

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin (IKET) und Zentrum für Klinische
Transfusionsmedizin (ZKT) der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Manuela Schoch
aus
Bautzen

2010

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin (IKET) und Zentrum für Klinische
Transfusionsmedizin (ZKT) der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Manuela Schoch
aus
Bautzen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein

Diese Dissertation entstand in der Zeit von Mai 2007 bis Dezember 2008 innerhalb der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des Instituts für Experimentelle und Klinische Transfusionsmedizin unter der Leitung von Dr. rer. nat. Frank K. Gehring. Die Begutachtung wurde von Professor Dr. H. Northoff, Universität Tübingen und Professor Dr. G. Klein, Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart, vorgenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Einführung.....	3
1.2 Blutzusammensetzung und Funktion.....	4
1.3 Blutgruppensysteme.....	5
1.4 Lektine und Neutraavidin.....	8
1.4.1 Allgemein.....	8
1.4.2 Das Biotin-Avidin System (Neutraavidin).....	9
1.4.3 Dolichos biflorus Agglutinin (DBA).....	11
1.4.4 Euonymus Europaeus Lektin (EEL).....	11
1.4.5 Concanavalin Agglutinin (CON-A).....	11
1.4.6 Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E).....	12
1.5 Biosensoren.....	12
1.5.1 Massensensitive Sensoren.....	13
1.5.2 QCM als Immunosensor.....	14
1.5.3 Sensorbeschichtung.....	15
1.6 Dummy System.....	16
1.7 FidgeType Fg T1 Anlage.....	17
1.8 Ziel der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Labormaterialien.....	20
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	21
2.1.4 Beschichtung / Lektine.....	23
2.1.5 Blut- und Plasmaproben.....	23
2.1.6 QCM-Sensor.....	24
2.1.7 Dummy-System.....	24
2.1.8 FidgeType Fg T1 Anlage.....	25
2.1.9 Software.....	25
2.1.10 Geräte.....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Probenvorbereitung Blut und Plasma.....	26
2.2.2 Quarzvorbereitung, Quarzbeschichtung und Einbau in die Messkammer.....	27
2.2.3 Messung im Dummy-System.....	29
2.2.4 Dokumentation und Auswertung (Dummy-System).....	31
2.2.5 Messung auf FidgeType Fg T1 Anlage.....	33
2.2.6 Dokumentation und Auswertung (FidgeType Anlage).....	35
2.2.7 Recycling des Schwingquarzes.....	38
2.2.8 Reinigung Dummy-System und FidgeType Anlage.....	39
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Messungen Dummy-System.....	40
3.1.1 Neutraavidin (NAV) auf Dummy-Anlage.....	40
3.1.2 Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) auf Dummy-Anlage.....	41
3.1.3 Euonymus Europaeus Lektin (EEL) auf Dummy-Anlage.....	44
3.1.4 Concanavalin Agglutinin (CON-A) auf Dummy-Anlage.....	48
3.1.5 Phaseolus vulgaris Agglutinin (PHA-E) auf Dummy-Anlage.....	51
3.2 Messungen FidgeType Anlage.....	55
3.2.1 Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) auf FidgeType Anlage.....	56
3.2.2 Euronimus Europaeus Lektin (ELL) auf FidgeType Anlage.....	61
3.2.3 Concanavalin Agglutinin (CON-A) auf FidgeType Anlage.....	65
3.2.4 Phaseolus vulgaris Agglutinin (PHA-E) auf FidgeType Anlage.....	68

Inhaltsverzeichnis

3.3	Wiederverwendung der Schwingquarze und Einflüsse des Plasmas.....	70
3.3.1	Elutions- und Inhibitionsversuche mit Zucker.....	70
3.3.2	Regeneration von Schwingquarzen.....	79
3.3.3	Online-Beschichtung in der FidgeType Anlage.....	80
3.3.4	Einflüsse des Plasmas.....	81
4	Diskussion	89
4.1	Stand der Wissenschaft.....	89
4.2	Diskussion der Methode	89
4.3	Diskussion der Ergebnisse im Dummy-System.....	90
4.3.1	Neutravidin.....	90
4.3.2	DBA	91
4.3.3	EEL	91
4.3.4	CON-A	92
4.3.5	PHA-E.....	93
4.4	Diskussion der Ergebnisse in der FidgeType Anlage.....	93
4.4.1	DBA	94
4.4.2	EEL	95
4.4.3	CON-A	95
4.4.4	PHA-E.....	96
4.5	Diskussion der Ergebnisse zum Recycling und Einfluss des Plasmas	96
4.5.1	Zuckermessungen	97
4.5.2	Recycling	98
4.5.3	Online-Beschichtung.....	99
4.5.4	Einflüsse der Plasmas	99
4.5.5	Schlussfolgerungen	100
5	Zusammenfassung	101
6	Anhang	103
6.1	Verzeichnis der Abkürzungen.....	103
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Danksagung.....	109
9	Lebenslauf	110

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Entdeckung des AB0-Blutgruppensystems ist auf Landsteiner und zwei seiner Schüler im Jahr 1900 zurückzuführen. Durch die Erkenntnisse über den Agglutinationsprozess von Erythrozyten [41, 42] wurden die Grundlagen für die heutigen Standards der Serologie und Transfusionsmedizin gelegt. Die Wissenschaft der Serologie, d.h. die Lehre der Bildung und Wirkung von Antikörpern, stellt heute einen wichtigen Teil der Blutanalytik dar. Für den sicheren klinischen Einsatz von Blutkomponenten sind die Blutgruppen- und Blutantikörperbestimmungen in der modernen Medizin unverzichtbar.

Seit über 100 Jahren werden Blutgruppenbestimmungen durchgeführt. Flächendeckend wurde ein Netz aus Blutbanken und transfusionsmedizinischen Instituten aufgebaut, welches seit den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts rasant zugenommen hat. Doch im Vergleich dazu hat sich die Technik der Blutgruppenbestimmung nur langsam weiterentwickelt. Das vorherrschende Grundprinzip der optischen beziehungsweise visuellen Beurteilung der Agglutination [69] wurde im Laufe der Jahre optimiert und variiert, aber viele Untersuchungen werden auch heute von „Hand“ durchgeführt. Viele Prozesse lassen sich automatisieren, diese stoßen aber durch das uneinheitliche Substanzgemisch Blut bei der optischen Verifikation der Ergebnisse, d.h. die Kontrolle der Agglutination durch Vergleich mit in einer Datenbank hinterlegten Bildern, gelegentlich an ihre Grenzen. Ein großes maschinelles System und ein erheblicher Zeitaufwand sind bislang immer erforderlich.

Bisher gab es nur wenige Ansätze für alternative Verfahren zur Blutgruppenbestimmung. Zum Beispiel hatte Aizawa 1980 die elektrochemische Separation von AB0-Blutgruppen beschrieben [1].

Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von Biosensoren dar. Dabei werden die vom Analyten ausgehenden Informationen in elektrische Signale umgewandelt. Die ersten Ansätze, bei denen aus einer Blutprobe erfolgreich Erythrozyten mit einem Antikörperbeschichteten Schwingquarz separiert wurden konnten, wurden 1993 von König und Gräzel [38, 39] formuliert. Erste

Blutgruppenbestimmungen mit einem antikörperbeschichteten Quartz-Crystal-Mikrobalance-Biosensor konnten 2001 durch Krapf [40] realisiert werden. Diese Methode wurde 2006 durch Gehring [24] verfeinert und auf der selbstentwickelten FidgeType FgT1 Anlage zur automatisierten Blutgruppenbestimmung eingesetzt.

Die Problematik bei dem Einsatz von Biosensoren besteht in der Tatsache, dass es sich bei der sensitiven Schicht um biologisches Material handelt, welches auf eine künstliche Oberfläche angekoppelt werden muss, ohne die biologische Aktivität zu beeinträchtigen.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Optimierung von Beschichtungen eines QCM-Biosensors mittels Lektinen zur Analyse der Blutgruppeneigenschaften im AB0-System.

Die biologischen und technischen Grundlagen der Blutgruppenbestimmung, die neu entwickelte Technik zur Blutgruppenanalyse mittels Schwingquarzen und die Darstellung der Technik des sog. Dummy-Systems wurden bereits von Cluss [12] beschrieben. Die erzielten Ergebnisse dienen als Grundlage für die in dieser Arbeit neu entwickelten Schichtsysteme auf der Basis von Lektinen, welche im Dummy-System entwickelt und auf der FidgeType Anlage überprüft wurden.

1.2 *Blutzusammensetzung und Funktion*

Blut setzt sich aus einem festen (korpuskulären) und flüssigen (Plasma) Anteil zusammen. Es besteht hauptsächlich aus Wasser, in dem Elektrolyte, wasserlösliche Nährstoffe und Vitamine sowie Gase gelöst sind. Diese wässrige Lösung enthält ebenfalls Proteine, an die teilweise schlecht wasserlösliche Substanzen angelagert sind. Der pH-Wert des Blutes ist 7,4. Beim Erwachsenen beträgt der Anteil des Blutvolumens 6 bis 8% der fettfreien Körpermasse. Das normale Blutvolumen für Frauen liegt bei 4 bis 4,5l und für Männer bei 4,5 bis 5l und trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung des Blutkreislaufes bei. Der korpuskuläre Anteil des Blutes besteht aus verschiedenen Zellpopulationen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) und beträgt 45 bis 55% des gesamten Blutvolumens, wobei der Anteil der

Erythrozyten (>90%) am dominantesten ist. Hingegen tragen Thrombozyten ca. 6% und Leukozyten weniger als 1% zum Blutvolumen bei.

Blutplasma wird durch Entfernung der korpuskulären Bestandteile aus dem Blut hergestellt und besteht zu 90% aus Wasser. Von den festen Substanzen machen hochmolekulare Proteine ca. 2/3 aus, die restlichen sind niedermolekulare Stoffe und Elektrolyte. Die Gesamtheit der im Plasma gelösten Substanzen hat eine osmolale Konzentration von 290mosm/kg Wasser, den größten Anteil haben Natriumionen als Kationen und Chlorid- und Bicarbonationen als Anionen. Die enthaltenen Plasmaproteine sind zu 60-80% Albumine, zu 20-40% Globuline und zu ca. 4% Fibrinogen. Das Albumin hat neben der Funktion als Transportprotein einen wesentlichen Anteil an der Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes im Gewebe.

Erythrozyten sind kleine kernlose bikonkave Scheiben mit einem Durchmesser von 7,5µm, einer Randdicke von 2µm und einer zentralen Dicke von 1µm. Das mittlere Zellvolumen beträgt 92µm³ und die Masse ca. 28 bis 33pg. Der Gastransport stellt die Hauptaufgabe der Erythrozyten dar. Die bikonkave Scheibenform ermöglicht ein hohes Oberflächen / Volumenverhältnis, sowie eine kurze Diffusionsstrecke zwischen Sauerstoff und Hämoglobin. Die gute Verformbarkeit der Erythrozyten während der Kapillarpassage verbessert deutlich die rheologischen Eigenschaften des Blutes. Die mittlere Lebensdauer der roten Blutkörperchen beträgt 120 Tage [37].

1.3 Blutgruppensysteme

Unter Blutgruppen im engeren Sinne versteht man alle genetisch determinierten Erythrozyteneigenschaften, die durch das Vorhandensein spezifischer Antigene auf der Erythrozytenmembran charakterisiert und mit serologischen Labormethoden nachweisbar sind. Diese Antigene sind in Ihrem Aufbau genetisch festgelegt und spielen eine zentrale Rolle bei der Definition der immunologischen Identität. Antigene sind makromolekulare Strukturen, die in einem fremden Organismus eine Immunreaktion hervorrufen können. Durch die Blutgruppenantigene kann das menschliche Immunsystem zwischen eigenen und fremden Erythrozyten unterscheiden und gezielt gegen fremde

Erythrozytenantigene vorgehen [18]. Die determinierenden Blutgruppengene sind schwache Histokompatibilitätssysteme, sie sind an der Modulation zellulärer Abwehrmechanismen beteiligt. Die chronische „graft-versus-host-Reaktion“ nach Knochenmarktransplantation wird z.B. über genetische Differenzen in den Blutgruppensystemen von Spender und Empfänger vermittelt [5, 19]. Die Blutdiagnostik besitzt daher eine zentrale Stellung in der Transfusions- und Transplantationsmedizin und ermöglicht eine Typisierung von Antigenen und Antikörpern von Spendern und Empfängern, um eine Versorgung mit kompatiblen Blutprodukten zu gewährleisten. Blutgruppenantigene befinden sich nicht nur auf Erythrozyten, sondern kommen ebenfalls auf vielen anderen Körperzellen (Endothelzellen, Epithelzellen, Thrombozyten, Leukozyten) und in Körperflüssigkeiten vor. Des Weiteren sind sie nicht nur auf den Menschen beschränkt, sondern sind bei Tieren, Mikroorganismen und Pflanzen zu finden [18].

Das AB0-System ist das wichtigste Blutgruppensystem und wurde 1900 von Landsteiner [41] entdeckt. Dieses System basiert auf dem Vorkommen natürlicher Antikörper (Isoagglutinine) gegen die A- und B-Antigene auf der Erythrozytenoberfläche. Durch Familienuntersuchungen im AB0-System konnte erstmalig die Vererbbarkeit der Blutgruppenantigene 1924 durch Bernstein [6] postuliert werden. Landsteiner und Wiener beschrieben 1940 erstmalig die Rhesusblutgruppen [44]. Die Entdeckung einzelner Blutgruppensysteme reicht bis in die heutige Zeit, es konnten bisher etwa 20 Blutgruppensysteme beschrieben werden. Die klinische Relevanz ist unterschiedlich stark.

In dieser Arbeit steht das AB0-Blutgruppensystem im Mittelpunkt. Im AB0-System werden insgesamt die vier Hauptblutgruppen A, B, AB und 0 unterschieden.

Chemisch handelt es sich bei den Blutgruppenantigenen A und B um endständige Kohlenhydratabschnitte, die von spezifischen Glykosyltransferasen an die H-Substanz „angehängt“ werden. Die H-Substanz der Erythrozyten entsteht aus einer sogenannten Vorstufensubstanz (Präcursorsubstanz). Von dieser Präcursorsubstanz sind insgesamt sechs Typen bekannt, von denen die Typen 1-4 und 6 beim Menschen vorkommen. Des Weiteren kommen in

Körpersekreten und Plasma Typ1 ABH-Antigene und Lewis-Strukturen (blutgruppenähnliche Antigene) vor. Typ 2-Strukturen stellen die wichtigsten ABH-Oligosaccharide auf Erythrozyten dar, kommen aber auch in Sekreten vor. Bei dem seltenen Bombay-Phänotyp (O_h), bei dem das rezessive Merkmal h in homozygoter Form geerbt wurde, fehlt die H-Eigenschaft im gesamten Körper. Auch die A- und B-Merkmale sind bei solchen hh-Individuen nicht feststellbar. Bei Bombay-Individuen liegt neben Anti-A und Anti-B ein Anti-H im Serum vor. Oberflächlich wirken sie phänotypisch als „0“.

Typ	Struktur
Typ 1	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$
Typ 2	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$
Typ 3	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{R}$
Typ 4	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$
Typ 5	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{R}$
Typ 6	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{R}$

Tabelle 1: Präcursorsubstanzen [34]

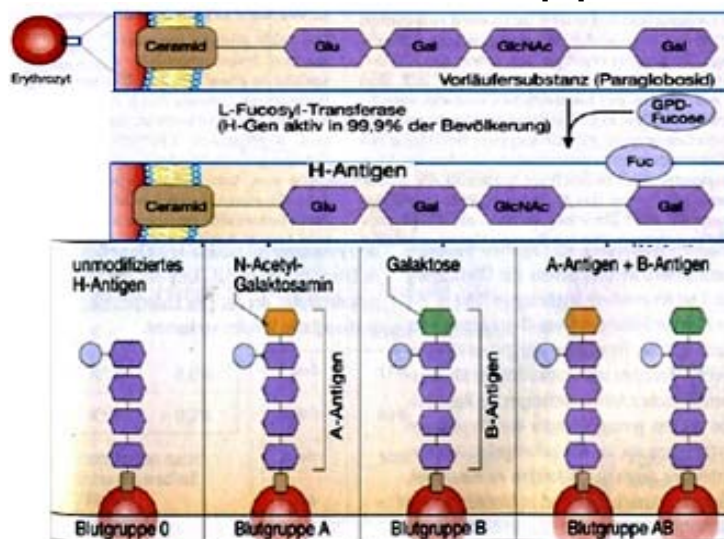


Abbildung 1: Entstehung der ABO-Antigene [8]

Bei 80% der Individuen lassen sich im Speichel und anderen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blutplasma, Muttermilch, Tränenflüssigkeit und Aszitis H-Antigene und Sekretoreigenschaften nachweisen. Diese Ausscheider werden Sekretoren (Genotyp SeSe oder Sese) genannt. Bei den Nichtsekretoren (20% der Individuen, Genotyp sese) fehlen sie. Die Kodierung erfolgt durch benachbarte Gene auf Chromosom 19. Ein anderes Blutgruppensystem, das Lewis-System interferiert mit diesem Sekretorenstatus.

