelabelte Sekundärantikörper. Unter A) sind die Messungen des LIF-Messaufbaus und unter B) die des Fluoreszenzspektrometers gezeigt. Die magnetischen Partikel sind Micromer M[®] Partikel. Bei A) ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] und bei B) die Fluoreszenzintensität [a.u.] gegen die Wellenlänge [nm] aufgetragen.

A)



B)

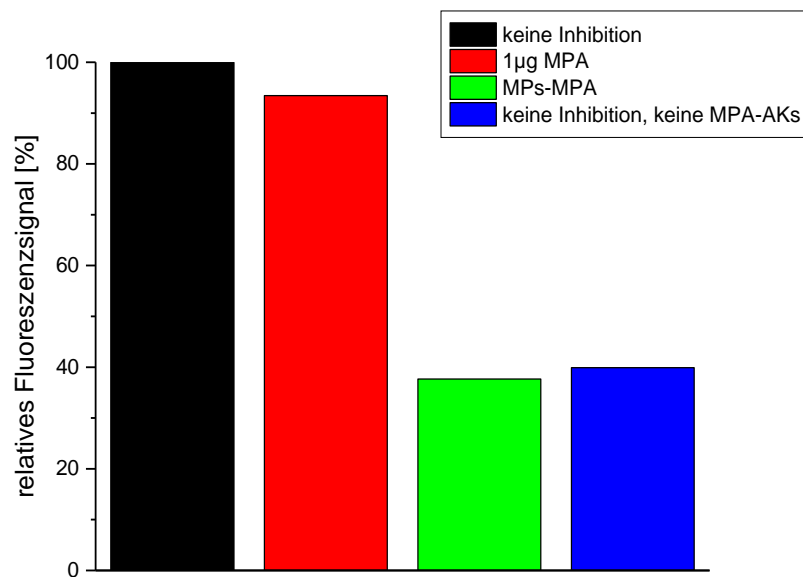


Abbildung 95: Um einen groben Vergleich beider Messmethoden zu ermöglichen, wurden die Flächen unter den Kurven (AUC) integriert und die nicht inhibierte Messung (schwarz) auf jeweils 100 % gesetzt. Bei den Messungen mit dem Fluoreszenzspektrometer wurde der Wellenlängenbereich: 655 - 700 nm integriert, bei den Messungen mit dem LIF-Messaufbau der Zeitraum 55 - 400 sec. Die Farben entsprechen den jeweiligen Messungen aus Abbildung 94. Unter A) sind die Messungen des LIF-Messaufbaus und unter B) die des Fluoreszenzspektrometers gezeigt.

Die erhaltenen Messsignale sind relativ zueinander gesehen bei beiden Messmethoden sehr ähnlich (Abbildung 95). Bei dem LIF-Messaufbau kann man durchaus von einer etwas größeren Signalausdifferenzierung sprechen, welche eventuell von der deutlich stärkeren Laserlichtquelle und der anderen Auswerte- und Detektionsmethode herrührt.

Bezüglich des homogenen Immunoassays lässt sich sagen, dass die Inhibition mittels 1 µg MPA erfolgreich war. Außerdem ist ersichtlich, dass die MPs mit MPA Liganden das Licht streuen (grün). Dieses Messsignal ist bei dem LIF-Messaufbau niedriger, was durch den deutlich kürzeren Strahlengang durch die Lösung begründet werden kann. Die blaue Säule zeigt die relativ hohe unspezifische Wechselwirkung der MPs-MPA mit den sekundären Fluoreszenzantikörpern. Generell lässt sich folgern, dass der LIF-Messaufbau in der früh eingesetzten Variante schon eine vergleichbare Signaldynamik und Signalintensität wie ein kommerziell erhältliches Fluoreszenzspektrometer hat.

Mit diesen Validierungsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass im LIF-Messaufbau ebenso wie mit dem Fluoreszenzspektrometer gemessen werden kann. Dieser Vergleich kann jedoch nur begrenzt gelten, da sowohl die Lichtquellen, als auch die Detektoren bei beiden Aufbauten sehr unterschiedlich sind. Beim LIF-Messaufbau wird mit einem Laser angeregt und einer Photodiode detektiert, bei dem Fluoreszenzspektrometer mit einer Xenonlampe und einem Photomultiplier. Außerdem wurde bei einer Methode in konstantem Volumen ohne Fluss detektiert und bei der anderen im Fluss. Im Fluoreszenzspektrometer befindet sich die gesamte Probe in der Küvette, im LIF-Messaufbau wird sie automatisch durch die Fluidik zur Messung in der Flusszelle gepumpt und danach wieder entfernt.

Trotzdem weisen beide Messaufbauten bei den relativ ausgewerteten Signalen die gleichen Messaussagen auf und ermöglichen die Validierung der Messergebnisse des LIF-Messaufbaus mittels des Fluoreszenzspektrometers als Referenz.

4.8.4.2. Homogene Immunoassays mit großen magnetischen Partikeln

Die homogenen Immunoassays wurden mit magnetischen Partikel $> 1 \mu\text{m}$ durchgeführt. Ein Vorteil der großen magnetischen Partikel ist, dass sie eine kleinere Oberfläche besitzen und dadurch besser gegen unspezifische Wechselwirkungen abschirmbar sind. Als ein Nachteil kann gelten, dass die Scherkräfte in der verwendeten Flusszellvariante mit einer Flusskanalhöhe von $145 \mu\text{m}$ sehr hoch sind und es theoretisch leicht zu Verstopfungen kommen könnte. Diese wurden aber bei keiner Magnetpartikelvariante beobachtet. Außerdem sedimentieren große magnetische Partikel deutlich schneller, wie in Kapitel 4.7.2 diskutiert.

4.8.4.3. Messungen mit Sekundärantikörpern und magnetischen Partikeln

Es wurde ein homogener Immunoassay zur Detektion von MPA durchgeführt. Es wurden $3 \mu\text{m}$ große magnetische Partikel mit MPA gelabelt und zusammen mit MPA-AKs und fluoreszierenden Anti-IgG Antikörpern ein Bindungsinhibitionsassay durchgeführt. In diesem Ansatz wurden das erste Mal in der Arbeit in einem homogenen Immunoassay Fc-Teil spezifische Sekundärantikörper eingesetzt. Die Folgerungen bzgl. der Assayschrittfolge werden in der Ergebnisdiskussion diskutiert.

Parameter:

Die magnetischen Partikel sind MicromerM[®] Partikel mit 3 µm Durchmesser. Sie haben eine PEG(NH₂)₂ Oberfläche und sind mit MPA gelabelt. Die MPA-AKs wurden ungelabelt im Assay eingesetzt. An sie binden fsAKs vom Typ Anti-IgG Fc-Teil spezifisch mit dem Fluorophor Alexa647. Im Rahmen der Versuche der Messreihen 2 und 3 (Kapitel 4.8.3.3) wurde ersichtlich, dass in dieser Kombination eine gute Signaldynamik zu erwarten ist. Die Messungen wurden in einer Flusszelle mit 2 mm Kanalweite und Flusszelloberseite 2 durchgeführt. Diese Versuche wurden mit der Messphotodiode 4 eines vierer Chips bei einer Neigung von 135° gemessen. Die Fläche unter der Kurve (AUC) wurde im Zeitraum 50 - 300 sec ausgewertet, und der Messpunkt 70 wurde in der Basislinie vor der Probeninjektion bei allen Messungen auf null gesetzt. Die Konzentration der MPA-AKs beträgt $c = 0,015$ mg/mL und die der fluoreszenzgelabelten Sekundärantikörper ist $c = 0,04$ mg/mL.

Assay Ablauf:

Im ersten Inkubationsschritt reagieren zunächst ungelabelte MPA-AKs, da sie die höchste Affinität zeigen, mit MPA in der Probe ($t = 15 - 30$ min). Danach werden in einem weiteren Inkubationsschritt magnetische Partikel mit MPA auf der Oberfläche zugesetzt. Anschließend wird gewaschen, um MPA mit MPA-AKs zu entfernen. Nur die MPs-MPA mit MPA-AKs bleiben im Cup. Im letzten Inkubationsschritt werden fluoreszierender Sekundärantikörper (fsAKs), welche an die MPA-AKs an den MPs mit MPA auf der Oberfläche binden zugegeben. Die Signalausdifferenzierung erfolgt durch das Wegspülen ungebundener fsAKs im Anschluss durch einen Waschschrift im Eppendorf[®] Cup an einem Permanentmagneten. Anschließend wird der Immunoassay im LIF-Messaufbau detektiert.

Ergebnisdiskussion:

Bei den Messungen dieser Serien wurde die nicht inhibierte Messung (Messung 1) auf 100 % gesetzt, das heißt, dass kein Analyt, aber alle Immunoassayreagenzien eingesetzt wurden (Abbildung 96). Mit 29 µg/L (Messung 2) und 143 mg/L (Messung 3) wurde inhibiert. Die unspezifische Wechselwirkung wurde anhand unfunktionalisierter, magnetischer Partikel (Messung 4) getestet. Sie haben eine PEG(NH₂)₂ Oberfläche, welche an sich schon gut gegen unspezifische Wechselwirkungen abschirmt. Eine Blank Messung zeigt die Stabilität der Anregungs- und Detektionskomponenten des LIF-Messaufbaus (Messung 5). Außerdem wurde die Fluoreszenz der Konzentration der im Immunoassay eingesetzten fsAKs ohne Zusatz weiterer Assaybestandteile detektiert (Messung 6).

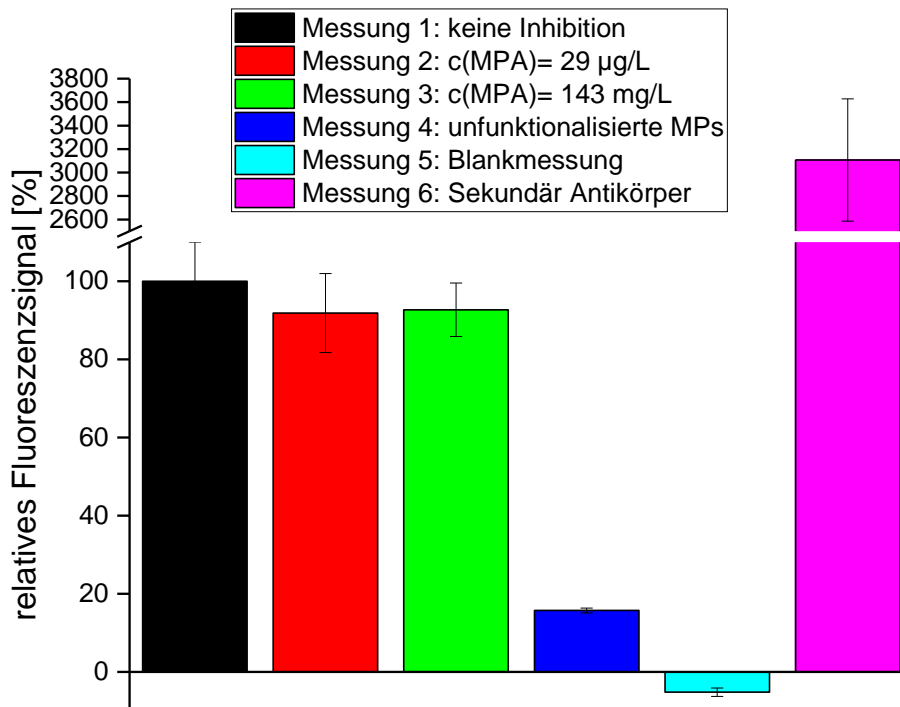


Abbildung 96: In Messung 1 - 3 wurden zwei verschiedene MPA Konzentrationen und der uninhibierte Assay gemessen. Außerdem wurden in Messung 4 die unspezifischen Wechselwirkungen von unfunktionalisierten magnetischen Partikeln untersucht. Messung 5 zeigt den Blank Wert mit Puffer. Messung 6 zeigt den puren Wert der eingesetzten Sekundärantikörper im Assay.

Unfunktionalisierte MPs haben eine geringe unspezifische Wechselwirkung mit MPA-AKs und fsAKs (Messung 4). Folglich ist die Oberfläche gut durch die PEG(NH₂)₂ Gruppen abgeschirmt. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass der LIF-Messaufbau eine leichte Drift nach unten zeigt und nicht ideal stabil während der Messungen ist (Messung 5). Das Signal der fluoreszierenden Sekundärantikörper (Messung 6) zeigt, dass sie in ausreichendem Überschuss zugegeben wurden und beim Reinigungsschritt ausreichend abgetrennt werden können, da das Signal um eine Größenordnung größer ist.

Die Messungen 1 - 3 des Immunoassays weisen keine ausreichende Signaldynamik (überlappende Fehlerbalken) auf. Die Messungen: keine Inhibition, 29 µg/L MPA und 143 mg/L MPA belegen dies eindeutig.

Sie stammen von dreifach gemessenen Proben desselben Immunoassaysansatzes. Da es sich um dieselben Proben des Immunoassaysansatzes handelt, sprechen die überlappenden Fehlerbalken für eine instabile Oberfläche. Die Fehlerbalken der Dreifachmessungen der Messung 4 und 5 zeigen gute Reproduzierbarkeiten, was für die Stabilität des Messaufbaus spricht.

Ausblick:

Im folgenden Kapitel 4.8.4.4 wurde statt der Kombination von MPA-AKs und fsAKs ein Versuch mit MPA-AK gelabelten fluoreszierenden Partikeln durchgeführt und in Kapitel 4.8.4.5 wurde dieser Ansatz stark modifiziert wieder aufgenommen und konnte für eine Kalibrierung verwendet werden. In Kapitel 4.8.4.5 wurden unter anderem die Reihenfolge der Assayschritte verändert und ein Permanentmagnet an die Flusszelle angebracht, weswegen signifikant andere Ergebnisse erhalten wurden.

4.8.4.4. Messungen mit fluoreszierenden und magnetischen Partikeln

Bei diesem Assay sollte die Signaldynamik durch Austausch der Erkennungskomponenten verbessert werden (Kapitel 4.8.4.3). Ebenso wie im vorangegangenen Versuch wurde ein homogener Immunoassay in Form eines Bindungsinhibitionstests mit großen magnetischen Partikeln durchgeführt. In diesem Fall wurden statt MPA-AKs in Kombination mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern nun fluoreszierende Partikel, welche mit MPA-AKs gelabelt waren, eingesetzt.

Parameter:

Die magnetischen Partikel sind Micromer M[®] Partikel mit 3 µm Durchmesser, die eine PEG(NH₂)₂ Oberfläche besitzen und mit MPA gelabelt sind. Die fluoreszierenden Nanopartikel sind ScreenCORE/R Protein G Partikel mit 1 µm Durchmesser, die mit MPA-AKs gelabelt sind. Gelabelt wurden sie nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers mit MPA-AKs. Die Labeling-Prozedur ist in Kapitel 3.2.4 kurz zusammengefasst. Die fluoreszierenden Partikel werden statt der Kombination MPA-AKs und fluoreszierende Sekundärantikörper eingesetzt. Die Messungen wurden in einer Flusszelle mit Flusszelloberseite 2, einer Kanalweite von 2 mm und mit Diode 4 eines vierer Diodenchips bei einer Neigung von 135° durchgeführt. Die Fläche unter der Kurve (AUC) wurde im Zeitraum 50 – 300 sec ausgewertet und hierbei der Messpunkt 70 in der Basislinie vor der Probeninjektion bei allen Messungen auf null gesetzt. Die Konzentration der beim Labeling verwendeten ScreenCORE[®]/R Partikel beträgt $c = 1,3$ mg/mL. Sie wurden mit einer Konzentration von $c = 0,53$ mg/mL MPA-AKs gelabelt. Bei den Waschschrritten wurden Teile beider Komponenten verloren. Im späteren Assay kamen somit maximal ScreenCORE/R Partikel der Konzentration ca. $c = 0,043$ mg/mL mit MPA-AKs der Konzentration $c = 0,018$ mg/mL auf der Oberfläche in Einsatz.

Assay Ablauf:

Zunächst wurden die fluoreszierenden Nanopartikel mit MPA-AKs gelabelt und im Immunoassay dann mit der Probe (mit MPA) vorinkubiert ($t = 15 - 30$ min). Im Anschluss wurden die magnetischen Partikel mit MPA auf der Oberfläche zugegeben. Nach einem weiteren Inkubationsschritt wurde mittels Permanentmagnet im Eppendorf[®] Cup gewaschen und die ungebundenen fluoreszierenden Nanopartikel abgetrennt (Signalausdifferenzierungsschritt). Der Detektionsschritt erfolgte im Volumen im automatisierten Durchfluss in der Messzelle. Derselbe Batch (Durchlauf) eines Assays wurde jeweils dreifach gemessen.

Ergebnisdiskussion:

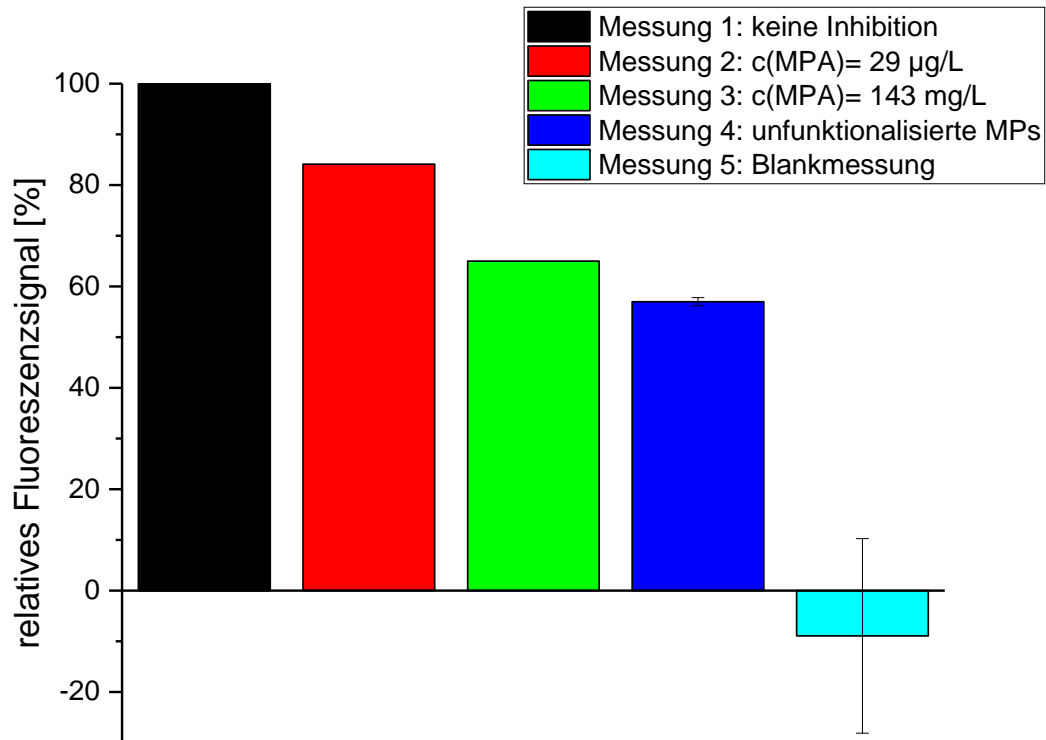


Abbildung 97: In Messung 1 - 3 wurden zwei verschiedene MPA Konzentrationen und der uninhibierte Assay gemessen. Außerdem wurden in Messung 4 die unspezifischen Wechselwirkungen von unfunktionalisierten magnetischen Partikeln untersucht. Messung 5 zeigt den Blank Wert mit Puffer. Die unfunktionalisierten magnetischen Partikel und der Blank Wert wurden dreifach gemessen.

Bei dem Bindungsinhibitionstest erhält man, wie es zu erwarten war, ein inverses Fluoreszenzsignal. Die Signaldynamik ist hinreichend gut obwohl die Blank Messungen eine hohe Standardabweichung bei einem negativen Mittelwert aufweisen. Letzteres deutet auf eine starke Drift des LIF-Messaufbaus bei den Messungen hin. Den Standardabweichungen bei den Messungen der unfunktionalisierten Partikel und des Blank Wertes liegen Dreifachmessungen von Proben desselben Immunoassayansatzes zugrunde. Die anderen Proben wurden wegen technischer Probleme nur einfach gemessen. Die unfunktionalisierten, magnetischen Partikel zeigen eine relativ hohe Wechselwirkung mit den gelabelten fluoreszierenden Partikeln. Dies war der Grund weswegen dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde. Das Signal von 55 % bei der Detektion der unspezifischen Wechselwirkung ist zu hoch.

4.8.4.5. Messungen mit Permanentmagnet an der Flusszelle

Der homogene Immunoassay wurde in Form eines Bindungsinhibitionstests durchgeführt. Er wurde, verglichen mit denen aus Kapitel 4.8.4.3, um einen pseudo-heterogenen Detektionsschritt erweitert und mit ähnlichen Immunoassayparametern durchgeführt. Für

diese Versuche wurden eine andere Messphotodiode, veränderte Flusszellneigung und Auswertung der Messungen verwendet.