Die Lewis-Antigene (Le, le) werden als Blutgruppenantigene betrachtet, obwohl sie nicht auf den Erythrozyten selbst synthetisiert werden. Sie entstehen im Plasma und werden anschließend auf die Erythrozytenmembran absorbiert. Es existieren ein dominantes Le und ein stummes le Allel. Sekretoren wandeln den überwiegenden Anteil ihrer Le (a) Substanz in Le (b) Substanz um, sodass praktisch keine Le (a) Substanz mehr nachweisbar ist. Personen, die nach dem AB0-Blutgruppensystem Sekretoren sind, sind daher in diesem System Le(a-b+). Sogenannte Nicht-Sekretoren scheiden nach dem AB0-System keine Blutgruppenantigene aus, sie sind im Lewis-System Le(a+b-). Bei Personen, die Le(a-b-) sind, fehlt das Le-Gen komplett und es werden keinerlei Lewis-Substanzen gebildet. Eine Zuordnung zum Sekretorstatus ist in diesem Fall nicht möglich. Die meisten Antikörper des Lewis-Systems stellen die natürlich vorkommenden IgM Antikörper dar. Sie kommen relativ häufig (1%) vor und werden von Le(a-b-) Individuen gebildet. Es wurden reine Anti-Le^a und Anti-Le^b, sowie Gemische von Anti-Le^a und Anti-Le^b gefunden [15, 32, 35].

1.4 Lektine und Neutravidin

1.4.1 Allgemein

Die erste Beobachtung von Zellverklumpung durch Zugabe von Klapperschlangengift wurde 1860 von Mitchel [46] dokumentiert. Er führte dies auf Gerinnungsvorgänge zurück. Erst die Wiederholung des Experimentes 1902 durch Flexner [20] zeigte die lektinabhängige Agglutination der Blutzellen. Zwischenzeitlich berichtete Stillmark 1880 [77] über ein toxisches Protein in Rizinussamen, welches eine Zellagglutination verursachte. Die Lektine rückten näher in den Mittelpunkt der Forschung. Landsteiner beschrieb 1907 [43] die Detektion von nichttoxischen Agglutininen in Pflanzen. Sumner gelang 1919 erstmalig die Kristallisation von Concanavalin Agglutinin [78], einem Lektin aus dem Samen der Jackbohne, 17 Jahre später postulierte er die Interaktion zwischen Lektinen und den Kohlenhydratstrukturen der Erythrozytenmembran als Liganden [79]. Lektine sind komplexe Proteine oder Glykoproteine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen reversibel binden und dadurch in der Lage sind, sich spezifisch an Zellen bzw. Zellmembranen von menschlichen und

tierischen Zellen zu binden und von dort aus biochemische Reaktionen auszulösen. Sie haben jedoch keine enzymatische Aktivität. Wegen ihrer Fähigkeit, Erythrozyten zusammenzuballen, wurden sie Phytohämagglutinine genannt. Boyd [7] prägte 1954 den Begriff Lektine (lat.: legere = auswählen), um auf das Auswahlvermögen für bestimmte menschliche Blutgruppen hinzuweisen, welches sich in manchen Phytohämagglutininen findet. Heute wird der Begriff Lektine für alle Phytohämagglutinine verwendet, ohne Rücksicht auf eventuell vorhandene Blutgruppenspezifitäten [67]. Lektine sind ubiquitär und weit verbreitet in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen, finden sich aber besonders häufig in Leguminosen [75]. Darauf basierend erfolgte die Einteilung in pflanzliche und tierische Lektine. Lektine könne verschiedene Stoffwechselfvorgänge wie die Zellteilung, die ribosomale Proteinbiosynthese, die Agglutination von Zellen oder das Immunsystem beeinflussen [52, 61]. Lektine ähneln den bekannten tierischen und menschlichen humoralen Antikörpern: Beide binden sich mehr oder weniger spezifisch an bestimmte Strukturen, im Falle der Lektine an Zucker, und sie sind mehrwertig. Die Spezifität ist bei den Lektinen nicht so eng wie bei den Antikörpern. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass Pflanzen die für sie typischen Lektine immer enthalten, ohne dass ein Kontakt mit einer komplementären Oligosaccharidstruktur stattgefunden hatte. Antikörper hingegen werden erst im Laufe der Individualentwicklung produziert. Das auffälligste Merkmal der Lektine ist ihre Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren. Viele Lektine binden unspezifisch Erythrozyten aller Blutgruppen, einige hingegen sind erstaunlich spezifisch gegen bestimmte Erythrozyten aus dem ABO-System [67]. Die Agglutination von Erythrozyten an Lektine lässt sich durch Mono- oder Oligosaccharide hemmen [83], die somit eine ähnliche Rolle spielen, wie die Haptene bei den Antikörpern. Lektine lassen sich daher auch zur Blutgruppenbestimmung verwenden.

1.4.2 Das Biotin-Avidin System (Neutravidin)

Avidin ist ein im Hühnereiweiß natürlich vorkommendes tetrameres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 67kDa, welches einen stabilen

Affinitätskomplex (konstante Affinität $> 10^{15} \text{ M}^{-1}$) mit vier Äquivalenten Biotin ausgebildet. Streptavidin, ein bakterielles Avidin aus *Streptomyces*, hat ähnliche Eigenschaften wie Avidin, jedoch ist die Affinität zu Biotin geringer. Biotin, auch als Vitamin B₇ oder Vitamin H bezeichnet, ist ein wasserlösliches Vitamin aus dem B-Komplex. Viele Proteine können mit Biotin-Molekülen gekoppelt werden, um an mehr als ein Avidin Molekül zu binden. Das Biotin-Avidin-System stellte sich in der Detektion und Lokalisation von Antigenen, Glycokonjugaten und Nukleinsäuren unter Verwendung biotinylierter Antikörper, Lektinen oder Nukleinsäureproben als gut geeignet heraus. Die heute am meisten verwendete Technik ist die „preformed complex“ Methode. Sie besteht aus einem vorgefertigten Komplex aus Avidin bzw. Streptavidin und biotinylierten Enzymen oder Lektinen. Die hohe Affinität von Avidin an Biotin gewährleistet eine schnelle und stabile Komplexbildung mit biotinylierten Proteinen. In dieser Arbeit wurden alle Lektine in biotinylierter Form verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete Neutraavidin (ähnlich dem Avidin) verfügt über Cystein- d.h. thiohaltige Bausteine, die zu einer spontanen Adsorption an die Goldoberfläche führen und so die Verbindung zwischen der Goldoberfläche des Schwingquarzes und der Lektinschicht als sensitives Messinstrument herstellt [4, 29, 56].

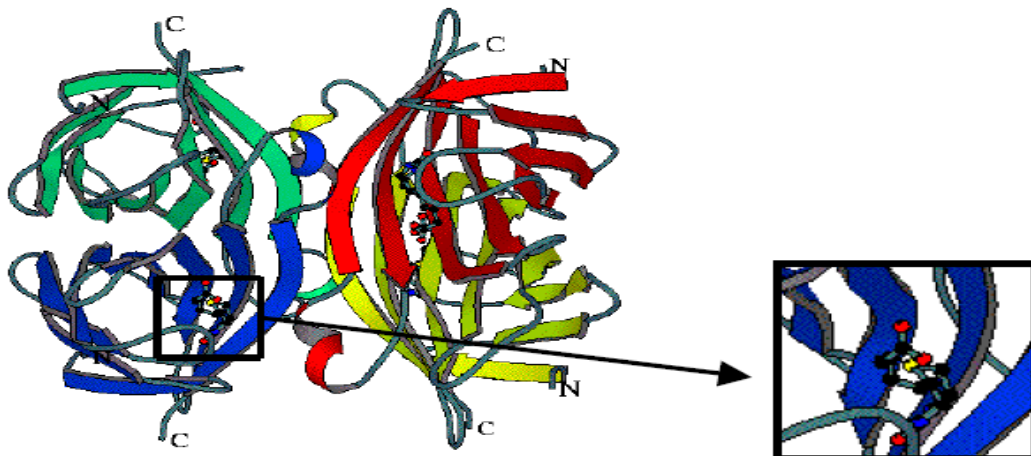


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Avidin mit vier gebundenen Biotin-Molekülen, Ausschnittsvergrößerung einer Bindungsstelle [28]

1.4.3 Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Dolichos biflorus agglutinin aus der Helmbohne ist ein Glycoprotein mit einem spezifischen Molekulargewicht von 120 000 Dalton und besteht aus vier gleich großen Untereinheiten. Der Isoelektrische Punkt liegt bei pH 5.5, es liegt eine Kohlenhydratspezifität für N-Acetylgalactosamin vor. DBA hat eine 5000fache Bindungsaktivität für Erythrozyten der Blutgruppe A₁ gegenüber A₂. Elutions- bzw. Inhibitionszucker ist N-Acetylgalactosamin. In der Serologie wird es ebenfalls zur Ermittlung des Sekretorstatus in A₁ Individuen verwendet. Untersuchungen zeigten einen Nachweis Blutgruppenantikörper sezernierender Tumorzellen [58].

1.4.4 Euonymus Europaeus Lektin (EEL)

Euonymus Europaeus Lektin aus dem Pfaffenhütchen ist ein Glycoprotein mit einem spezifischen Molekulargewicht von 140 000 Dalton und besteht aus sechs sehr verwandten Lektinen mit Isoelektrischen Punkten zwischen pH 4.3 und 4.7. Die meisten der 35 000 Dalton großen Untereinheiten scheinen aus zwei zusammengefügte Disulfid Ketten (15 000 Dalton) zu bestehen. Das Lektin EEL hat Bindungsspezifität für Kohlenhydratstrukturen der Blutgruppe B, kann aber auch andere Oligosaccharide mit Galactosyl(α -1,3)Galactose binden. Weiterhin besitzt das Lektin EEL eine hohe Affinität für die Strukturen der Blutgruppe 0 (H-Substanz). Andere Untersuchungen zeigten eine mögliche Detektion von humanen und nicht-humanen Endothelzellen, sowie die Erkennung von Kohlenhydratstrukturen an der Oberfläche peritonealer Mauslymphoidzellen. Elutions- bzw. Inhibitionszucker sind Lactose und Galactose [59].

1.4.5 Concanavalin Agglutinin (CON-A)

Das Lektin Concanavalin A aus der Schwertbohne ist eines der meist genutzten und sehr gut charakterisierten Lektine. Das Lektin bindet unspezifische Erythrozyten aller Blutgruppen. Bei neutralen oder alkalischen pH Werten existiert das Lektin CON-A als Tetramer bestehend aus vier identischen Untereinheiten eines molekularen Gewichts von 26 000 Dalton. Unterhalb pH

5.6 dissoziiert das Lektin CON-A in aktive Dimere (je 52 000 Dalton). Der Isoelektrische Punkt liegt bei pH 5, das Lektin CON-A benötigt Calcium oder Mangan Ionen für jedes seiner vier Saccharid Bindungsstellen. Diese divalenten Metallionen werden sehr stark an die Polypeptidstruktur gebunden. Elutions bzw. Inhibitionszucker sind α -Methyl-Mannose und α -Methyl-Glucose [57]. Das Lektin CON-A verdankt seine breite Anwendung hauptsächlich der Erkennung der weit verbreiteten Zuckerstruktur α -Mannose, so wird dieses Lektin z.B. für Hormonrezeptorstudien, Mitogenassays, die Charakterisierung von normalen und malignen Zellen, die Isolation viraler Antigene, Studien über Zell Agglutination oder die Aggregation von Bakterien genutzt, um nur einige Beispiele zu nennen [76, 81].

1.4.6 Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

Unter dem Namen Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (aus der Gartenbohne) wird eine Familie von Lektinen subsummiert, von denen jedes vier Untereinheiten beinhaltet. Es wird in zwei verschiedene Typen von Untereinheiten unterschieden. Typ E agglutiniert bevorzugt rote Blutkörperchen (Erythroagglutinin), Typ L zeigt eine Präferenz für Lymphozyten (Leukoagglutinin) und besitzt eine mitogene Aktivität. Diese Untereinheiten verbinden sich zu fünf Isolektinen, Glycoproteine mit einem Molekulargewicht von 125 000 Dalton. Das Isolektin PHA-E besteht aus vier „E“ Untereinheiten und hat einen isoelektrischen Punkt von pH 6.0. PHA-E zeigt eine starke hämagglutinative Aktivität ohne Spezifität für Erythrozyten einer bestimmten Blutgruppe, aber nur eine geringe Mitogenität. Für die Aktivität werden Calcium und Mangan Ionen benötigt. Elutions- bzw. Inhibitionszucker ist Galactose [60].

1.5 Biosensoren

Unter einem Sensor versteht man einen meist miniaturisierten Messwertaufnehmer, der aus dem sogenannten Transducer (Signalwandler) und bei Chemo- und Biosensoren aus einer zusätzlichen selektiven Erkennungskomponente besteht (extrinsische Sensoren). Die Erkennungskomponente reagiert spezifisch mit dem nachzuweisenden Stoff. Der Transducer wandelt diese Reaktion in ein elektrisches Signal um, dem

Transducer ist eine Elektronik zur Signalverstärkung und Signalauswertung nachgeschaltet. Bei einer biologischen Erkennungskomponente handelt es sich um einen Biosensoren. Die räumliche Integration von biologischen Erkennungselementen und Messfühlern sind besonderes Merkmal von Biosensoren. Die Affinität komplementärer biologischer Strukturen bewirkt eine hohe selektive Stofferkennung, welche vereinfacht nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ arbeitet. Die Änderung eines chemischen oder physikalischen Parameters auf Grund der Wechselwirkung zwischen Analyten und der immobilisierten Biokomponente wird durch den Transducer in ein elektrisches Signal umgewandelt. So kann aus einer Probe mit einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle selektiv das gesuchte Molekül nachgewiesen werden. Biosensoren können als Immunosensoren eingesetzt werden und tragen als Biokomponente Lektine, Antigene oder Antikörper [23].

Ein Problem der Biosensorik stellt die Verbindung zwischen künstlicher Oberfläche und sensitiver biologischer Schicht dar, welches Folgen für die biologische Aktivität, die sterischen Verhältnisse, die Schichtstabilität und Wiederverwendbarkeit hat [72, 73].

1.5.1 Massensensitive Sensoren

Die Massenänderung an der Oberfläche eines Sensors kann zur Detektion von Analyten genutzt werden, oben erwähnte Immunosensoren arbeiten nach diesem Prinzip. Dabei agglutinieren Erythrozyten mit dem für sie spezifischen Lektin und es kommt dadurch zu einer Massenzunahme, die detektiert wird.

Ausgehend von der Erforschung des pyroelektrischen Effekts entdeckten Pierre und Jaques Curie erstmals 1880 den piezoelektrischen Effekt [14]. Beim direkten piezoelektrischen Effekt erzeugt die mechanische Deformation eines piezoelektrischen Kristalls eine elektrische Oberflächenladung. Beim umgekehrten piezoelektrischen Effekt tritt beim Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes eine Deformation des piezoelektrischen Kristalls auf. Ein Schwingquarz ist eine Scheibe aus Quarzkristall mit einer bestimmten Geometrie und einem speziellen Kristallschnitt. An die aufgedampften Goldelektroden wird eine elektrische Wechselspannung angelegt. Es entsteht

eine mechanische Scherwelle, die in oberflächenangrenzende Medien eindringen kann. Die Wechselwirkung der akustischen Welle an der Grenzfläche zwischen Kristalloberfläche und dem anliegenden Medium ist für die sensorischen Eigenschaften verantwortlich. Eine Anlagerung an der Quarzoberfläche, z.B. durch Antikörper oder angekoppelte Erythrozyten, führt zu einer zur Fremdschichtmasse proportionalen Resonanzfrequenzänderung. Dadurch ist der Nachweis von kleinsten Partikeln im ng-Bereich möglich [3, 24, 27, 28, 50, 53, 65, 71]. Deshalb wird dieses Prinzip ebenfalls für Präzisionswaagen verwendet.

1.5.2 QCM als Immunosensor

Wird die Goldelektrode mit einer immunologisch wirksamen Schicht versehen, kann er als empfindlicher Immunosensor eingesetzt werden. Wird der Analyt an die immobilisierte Biokomponente gebunden, kommt es zu einer Zunahme der Masse auf dem Quarz, was detektiert wird. Dabei liegt die Sensitivitätsgrenze im Bereich von wenigen $\mu\text{g/ml}$ [31]. Der Detektionsbereich umfasst den Nachweis sehr geringer Massen, wie kleine Moleküle bis hin zu großen Massen durch Agglutination ganzer Zellen [24, 31, 45]. Die kontinuierliche Beobachtung der Resonanzfrequenz ermöglicht eine Analyse der abgeschlossenen Immunreaktion ebenso wie Antigen-Antikörper-Bindung in Echtzeit [33]. Weiterhin gelang eine Separierung und Identifizierung bestimmter Antikörperklassen, sowie der Nachweis von Toxinen mit Hilfe der QCM-Technik [9, 10, 16, 21, 47-49, 51, 63, 66, 84]. Das Loslösen des Antigens aus der Bindung ist ebenfalls detektierbar. Durch Erhöhung der Amplitude des Schwingquarzes kann die Antigen-Antikörper-Bindung „aufgebrochen“ werden. Die dabei entstehenden Schallwellen sind messbar, kleinste Biopartikel und Viren sind mit diesem Prinzip nachweisbar [13, 24, 70, 74]. Die QCM Technik wurde ebenfalls zur Analyse von Lektineigenschaften, wie zum Beispiel Glycogencharakterisierung, Definition der Kohlenhydratspezifität, Untersuchung der Bindungseigenschaften genutzt [30, 54, 55, 81, 82].