Im heterogenen Detektionsschritt werden das Signal und die Signaldynamik verstärkt, da ein Permanentmagnet gegenüber der Messphotodiode zwischen Ein- und Auslass an der Flusszelle die magnetischen Partikel, auf welchen der Immunoassay stattgefunden hat, anreichert (Abbildung 98). Die Vor- und Nachteile von Permanentmagneten und weitere Details zur Entwicklung dieses Aufbaus sind ausführlich in Kapitel 4.7.1 beschrieben.

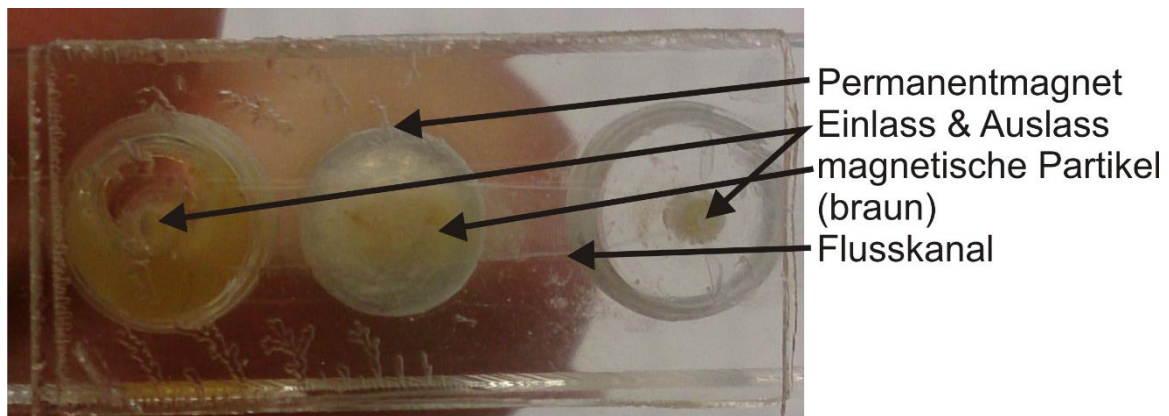


Abbildung 98: In der Abbildung ist ein Foto einer Flusszelle der Variante 2 mit Ein- und Auslass (rechts und links) zu sehen. In der Mitte befindet sich der Permanentmagnet unter der Flusszelle. Bei ihm ist eine Anreicherung der magnetischen Partikel deutlich zu erkennen.

Parameter:

Es wurden 3 μm große magnetische Micromer M[®] Partikel mit einer PEG(NH₂)₂ Oberfläche verwendet. Sie wurden mit MPA und Testosteronoxim gelabelt. Außerdem wurden ungelabelte MPA-AKs mit der Konzentration $c = 0,052 \text{ mg/mL}$ und fluoreszierenden Sekundärantikörper AlexaFluor 647 Anti-IgG Fc-Teil spezifisch mit der Konzentration $c = 0,028 \text{ mg/mL}$ eingesetzt. Zur Regeneration wurde sehr schnell gepumpt und SDS 0,5 % mit $\text{pH} = 2$ zur Reinigung des Flusskanals eingesetzt.

Für diesen Ansatz wurde Messphotodiode 2 eines vierer Chips verwendet. Die Permanentmagnete wurden in Flusszelloberseite 2 eingeklebt. Der Flusszellboden ist aus Glas und zur Passivierung mit AMD beschichtet. Die Flusskanalbreite beträgt 2 mm und die Flusszellneigung 90°, da die Permanentmagnete bei dieser Anordnung ansonsten verrutschen könnten. Bei den Messungen wurden sieben Permanentmagnete auf einen, der fest in der Flusskanaloberseite verklebt war, gestapelt. Hierdurch konnte das Magnetfeld des an der Flusszelle befestigten Permanentmagneten ausreichend verstärkt werden. Während der Inkubationszeiten wurde nicht geschüttelt, die Eppendorf[®] Cups stranden unbewegt im Cup-Halter. Die Anfangssteigung der Probeninjektion wurde ausgewertet.

Assay Ablauf:

Alle gemessenen Konzentrationen wurden mit jeweils frisch pipettierten und zeitlich exakt vorinkubierten Immunoassayansätzen detektiert. Um die Detektion von Messartefaken auszuschließen wurde die Messreihenfolge der verschiedenen Konzentrationen randomisiert. Zunächst wurde die Probe, bestehend aus MPA mit MPA-AKs, 15 min

inkubiert. Anschließend wurden fsAKs zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden mit MPA derivatisierte MPs zugegeben und 30 min inkubiert. Dann folgte ein Waschschrift, in dem zweimal mit 100 µL PBS gewaschen wurde. Die Inkubationen fanden jeweils bei Raumtemperatur in Dunkelheit statt. Bei den Messungen ohne MPA Zusatz wurde das Volumen ausgeglichen, um dieselben Konzentrationen zu erhalten.

Verglichen mit Kapitel 4.8.4.3 wurde unter anderem die Reihenfolge der Assayschritte verändert und dadurch der Fc-Teil Spezifität der Sekundärantikörper Rechnung getragen. Dieser Tausch, bei dem die magnetischen Partikel zuletzt zugegeben werden, verringert vermutlich ein unspezifisches Anbinden der Sekundärantikörper, was zu einer Verbesserung der Signaldynamik führt. In dem Inkubationsschritt mit den MPA-AKs, MPA und fluoreszierenden Sekundärantikörpern können zusätzlich, falls dies sterisch möglich ist, mehrere fluoreszierende Sekundärantikörper, welche im Überschuss vorhanden sind, an einen MPA-AK binden und dadurch zu einem hohen Signal führen.

Der Ablauf des pseudo-heterogenen Immunoassays mit den einzelnen Schritten ist auch in Tabelle 14 ausführlich dargestellt.

Tabelle 14: Die Assayschritte mit Inkubationszeiten und Reagenzien sind für einen Bindungsinhibitionstest gezeigt. Es wird zwischen 0 µg MPA (keine Inhibition) und x µg MPA (einer bestimmten Menge) unterschieden.

Schritt Nummer:	Inkubationszeit [min]	A: Assay 0 µg/L:	B: Assay x µg/L:
1	A: 15 / B: 15	1µL MPA-AK + 2 µL sek. AK + 17 µL PBS	1 µL MPA-AK + 10 µL MPA Stammlösung + 9 µL PBS
2	A: 30 / B: 15	+3 µL MPA-MPs	+ 2 µL sek. AK
3	A:- / B: 30	2 mal Waschen mit 100 µL PBS	+3 µL MPA-MPs
4	A:- / B: -		2 mal Waschen mit 100 µL PBS

Bei dem Einfangen der Partikel am Permanentmagneten im Detektionsschritt wurde langsam gepumpt. Bei der „Regeneration“ wurde sehr schnell gepumpt, außerdem wurde SDS 0,5 % mit einem pH= 2 zur Reinigung des Flusskanals hindurch gepumpt.

Ergebnisdiskussion:

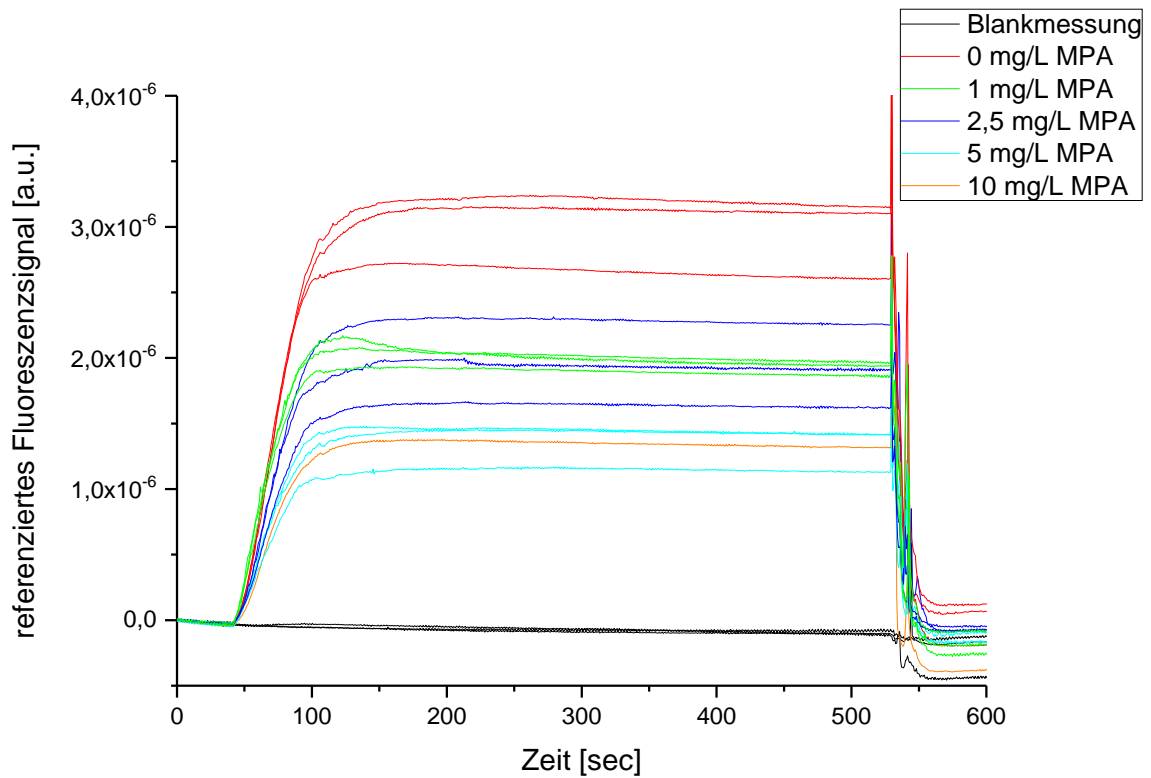


Abbildung 99: Die Messreihenfolge der Immunoassaykonzentrationen erfolgte randomisiert. Ebenso wurde die Reihenfolge der dreifach gemessenen Konzentrationen randomisiert. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen.

Es wurden die Steigungen der referenzierten Fluoreszenzsignale im Zeitraum von $t = 50 - 65$ sec ausgewertet (Abbildung 99). Sie verhalten sich umgekehrt proportional zur MPA Konzentration. Der Blank Wert (Puffer) und 4 MPA Konzentrationen ($c = 0; 1; 2,5$ und 5 mg/L) konnten dreifach gemessen werden. Eine weitere MPA Konzentration ($c = 10$ mg/L) wurde einfach gemessen. Im Zeitraum $0 - 50$ sec wird die Basislinie aufgenommen, welche nach der Regeneration in $550 - 600$ sec wieder erreicht wird. Bei der Probeninjektion ab Sekunde 50 kann sehr gut eine lineare Anfangssteigung ausgewertet werden. Die Plateauphase mit der Signalhöhe wird durch den Permanentmagneten stabilisiert. Da sie stark streut, wurde die Anfangssignalsteigung zur Auswertung verwendet. Die Reproduzierbarkeit der Signalhöhe könnte durch fluidische Optimierungen, wie zum Beispiel eine Abtrennung der Probe durch Luftblasen oder die Anpassung der Flusskanalform an das Magnetfeld, verbessert werden.