Die Blutgruppenanalyse mit einem QCM-Biosensor basiert auf der mit Blutgruppenantikörpern beschichteten Goldoberfläche, an welche die

Erythrozyten mit den entsprechenden Epitopen reagieren und spezifisch binden.

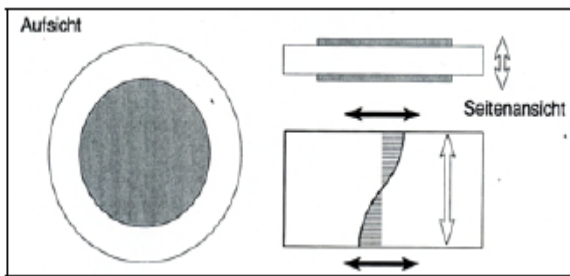


Abbildung 3: Schwingquarz schematisch mit Scherwellenausbreitung [24]

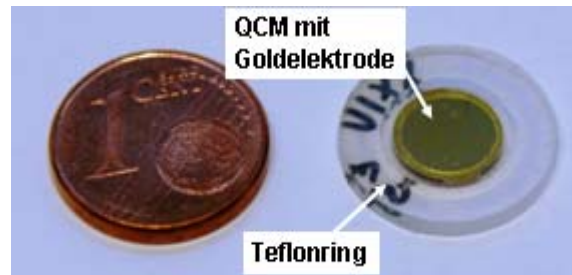


Abbildung 4: Schwingquarz in Teflonhalterung, zum Größenvergleich 1 Cent-Stück

1.5.3 Sensorbeschichtung

Den wichtigsten Faktor für eine erfolgreiche Biosensorik stellt die Beschichtung dar. Die Entwicklung erfolgreicher Schichtmodelle zur Blutgruppenanalytik mit Biosensoren führte in früheren Arbeiten zu Beschichtungen mit Antikörpern direkt auf Gold, Beschichtung mit Polylysin und Beschichtung mit Protein A [11, 12, 17, 24, 40]. In dieser Arbeit wird als neues Schichtmodell die Immobilisierung mit Lektinen aufgegriffen.

Als Haftgrundlage an der Goldoberfläche des Schwingquarzes wird das Neutravidin-Biotin-System [siehe 1.4.2] genutzt. Van-der-Waals-Kräfte binden das Neutravidin an die Goldoberfläche des Quarzes. Alle verwendeten Lektine lagen in biotinylierter Form vor, was die Bindung an das Neutravidin ermöglichte. An dieser Kopplungsreaktion sind keine Anteile beteiligt, die an der biologischen Aktivität des Lektins beteiligt sind. Das Lektin besitzt Bindungstaschen, in welchen sich die Bindungsstellen für die Mono- bzw. Oligosaccharide der Blutgruppenantigene der Erythrozyten befinden. Die Affinität von Lektinen zu Zellen oder Makromolekülen ist deutlich größer als die zu deren Zuckern [62]. Daraus wurde geschlossen, dass weitere Bindungen den Komplex stabilisieren. So werden schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen, multivalente Liganden und die Interaktion mit mehreren Monosaccharidresten eines Oligosaccharides für die Komplexstabilisierung verantwortlich gemacht. Ein weiterer Aspekt ist die Gruppierung von identischen Bindungsstellen durch Formation von Proteinen, die sich simultan mit anderen zusammenschließen, um Arme von verzweigten Oligosacchariden zu binden.

Einen großen Einfluss übt die sterische Lage der Kohlenhydrate an der Molekül- oder Zelloberfläche aus. Die der Erythrozyten ragt weit aus der Oberfläche heraus und bietet eine gute Bindungsfreiheit für die Interaktion mit den Lektinen. Die Bindungskonstante einer Oligosaccharid-Lektin-Interaktion liegt meistens im millimolaren Bereich [75].

1.6 Dummy System

Das Dummy-System ist ein einfaches, rein mechanisches System zur Durchführung von Vorexperimenten mit Erythrozyten. Es besteht aus einer Messkammer, in die ein Schwingquarz eingebracht wird und hat die gleichen mechanischen Bauteile wie die vollautomatisierte Anlage (FidgeType FgT1 Anlage), es können dieselben Schwingquarze verwendet werden. Da sie nicht zum Schwingen angeregt werden, kann auf Elektronik verzichtet werden. Die Auswertung der Ankopplung von Erythrozyten wird rein visuell per Mikroskopie vorgenommen. Um eine Übertragbarkeit der Experimente auf die FidgeType Anlage zu erreichen, ist die Fluidik identisch ausgeführt und mit biokompatiblen Materialien wie Teflon ausgestattet. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wird das Analyt über ein Schlauchsystem in die Messkammer gefördert. Der Fluidik-Fluss wird manuell gesteuert, aus diesem Grund kann auf das Steuergerät und auf einen PC verzichtet werden.

Mit Hilfe des Dummy-Systems können orientierende Versuchsreihen zur Optimierung und Weiterentwicklung sensibler Beschichtungen als Vorexperimente durchgeführt werden.

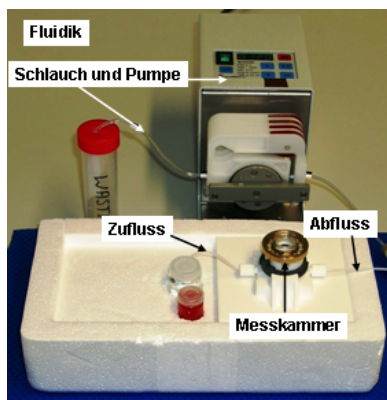


Abbildung 5: Aufbau Dummy-System

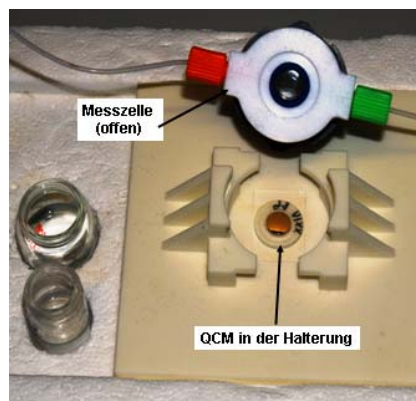


Abbildung 6: geöffnete Messkammer mit Quarzhalterung



Abbildung 7: Auflichtmikroskop

1.7 FidgeType Fg T1 Anlage

Gehring entwickelte ein vollautomatisiertes Blutanalysegerät (FidgeType Fg T1), welches nach dem Prinzip der QCM-Technik arbeitet. Die Messstation besteht aus zwei Messkammern, die eine parallele Analyse von zwei Proben ermöglicht. Diese Messkammern beinhalten die Schwingquarze, die in der speziellen Halterung fixiert sind. Über eine Elektronik können die Quarze zum Schwingen angeregt werden. Die Beschichtung der Quarze mit Lektin erfolgte außerhalb der Anlage. An der Messstation sind ein Steuergerät und ein PC angeschlossen. Mit Hilfe einer speziell entwickelten Computer Software konnten die einzelnen Δf und $\Delta \Gamma$ Signale registriert und graphisch dargestellt werden. Temperaturen, Fließgeschwindigkeiten und Ventilpositionen konnten ebenfalls erfasst, die gesamte Peripherie (Pumpen, Peltier-Controller, Frequenzzähler) angesteuert und bedient werden. Der Aufbau der Systemfluidik erlaubt die Analyse minimaler Probenmengen. Um Wechselwirkungen zu minimieren, wurden ausschließlich biokompatible Materialien verwendet [24].

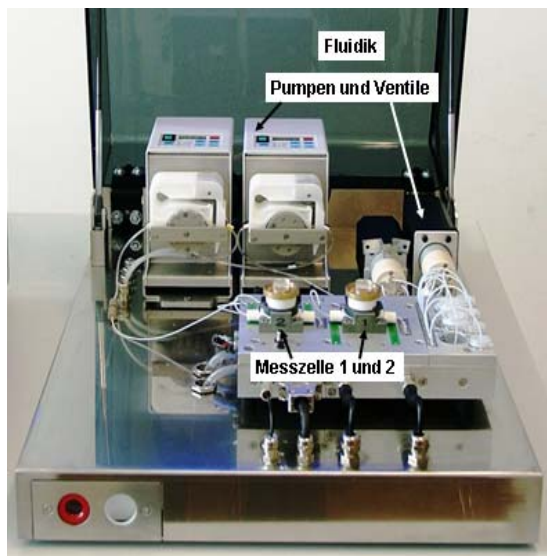


Abbildung 8: vollautomatisiertes Blutanalysegerät FidgeType Fg T1

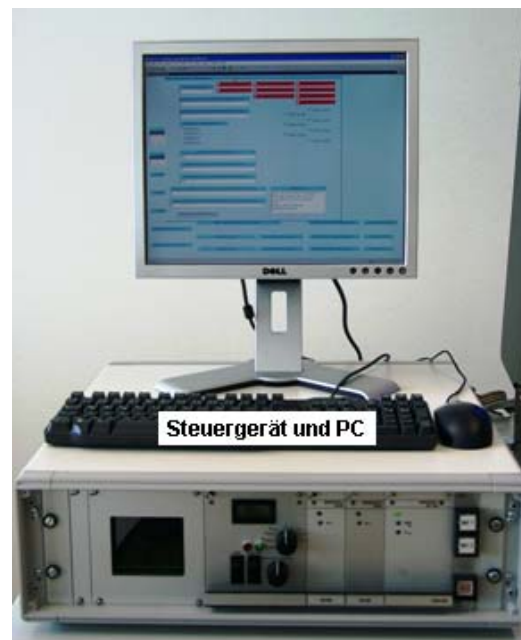


Abbildung 9: Steuergerät und PC

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Eigenschaft der Lektine, Erythrozyten spezifisch zu binden zu nutzen und der Blutgruppenbestimmung im AB0-

System mit Hilfe der QCM-Technik zugänglich zu machen. Dazu wurden erste Experimente zur Schichtentwicklung und Optimierung mit dem Dummy-System durchgeführt, später erfolgte die Übertragung dieser Ergebnisse auf die FidgeType Anlage.

Es wurden vier Lektine mit unterschiedlichem Agglutinationsverhalten untersucht und geeignete Beschichtungsparameter und Messbedingungen erarbeitet. Dabei wurde das blutgruppenspezifische oder -unspezifische Bindungsverhalten an Erythrozyten getestet und mit den bereits bekannten Eigenschaften [vgl. 1.4.1] verglichen. Jedes der vier Lektine wurde im Dummy-System und in der FidgeType Anlage mit Erythrozyten der wichtigsten Blutgruppen im AB0-System untersucht.

Um das Verhalten der einzelnen Komponenten der Lektinbeschichtung und den Ankopplungsvorgang der Erythrozyten auf der FidgeType Anlage zu analysieren, wurde eine Online-Beschichtung durchgeführt. Der gereinigte unbeschichtete Schwingquarz wurde dazu in die Messkammer der FidgeType Anlage eingebaut und anschließend die einzelnen Komponenten (Neutraavidin, Lektin und Blut) nacheinander über getrennte Flusskanäle in die Messkammer geführt und damit auf den Schwingquarz gebracht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die Chemikalien, Labormaterialien und Geräte aufgelistet, wie sie für diese Arbeit verwendet wurden.

2.1.1 Chemikalien

Art	Hersteller	Artikel Nr.
alpha-Methyl-Glucose	Fluka-Biochemika, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	66940
alpha-Methyl-Mannosit	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	M6882
Aceton HLPC grade, 99,9%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	01-0520
N-Acetyl-D-Galactosamin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	A2795
Aqua bidest. 18,2 Mega-Ohm x cm Leitfähigkeit	stationäre Laborversorgung	
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	21097
Ethylendinitrotetra-essigsäure (EDTA) 99%	Merck KGaA, Darmstadt	1.12029
D(+)-Galactose	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	G0750
D-Lactose Monohydrat	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	61339
Helmanex II	Hellma GmbH, Müllheim	132182
HEPES	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	H0887

Magnesium(II)-chlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	M 2393
Mangan(II)chlorid (MnCl ₂)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	328146
Natriumazid (NaN ₃) 99,5%	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	S2002
Natriumchlorid (NaCl) 99,5%	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	S3014
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt	6462
PBS (Dulbecco A-Tablets)	Oxoid	BR0014G
Stickstoff (N ₂), 4.0	stationäre Laborversorgung	
Natriumhypochlorid NaOCl, 4%, wässrige Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	23,930-5
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 98%	Chemie Ausgabe des UKT	
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt	108382
Tween 20®	Fluka-Biochemika, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim	P1379
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck GmbH, Darmstadt	108597

Tabelle 2: Chemikalien

2.1.2 Labormaterialien

Art	Firma
Analyseröhrchen S-Monovette®	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Mehrzweckröhrchen	Greiner bio-one GmbH,

	Frickenhausen
Regenerationsröhrchen Cryo S	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Messkolben 100ml und 250ml	Schott Duran GmbH, Mainz
Glasschale 100ml	Schott Duran GmbH, Mainz
Enghalsflasche mit Spritzverschluss 500ml und 1000ml	Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Pipetten, Eppendorf research 0,5–10µl, 5– 100µl und 50–1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pinzetten, Dumont # 5	World Precision Instruments Inc., Sarasota (USA)

Tabelle 3: Labormaterialien

2.1.3 Puffer und Lösungen

Für die Versuche mit Lektinen war die Herstellung spezieller Pufferlösungen nötig.

Lösung	Ansatz
EDTA-Tris Puffer pH 7,9	1000ml Ansatz: 1000ml Aqua bidest. 1g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) 9g Natriumchlorid (NaCl) 1g Ethylendinitroltetraessigsäure (EDTA) 0,1ml Tween 20®
HEPES Puffer pH 7,5	1000ml Ansatz: 1000ml Aqua bidest. 2,6g HEPES 8,7g Natriumchlorid (NaCl)

2 Material und Methoden

	0,15g Calciumchlorid (CaCl ₂) 0,2g Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 1ml Natriumazid (NaN ₃)
HEPES+Ca+Mn Puffer pH 7,5	250ml Ansatz: 250ml HEPES Pufferlösung 400µl 0,5M Calciumchlorid (CaCl ₂) 20µl 0,1M Manganchlorid (MnCl ₂)
PBS Puffer pH 7,4	1000ml Ansatz: 1000ml Aqua bidest. 1 Tablette PBS Dulbecco A
TRIS-NaCl Puffer pH 7,4	1000ml Ansatz: 1000ml Aqua bidest. 7,3g Natriumchlorid (NaCl) 6,05g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)
TRIS-NaCl+Ca+Mn Puffer pH 7,4	250ml Ansatz: 250ml TRIS NaCl Pufferlösung 400µl 0,5M Calciumchlorid (CaCl ₂) 20µl 0,1M Manganchlorid (MnCl ₂)
200mM N-Acetyl- galactosamin Zuckerlösung	1ml Ansatz: 1ml Aqua bidest. 0,044g N-Acetylgalactosamin
200mM Galaktose Zuckerlösung	10ml Ansatz: 10ml Aqua bidest. 0,36g D-Galaktose
200mM α-Methyl- Glucose Zuckerlösung	10ml Ansatz: 10ml Aqua bidest. 0,39g α-Methyl-Glucose
200mM Lactose Zuckerlösung	10ml Ansatz: 10ml Aqua bidest. 0,72g D-Lactose
200mM α-Methyl-	10ml Ansatz:

Mannosit Zuckerlösung	10ml Aqua bidest. 0,39g α -Methyl-Mannosit
Piranha-Lösung	15ml Schwefelsäure H_2SO_4 5ml Wasserstoffperoxid H_2O_2 , 30 %

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

2.1.4 Beschichtung / Lektine

Produkt	Hersteller	Artikel Nummer
Neutravidin	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois (USA)	31000
biotinyliertes Concanavalin A Lectin (b-CON-A)	Linaris Biologische Produkte GmbH, Bettingen	B-1005
biotinyliertes Dolichorus biflorus Agglutinin (b-DBA)	Linaris Biologische Produkte GmbH, Bettingen	B-1035
biotinyliertes Eunonymos Europaeus Lectin (b-EEL)	Linaris Biologische Produkte GmbH, Bettingen	B-1335
biotinyliertes Phaseolus vulgaris Erythro-agglutinin (b-PHA-E)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt	431782

Tabelle 5: Beschichtung / Lektine

2.1.5 Blut- und Plasmaproben

Die Vollblut- und teilweise die Plasmaproben stammten von freiwilligen Blutspendern des ZKT Tübingen. Die Proben waren anonymisiert, es wurden jeweils Blutgruppe und Spenderdatum dokumentiert. Die Lagerung der Blutproben erfolgte im Pilotröhrchen bei 7°C. Blutplasma wurde bei 7°C bzw. bei -30°C gelagert.

Verwendet wurden Blutproben der Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, B und 0, mit einer Erythrozytenkonzentration von ca. 500 000 / µl und einer Verdünnung im Verhältnis 1:10 mit der jeweils verwendeten Pufferlösung.

Es wurden humane Plasmaproben der Blutgruppen A, B und 0 verwendet und im Verhältnis 1:10 mit der jeweils verwendeten Pufferlösung verdünnt. Gepooltes humanes Plasma wurde aus fünf mit EDTA versetzten Vollblutproben der jeweils benötigten Blutgruppe hergestellt. Ungepooltes Humanes Plasma wurde auf den Sekretorstatus getestet (Lewis Gruppe, Sekretor / Non-Sekretor).