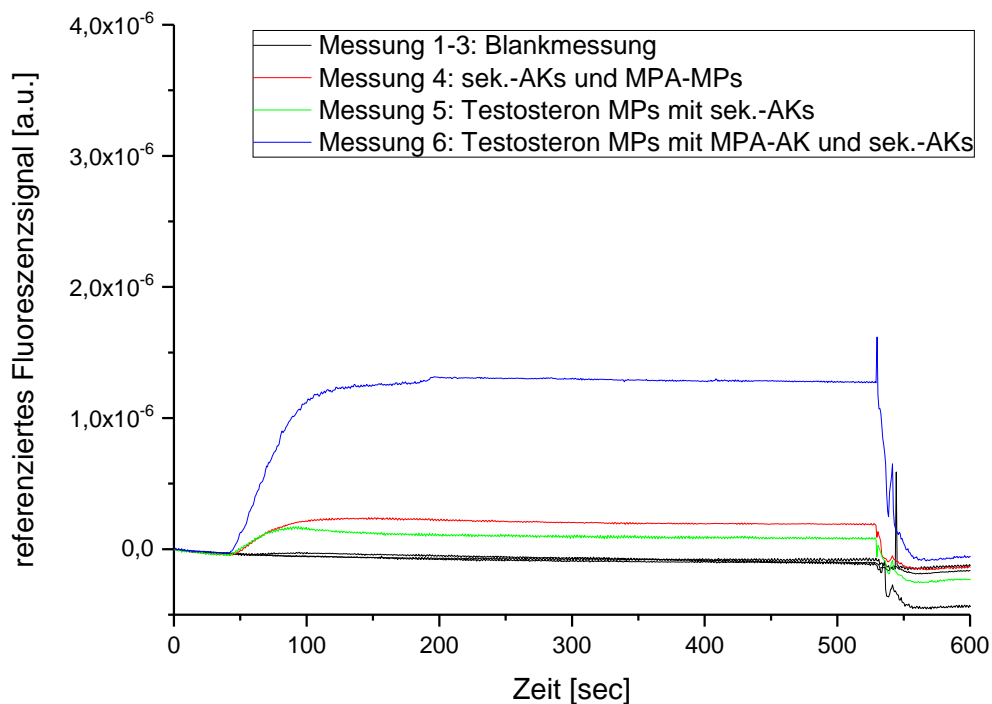


Abbildung 100: Tests auf unspezifische Wechselwirkungen: Testosteronpartikelmessungen und Blank Messungen mit PBS. Die Messungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit genau der gleichen Skalierung wie in Abbildung 99 aufgetragen. Es ist das referenzierte Fluoreszenzsignal [a.u.] gegen die Zeit [sec] aufgetragen. Die Nummerierung der Messungen entspricht nicht der zeitlichen Reihenfolge sondern erfolgte nach Funktionalität, da wiederum randomisiert gemessen wurde.

Abbildung 100 gibt die Tests auf unspezifische Wechselwirkungen der MPA Antikörper, fsAKs, MPA-MPs und Blank Messungen wieder. Um die unspezifische Wechselwirkung zu untersuchen, wurden magnetische Partikel mit Testosteronoxim statt mit MPA auf der Oberfläche funktionalisiert. Es handelt sich um ein relativ apolares Molekül, welches in der molaren Masse MPA ähnlich ist. Die Funktionalisierung erfolgte nach etablierter Standardchemie [86, 87].

Aus Messung 6 (Abbildung 100) lässt sich entnehmen, dass die Wechselwirkung der magnetischen Partikel mit Testosteronoxim, MPA-AKs und fsAKs verglichen mit den spezifischen Messsignalen relativ stark ausgeprägt ist (Abbildung 99). Durch Messung 5 wird nachgewiesen, dass die Wechselwirkung der MPs mit Testosteronoxim und fsAKs relativ gering ist. Das Gleiche gilt für die Wechselwirkung von fsAKs mit magnetischen Partikeln mit MPA auf der Oberfläche in Messung 4.

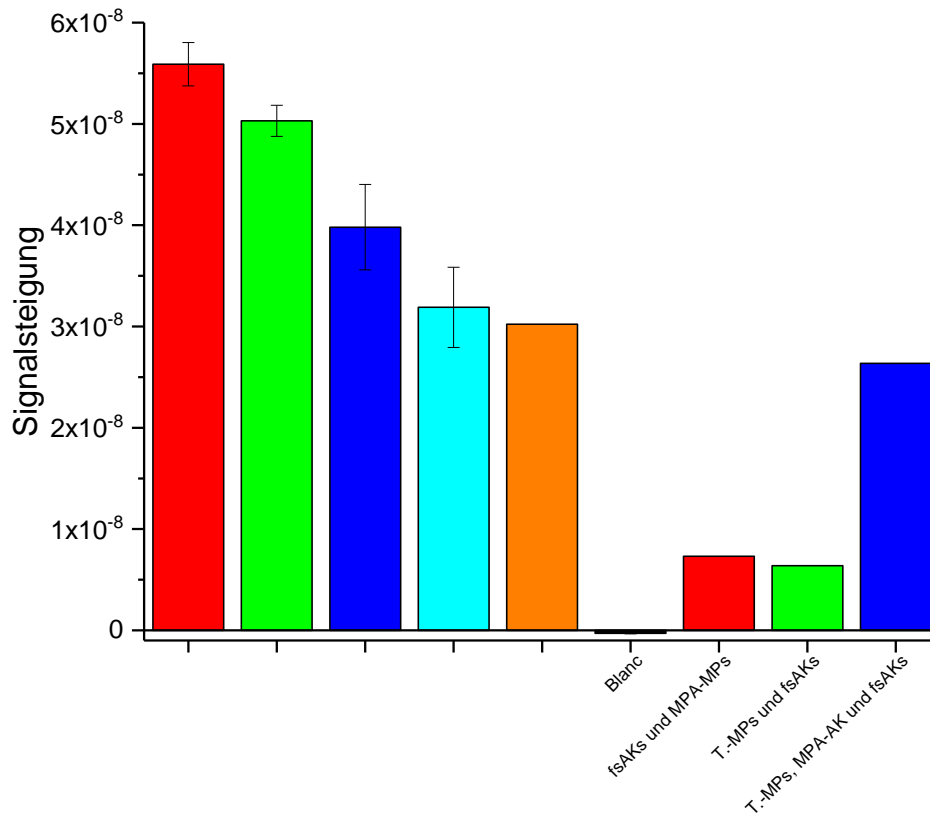


Abbildung 101: Es ist die Steigung aller Messungen des homogenen MPA Immunoassays gezeigt. Es ist die Anfangssignalsteigerung gegen die einzelnen Messungen aufgetragen.

Alle ausgewerteten Steigungen des Immunoassays und der Tests auf unspezifische Wechselwirkungen werden zur besseren Vergleichbarkeit in Säulenform dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Messaufbau keine Drift oder technische Probleme aufweist, da der Blank Wert eine sehr kleine Varianz aufweist. In Abbildung 99 ist dies auch im Signalverlauf deutlich zu erkennen. Wie schon im oberen Absatz diskutiert deutet das Signal des Wechselwirkungstests von mit Testosteron gelabelten magnetischen Partikeln, MPA-AKs und fsAKs auf eine starke Wechselwirkung von Testosteron mit den MPA-AKs hin. Dieses Verhalten lässt sich plausibel durch die hydrophoben Eigenschaften von Testosteron und die polyklonale Eigenschaft der MPA-AKs erklären, denn MPA hat auch viele hydrophobe Domänen und polyklonale Antikörper können an verschiedenen ähnlichen Epitopen, eben auch an fremde Epitope, anbinden.

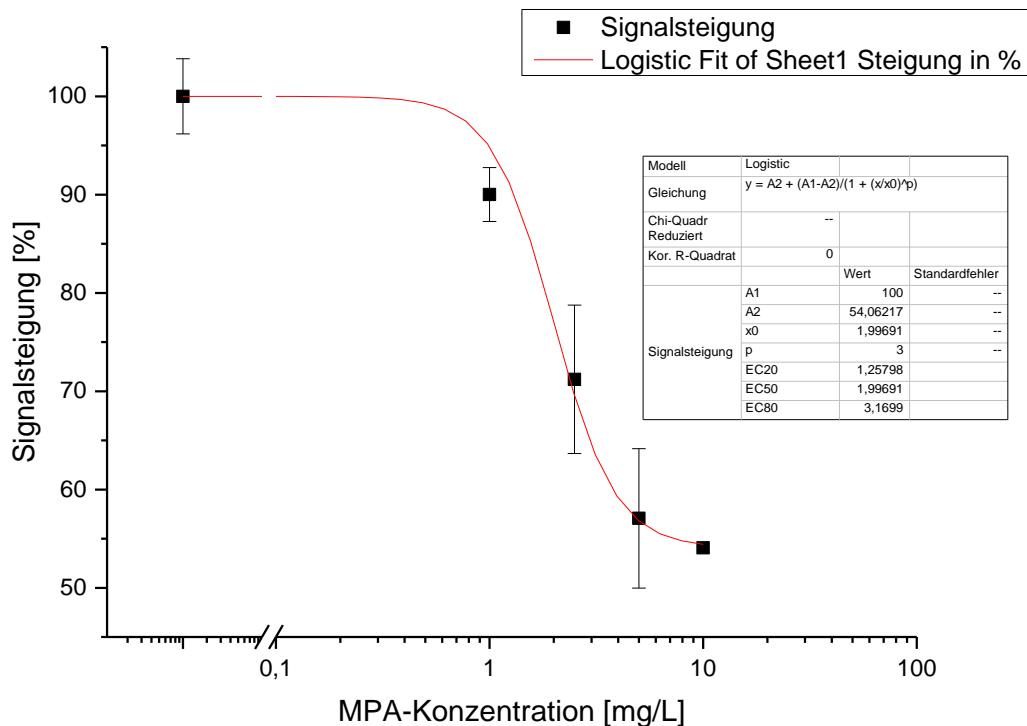


Abbildung 102: Kalibrierkurve homogener MPA Immunoassay. Es wurde die Signalsteigerung [%] gegen die MPA-Konzentration in [mg/L] aufgetragen.

Basierend auf den in Abbildung 99 gezeigten Messungen wurde die Steigung ausgewertet und eine Kalibrierkurve in Form einer logistischen Fitfunktion ermittelt (Abbildung 102). Die Steigung einer uninhibierten Messung wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Konzentrationen jeweils in Bezug dazu auf diesen Wert geplottet. Die Messwerte liegen nah am Fit der Kurve, jedoch sind die Standardabweichungen relativ groß und überlappen sich in einem Fall. Leider ließen sich keine weiteren Konzentrationen oder Wiederfindungsraten bestimmen, da das System in einigen Parametern instabil ist. Um Messungen in niedrigeren Konzentrationsbereichen durchführen zu können, müssen weitere Optimierungen am homogenen Immunoassay erfolgen. Hauptsächlich muss die unspezifische Wechselwirkung der Partikel weiter verringert werden. Ein Anzeichen dafür, dass dies noch geschehen muss, ist die noch hohe Signalsteigung von 55 % bei der Messung mit der höchsten gemessenen MPA Konzentration. Sie müsste am unteren Ende der sigmoidalen Kurve, aus den Erfahrungen bei klassischen heterogenen Immunoassays, bei einem niedrigeren Wert sein.

Messungen des homogenen Immunoassays mit Schütteltisch:

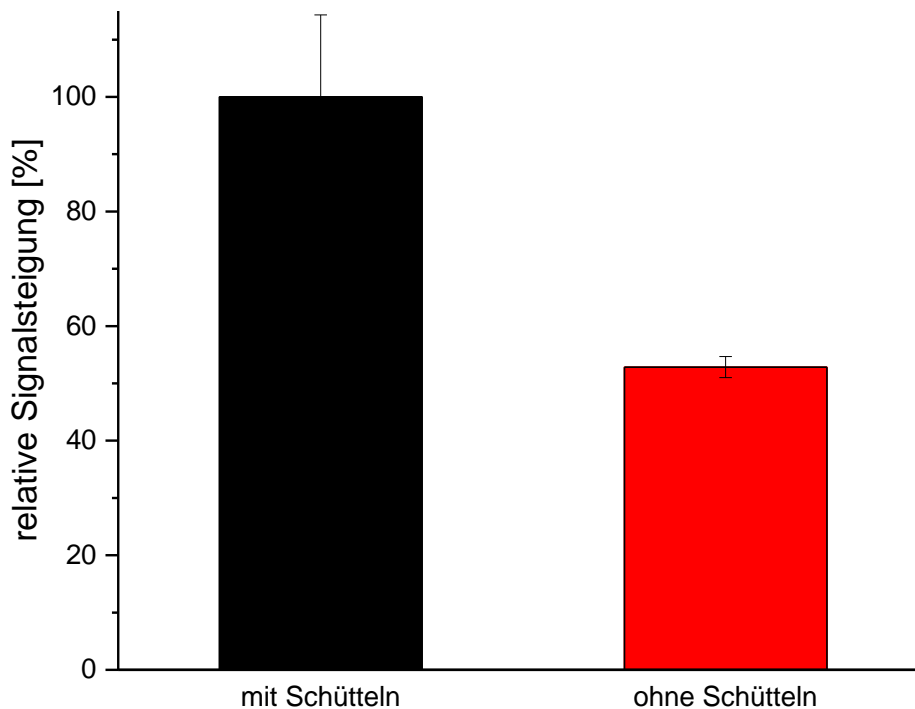


Abbildung 103: Vergleich zweier nicht inhibierter Dreifachmessungen mit und ohne Schütteln auf Schütteltisch Aufbau (in Kapitel 4.7.2 vorgestellt).

Um zu testen, welche Auswirkungen das Schütteln des homogenen Immunoassays während der Inkubationszeiten, das Turbulenzen (Scherströmungen) im Reaktionsmedium auslösen, haben, wurden Versuche hierzu durchgeführt. Die Eppendorf® Cups wurden während den Inkubationszeiten auf den in Kapitel 4.7.2 vorgestellten Schütteltisch gestellt. Scherströmungen durch Schütteln des Mediums während der Inkubation lassen das Signal deutlich ansteigen, jedoch steigt auch die Varianz deutlich an, dieser Anstieg könnte durch eine stärkere Scherströmungsbelastung der Antikörper begründet werden. Ohne Schütteln ist das Signal nur noch ungefähr halb so hoch und die Varianz der Messwerte gering. Deswegen wurde vom Schütteln in der Inkubation in den weiteren Messungen abgesehen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Entsprechend der Problemstellung und Motivation, Möglichkeiten und zukunftsweisende Ansätze zu erforschen, bei Transplantationen und der Nachsorge mit Point-of-Care-Testing Lösungen erfolgreich und in kurzer Zeit häufig und mit guter Quantifizierung innerhalb des therapeutischen Fensters zu messen, wurden die folgenden Forschungsbereiche bearbeitet.

Die Kombination von homogenen und heterogenen Phasenassays zum vorteilhaften pseudo heterogenem Assay. Die Reduktion des Analytenvolumens durch eine miniaturisierte Fluidik. Die Erniedrigung des LOD durch die Fluoreszenzdetektion mittels Laserinduzierter Fluoreszenz nach Anreicherung der Partikel am Magnet.

Dazu mussten folgende Ergebnisse erzielt werden:

LIF-Messaufbau:

Es wurde intensive Forschung betrieben, um einen LIF-Messaufbau zur Detektion von homogenen Immunoassays zu schaffen. So wurden die Dimensionen passend zur Integration in ein miniaturisierbares Point-of-Care-Test-Gerät gewählt. Viele weitere Geräteeigenschaften des LIF-Messaufbaus wurden untersucht und bei dem erhaltenen Messaufbau berücksichtigt. So sind die Einwegbauteile einfach herzustellen und kostengünstig. Das kleine Volumen der Flusszelle ist an das zu erwartende geringe Probenvolumen vom Patienten angepasst. Die Flusszelle weist eine hohe Dichtigkeit, Platziergenauigkeit ohne Neujustierung im Messaufbau, Zuverlässigkeit und Säurebeständigkeit auf. Eine freie Ausrichtbarkeit zwischen Anregungslichtquelle und Detektor zu Forschungszwecken und eine intelligente, modulare Anordnung der Messaufbaukomponenten um Reparaturen zu ermöglichen wurden integriert. Das Gerät arbeitet leise und es sind viele Messungen in Reihe ohne Temperaturkomplikationen möglich.

Kalibrierfunktion homogener Immunoassay

Im Messaufbau wurden neuartige, homogene Immunoassaymessungen im Flusszellvolumen zur Detektion von Mycophenolsäurespiegeln exemplarisch für ein Immunsuppressivum durchgeführt.

Betrachtet man die Kalibrierfunktion des homogenen Immunoassays sieht man, dass die Messwerte am Fit der Kurve liegen. Für Messungen in niedrigeren Konzentrationsbereichen müssen weitere Optimierungen am homogenen Immunoassay durchgeführt werden. Eine deutlich verbesserte Oberflächenabschirmung konnte durch magnetische Partikel mit $\text{PEG}(\text{NH}_2)_2$ auf der Oberfläche erhalten werden. Lediglich der Test auf unspezifische Wechselwirkung mit einem anderen Molekül (Testosteronoxim) viel etwas schlechter aus, dies kann aber durch die polyklonalen Eigenschaften des MPA-AKs und die ähnlichen Moleküleigenschaften erklärt werden. Diese schon deutlich verringerte unspezifische Wechselwirkung muss aber noch weiter verringert werden, um die nötige Signaldynamik für niedrigere Konzentrationen zu erhalten. Die Tatsache, dass selbst bei hohen MPA Konzentrationen und dadurch resultierenden starken Inhibitionen noch hohe Signale erhalten werden ist ein eindeutiges Indiz dafür.

Als essentieller Vorteil des homogenen Immunoassays kann gelten, dass kein Regenerationsschritt der Sensoroberfläche nach einer Messung mehr benötigt wird. Für jede Messung können die Immunoassaybestandteile frisch aus den Vorratsgefäßen entnommen werden. Probleme wie Photobleaching durch den Laser oder die Abnutzung der Sensoroberfläche nach mehreren Messzyklen treten nicht mehr auf.

Kalibrierfunktion heterogener Immunoassay

Um den Projektpartnern zu helfen und um die gefundenen Ergebnisse besser vergleichen zu können wurden zusätzlich heterogene Immunoassaymessungen auf dem Flusszellboden durchgeführt.

Die erhaltene Kalibrierfunktion des heterogenen Immunoassays wurde auf partiell gespotteten Sensoroberflächen detektiert. Durch das Laserlicht alterte die Sensoroberfläche stetig, dies musste mit Referenzmessungen ausgeglichen werden. Nach drei Messungen wurde immer eine Referenzmessung zur Überprüfung der Oberflächensensitivität durchgeführt, um die Messsignale zurückzurechnen. Diese Rückrechnung funktioniert zu Beginn einer Messreihe sehr gut, nach einigen dreifach gemessenen Werten ist jedoch eine Rückrechnung nicht mehr möglich da die Sensoroberfläche zu stark altert.

Es wurde mit einer gespotteten Oberfläche gearbeitet, da diese dazu führt dass nur über den Photodioden detektiert wird und dadurch kein Signal an anderen Stellen verloren geht. Dieses Vorgehen kann deutlich besser als eine flächige- oder Onlineimmobilisierung sein. Außerdem kann auch der Analyt bei Bedarf durch diese Vorgehensweise genau an der Stelle angereichert werden, an der er auch später zum Beispiel in einem Sandwich Assay detektiert wird.

Zusammenfassung Immunoassays

Bei großen Messreihen der homogenen und heterogenen Immunoassays ist eindeutig erkennbar, dass der Messaufbau keine Drift oder technischen Probleme aufweist und zuverlässig arbeitet. Sämtliche in der Arbeit vorgestellten Messungen wurden mit dem LIF-Messaufbau detektiert, falls nicht anders erwähnt. Bei beiden Immunoassayvarianten konnten reproduzierbare Messungen und Kalibrierungen durchgeführt werden. Die Konzentrationsbereiche beider Kalibrierungen können durch weitere Optimierungsschritte noch weiter abgesenkt werden. Speziell der homogene Immunoassay kann aufgrund der vielen neuen Parameter (Oberflächenchemie der Partikel, Assayvarianten, Inkubations- und Detektionsmodi) noch weiter optimiert werden.

Interdisziplinäres Arbeiten

Die besonderen Herausforderungen der Forschungsarbeit im Rahmen der Arbeit bestanden darin, die verschiedenen Aspekte der biochemischen Immunoassayentwicklung mit den physikalisch-chemischen Aspekten der LIF-Messaufbau Entwicklung in Einklang zu bringen. Zusätzlich mussten die Materialwissenschaftlichen Untersuchungen der Fluidik und die durch die Projektpartner entwickelten Komponenten bedacht und implementiert werden. Dieses Interdisziplinäre Arbeiten ermöglichte eine tiefgehende und weitreichende Forschung zu dem Themenkomplex in dem relativ kurzen Projektzeitraum.