2.1.6 QCM-Sensor

2.1.6.1 Schwingquarz

Polierte Quarzscheibe, AT-Schnitt, Durchmesser 8,5 mm, Goldelektroden zur elektronischen Kontaktierung, Frequenz 10 MHz

2.1.6.2 Schwingquarzhalterung

Haltering aus Teflon, Innendurchmesser 9 mm, Außendurchmesser 16 mm

Konstruktion und Herstellung: Dr. Frank Gehring, Tübingen

Selbstklebende Kunststoffolie aus Polypropylen, Innendurchmesser 6 mm, Außendurchmesser 13 mm, Folie von Greiner Bio-One bzw. 3M

Konstruktion: Dr. Frank Gehring, Tübingen

2.1.7 Dummy-System

2.1.7.1 Flusszelle

Kunststoffummantelung mit Dichtring

Konstruktion und Herstellung: Dr. Frank Gehring, Tübingen

2.1.7.2 Flussleitungen

Aus Teflon, Durchmesser 1 mm, 1/16", Volumen 16µl, Ismatec, Wertheim

2.1.7.3 Peristaltikpumpe

Reglo-Digital MS-4/8-100, Pumpenschläuche TYGON, Ismatec, Wertheim

2.1.8 FidgeType Fg T1 Anlage

Vollautomatisches 2-Kanal Analysegerät auf Schwingquarzsensoren beruhend, im Folgenden als FidgeType Anlage bezeichnet.

Konstruktion und Herstellung: Dr. Frank Gehring, Tübingen [24]

2.1.9 Software

Microsoft Office Picture Manager 2003; Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Optische Auswertesoftware; Gärtner, Software, PC- und Netzwerktechnik, Böblingen

Messung und Dokumentation mit speziell für die FidgeType entwickelte Software (Agilent-Vee Umgebung); Entwicklung: Dr. Frank Gehring und Dr. Hartmut Drechsel, Tübingen

Auswertung mit dem Programm Origin SR0; OriginLab Corporation, Northampton, USA

2.1.10 Geräte

Typ	Gerätename	Firma
Digitalkamera 4-fach optischer und 3-fach digitaler Zoom	Casio QV 5700, 5.0 Mega-Pixel	Casio Europe GmbH, Hamburg
Lötkolben	WS 80	Weller GmbH, Besigheim
Mikroskop 50-, 100- und 500- fache Vergrößerung, Aufsatz für Digitalkamera	Auflichtmikro- skop Axiostar 2 MAT	Carl Zeiss AG, Jena
Mischschüttler	Relax top	Heidolph GmbH, Kelheim
pH-Meter	pH 111	Hanna Instruments GmbH, Kehl am

		Rhein
Rührer	RCT basic	IKA Werke GmbH, Staufen
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex	Bandelin electronic, Berlin
Zentrifuge	DADE Immufuge	DADE, Miami, Florida, USA
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory, Osterode

Tabelle 6:Geräte

2.2 Methoden

2.2.1 Probenvorbereitung Blut und Plasma

2.2.1.1 Vollblut

Die Blutproben kamen in Pilotröhrchen mit EDTA-Zusatz (Verhindert die Gerinnung des Blutes im Röhrchen) aus der Blutspende der Transfusionsmedizin Tübingen von anonymisierten Blutspendern. Es wurden Blutgruppe und Spenderdatum dokumentiert. Die Lagerung erfolgte bei 7°C. Die Proben wurden für die Messungen im Verhältnis 1:10 mit dem jeweiligen Puffer verdünnt.

2.2.1.2 Herstellung der Erythrozytensuspension

Aus den mit EDTA versetzten Vollblutproben wurde 1,5ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abpipettiert. Diese Blutlösungen wurden mit 800 RPM für 20 Minuten bei 25°C zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Es bildeten sich unterschiedliche Schichten der Blutkomponenten aus. In der unteren Schicht befanden sich Blutzellen, wie z.B. Erythrozyten. Der obere Anteil (Überstand) bestand aus Blutplasma, Thrombozyten und den darin gelösten Blutbestandteilen. Nach der Zentrifugation wurde aus dieser Probe der Überstand abpipettiert und die restliche Probe auf 2ml mit Puffer (Tris-NaCl) aufgefüllt und in der Zentrifuge (DADE Immufuge) für 2,5 Minuten auf hoher Geschwindigkeitsstufe zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut

abpipettiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach insgesamt drei Waschgängen wurde der Überstand abpipettiert und die Probe auf 1,5ml mit Puffer Tris-NaCl aufgefüllt, was dem Ausgangsvolumen entspricht. Dokumentiert wurden Blutgruppe und Spenderdatum. Die Proben wurden zu den Messungen 1:10 mit dem jeweiligen Puffer verdünnt.

2.2.1.3 Gewinnung des Blutplasmas

Zur Gewinnung eines Blutplasma-Pools wurden fünf mit EDTA versetzte Vollblutproben der gleichen Blutgruppe, aber unterschiedlicher Spender benötigt. Alle fünf Vollblutproben wurden bei 800 RPM für 20 Minuten zentrifugiert. Es bildete sich ein Überstand. Aus jedem Überstand wurden je 500µl in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert. Dieser Plasmapool aus fünf verschiedenen Spendern wurde bei 7°C gelagert und war ca. eine Woche haltbar. Bei Tiefkühlung innerhalb 6h und Lagerung bei -30°C beträgt die Haltbarkeit bis 24 Monate (entspricht FFP- Fresh Frozen Plasma).

An ungepoolten Plasmalösungen wurde mittels Hämagglutinations-Hemmtest der Sekretorstatus für die Antigene des Lewissystems, Le^a und Le^b ermittelt. Diese Proben wurden freundlicherweise von der Zentralen Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen (ZKT) zur Verfügung gestellt.

Dokumentiert wurden die Blutgruppe und das Herstellungsdatum. Die Proben wurden zu den Messungen 1:10 mit dem jeweiligen Puffer verdünnt.

2.2.2 Quarzvorbereitung, Quarzbeschichtung und Einbau in die Messkammer

2.2.2.1 Quarzreinigung (Oxidative Quarzaktivierung)

Die Quarzreinigung beinhaltet ein Aceton- und ein Piranhabad. Dazu wurde der Schwingquarz zuerst für eine Minute in Aceton entfettet, vorsichtig mit Aqua bidest. gespült und mit Stickstoff getrocknet. Im Anschluss erfolgte zur chemischen Reinigung ein einminütiges Piranhabad, vorsichtige Spülung mit Aqua bidest. und Trocknung mit Stickstoff.

2.2.2.2 Quarzpräparation

Zur Präparation des gereinigten Quarzes wurde dieser mit der Goldoberfläche nach oben auf einer Kunststoffunterlage gelagert. Es folgte ein symmetrisches Anbringen einer ringförmigen Klebefolie, welche einen kleineren Innendurchmesser als der Quarz hat, auf den äußeren Rand des Quarzes. Zur wasserdichten Fixierung wurde diese Folie mittels Lötkoben auf 170°C erhitzt. Im zweiten Schritt erfolgte ein symmetrisches Anbringen des Quarzes mit Klebefolie auf den Teflonring. Beendet wurde die Quarzpräparation mit einer wasserdichten Fixierung der Klebefolie durch Erhitzen mittels Lötkoben auf 170°C.

2.2.2.3 Beschichtung

Der präparierte Schwingquarz wurde auf einer Kunststoffunterlage fixiert. Die Neutravidinlösung wurde der Kühleinheit entnommen, auf Raumtemperatur erwärmt und zu einer Lösung der Konzentration 25µg/ml mit PBS Pufferlösung verdünnt. Es wurden 50µl auf die Goldoberfläche des Quarzes pipettiert, so dass dessen Oberfläche vollständig mit einer ca. 0,5mm dicken Schicht überzogen war. Die Inkubationszeit betrug 5–60 Minuten. Anschließend wurde der Quarz vorsichtig mit Aqua bidest. und HEPES bzw. HEPES+Ca+Mn Puffer gespült. Danach erfolgte die Beschichtung mit dem jeweiligen Lektin. Dazu wurde die Lektinlösung der Kühleinheit entnommen, auf Raumtemperatur erwärmt und je nach Bedarf mit HEPES oder HEPES+Ca+Mn Puffer verdünnt. Es wurden 50µl auf die Goldoberfläche des Quarzes pipettiert, so dass eine ca. 0,5mm dicke Schicht die Quarzoberfläche bedeckte. Die Inkubationszeit in der feuchten Kammer betrug 1 bis 60 Minuten. Anschließend wurde der Quarz erneut vorsichtig mit Aqua bidest. und dem Puffer der nachfolgenden Blutlösung (EDTA-Tris, Tris-NaCl oder TRIS-NaCl+Ca+Mn) gespült. Während des gesamten Beschichtungsprozesses wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Beschichtung nicht eintrocknet.

2.2.2.4 Quarzeinbau

Der beschichtete Schwingquarz wurde in die Halterung des Dummys eingelegt und anschließend das Gehäuse mit Dichtring in die Bajonethalterung eingeschraubt.

Das System wurde entlüftet, indem der zuführende Schenkel auf ein mit dem jeweiligen Puffer gefülltes Spülreservoir geschaltet und die Peristaltikpumpe mit 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ betrieben wurde, solange bis die Messkammer vollständig mit Pufferlösung gefüllt war und durch das Kontrollfenster keine Luftblasen zu erkennen waren. Nach vollständiger Entlüftung wurde für drei Minuten mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ gespült.

2.2.3 Messung im Dummy-System

2.2.3.1 Standardoptimierungen

Die Messungen im Dummy-System (Teil 3.1 und 3.3) erfolgten unter Standardbedingungen bei 22°C und auf einer vibrationsgedämpften Unterlage. Nach Quarzeinbau und Entlüftung wurde die Peristaltikpumpe gestoppt und der zuführende Schenkel auf das zu analysierende Blut umgestellt. Anschließend erfolgte die Befüllung der Messkammer mit 250 μl Analyt mit einer Pumpgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. War die Messkammer vollständig befüllt, wurde die Pumpe für die jeweilige Inkubationszeit zwischen 1 und 15 Minuten gestoppt. Nach Abschluss dieser Zeit folgte eine Spülphase mit dem jeweiligen Puffer für 5 Minuten mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und anschließend mit erhöhter Fließgeschwindigkeit (250 $\mu\text{l}/\text{min}$), bis im Kontrollfenster der Messkammer keine freien Erythrozyten mehr sichtbar waren. Der Quarz wurde ausgebaut und die leere Messkammer mit dem jeweiligen Puffer gespült.

Kurzprotokoll für die Lektinversuche im Dummy-System in Teil 3.1 und 3.3

- Einbau des mit Lektin beschichteten Schwingquarzes in die Messkammer
- blasenfreies Befüllen der Messkammer mit dem jeweiligen Systempuffer und weiteres Spülen mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$
- Injektion von 250 μl der zu untersuchenden Blutprobe mit einer Pumpgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$

- Stopp je nach Versuch 1-15 Minuten
- Spülvorgang für 5 Minuten mit 100 μ l/min und anschließend mit 500 μ l/min, bis im Kontrollfenster der Messkammer keine freien Erythrozyten sichtbar waren

2.2.3.2 Elutionsversuche mit Zucker

Die Elutionsversuche mit Zucker sollten ein Ablösen von Erythrozyten bewirken, welche bereits an Lektin beschichteten Schwingquarze gebunden waren. Der mit Lektin beschichtete Schwingquarz wurde im Dummy-System nach dem oben beschriebenen Protokoll mit Erythrozyten inkubiert und anschließend aus der Messkammer ausgebaut. Die Erythrozytendichte wurde unter dem Mikroskop beurteilt und mittels Digitalkamera dokumentiert. Dies diente als Referenz für die folgenden Elutionsversuche. Für sämtliche Lösungsversuche wurden 50 μ l einer 200mM Lösung des jeweiligen Zuckers verwendet. Es wurden zwei Verfahren zum Ablösen der Erythrozyten untersucht. Einfaches Einwirken bzw. Absinken der Zuckerlösung (ohne Mischschüttler) für 15 Minuten, im Folgenden als „Stase“ Messung bezeichnet. Mit Hilfe mechanisch erzeugter Schwingungen mittels Mischschüttler für 15 Minuten, im Folgenden als „Schüttler“ Messung bezeichnet.

2.2.3.3 Inhibitionsversuche mit Zucker

Um zu untersuchen, ob eine Sättigung des Lektins mit dem jeweiligen Inhibitionszucker eine geringere Erythrozytenanbindung bewirkt, wurde ein mit Lektin beschichteter Schwingquarz für 15 Minuten mit 50 μ l einer 200mM Lösung des jeweiligen Zuckers vorinkubiert. Im Anschluss daran erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll die Inkubation mit Erythrozyten. Als Referenz für die Inhibitionsversuche dienten Messungen mit dem gleichen Versuchsaufbau ohne Vorinkubation mit Zucker. Nach Ausbau des Quarzes aus der Messkammer wurde die Erythrozytendichte unter dem Mikroskop beurteilt und mittels Digitalkamera dokumentiert.

2.2.4 Dokumentation und Auswertung (Dummy-System)

2.2.4.1 Mikroskopie

Das verwendete Auflichtmikroskop verfügte über eine angepasste Kamerahalterung. Der ausgebaute, mit dem jeweiligen Puffer feucht gehaltene Quarz wurde sofort unter dem Auflichtmikroskop bei 50 bis 500facher Vergrößerung untersucht. Es wurde die gesamte Oberfläche bewertet.

2.2.4.2 Dokumentation

Die an das Mikroskop angeschlossene Digitalkamera diente der Dokumentation der Versuche mit dem Dummy-System. Es wurden Aufnahmen mit 50 bis 500facher Vergrößerung an Referenzstellen der Oberfläche gemacht, welche per USB-Kabel auf den PC übertragen wurden. Abbildung 10 bis Abbildung 12 zeigen die fotografierten Schwingquarze in 50 bis 500facher Vergrößerung mit 3fachem digitalem Zoom. Für die spätere Auswertung hatte sich eine 100fache Vergrößerung mit 3fachem digitalem Zoom bewährt.

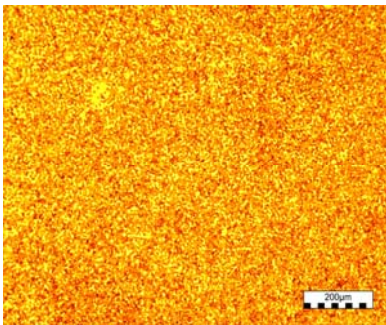


Abbildung 10: Vergrößerung
50fach, dig. Zoom 3fach

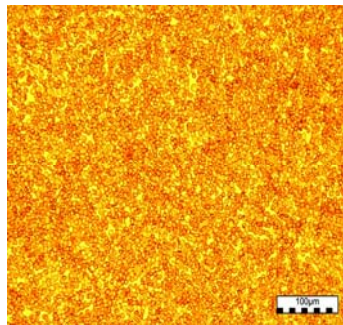


Abbildung 11: Vergrößerung
100fach, dig. Zoom 3fach

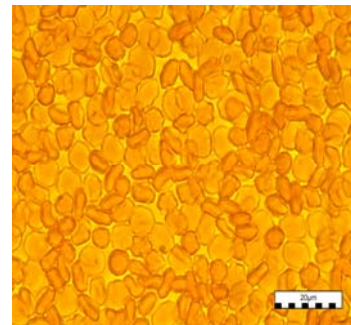


Abbildung 12: Vergrößerung
500fach, dig. Zoom 3fach

2.2.4.3 Messung der Erythrozytendichte

Für die Auswertung der Bilder mit der speziellen Auswertungssoftware (siehe Abbildung 13) eignete sich am besten eine Vergrößerung von 100fach. Diese Bilder wurden in das spezielle Zählprogramm geladen, in jeweils vier Quadranten unterteilt und komplett ausgezählt und damit die Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten bestimmt. Es konnten Abbildungs-Zoom der Digitalkamera und Zoom des Zählprogramms eingestellt werden. Aus den Zählergebnissen wurde der Mittelwert gebildet und dieser in Erythrozyten / $\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ angegeben. Das Ergebnis wurde dokumentiert und mit den digitalen

Abbildungen gespeichert. Abschließend erfolgte die grafische Darstellung der ausgezählten Ergebnisse, ein Fehler von 5% erscheint realistisch und wurde so als Fehlerbalken eingetragen. Bei Dichteunterschieden auf einem Quarz von mehr als 20% wurde die Messung wiederholt.

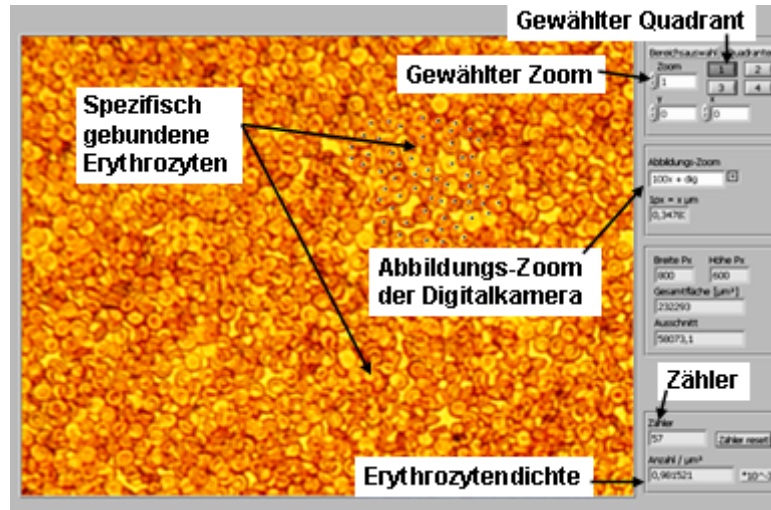


Abbildung 13: Auswertungssoftware

2.2.4.4 Theoretische Maximalbelegung

Ausgehend von einem durchschnittlichen Durchmesser der Erythrozyten von $7,5\mu\text{m}$ wurde die theoretisch zu erwartende maximale Belegungsichte der Schwingquarze bei Monolagen berechnet.