Die folgenden Projektpartner des NANODEM Projektes haben Komponenten beigesteuert. Der Projektpartner am Institut für Photovoltaik der Universität Stuttgart hat die Detektionsphotodioden, die Black Box und die Messschiene und Halter für die Komponenten eigens für den Messaufbau entwickelt und hergestellt. Außerdem war Marcel Berner an einer Vielzahl von Entwicklungen beteiligt und wird an entsprechender Stelle in der Arbeit genannt. Der mfcs® aus Jena hat Doppelklebebänder zur Verfügung gestellt und per Laser zugeschnitten. Inesc-MN aus Lissabon, Portugal hat die Siliziumwafer der Flusszellvariante 1 hergestellt.

Mit der Forschungsgruppe von Francesco Baldini vom CNR-IFAC in Florenz, Italien bestand ein reger Austausch und eine gemeinsame Forschung bezüglich der Oberflächenchemie und

Regeneration der Oberflächen. Das Spotten partieller Flächen wurde untersucht und erforscht um zum heterogenen Immunoassay der Projektpartner eine mögliche Alternative anzubieten. Kathrin Freudenberger aus der gleichen Arbeitsgruppe von Professor Gauglitz hat sich in ihrer Dissertation mit der Assayentwicklung für das Therapeutische Drug Monitoring von Immunsuppressiva auseinandergesetzt.

Ausblick:

Weiterentwicklungsmöglichkeiten des Messaufbaus

Der erhaltene LIF-Messaufbau kann zur Verwendung in einem POCT-Gerät zu Messungen in Patientendialysat weiterentwickelt werden. Es kann zu einem Gerät, welches den Sicherheitsrichtlinien von Intensivstationen entspricht und klein und kompakt am Patientenbett Platz findet umgebaut werden. Dann kann es von Pflegepersonal bedient werden und Einwegkomponenten und Reagenzien einfach tauschbar sein.

Im Fall des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) von Immunsuppressiva gibt es einige besondere Anforderungen an ein POCT-Gerät. Die zu detektierenden hydrophoben Arzneistoffe sind in großen Teilen an Blutbestandteile gebunden. Die freie, ungebundene Fraktion kann allerdings von den Immunoassays detektiert werden, sie liegt jedoch teilweise in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Die LOD und LOQ der Zentrallabore muss erreicht werden und optimierte und zuverlässige Immunoassays das zentrale Element des POCT-Gerätes sein.

Notwendigkeit eines POCT-Gerätes für TDM

Der LIF-Messaufbau soll in ein POCT-Gerät integriert werden, welches Wirkstoffkonzentrationen im Blut von Patienten (TDM) misst. Bei organtransplantierten Patienten muss das Immunsystem durch Immunsuppressiva unterdrückt werden. Nach einer Transplantation, in den ersten 48 - 72 h nach der Operation und in manchen Fällen noch länger kann die benötigte Dosierung nicht vorhergesagt werden. Sie muss durch engmaschige Messungen im Patientenblut bestimmt und dann angepasst werden. So können starke Nebenwirkungen bis hin zu Organabstoßungen durch Fehldosierungen vermieden werden. Momentan werden die Messungen mittels LC-MS/MS in Zentrallaboren von Krankenhäusern durchgeführt. In Zukunft können POCT-Geräte am Patientenbett zu engmaschigeren Messungen und einer besseren Überwachung der Wirkstoffspiegel führen und dadurch den klinischen Outcome der Patienten signifikant verbessern.

Das Forschungsprojekt Nanodem, im Rahmen dessen die Dissertation durchgeführt wurde, wurde im Framework 7 von der Europäischen Union unter der Nummer 318372 gefördert.

6. Literaturverzeichnis

1. Sackmann, E.K., A.L. Fulton, and D.J. Beebe, *The present and future role of microfluidics in biomedical research*. Nature, 2014. **507**(7491): p. 181-189.
2. Hughes, M., *Market Trends in Point-Of-Care Testing*. Point of Care, 2002. **1**(2): p. 84-94.
3. Gauglitz, G. and H. Löbert, *Fluoreszenz*. www.chemgapedia.de, 1996.

4. Jablonski, A., *Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes*. Nature, 1933. **131**: p. 2.
5. Gauglitz, G., et al., *Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers*. Sens. Actuators, B, 1993. **11**(1-3): p. 21-7.
6. Tetin, S.Y. and S.D. Stroupe, *Antibodies in diagnostic applications*. Curr Pharm Biotechnol, 2004. **5**(1): p. 9-16.
7. Hua, P., et al., *Integrated optical fluorescence multisensor for water pollution*. Optics Express, 2005. **13**(4): p. 1124-1130.
8. Chen, A. and S. Yang, *Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **71**(Supplement C): p. 230-242.
9. Lakhin, A.V., V.Z. Tarantul, and L.V. Gening, *Aptamers: Problems, Solutions and Prospects*. Acta Naturae, 2013. **5**(4): p. 34-43.
10. Padlan, E.A., *Anatomy of the antibody molecule*. Molecular Immunology, 1994. **31**(3): p. 169-217.
11. Shrive, A.K., et al., *Three dimensional structure of human C-reactive protein*. Nature Structural Biology, 1996. **3**: p. 346.
12. *English Oxford Dictionary*. <https://en.oxforddictionaries.com/>, 2018.
13. Sapsford, K.E., et al., *Demonstration of Four Immunoassay Formats Using the Array Biosensor*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(5): p. 1061-1068.
14. German, N., et al., *Determination of antibodies against human growth hormone using a direct immunoassay format and different electrochemical methods*. Analyst, 2013. **138**(5): p. 1427-1433.
15. Schult, K., et al., *Disposable Optical Sensor Chip for Medical Diagnostics: New Ways in Bioanalysis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(23): p. 5430-5435.
16. Rowe, C.A., et al., *Array Biosensor for Simultaneous Identification of Bacterial, Viral, and Protein Analytes*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(17): p. 3846-3852.
17. Schmidt, S.D., et al., *Abeta measurement by enzyme-linked immunosorbent assay*. Methods Mol Biol, 2012. **849**: p. 507-27.
18. Bleher, O., M. Ehni, and G. Gauglitz, *Label-free quantification of cystatin C as an improved marker for renal failure*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(1): p. 349-356.
19. Freudenberger, K., *Assayentwicklung für das Therapeutische Drug Monitoring von Immunsuppressiva*. Dissertation, 2017.
20. Kino, T., et al., *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro*. J Antibiot (Tokyo), 1987. **40**(9): p. 1256-65.
21. Borel, J.F., et al., *Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent*. Agents and Actions, 1976. **6**(4): p. 468-475.
22. Flanagan, W.M., et al., *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 803-807.
23. Burdmann, E.A., et al., *Cyclosporine nephrotoxicity*. Seminars in Nephrology. **23**(5): p. 465-476.
24. Martel, R.R., J. Klicius, and S. Galet, *Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1977. **55**(1): p. 48-51.
25. Allison, A.C., et al., *In vitro immunosuppressive effects of mycophenolic acid and an ester pro-drug, RS-61443*. Transplant Proc, 1991. **23**(2 Suppl 2): p. 10-4.
26. Ekberg, H., et al., *Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(25): p. 2562-2575.

27. Almeida, C.C., et al., *Safety of immunosuppressive drugs used as maintenance therapy in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(10): p. 1170-94.
28. Webster, A.C., et al., *Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data*. BMJ : British Medical Journal, 2005. **331**(7520): p. 810-810.
29. Matas, A.J., et al., *OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: Kidney*. American Journal of Transplantation, 2015. **15**(S2): p. 1-34.
30. Freudenberger, K., U. Hilbig, and G. Gauglitz, *Recent advances in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **79**: p. 257-268.
31. Kang, J.-S. and M.-H. Lee, *Overview of Therapeutic Drug Monitoring*. Korean J Intern Med, 2009. **24**(1): p. 1-10.
32. Johnston, A. and D.W. Holt, *Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1999. **47**(4): p. 339-350.
33. Krieg, A.K. and G. Gauglitz, *Ultrasensitive Label-Free Immunoassay for Optical Determination of Amitriptyline and Related Tricyclic Antidepressants in Human Serum*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(17): p. 8845-8850.
34. Kelly, K.A. and A.W. Butch, *Chapter 15 - Immunosuppressive Drug Monitoring: Limitations of Immunoassays and the Application of Liquid Chromatography Mass Spectrometry A2 - Dasgupta, Amitava*, in *Therapeutic Drug Monitoring*. 2012, Academic Press: Boston. p. 323-348.
35. Kuypers, D.R., *Influence of interactions between immunosuppressive drugs on therapeutic drug monitoring*. Ann Transplant, 2008. **13**(3): p. 11-8.
36. Wallemacq, P.E., *Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we?* Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(11): p. 1204-11.
37. Annesley, T.M., et al., *Standardization of LC-MS for therapeutic drug monitoring of tacrolimus*. Clin Chem, 2013. **59**(11): p. 1630-7.
38. Seger, C., et al., *A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples*. Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 526-34.
39. Streit, F., V.W. Armstrong, and M. Oellerich, *Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood*. Clin Chem, 2002. **48**(6 Pt 1): p. 955-8.
40. Luppa, P.B., et al., *Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(6): p. 887-898.
41. St John, A. and C.P. Price, *Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing*. The Clinical Biochemist Reviews, 2014. **35**(3): p. 155-167.
42. Gauglitz, G., *Point-of-care platforms*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2014. **7**: p. 297-315.
43. Pereira, A.T., et al., *Heterogeneous immunoassays in microfluidic format using fluorescence detection with integrated amorphous silicon photodiodes*. Biomicrofluidics, 2011. **5**(1): p. 014102.
44. Irawan, R., et al., *Integration of optical fiber light guide, fluorescence detection system, and multichannel disposable microfluidic chip*. Biomedical Microdevices, 2007. **9**(3): p. 413-419.

45. Li, H.F., et al., *A compactly integrated laser-induced fluorescence detector for microchip electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(12): p. 1907-15.
46. Seo, J. and L.P. Lee, *Disposable integrated microfluidics with self-aligned planar microlenses*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004. **99**(2–3): p. 615-622.
47. Kamei, T. and T. Wada, *Contact-lens type of micromachined hydrogenated amorphous Si fluorescence detector coupled with microfluidic electrophoresis devices*. *Applied Physics Letters*, 2006. **89**(11): p. 114101.
48. Berner, M., et al., *Silicon thin film photodetectors for multi-channel fluorescence detection in a microfluidic point-of-care testing device*. *Phys. Status Solidi A*, 2016. **213**(7): p. 1686-1696.
49. Anderson, G.W., J.E. Zimmerman, and F.M. Callahan, *N-Hydroxysuccinimide Esters in Peptide Synthesis*. *Journal of the American Chemical Society*, 1963. **85**(19): p. 3039-3039.
50. Cuatrecasas, P. and I. Parikh, *Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose*. *Biochemistry*, 1972. **11**(12): p. 2291-9.
51. Nakajima, N. and Y. Ikada, *Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media*. *Bioconjugate Chemistry*, 1995. **6**(1): p. 123-130.
52. Rau, S., U. Hilbig, and G. Gauglitz, *Label-free optical biosensor for detection and quantification of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in milk without any sample pretreatment*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. **406**(14): p. 3377-3386.
53. Hilbig, U., *Detektion des β 2GPI-Antikörpers zur Diagnostik des Antiphospholipidsyndroms mittels Reflektrometrischer Interferenzspektroskopie*. Diplomarbeit, 2011.
54. Schweizer, N., *Charakterisierung von Poly(ethylenglykol)-Derivaten für den Einsatz in der markierungsfreien optischen Biosensorik*. Dissertation, 2012.
55. Dankbar, D., *Photochemische Oberflächenmodifizierung für die Bioanalytik auf Kunststoffträgern*. Dissertation, 2005.
56. Dankbar, D., *Parallele photoinduzierte Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf Kunststoffträgern zur Herstellung von DNA-Mikroarrays*. Diplomarbeit, 2002.
57. Brecht, A. and G. Gauglitz, *Optimised layer systems for immunosensors based on the RIFS transducer*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1994. **349**(5): p. 360-366.
58. Schwarz, B., *Kinetische Analyse von Peptidarrays mittels bildgebender Reflektrometrischer Interferenzspektroskopie*. Dissertation, 2015.
59. Weber, P., *Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von Humanseren und markierten Antikörper-Antigen Paaren zur Entwicklung eines FRET basierenden Immunoassays*. Diplomarbeit, 2013.
60. Novak, L., et al., *An integrated fluorescence detection system for lab-on-a-chip applications*. *Lab on a Chip*, 2007. **7**(1): p. 27-29.
61. Webster, J.R., et al., *Monolithic Capillary Electrophoresis Device with Integrated Fluorescence Detector*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(7): p. 1622-1626.
62. Fu, J.-L., et al., *Laser-Induced Fluorescence Detection System for Microfluidic Chips Based on an Orthogonal Optical Arrangement*. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(11): p. 3827-3834.
63. Klotz, A., et al., *Immunofluorescence sensor for water analysis*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1998. **51**(1–3): p. 181-187.
64. Piunno, P.A., et al. *Toward the development of optical nucleic acid biosensors based on TIRF and TCSPC for high sensitivity determinations*. 2005.

65. Berrettoni, C., et al., *Optical Monitoring of Therapeutic Drugs with a Novel Fluorescence- Based POCT Device*. *Procedia Engineering*, 2014. **87**: p. 392-395.
66. Seidel, M. and R. Niessner, *Automated analytical microarrays: a critical review*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **391**(5): p. 1521.
67. Gauglitz, G.G. *Optical sensing: recognition elements and devices*. 2012.
68. Tsekenis, G., et al., *Laser Induced Forward Transfer: a study on the enhancement of sensitivity for multianalyte sensing*. *Stud Health Technol Inform*, 2016. **224**: p. 90-4.
69. Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz, *Verification of performance with the automated direct optical TIRF immunosensor (River Analyser) in single and multi-analyte assays with real water samples*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004. **20**(4): p. 743-752.
70. Gauglitz, G. and G. Proll, *Total Internal Reflection Fluorescence Sensing – Quality Assurance and Application to Water Analysis*, in *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I: Techniques*, U. Resch-Genger, Editor. 2008, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 415-428.
71. Gauglitz, G., *Direct optical detection in bioanalysis: an update*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. **398**(6): p. 2363-2372.
72. Chang, Y.-F., et al., *Use of liposomal amplifiers in total internal reflection fluorescence fiber-optic biosensors for protein detection*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. **77**: p. 1201-1207.
73. Krieg, A.K., *Immunoassay-Entwicklung für die optische Bestimmung von humaner Pankreas-Lipase und dem Arzneistoff Amitriptylin*. 2014.
74. Marcel, B., et al., *Laser-induced fluorescence detection platform for point-of-care testing*. *Measurement Science and Technology*, 2017. **28**(8): p. 085701.
75. Pike, D.J., et al., *Flow cell design for effective biosensing*. *Sensors*, 2013. **13**: p. 58-70.
76. Hemling, M., et al., *Microfluidics for High School Chemistry Students*. *Journal of chemical education*, 2014. **91**(1): p. 112-115.
77. Chabinyk, M.L., et al., *An Integrated Fluorescence Detection System in Poly(dimethylsiloxane) for Microfluidic Applications*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(18): p. 4491-4498.
78. Dovichi, N.J., et al., *Laser-induced fluorescence of flowing samples as an approach to single-molecule detection in liquids*. *Analytical Chemistry*, 1984. **56**(3): p. 348-354.
79. Budach, W., et al., *Planar Waveguides as High-Performance Sensing Platforms for Fluorescence-Based Multiplexed Oligonucleotide Hybridization Assays*. *Analytical Chemistry*, 1999. **71**(16): p. 3347-3355.
80. Xu, B., et al., *Line laser beam based laser-induced fluorescence detection system for microfluidic chip electrophoresis analysis*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2009. **152**(2): p. 168-175.
81. Inczedy, J., *IUPAC Compendium on Analytical Nomenclature 3rd. ed. (the "Orange Book")*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1998.
82. Wortmann, C., *Protokoll Schwerpunktspraktikum Analytische Chemie Immunologie*. Praktikum.
83. Green, N.M., *Avidin*, in *Advances in Protein Chemistry*, C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, and F.M. Richards, Editors. 1975, Academic Press. p. 85-133.
84. Holmberg, A., et al., *The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures*. *ELECTROPHORESIS*, 2005. **26**(3): p. 501-510.

85. Wolter, A., R. Niessner, and M. Seidel, *Preparation and Characterization of Functional Poly(ethylene glycol) Surfaces for the Use of Antibody Microarrays*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(12): p. 4529-4537.
86. Tschmelak, J., et al., *Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: antibody characterization, assay development and real sample measurements*. *Talanta*, 2006. **69**(2): p. 343-50.
87. Rau, S. and G. Gauglitz, *Reflectometric interference spectroscopy (RIFS) as a new tool to measure in the complex matrix milk at low analyte concentration*. *Anal Bioanal Chem*, 2012. **402**(1): p. 529-36.

7. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Begriffe:

AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
CDRs	Complimentary determining regions
EQE	External Quantum Efficiency
LIF	Laser induzierte Fluoreszenz
LOD	Level of Detection
LOQ	Level of Quantification
MW	Mittelwert
POCT	Point-of-Care Testing
R	Brechungsindex
RIFS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RT	Raumtemperatur
TIRF	Totale Interne Reflektions Fluoreszenzspektroskopie
TDM	Therapeutic Drug Monitoring

Chemikalien:

AMD	Aminodextran
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
Glycerin	Propan-1,2,3-triol
GndCl	Guanidiniumchlorid
MPA	Mycophenolsäure
Mylar	biaxial orientierte Polyesterfolie
New Coccine	Cochenillerot A
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PC	Phosphatidylcholin
PDMS	Polydimethylsiloxan

PE	Polyethylen
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
SDS	Natriumlaurylsulfat

Biochemikalien und Sonstige:

AK	Antikörper
C	Cholesterol
CL	Cardiolipin
CsA	Cyclosporin A
FNPs	Fluoreszierende Nanopartikel
FPs	Fluoreszierende Partikel
fsAKs	Fluoreszierende Sekundärantikörper
HS	Humanserum
MNPs	Magnetische Nanopartikel
MPA-AKs	Anti-Mycophenolsäure Antikörper
MPs	Magnetische Partikel
PC	Phosphoatidylcholin
Tac	Tacrolimus

Reagenzien:

PBS	Phosphatgepufferte Pufferlösung
Reinstwasser	Vollentsalztes Wasser aus einer Ionentauschanlage mit einer reversen Osmose Anlage aufbereitet

8.2. Akademische Lehrer

Prof. Dr. Gauglitz, Prof. Dr. Weimar, Prof. Dr. Huhn, Prof. Dr. Böckler, Prof. Dr. Daniels, Prof. Dr. Drews, PD Dr. Bertolt Gust, Prof. Dr. Heide, Jun.-Prof. Dr. Pierre Koch, Prof. Dr. Krippeit-Drews, Jun.-Prof. Dr. Lukowski, Prof. Dr. Laufer, Prof. Dr. Ruth, Prof. Dr. Wahl, PD Dr. Zimmermann, Prof. Dr. von Angerer, Prof. Dr. Bernhardt, Prof. Dr. Buschauer, Prof. Dr. Elz, Prof. Dr. Göpferich, Prof. Dr. Heilmann, Prof. Dr. Mahboobi, PD Dr. Andrea Strasser

8.3. Förderhinweis

Teile der Arbeit wurden von der Europäischen Union im Framework Programm Nr. 7 unter der Kennung: [FP7/2007-2013], grant agreement Nr. 318372, <http://nanodem.ifac.cnr.it>, gefördert.

8.4. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Urs Hilbig
Adresse: Albblick 1
73730 Esslingen
Email: urs.hilbig@googlemail.com
Geburtsdatum: 03.10.1984
Geburtsort: Nürtingen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung:

Schule	
2004	Abitur: Bildungszentrum Nord in Reutlingen
Zivildienst	
2004-2005	Hausmeister an der Volkshochschule Reutlingen
Studium	
2005-2011	Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg und Tübingen
2011	Diplomarbeit: "Detektion des β 2GP-I Antikörpers zur Diagnostik des Antiphospholipidsyndroms mittels Reflektometrischer Interferenspektroskopie" Institut für physikalische und theoretische Chemie Prof. Gauglitz & Pharmazeutische Technologie Prof. Daniels, Universität Tübingen,
Seit 2011 bis 2017	Dissertation im Arbeitskreis Prof. Gauglitz

8.5. Publikationen

8.5.1. Paper

2012	U. Hilbig , O. Bleher, A. Le Blanc, G. Gauglitz: "A biomimetic sensor surface to detect anti- β 2-glycoprotein-I antibodies as a marker for antiphospholipid syndrome", Analytical and Bioanalytical Chemistry 403 (3), 713-717, DOI 10.1007/s00216-012-5831-z
2013	S. Rau, U. Hilbig , G. Gauglitz: „Markierungsfreie Optische Detektion von Schmerzmitteln in Fließgewässern“, Tagungsband 11. Dresdner Sensor-Symposium, Biosensorik und Point of Care, 205-208, DOI: 10.5162/11dss2013/A21.
2013	U. Hilbig , O. Bleher, A. Le Blanc, G. Proll, S. Rau, G. Gauglitz „Eine biomimetrische Sensoroberfläche zur Detektion von Autoantikörpern, welche beim Antiphospholipidsyndrom gebildet werden“, Tagungsband 11. Dresdner Sensor-Symposium, Biosensorik und Point of Care, 159-162, DOI: 10.5162/11dss2013/A7
2014	S. Rau, N. Scheibe, U. Hilbig , W. von Tümpling, G. Gauglitz „Entwicklung eines markierungsfreien Biosensors zum Nachweis von Diclofenac in abwasserbelasteten Oberflächengewässern“, Mitt Umweltchem Ökotox 20, 1, 2-5.
2014	S. Rau, U. Hilbig , G. Gauglitz: "Label-free optical biosensor for detection and