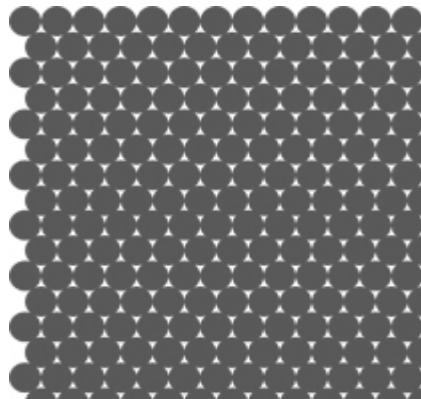


Abbildung 14: dichteste Packungsgröße

In Abbildung 14 ist die Maximalbelegung mit Erythrozyten bei maximaler Packungsdichte dargestellt. Die Kantenlänge der Abbildung entspricht im gewählten Maßstab $100\mu\text{m}$, der Durchmesser der durch Punkte symbolisch dargestellten Erythrozyten $7,5\mu\text{m}$. Durch Auszählen der in diesem Bild platzierten Punkte ergab sich eine maximale Belegungsichte von $21 \cdot 10^{-3}/\mu\text{m}^2$.

Da Form und Durchmesser der Erythrozyten in situ nicht konstant sind und nicht alle Erythrozyten genau flach auf dem Schwingquarz aufliegen, kann der Fehler durchaus 15% betragen. Als theoretisch zu erwartender Wert der Maximalbelegung wird hier deshalb von $21 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ pro μm^2 ausgegangen. Eine größere Belegung ist auf schrumpfen oder stapeln der Erythrozyten durch Puffer oder Salze zurückzuführen. Eine kleinere Anzahl der Erythrozyten ist ein Anzeichen für hypoosmolare Verhältnisse, die Erythrozyten wirken zerfließen. Eine durch das Lektin induzierte Deformierung der Erythrozyten nach erfolgter Agglutination wurde von Sung [80] beschrieben. Die Interaktion zwischen dem Lektin und dem Transmembranprotein Glycophorin an der Außenseite der Erythrozyten löst eine Veränderung des Zytoskeletts der Erythrozytenmembran aus, was zu einer Deformierung des Erythrozyten führt [2]. Dadurch nimmt der Durchmesser der Erythrozyten ab.

2.2.5 Messung auf FidgeType Fg T1 Anlage

2.2.5.1 Standardmessungen

Die Standardmessungen dienen dem Vergleich unterschiedlicher Probenvorbereitungen und Messprozeduren. Es sollten die Einflüsse von Erythrozyten aus Vollblutproben und gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension auf die Signalintensität untersucht werden. Dazu wurden mit dem jeweiligen Lektin beschichtete Schwingquarze in der FidgeType Anlage jeweils mit Vollblut und Erythrozytensuspension inkubiert. Für die Lektine CON-A und PHA-E entfielen die Versuche der Probenvorbereitung, da diese bereits mit dem Dummy-System durchgeführt wurden. Des Weiteren sollten die Messprozeduren verfeinert und eine bessere Signalstabilität erreicht werden. Für diese Untersuchungen wurden Messungen mit konstantem Fluss und 5 Minuten ohne Fluss durchgeführt. Die Versuche mit Stopp (im Folgenden als Stopp-Flow bezeichnet) orientierten sich an Δf (Frequenzänderung) und $\Delta\Gamma$ (eine zur Dämpfung proportionale Größe, welche als halbe Halbwertsbreite der Impedanz definiert ist) [24], die eintraten, sobald die Erythrozyten an den beschichteten Schwingquarz banden. Die Länge des Stopps wurde in Abhängigkeit von der Signalstabilität gewählt (5 bis

10 Minuten). Die einzelnen Messparameter wurden miteinander kombiniert, so dass folgende Versuchsreihen entstanden.

- Vollblut mit konstantem Fluss
- Vollblut mit 5 Minuten Stopp-Flow
- Erythrozytensuspension mit konstantem Fluss
- Erythrozytensuspension mit 5 Minuten Stopp-Flow

Diese Versuchsreihen wurden mit folgenden Lektinen durchgeführt:

- biotinyliertes Dolichorus biflorus Agglutinin (DBA)
- biotinyliertes Eunonymos Europaeus Lectin (EEL)
- biotinyliertes Concanavalin A Lectin (CON-A)
- biotinyliertes Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

Das vollautomatische Blutgruppenanalysegerät Fidget-Type Fg T1, welches auf der Schwingquarztechnik basiert, wurde von Dr. Frank Gehring entwickelt [24]. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen bei einer Thermostatisierung der Temperatur von 25°C, einer Fließgeschwindigkeit von 95µl/min während den Messungen und 300 bis 500µl/min zum Spülen. Messungen mit konstanter Fließgeschwindigkeit werden im Folgenden als „Fluss-Messung“ bezeichnet. Erfolgt die Messung mit einer Stopp Phase, so werden sie im Folgenden als „Stopp-Flow Messung“ bezeichnet.

Nach Einbau des mit Lektin beschichteten Schwingquarzes in die Messkammer erfolgte ein blasenfreies Befüllen der Messkammer mit dem jeweiligen Systempuffer. Dieser Vorgang konnte durch das Kontrollfenster der Messkammer beobachtet werden. Ein weiteres Spülen mit 95µl/min wurde für die Signalstabilisierung genutzt. In der Zwischenzeit wurde die Thermostatisierung (Peltiersystem) der Sensorplattform auf eine Temperatur von 25°C eingeschaltet. Sobald ein stabiles Messsignal am Rechner sichtbar war, wurde mit der Datenaufzeichnung begonnen. Bei kontinuierlichem Fluss mit 95µl/min erfolgte die Injektion von 250µl der zu untersuchenden Blutprobe. Je nach Versuchsprotokoll blieb die Fließgeschwindigkeit konstant oder es schloss sich eine Stoppphase von 5 Minuten an. Nach Signalstabilisierung folgte ein Spülvorgang mit 500µl/min. Die Datenaufzeichnung wurde beendet, sobald sich das Signal nicht mehr änderte.

Kurzprotokoll für die Lektinversuche in Teil 3.2 und 3.3

- Einbau des mit Lektin beschichteten Schwingquarzes in die Messkammer
- blasenfreies Befüllen der Messzelle mit dem jeweiligen Systempuffer und weiteres Spülen mit 95µl/min
- Einschaltung der Thermostatisierung (Peltiersystem) der Sensorplattform auf 25°C
- nach Signalstabilisierung am Rechner → Beginn der Datenaufzeichnung
- Injektion von 250µl der zu untersuchenden Blutprobe
- kontinuierlicher Fluss mit 95µl/min oder 5 Minuten Stopp
- nach Signalstabilisierung Spülvorgang mit 500µl/min
- Ende der Datenaufzeichnung

2.2.6 Dokumentation und Auswertung (FidgeType Anlage)

Die Dokumentation der Messungen erfolgte über eine spezielle Software [24]. Mit Hilfe dieser Software konnte die gesamte Peripherie (Pumpen, Peltier-Controller, Frequenzzähler) angesteuert und bedient werden. Des Weiteren wurden Messdaten wie Frequenzen, Temperaturen, Fließgeschwindigkeiten und Ventilpositionen erfasst. Nach Beendigung der Messung wurden die Messdaten in eine EXCEL Tabelle transferiert. Diese Tabelle konnte direkt in das Auswerteprogramm Origin eingefügt und damit die Messungen als Graphen dargestellt werden. Zur Auswertung gehörte ebenfalls die Markierung bestimmter Prozess-Schritte, wie beispielsweise Zugabe von Vollblut einer bestimmten Blutgruppe oder Stopp. Die EXCEL Tabellen und Origin Dateien wurden sorgfältig archiviert.

Abbildung 15: Datentabelle im Programm Origin Pro 7.5

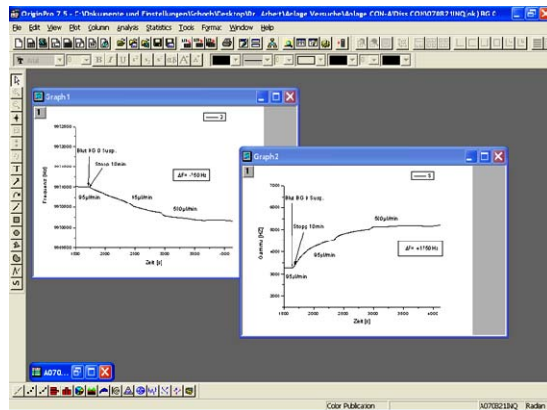


Abbildung 16: Auswertung und Erstellung Grafiken mit dem Programm Origin Pro 7.5

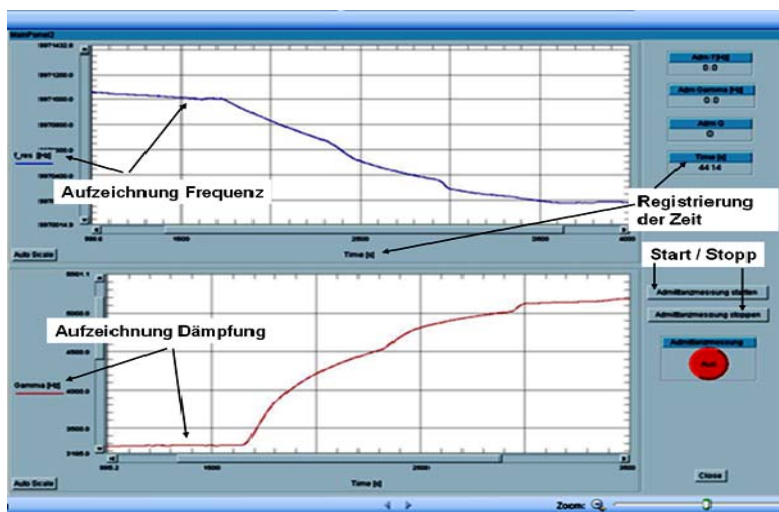


Abbildung 17: Registrierung der Messungen auf der FidgeType Anlage mit Agilent Vee Umgebung

2.2.6.1 Online Beschichtung

Um das Verhalten der einzelnen Komponenten der Lektinbeschichtung und den Ankopplungsvorgang der Erythrozyten auf der FidgeType Anlage zu analysieren, wurde eine Online-Beschichtung durchgeführt. Dazu wurde der gereinigte unbeschichtete Schwingquarz in die Messzelle der FidgeType Anlage eingebaut und anschließend die einzelnen Komponenten (Neutravidin, Lektin und Blut) nacheinander über getrennte Flusskanäle in die Messzelle geführt und damit auf den Schwingquarz gebracht. Die einzelnen Komponenten wurden mit 19 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgebracht. Der Systempuffer wurde der jeweiligen Beschichtungsstufe angepasst, d.h. für Neutravidin mit PBS-Puffer, für EEL mit HEPES-Puffer und für Blut mit EDTA-Puffer. Der Pufferwechsel zwischen den einzelnen Komponenten erfolgte mit konstanter Flussgeschwindigkeit von

100µl/min. Die Blutprobe aus Vollblut wurde 1:10 mit EDTA-Tris Puffer verdünnt. Die Systemtemperatur der FidgeType Anlage wurde auf 25°C eingestellt. Am Ende wurde mit 300 bis 500µl/min gespült.

2.2.6.2 Messung Viskosität

Es wurden Untersuchungen zum Einfluss der Viskosität der Zuckerlösungen auf das Messsignal am Beispiel der Elutions- und Inhibitionszucker des Lektins CON-A α -Methyl-Glucose (im Folgenden als „ α -MG“ bezeichnet) als einfacher Zucker und α -Methyl-Mannosit (im Folgenden als „ α -MM“ bezeichnet) als komplexer Zucker vorgenommen. Es wurden jeweils 200mM Zuckerlösungen verwendet. Dazu wurden mit dem Lektin CON-A beschichtete Schwingquarze in der FidgeType Anlage jeweils mit α -MG bzw. α -MM für 15 Minuten mit einer Flussgeschwindigkeit von 95µl/min inkubiert. Abschließend wurde mit dem Puffer Tris-NaCl+Ca+Mn mit einer Fließgeschwindigkeit von 500µl/min gespült.

2.2.6.3 Messung der Elution und Inhibition mit Zucker

Gegenstand dieser Versuche ist die Frage, ob bereits auf dem beschichteten Schwingquarz gebundene Erythrozyten mit einem geeigneten Elutions- / Inhibitionszucker ablösbar sind (im Folgenden als „Elution“ bezeichnet). Ebenso wurde die Frage geklärt, ob die Inkubation des beschichteten Schwingquarzes mit einem geeigneten Elutions- / Inhibitionszucker ein Anbinden der Erythrozyten an den Schwingquarz verhindern kann (im Folgenden als „Inhibition“ bezeichnet). Diese Untersuchungen wurden am Beispiel der Elutions- und Inhibitionszucker des Lektins CON-A α -Methyl-Glucose als einfacher Zucker und α -Methyl-Mannosit als komplexer Zucker vorgenommen. Die Lektinbeschichtung erfolgte mit den bereits optimierten Beschichtungskomponenten für das Lektin. Die optimierten Messbedingungen wurden dem Protokoll aus den Standardmessungen entnommen. Es wurden 200mM Zuckerlösungen verwendet. Als Systempuffer diente Tris-NaCl+Ca+Mn. Die Fließgeschwindigkeit betrug 95µl/min. Die Systemtemperatur der FidgeType Anlage wurde auf 25°C eingestellt. Am Ende wurde mit 300 bis 500µl/min gespült.

Elution: Der Lektin CON-A beschichtete Schwingquarz wurde in der FidgeType Anlage mit gewaschenen Erythrozyten als Suspension benetzt. Nach einem Spülvorgang wurde die Messkammer über separate Kanäle mit dem jeweiligen Zucker in EDTA-Tris Puffer befüllt. Es konnten Frequenz- bzw. Dämpfungsänderungen beobachtet werden. Nach ca. 25 Minuten wurde erneut mit Puffer Tris-NaCl+Ca+Mn gespült.

Inhibition: Um die Ankopplung von Erythrozyten zu inhibieren, wurden folgende zwei Möglichkeiten überprüft.

Blockierung der Lektinschicht mit Zucker vor der Inkubation mit Erythrozyten. Es wurden Lektin CON-A beschichtete Schwingquarze in der FidgeType Anlage zuerst mit dem Zucker benetzt. Nach einem Spülvorgang wurde die Messkammer über separate Kanäle mit gewaschenen Erythrozyten als Suspension befüllt.

Verwendung einer Erythrozyten-Zucker-Lösung. Die Lektin CON-A beschichteten Schwingquarze wurden in der FidgeType Anlage mit einer Erythrozyten-Zucker-Lösung inkubiert.

2.2.7 Recycling des Schwingquarzes

Gebrauchte Quarze mit gebundenen Erythrozyten auf einer Lektinschicht wurden nach der Messung mit Aqua bidest. gespült und für einige Minuten zur Entfernung von Klebefolie und Teflonring in Isopropanol gewässert. Für die vollständige Entfernung organischen Materials wurden verschiedene Prozeduren untersucht.

- 10 Minuten bei 80°C in 6N NaOH, weitere 10 Minuten bei 45 bis 50°C in 6N NaOH im Ultraschallbad und anschließend eine Minute im Piranhabad
- 10 Minuten mit bei Raumtemperatur in Helmanex® im Ultraschallbad und anschließend eine Minute im Piranhabad.

2.2.7.1 Messung recycelter Schwingquarze in der FidgeType Anlage

Beispielhaft wurden mit Lektin PHA-E beschichteten Schwingquarzen die oben genannten Recycling Methoden auf der FidgeType Anlage überprüft. Die dazu nötige Beschichtung der Schwingquarze wurde nach dem optimierten Protokoll

mit dem Lektin PHA-E vorgenommen und wie die Standardmessungen in 2.2.5.1 gemessen. Als Systempuffer diente Tris-NaCl+Ca+Mn. Die Messungen wurden als Konstant-Messungen durchgeführt.

Diese Methoden wurden von Dipl.-Chem. Lothar Müller und Petra Brozik erarbeitet. In dieser Arbeit erfolgte erstmalig der direkte Vergleich neuer und Helmanex® regenerierter Schwingquarze auf der FidgeType Anlage.

2.2.7.2 Messung mit Plasma (Pool oder Sekretor / Non-Sekretor)

Die Beschichtungskomponenten wurden in den optimierten Konzentrationen aufgetragen. Das Plasma (gepoolt, ungepoolt oder als Sekretor / Non-Sekretor) wurde im Verhältnis 1:10 mit dem Puffer Tris-NaCl+Ca+Mn verdünnt. Davon wurden 200µl Plasma der jeweiligen Blutgruppe verwendet. Zur Neutralisierung des Lektins wurde der mit Lektin beschichtete Schwingquarz zuerst mit Plasma für 15 Minuten in der FidgeType Anlage (in konstantem Fluss 95µl/min) inkubiert. Nach den zu beobachtende Frequenz- und Dämpfungsänderungen wurde die Stabilisierung des Messsignals abgewartet. Es folgte eine Spülphase mit 300µl/min. Anschließend folgte die Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten der jeweiligen Blutgruppe mit konstantem Fluss (95µl/min). Abschließend wurde mit 500µl/min gespült. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen mit den Lektinen DBA und EEL.

2.2.8 Reinigung Dummy-System und FidgeType Anlage

Die Reinigung des Dummy-Systems und der FidgeType Anlage erfolgte mit Natriumhypochlorid 4% in wässriger Lösung. Der zuführende Schenkel des Flusssystems wurde für 5 Minuten mit Aqua bidest. und anschließend für 10 Minuten mit Natriumhypochlorid befahren. Die Fließgeschwindigkeit betrug 250µl/min. Um das System frei von Natriumhypochlorid zu erhalten, wurde erneut für 5 Minuten mit Aqua bidest. bei einer Pumpgeschwindigkeit von 500µl/min gespült.

3 Ergebnisse

3.1 Messungen Dummy-System

Dieser Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Optimierung aller Beschichtungsparameter auf der Dummy Anlage. Es wurde zuerst damit begonnen, die Neutravidinschicht hinsichtlich Konzentration und Inkubationszeit zu optimieren. Es ist davon auszugehen, dass für die Beschichtung mit Lektinen eine vollständige Bedeckung des Schwingquarzes mit Neutravidin optimal ist, da Neutravidin als Haftvermittler zwischen Schwingquarz und Lektin fungiert. Auf Grund dieser Annahme wurden die einzelnen Beschichtungsoptima für Neutravidin und Lektin nacheinander bestimmt. Zur Optimierung der einzelnen Lektinschichten wurden ebenfalls die Konzentration und die Inkubationszeit des Lektins nacheinander variiert, sowie verschiedene Inkubationszeiten des Blutes untersucht. Die folgenden Lektine wurden untersucht: Dolichus Biflorus Agglutinin (DBA), Euonymus Europaeus Agglutinin (EEL), Concanavalin Agglutinin (CON-A), Phaseolus vulgaris Agglutinin-Erythroagglutinin (PHA-E).

3.1.1 Neutravidin (NAV) auf Dummy-Anlage

Zur Optimierung der Neutravidinbeschichtung wurde Konzentration und Einwirkzeit des Neutravidins variiert und anschließend nach Abspülen mit bidestilliertem Wasser und HEPES Puffer mit DBA beschichtet. Die Inkubationszeit mit Erythrozyten der Blutgruppe A₁ aus unbehandeltem Vollblut (Verdünnung 1:10 mit EDTA-Tris Puffer) bei Raumtemperatur betrug 15 Minuten. Anschließend wurde mit EDTA-Tris Puffer gespült bis augenscheinlich das Blut von der Probe gewaschen war. Unter dem Auflichtmikroskop wurde die Oberfläche betrachtet, quantitativ bewertet und fotografiert. Durch Auszählen der Erythrozyten wurde die geschätzte Belegungsdichte der Oberfläche mit Erythrozyten präzisiert.

3.1.1.1 Optimierung Konzentration Neutravidin

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurde Neutravidin in den Konzentrationen 6,25µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml und

100µg/ml auf den Quarz aufgebracht. Ab einer Neutravidinkonzentration von 25µg/ml erreichte die ausgezählte Erythrozytenbelegungsdichte einen Wert von $20/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ und größer (vgl. Abbildung 18).

Für alle weiteren Experimente wurde eine Neutravidinkonzentration von 25µg/ml gewählt, da mit dieser Konzentration eine optimale Bedeckung des Schwingquarzes mit Lektin gewährleistet ist.

3.1.1.2 Optimierung Inkubationszeit Neutravidin

Die Inkubationszeit des Neutravidins wurde von 5 bis 60 Minuten in sechs Schritten (5, 10, 15, 30, 45 und 60min) variiert. Bereits nach 15 Minuten Inkubationsdauer war eine vollständige Bedeckung des Schwingquarzes mit Erythrozyten zu erkennen, weshalb für alle folgenden Experimente diese Inkubationsdauer für Neutravidin gewählt wurde (vgl. Abbildung 19).

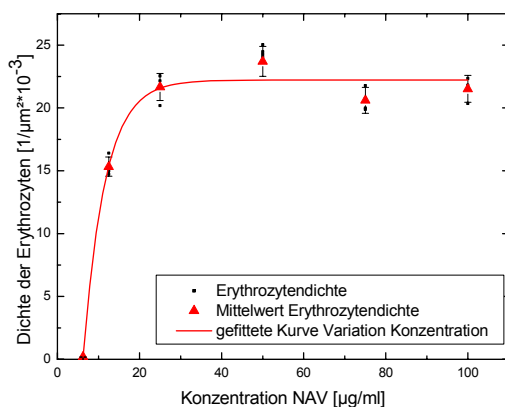


Abbildung 18 : NAV: Variation der NAV-Konzentration, mit Lektin DBA und Erythrozyten der Blutgruppe A₁

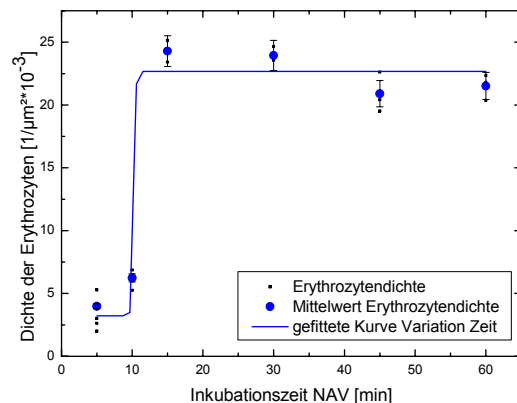


Abbildung 19: NAV: Variation der NAV-Inkubationszeit, mit Lektin DBA und Erythrozyten der Blutgruppe A₁

3.1.2 Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) auf Dummy-Anlage

Das Lektin DBA wurde auf die Eignung für den spezifischen Nachweis der Blutgruppe A₁ getestet. Die folgenden Experimente zeigen Optimierungsschritte des Lektins DBA in der Dummyanlage bezüglich Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, sowie Inkubationszeit des Blutes. Es wurden Spezifitätstests mit allen Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) durchgeführt.

3.1.2.1 Optimierung Konzentration Lektin DBA

Es wurde die Konzentration des Lektins DBA von 25µg/ml bis 100µg/ml in vier Schritten (25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml und 100µg/ml) variiert.

Exemplarisch für alle Messungen dieser Arbeit sind in Abbildung 20 bis Abbildung 22 drei Mikroskopierbilder aus der Bilderserie zur Variation der Konzentration (hier 50µg/ml, 75µg/ml und 100µg/ml) dargestellt. Als optimal auswertbar hat sich eine Bildvergrößerung von 100fach digital herausgestellt. In dieser Bilderserie ist sehr gut die steigende Belegungsdichte von ca. $7,5/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ bis ca. $24,2/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ mit Erythrozyten zu erkennen.

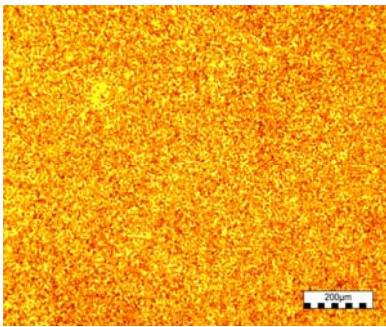


Abbildung 20: Vergrößerung 50fach, digitaler Zoom 3fach

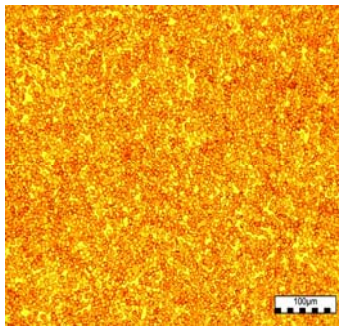


Abbildung 21: Vergrößerung 100fach, digitaler Zoom 3fach

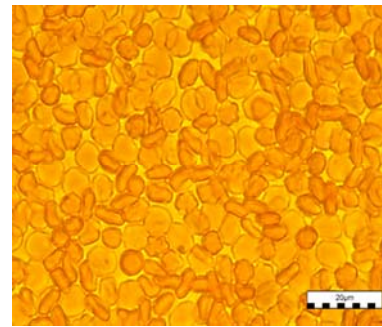


Abbildung 22: Vergrößerung 500fach, digitaler Zoom 3fach

In Abbildung 23 ist die beobachtete Erythrozytendichte über der DBA Konzentration aufgetragen. Bei einer Konzentration von 100µg/ml wurde eine maximale Erythrozytendichte von ca. $24/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ erreicht.

3.1.2.2 Optimierung Inkubationszeit Lektin DBA

Es wurde die Inkubationszeit von 7 bis 60 Minuten (7, 15, 30, 45 und 60min) variiert.

In Abbildung 24 ist die beobachtete Erythrozytendichte über der DBA Inkubationszeit aufgetragen. Für die Optimierung der Inkubationszeit mit Blut, sowie für die Spezifitätstests wurde eine Inkubationszeit von 60 Minuten gewählt.

3 Ergebnisse

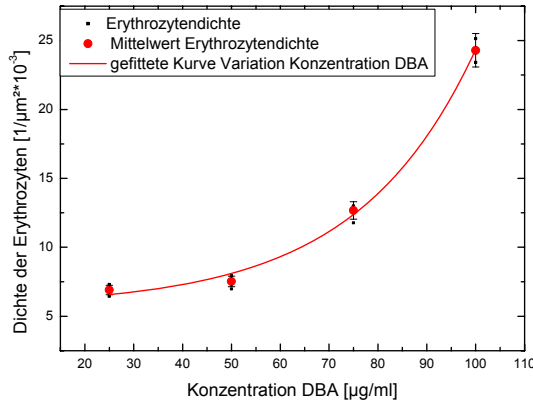


Abbildung 23: Lektin DBA: Variation der DBA Konzentration, Dichte der Erythrozyten (Blutgruppe A₁)

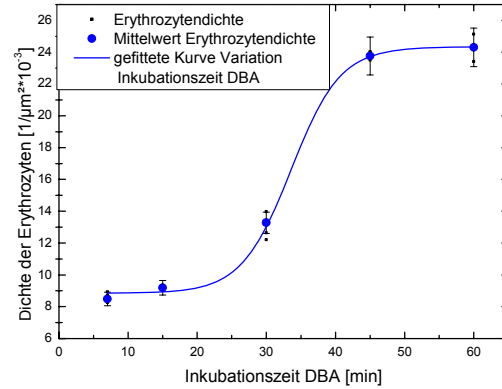


Abbildung 24: Lektin DBA: Variation der Inkubationszeit von DBA, Dichte der Erythrozyten (Blutgruppe A₁)

3.1.2.3 Optimierung Inkubationszeit von Blut

Um die benötigte Inkubationszeit des Blutes zu untersuchen, wurden die Zeiten zwischen 1 und 15 Minuten in fünf Schritten variiert (1, 3, 5, 10 und 15min). In Abbildung 25 ist die beobachtete Erythrozytendichte über der Inkubationszeit des Blutes aufgetragen. Bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten wird eine maximale Erythrozytendichte von ca. $24/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ erreicht.

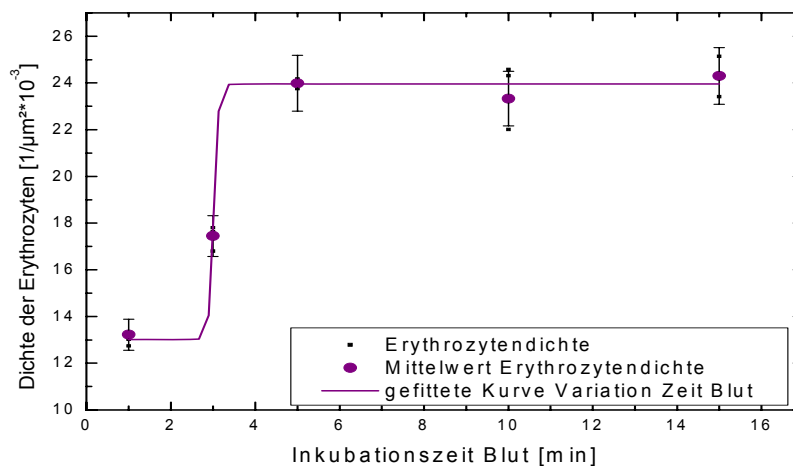


Abbildung 25: Lektin DBA: Einfluss der Inkubationszeit des Blutes auf die Erythrozytendichte

3.1.2.4 Spezifitätstest

Zur Überprüfung der Spezifität des Lektins DBA auf die Erythrozyten der Blutgruppe A₁ wurden mit Lektin DBA beschichtete Schwingquarze (Lektinkonzentration 100µg/ml) mit Erythrozyten der Blutgruppen A₁, A₂, B, A₁B und 0 für jeweils 15 Minuten inkubiert. In Abbildung 26 ist eine deutliche Spezifität für die Blutgruppe A₁ sichtbar (Erythrozytendichte von 24/µm²·10⁻³). Alle anderen Blutgruppen zeigten eine drastisch reduzierte Erythrozytenbelegung (Blutgruppe A₂: 3,3/µm²·10⁻³, A₁B: 0,87/µm²·10⁻³, B: 0,23/µm²·10⁻³ und 0: 0,19/µm²·10⁻³). Somit war eine Spezifität des Lektins DBA für die Blutgruppe A₁ gegeben.

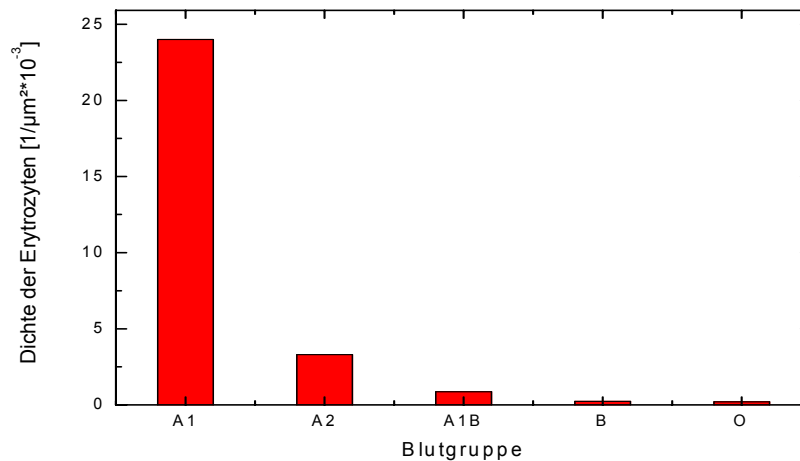


Abbildung 26: Lektin DBA: Spezifitätstests mit den wichtigen Blutgruppen A₁, A₂, B, A₁B und 0

3.1.3 Euonymus Europaeus Lektin (EEL) auf Dummy-Anlage

Das Lektin EEL wurde auf die Eignung für den spezifischen Nachweis der Blutgruppe B getestet. Die folgenden Experimente zeigen Optimierungsschritte des Lektins EEL mit der Dummyanlage bezüglich Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, sowie Inkubationszeit des Blutes. Es wurden Spezifitätstests mit allen Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) durchgeführt.

3.1.3.1 Optimierung Konzentration Lektin

Es wurden die Konzentrationen von 12,5µg/ml bis 100µg/ml in fünf Schritten (12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml und 100µg/ml) variiert. Dabei zeigte sich

ein ausreichendes Bindungsverhalten der Erythrozyten bei geringen Lektinkonzentrationen (ab Lektinkonzentration von $12,5\mu\text{g/ml}$). In Abbildung 27: ist die beobachtete Erythrozytendichte über der Konzentration des Lektins EEL aufgetragen. Bereits bei einer Konzentration von $12,5\mu\text{g/ml}$ ist eine Erythrozytendichte von ca. $20/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ sichtbar. Bei einer EEL Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ kann man eine maximale Belegungsdichte von ca. $26/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ erkennen.

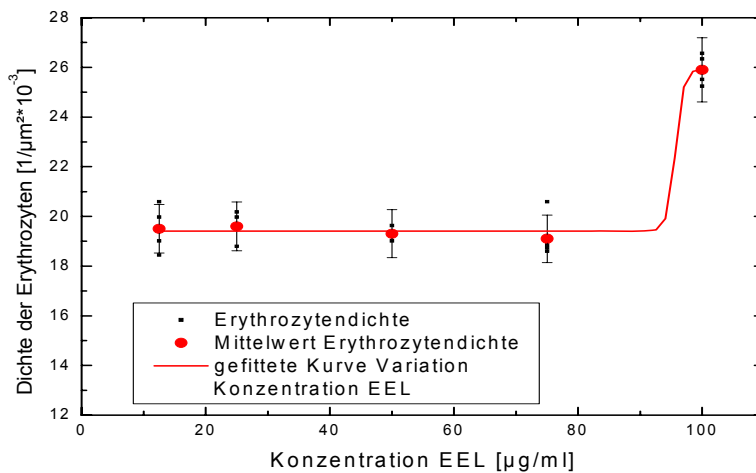


Abbildung 27: Lektin EEL: Einfluss der EEL Konzentration auf die Erythrozytendichte

3.1.3.2 Optimierung von Inkubationszeit Lektin und Inkubationszeit Blut mit EEL $50\mu\text{g/ml}$

Im Folgenden wurden Optimierungsschritte bezüglich Inkubationszeit Lektin und Inkubationszeit von Blut mit einer Lektin EEL Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$ vorgenommen. Bei diesen Versuchen erwies sich eine Konzentrationsreduktion des Lektins auf $50\mu\text{g/ml}$ als nicht sinnvoll (zu geringe Belegungsdichte der Erythrozyten). Beide Einwirkzeiten (Lektin und Blut) ließen sich nicht weiter reduzieren und brachten nur Erythrozytenanbindungen mit $8-15/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ Erythrozytendichte (vgl. Abbildung 28 und Abbildung 29). Vergleichende Optimierungsversuche mit EEL der Konzentration $100\mu\text{g}$ folgten.