	<i>quantification of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in milk without sample-pretreatment</i> , Anal Bioanal Chem 406, 3377-3386, DOI: 10.1007/s00216-014-7755-2.
2014	P. Fechner, O. Bleher, M. Ewald, K. Freudenberge, 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: „ <i>Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction</i> “, Analytical and Bioanalytical Chemistry 406, 4033-4051, DOI: 10.1007/s00216-014-7834-4
2015	K. Freudenberger, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Optische Sensoren in medizinischer Diagnostik und Umweltanalytik</i> “ GDCh, Aktuelle Wochenschau: Woche 31 – Licht in der Diagnostik, http://www.aktuelle-wochenschau.de/main-navi/archiv/chemie-und-licht-2015/kw31-licht-in-der-diagnostik-optische-sensoren-in-medizinischer-diagnostik-und-umweltanalytik.html
2015	U. Hilbig , C. Keck, G. Gauglitz: „ <i>Vorarbeiten zur Entwicklung eines Immunoassays zur Schnelldiagnose von kardialem Troponin I bei Myokardinfarkten</i> “, 12. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland, DOI: 10.5162/12dss2015/P9.7
2016	K. Freudenberger, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Recent advances in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs</i> “, Trends in Analytical Chemistry Volume: 79, Pages: 257-268, 2016
2016	M. Berner, R. Rothmund, S. Vollmer, M. Schubert, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Silicon thin film photodetectors for multi-channel fluorescence detection in a microfluidic point-of-care testing device</i> “, Physica Status Solidi A: Applications and Materials Science, Volume: 213, Issue: 7, Pages: 1686-1696, July 2016
2017	M. Berner, U. Hilbig , M. Schubert, G. Gauglitz: „ <i>Laser-induced fluorescence detection platform for point-of-care testing</i> “, Measurement Science and Technology, Volume: 28, Number: 8, 2017

8.5.2. Sonstige Publikationen

2011	U. Hilbig : „ <i>Detektion des β_2GP-I Antikörpers zur Diagnostik des Antiphospholipidsyndroms mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie</i> “, Diplomarbeit
2012	S. Rau, U. Hilbig : „ <i>Fouth EuCheMS Chemisty in Prague, Czech Republic</i> “, Analytical and Bioanalytical Chemistry 405, 19-20, DOI: 10.1007/s00216-012-6520-7
2014	S. Rau, P. Weber, U. Hilbig , K. Freudenberger, J. Widmaier: „ <i>Europt(r)ode XII: Twelfth European conference on optical chemical sensors and biosensors.</i> “, Analytical and Bioanalytical Chemistry 406, 5253-5254, DOI: 10.1007/s00216-014-7957-7
2014	J. Widmaier, K. Freudenberger, S. Rau, U. Hilbig : „ <i>11th Dresdner Sensor Symposium - a conference on sensors, measurement techniques, and medical engineering</i> “, Analytical and Bioanalytical Chemistry 406, 3257-3258, DOI: 10.1007/s00216-014-7652-8.

8.5.3. Poster

2012	U. Hilbig , O. Bleher, A. Le Blanc, G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>A biomimetic surface to detect anti-β_2-glycoprotein-I antibodies as a marker for antiphospholipid syndrome</i> “, 4 th EuCheMS Congress, Prag, Tschechien
2013	P. Weber, U. Hilbig , G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>Characterization of optical properties of human sera to detect laboratory parameters via fluorescence markers</i> “, Euroanalysis XVII, Warsaw, Polen
2013	K. Freudenberger, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Entwicklung eines optischen Sensors zur Bestimmung von Immunsuppressiva in Blut</i> “, GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2013, Darmstadt, Deutschland
2013	U. Hilbig , O. Bleher, A. Le Blanc, G. Proll, S. Rau, G. Gauglitz: „ <i>Eine biomimetrische Sensoroberfläche zur Detektion von Autoantikörpern, welche beim Antiphospholipidsyndrom gebildet werden</i> “, 11. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland
2013	S. Rau, N. Scheibe, U. Hilbig , W. von Tümpling, G. Gauglitz: „ <i>Markierungsfreie optische Detektion von Schmerzmitteln in Fließgewässern</i> “, 11. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland
2014	P. Weber, U. Hilbig , G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>Development of a FRET Immunoassay for the detection of CRP in human sera</i> “, Analytica, München, Deutschland
2014	U. Hilbig , O. Bleher, A. Le Blanc, G. Proll, S. Rau, G. Gauglitz: „ <i>A biomimetic sensor surface to detect autoantibodies directed against β_2-glycoprotein-I and cardiolipin in antiphospholipid syndrome disease</i> “, EUROPT(R)ODE XII, Athen, Griechenland
2014	P. Weber, U. Hilbig , G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>Development of a homogeneous immunoassay in human sera to detect CRP via FRET</i> “, EUROPT(R)ODE XII, Athen, Griechenland
2015	K. Freudenberger, U. Hilbig , F. Salis, G. Orellana, A. Descalzo, G. Gauglitz: „ <i>Therapeutisches Drug Monitoring von Immunsuppressiva mittels eines Biosensors</i> “, Anakon 2015, Graz, Österreich
2015	P. Weber, U. Hilbig , G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>Entwicklung eines FRET basierenden homogenen Immunoassays zur Detektion von CRP</i> “, 9. Deutsches BioSensor Symposium – DBS 2015, München, Deutschland
2015	U. Hilbig , C. Keck, G. Gauglitz: „ <i>Preparatory work for the development of an immunoassay to detect cardiac troponin I in myocardial infarctions</i> “, BBMEC: 11 th Workshop on Biosensors & Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food & Clinical Analytics, Regensburg, Deutschland
2015	K. Freudenberger, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>An optical sensor for therapeutic drug monitoring of tacrolimus and mycophenolic acid</i> “, BBMEC: 11 th Workshop on Biosensors & Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food & Clinical Analytics, Regensburg, Deutschland
2015	U. Hilbig , C. Keck, G. Gauglitz: „ <i>Vorarbeiten zur Entwicklung eines Immunoassays zur Schnell diagnose von kardialem Troponin I bei Myokardinfarkten</i> “, 12. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, Deutschland
2016	U. Hilbig , M. Berner, K. Freudenberger, M. Schubert, G. Gauglitz: „ <i>Efficient electromagnetic trapping of magnetic particles for the application in immunoassays</i> “, EUROPT(R)ODE XIII, Graz, Österreich
2016	K. Freudenberger, U. Hilbig , F. Salis, A. Descalzo, G. Orellana, G. Gauglitz: „ <i>An optical biosensor for cyclosporine A</i> “, Analytica, München, Deutschland

2017	U. Hilbig , K. Freudenberger, M. Berner, M. Schubert, G. Gauglitz: „ <i>Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants in a novel laser induced fluorescence Point-of-Care Testing based approach</i> “, 3. Münchner POCT Symposium, München, Deutschland
2017	U. Hilbig , K. Freudenberger, M. Berner, M. Schubert, J. Stüb, G. Gauglitz: „ <i>Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants in a novel laser induced fluorescence based miniaturized setup</i> “, First european/ Zehntes deutsches BioSensor Symposium, Potsdam, Deutschland
2017	M. Berner, M. Schubert, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Integrierbare Dünnschichtphotodioden-Arrays für Biosensoren-Transducer</i> “, Anakon 2017, Tübingen, Deutschland

8.5.4. Vorträge

2013	U. Hilbig , O. Bleher, A. Le Blanc, G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>A biomimetic sensor surface to detect anti-cardiolipin antibodies as a marker for antiphospholipid syndrome via reflectometric interference spectroscopy (RIFS)</i> “, 7. Interdisziplinäres Doktorandenseminar, Arbeitskreis Prozessanalytik, Berlin, Deutschland
2013	P. Weber, U. Hilbig , G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>Charakterisierung optischer Eigenschaften von Seren zur Detektion von Blutparametern mittels Fluoreszenzmarkern</i> “, 7. Interdisziplinäres Doktorandenseminar, Arbeitskreis Prozessanalytik, Berlin, Deutschland
2013	U. Hilbig , O. Bleher, A. Le Blanc, G. Proll, G. Gauglitz: „ <i>A biomimetic sensor surface to detect markers for the antiphospholipid syndrome via reflectometric interference spectroscopy (RIFS)</i> “, 8. Deutsches BioSensor Symposium – DBS 2013, Wildau, Deutschland
2013	S. Rau, N. Scheibe, W. von Tümpling, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Erster markierungsfreier optischer Biosensor zum Nachweis von Diclofenac in Fließgewässern</i> “, Forum junger Umweltwissenschaftler der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh, Blomberg, Deutschland
2013	S. Rau, N. Scheibe, W. von Tümpling, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Label-free optical biosensor for detection and quantification of diclofenac in food of animal origin and river water</i> “, GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2013, Darmstadt, Deutschland
2015	U. Hilbig , S. Rau, P. Weber, G. Gauglitz: „ <i>Ein Reflektometrischer Interferenzspektroskopie Multispotsensor zur Charakterisierung von Oberflächen in der flüssigen Phase und zur Charakterisierung von Flusseigenschaften in mikrofluidischen Aufbauten</i> “, 9. Deutsches BioSensor Symposium – DBS 2015, München, Deutschland
2016	K. Freudenberger, U. Hilbig , G. Gauglitz: „ <i>Development of a biosensor for determination of immunosuppressive drugs</i> “, DAAS Doktorandenseminar, Ulm, Deutschland
2016	U. Hilbig , K. Freudenberger, M. Berner, M. Schubert, F. Salis, A. Descalzo, G. Orellana, G. Gauglitz: „ <i>Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants in recently transplanted patients using a novel fluorescence based measurement device</i> “, 7 th EuCheMS Chemistry Congress, Sevilla, Spanien
2017	K. Freudenberger, U. Hilbig , M. Schubert, G. Gauglitz, M. Berner: „ <i>Immunoassay</i> “

	zur <i>Detektion von Immunsuppressiva mittels Laser-induzierter Fluoreszenz</i> “, Anakon 2017, Tübingen, Deutschland
--	--