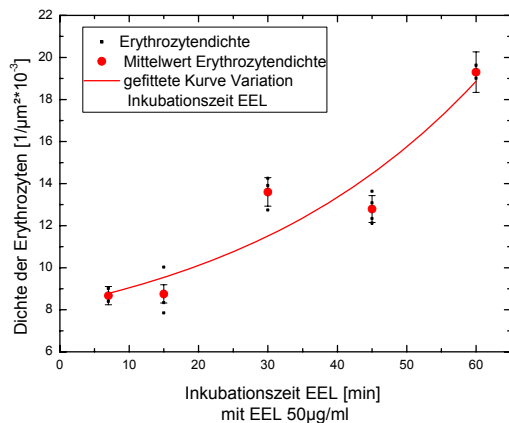


Abbildung 28: Lektin EEL (50 $\mu\text{g/ml}$): Variation der Inkubationszeit (EEL), Einfluss auf die Erythrozytendichte

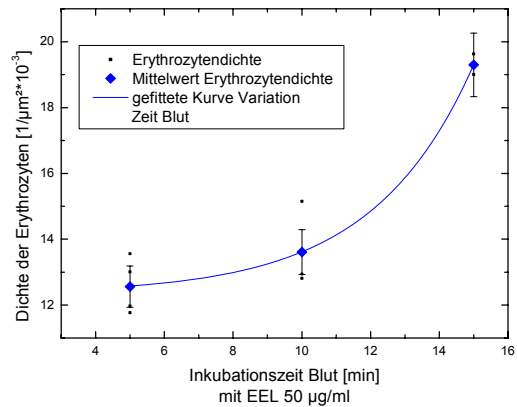


Abbildung 29: Lektin EEL (50 $\mu\text{g/ml}$): Variation der Inkubationszeit des Blutes, Einfluss auf die Erythrozytendichte

3.1.3.3 Optimierung von Inkubationszeit Lektin und Inkubationszeit Blut mit EEL 100 $\mu\text{g/ml}$

Die vorangegangenen Untersuchungen mit Lektin EEL der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ machten weitere Optimierungsschritte mit Lektin EEL der Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$ nötig. Dazu wurden die Schwingquarze mit Lektin EEL 100 $\mu\text{g/ml}$ mit variablen Inkubationszeiten von 7 bis 60 Minuten (7, 15, 30, 45 und 60min) beschichtet und anschließend für 15 Minuten mit Vollblut der Blutgruppe B inkubiert. Abbildung 30 zeigt den Einfluss der Inkubationszeit des Lektins EEL auf die Dichte der angekoppelten Erythrozyten. Dabei zeigte sich eine Inkubationszeit des Lektins von 60 Minuten als erforderlich. Die Untersuchung der optimalen Inkubationszeit für Blut erfolgte mit EEL (Lektinkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$ für 60 Minuten) beschichteten Schwingquarzen und variablen Einwirkzeiten für das Blut (Vollblut der Blutgruppe B) von 5, 10 und 15 Minuten. In Abbildung 31 wird der Einfluss der Einwirkzeit des Blutes auf die Dichte der gebundenen Erythrozyten dargestellt. Hier zeigte sich eine sehr langsame Ankopplungsreaktion. Nach 5 Minuten war eine Belegungsdichte von ca. $10/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ Erythrozyten erreicht, nach 15 Minuten konnte eine vollständige Belegung mit ca. $26/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ beobachtet werden.

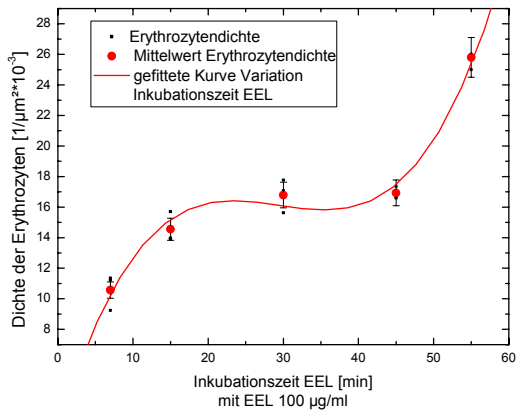


Abbildung 30: Lektin EEL (100 μg/ml): Variation der EEL Inkubationszeit, Einfluss auf die Erythrozytendichte

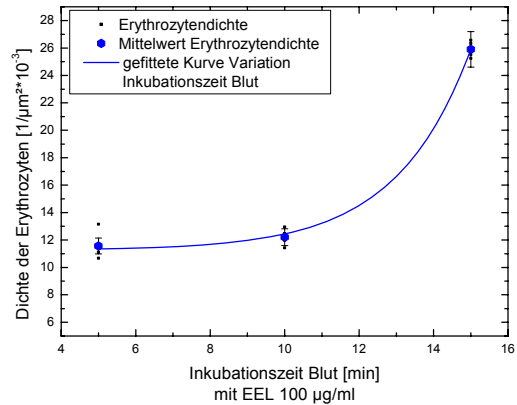


Abbildung 31: Lektin EEL (100 μg/ml): Variation der Inkubationszeit von Blut, Einfluss auf die Erythrozytendichte

3.1.3.4 Spezifitätstest

Zur Überprüfung der Spezifität wurde das Lektin EEL (Lektinkonzentration 100μg/ml für 60 Minuten) mit Erythrozyten aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Ankopplung von Erythrozyten der Blutgruppe B, aber auch ein gewisses Bindungsverhalten mit Erythrozyten der Blutgruppen A₁B und 0. Abbildung 32 stellt das unterschiedliche Reaktionsverhalten der Erythrozyten der Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, B und 0 dar. Es wird deutlich, dass die Erythrozyten der Blutgruppe B am stärksten an das Lektin EEL gebunden haben. Erythrozyten der Blutgruppe A₁B und 0 zeigten ein weniger starkes Bindungsverhalten an das Lektin EEL. Dieses war aber trotzdem nachweisbar.

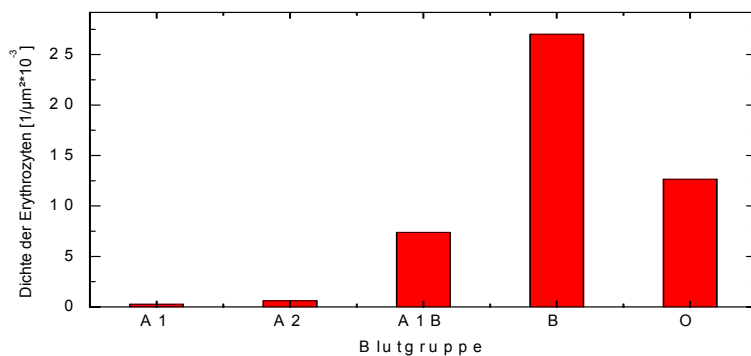


Abbildung 32: Lektin EEL: Spezifitätstest mit den Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, B und 0

3.1.4 Concanavalin Agglutinin (CON-A) auf Dummy-Anlage

Das Lektin CON-A bindet unspezifisch Erythrozyten aller Blutgruppen. Allen Experimenten zur Optimierung der einzelnen Parameter wurden Untersuchungen vorangestellt, die sich mit der Probenvorbereitung der Erythrozyten beschäftigten (Vollblut oder gewaschene Erythrozyten, verschiedene Pufferlösungen). Die darauf folgenden Experimente zeigen Optimierungsschritte des Lektins CON-A in der Dummyanlage bezüglich Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, sowie Inkubationszeit des Blutes. Es wurden Spezifitätstests mit allen Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) durchgeführt.

3.1.4.1 Untersuchungen zur Probenvorbereitung

In dieser Versuchsreihe wurde das unterschiedliche Bindungsverhalten der Erythrozyten in Abhängigkeit vom Puffermedium untersucht. Dazu wurden die Schwingquarze mit dem Lektin CON-A in einer Konzentration von 100µg/ml mit 60 Minuten Einwirkzeit beschichtet. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit Erythrozyten der Blutgruppe 0 in unterschiedlichen Puffermedien. Abbildung 33 zeigt, dass bei Benutzung des Puffers EDTA-Tris kaum eine Bindung der Erythrozyten an das Lektin CON-A erfolgte. Hingegen unter Verwendung von gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension mit dem Puffer Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn konnte ein gutes Bindungsverhalten der Erythrozyten gezeigt werden. Alle weiteren Optimierungsschritte wurden mit gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension in Tris-NaCl+Ca+Mn Puffer durchgeführt.

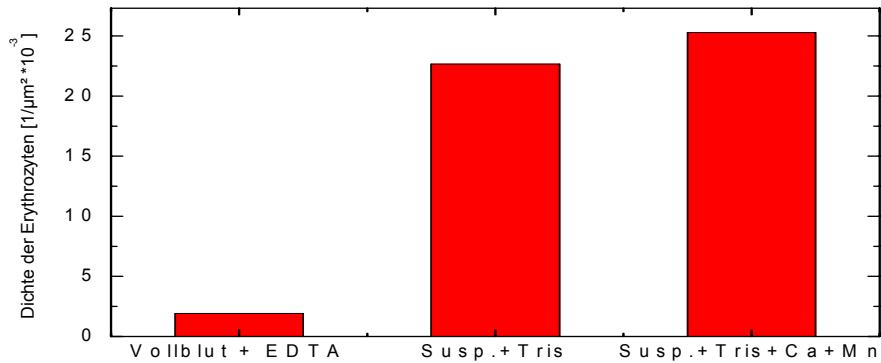


Abbildung 33: Lektin CON-A: Vergleich des Bindungsverhaltens der Erythrozyten der Blutgruppe 0 in Abhängigkeit des verwendeten Puffers bzw. als Vollblut oder Erythrozytensuspension

3.1.4.2 Optimierung Konzentration Lektin

Die Optimierung des Lektins CON-A bezüglich Konzentration beinhaltet eine Variation der Konzentrationen von $1,56\mu\text{g/ml}$ bis $100\mu\text{g/ml}$ in acht Schritten ($1,56\mu\text{g/ml}$, $3,125\mu\text{g/ml}$, $6,25\mu\text{g/ml}$, $12,5\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$, $75\mu\text{g/ml}$ und $100\mu\text{g/ml}$). In Abbildung 34 wird deutlich, dass für eine maximale Erythrozytenanbindung nur sehr geringe Konzentrationen des Lektins CON-A nötig sind. Bereits bei einer Konzentration von $3,125\mu\text{g/ml}$ war eine Erythrozytendichte von $21/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ zu beobachten. Ab einer Konzentration von $6,25\mu\text{g/ml}$ betrug die Erythrozytendichte $25/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$. Alle weiteren Versuche wurden mit einer Lektin CON-A Konzentration von $6,25\mu\text{g/ml}$ durchgeführt.

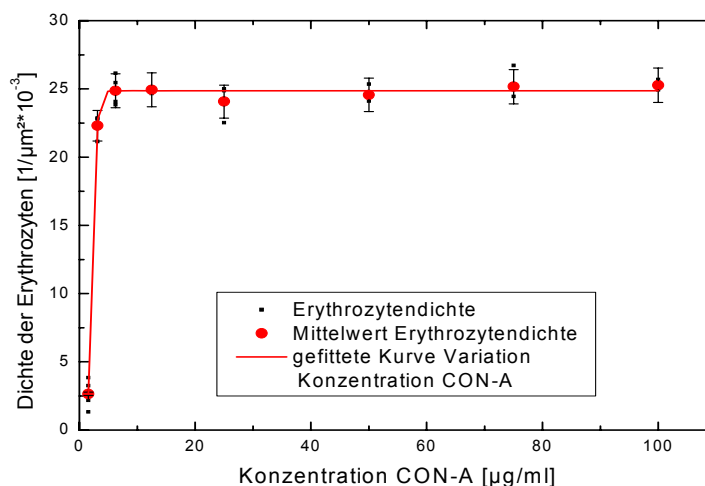


Abbildung 34: Lektin CON-A: Einfluss der CON-A Konzentration auf die Erythrozytendichte

3.1.4.3 Optimierung Inkubationszeit Lektin

Zur weiteren Optimierung der Inkubationszeit des Lektin CON-A wurde eine Lektin CON-A Konzentration von $6,25\mu\text{g/ml}$ gewählt. Die Variation der Inkubationszeit erfolgte in sieben Schritten von 1 bis 60 Minuten (1, 3, 7, 15, 30, 45 und 60min). Abbildung 35 zeigt das Bindungsverhalten der Erythrozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Lektins CON-A. Dabei wird sichtbar, dass nach einer Lektininkubationszeit von 3 bis 5 Minuten eine Sättigung mit maximalen Belegungen von ca. $25/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ erreicht wurde. Alle weiteren Messungen erfolgten mit einer Lektin CON-A Inkubationszeit von 5 Minuten.

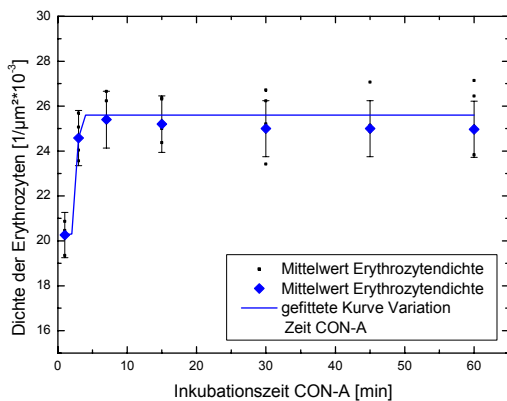


Abbildung 35: Lektin CON-A ($6,25\mu\text{g/ml}$): Einfluss der Inkubationszeit von CON-

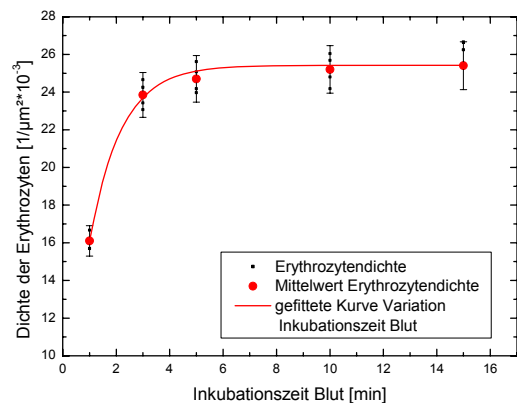


Abbildung 36: Lektin CON-A: Einfluss der Inkubationszeit von Blut auf die Erythrozytendichte

3.1.4.4 Optimierung Inkubationszeit von Blut

Die Optimierung der Inkubationszeit der Erythrozyten erfolgte mit einer Lektinkonzentration von $6,25\mu\text{g/ml}$ und 5 Minuten Einwirkzeit des Lektins CON-A. Dabei wurde die Inkubationszeit des Blutes in fünf Schritten von 1 bis 15 Minuten (1, 3, 5, 10 und 15min) variiert. In Abbildung 36 wird deutlich, dass nach einer Einwirkzeit des Blutes von 3 bis 5 Minuten eine maximale Erythrozytenbelegung von $25/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ erfolgte.

3.1.4.5 Spezifitätstest

Zur Überprüfung der Spezifität bzw. Unspezifität des Lektins CON-A wurden Schwingquarze mit dem Lektin CON-A in einer Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ beschichtet und mit Erythrozyten der Blutgruppen A_1 , A_2 , A_1B , B und 0 inkubiert.

In späteren Stichversuchen stellte sich heraus, dass 6,25µg/ml hierfür ausreichend sind. Es wurden alle Puffermedien aus 3.1.4.1 (EDTA-Tris, Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn) untersucht. Dabei bestätigte sich ein pufferabhängiges Bindungsverhalten. Abbildung 37 zeigt das unterschiedliche Bindungsverhalten der Erythrozyten an mit Lektin CON-A beschichteten Schwingquarzen in Abhängigkeit des verwendeten Puffers und als Vollblut oder Suspension. Es war zu beobachten, dass Erythrozyten aus Vollblut aller Blutgruppen im Puffer EDTA-Tris kaum binden. Im Gegensatz dazu weisen gewaschene Erythrozyten in Suspension mit dem Puffer Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn ein sehr gutes unspezifisches Bindungsverhalten auf. Es besteht kaum ein Unterschied zwischen Tris-NaCl und dem Zusatz von Ca und Mn.

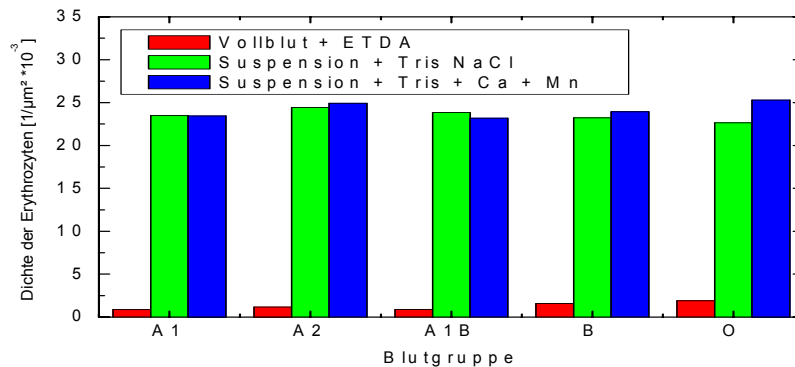


Abbildung 37: Lektin CON-A: Vergleich des Bindungsverhaltens der Erythrozyten unterschiedlicher Blutgruppen in Abhängigkeit des verwendeten Puffers bzw. als Vollblut oder Erythrozytensuspension

3.1.5 Phaseolus vulgaris Agglutinin (PHA-E) auf Dummy-Anlage

Das Lektin PHA-E bindet unspezifisch Erythrozyten aller Blutgruppen. Allen Experimenten zur Optimierung der einzelnen Parameter wurden Untersuchungen vorangestellt, die sich mit der Probenvorbereitung der Erythrozyten beschäftigten (Vollblut oder gewaschene Erythrozyten, verschiedene Pufferlösungen). Die folgenden Experimente zeigen Optimierungsschritte des Lektins PHA-E in der Dummyanlage bezüglich Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, sowie Inkubationszeit des Blutes. Es wurden Spezifitätstests mit allen Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und O) durchgeführt.

3.1.5.1 Untersuchungen zur Probenvorbereitung

Diese Versuchsreihe diente der Untersuchung des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der Erythrozyten in Abhängigkeit vom Puffermedium. Dazu wurden die Schwingquarze mit dem Lektin PHA-E in einer Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit Erythrozyten der Blutgruppe 0 in unterschiedlichen Puffermedien.

Abbildung 38 zeigt das unterschiedliche Bindungsverhalten der Erythrozyten bei Verwendung der Puffer EDTA-Tris, Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn. Es wurde eine geringe Bindung der Erythrozyten an das Lektin PHA-E unter Einfluss des Puffers EDTA beobachtet. Unter Verwendung von gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension mit dem Puffer Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn konnte ein deutlich besseres Bindungsverhalten der Erythrozyten gezeigt werden. Alle weiteren Optimierungsschritte erfolgten mit gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension in Tris-NaCl+Ca+Mn Puffer.

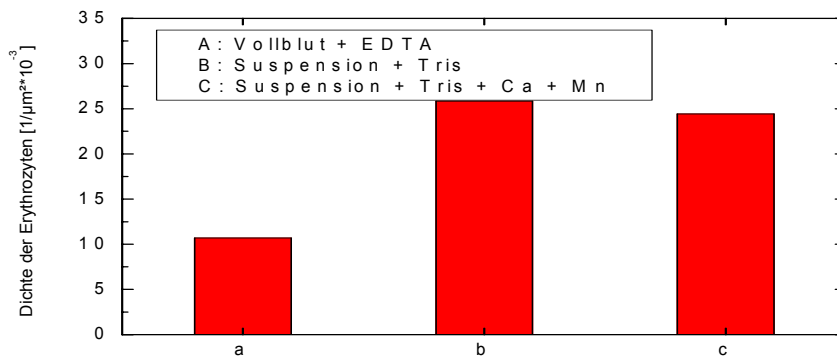


Abbildung 38: Lektin PHA-E: Vergleich des Bindungsverhaltens der Erythrozyten der Blutgruppe 0 in Abhängigkeit des verwendeten Puffers bzw. als Vollblut oder Erythrozytensuspension

3.1.5.2 Optimierung Konzentration Lektin

Zur Optimierung der Beschichtung hinsichtlich Lektinkonzentration wurden die Konzentrationen des Lektins PHA-E in sechs Stufen zwischen $6,25\mu\text{g/ml}$ und $100\mu\text{g/ml}$ variiert ($6,25\mu\text{g/ml}$, $12,5\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$, $50\mu\text{g/ml}$, $75\mu\text{g/ml}$ und $100\mu\text{g/ml}$). Dabei stellte sich ab einer Konzentration von $12,5\mu\text{g/ml}$ eine sehr starke Erythrozytenanbindung ein. Weitere Versuche erfolgen mit einer PHA-E Konzentration von $12,5\mu\text{g/ml}$. Abbildung 39 zeigt die Abhängigkeit der

Erythrozytendichte von der Lektinkonzentration mit deutlicher Dichtezunahme auf ca. $25/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ ab einer Lektin PHA-E Konzentration von $12,5\mu\text{g/ml}$.

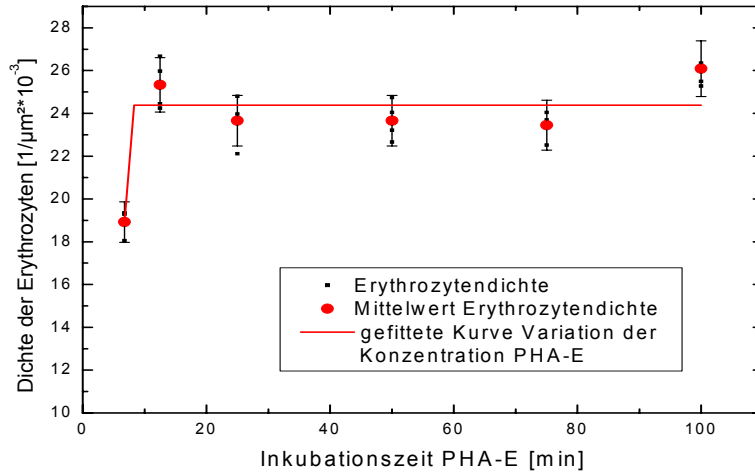


Abbildung 39: Lektin PHA-E: Einfluss der PHA-E Konzentration auf die Erythrozytendichte

3.1.5.3 Optimierung Inkubationszeit Lektin

Die Optimierung der Lektininkubationszeit wurde mit Lektin PHA-E Konzentration von $12,5\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Dabei wurden die Inkubationszeiten in sieben Schritten zwischen 1 und 60 Minuten variiert (1, 3, 7, 15, 30, 45 und 60min). Abbildung 40 zeigt, dass bereits ab einer Lektininkubationszeit von 1 bis 3 Minuten eine sehr gute Erythrozytenanbindung mit einer Erythrozytendichte von ca. 21 bis $23/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ auftrat.

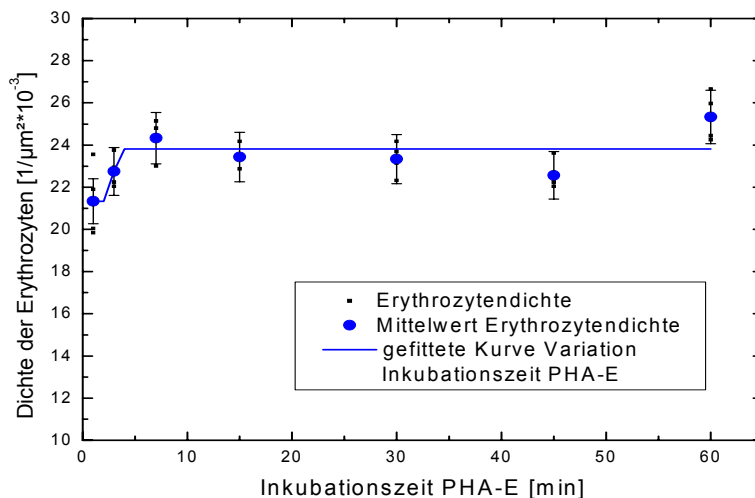


Abbildung 40: Lektin PHA-E: Einfluss der Inkubationszeit von PHA-E auf die Erythrozytendichte

3.1.5.4 Optimierung Inkubationszeit von Blut

Um die Inkubationszeit des Blutes zu optimieren wurden Schwingquarze mit dem Lektin PHA-E der Konzentration $12,5\mu\text{g/ml}$ für 5 Minuten inkubiert und anschließend im Dummy-System mit Blut in variablen Zeiten von 1 bis 15 Minuten inkubiert (1, 5, 10 und 15min). In Abbildung 41 ist zu sehen, dass bereits die geringe Inkubationszeit des Blutes von 1 Minute für eine Erythrozytenanbindung mit einer Dichte von $20/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ ausreichend war.

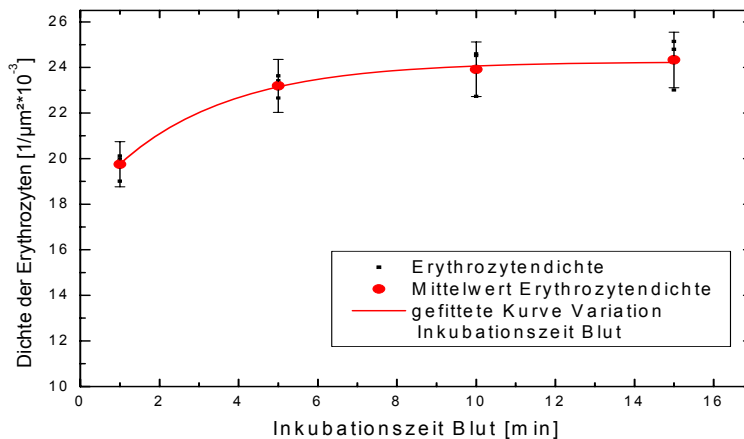


Abbildung 41: Lektin PHA-E: Einfluss der Inkubationszeit von Blut auf die Erythrozytendichte von PHA-E beschichteten Schwingquarzen

3.1.5.5 Spezifitätstest

Zur Überprüfung der Spezifität des Lektins PHA-E mit Erythrozyten aller Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B und 0) wurden Schwingquarze mit dem Lektin PHA-E in einer Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$ und einer Inkubationszeit von 60 Minuten beschichtet. Es wurden die gleichen Puffermedien wie in 3.1.5.1 (EDTA-Tris, Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn) untersucht. Bei Verwendung von unbehandeltem Vollblut und Puffer EDTA-Tris zeigte sich eine Bindungsdifferenz der Erythrozyten der Blutgruppen mit A Anteil (A_1 , A_2 und A_1B). Die Erythrozyten der Blutgruppe B und 0 zeigten ein deutlich gemindertes Bindungsverhalten (ca. 40%).

Nach Waschen der Erythrozyten und Verwendung einer Erythrozytensuspension mit dem Puffer Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn konnte ein unspezifisches Bindungsverhalten der Erythrozyten aller

Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) mit durchweg hohen Belegungsdichten beobachtet werden. Abbildung 42 zeigt den Vergleich der unterschiedlichen Puffermedien für die Überprüfung des Bindungsverhaltens von Erythrozyten verschiedener Blutgruppen. Daraus geht hervor, dass das Lektin PHA-E wie erwartet unselektiv Erythrozyten gebunden hat, bei Verwendung des Puffers Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn.

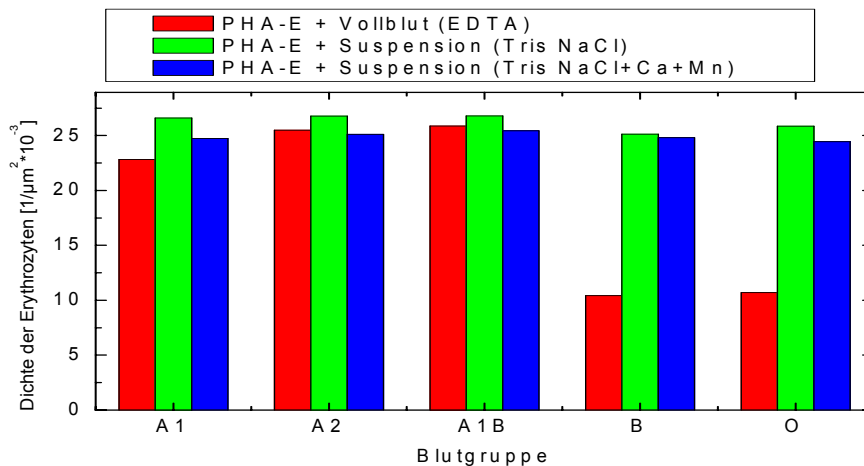


Abbildung 42: Lektin PHA-E: Vergleich des Bindungsverhaltens der Erythrozyten unterschiedlicher Blutgruppen in Abhängigkeit des verwendeten Puffers bzw. als Vollblut oder Erythrozytensuspension

3.2 Messungen FidgeType Anlage

In Teil 3.2 dieser Arbeit sollten die vorangegangenen Ergebnisse der Schichtoptimierung der einzelnen Lektine mit der Dummy-Anlage (Teil 3.1) auf die FidgeType Anlage übertragen werden. Dazu wurden die gleichen Systempuffer und Parameter für Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, sowie die Inkubationszeit des Blutes verwendet. In den folgenden Versuchen mit den Lektinen DBA und EEL wurden die Probenvorbereitung (Erythrozyten aus Vollblut oder gewaschenen Erythrozyten als Suspension), sowie die Messprozedur (konstanter Fluss oder Stopp) optimiert. Für die Lektine CON-A und PHA-E entfielen die Versuche der Probenvorbereitung, da diese bereits mit der Dummy-Anlage durchgeführt wurden. Es wurden nur die Messprozeduren (konstanter Fluss oder Stopp-Flow) optimiert. Die Versuche mit Stopp-Flow orientierten sich an den Signaländerungen (Δf , $\Delta \Gamma$), die eintraten sobald die

Erythrozyten den beschichteten Schwingquarz erreichten. Die Länge des Stopps wurde in Abhängigkeit von der Signalstabilität gewählt (5 bis 10 Minuten).

Die letzten Experimente eines Lektins beschäftigten sich mit der Überprüfung der Selektivität auf Erythrozyten der verschiedenen Blutgruppen. Dazu wurden unter optimierten Parametern Erythrozyten der Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, B und 0 in der FidgeType Anlage untersucht. Gemessen wurden jeweils Δf [Hz] und $\Delta \Gamma$ [Hz].

3.2.1 Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) auf FidgeType Anlage

Durch die folgenden Experimente sollten die Ergebnisse der Optimierungsschritte des Lektins DBA mit der Dummy-Anlage (Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, Inkubationszeit des Blutes) auf die FidgeType Anlage übertragen werden. Im Folgenden wurden die Probenvorbereitung (Erythrozyten aus Vollblut oder gewaschenen Erythrozyten als Suspension), sowie die Messprozedur (konstanter Fluss oder Stopp-Flow) jeweils mit Erythrozyten der Blutgruppe A₁ optimiert. Im letzten Schritt wurde die Selektivität des Lektins DBA auf Erythrozyten der Blutgruppe A₁ unter optimierten Parametern überprüft. Die Beschichtung der Schwingquarze für diese Versuche wurde aus den Experimenten mit der Dummy-Anlage übernommen und erfolgte mit 50 μ l Neutravidin der Konzentration 25 μ g/ml und 15 Minuten Inkubationszeit, anschließend mit 50 μ l des Lektins DBA der Konzentration 100 μ g/ml für 60 Minuten. Die Blutproben aus Vollblut bzw. Erythrozytensuspension wurden 1:10 mit EDTA-Tris Puffer verdünnt. Als Systempuffer wurde EDTA-Tris verwendet. Die Systemtemperatur der FidgeType Anlage wurde auf 25°C eingestellt. Die Fluss-Messungen erfolgten mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 95 μ l/min. Bei Messungen mit Stopp (im Folgenden als „Stopp-Flow“ Messung“ bezeichnet) wurde für 5 Minuten der Fluss unterbrochen. Am Ende wurde mit 500 μ l/min und EDTA-Tris Puffer gespült.

3.2.1.1 Probenvorbereitung und Messprozeduren

Die folgenden Messungen sollten die unterschiedlichen Probenvorbereitungen und Messprozeduren in der FidgeType Anlage vergleichen. Dazu wurde

folgende Versuchsreihe mit Lektin DBA beschichteten Schwingquarzen durchgeführt:

- Vollblut mit konstantem Fluss
- Vollblut mit 5 Minuten Stopp
- Erythrozytensuspension mit konstantem Fluss
- Erythrozytensuspension mit 5 Minuten Stopp

- Vollblut der Blutgruppe A₁ mit konstantem Fluss

Mit diesen Messungen sollte untersucht werden, welchen Einfluss Erythrozyten aus Vollblut im konstanten Fluss auf die Signalamplituden haben. In Abbildung 43 ist eine geringe Signaländerungen von $\Delta f = -30$ Hz und $\Delta\Gamma = 600$ Hz erkennbar.

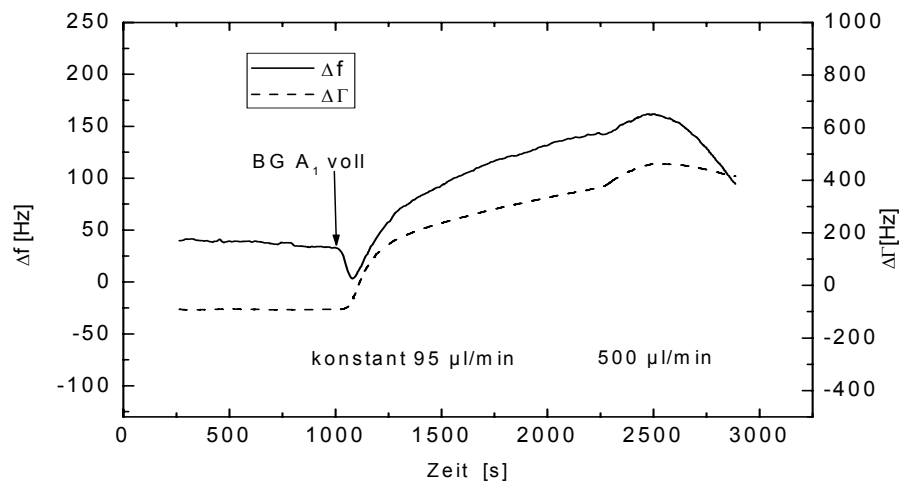


Abbildung 43: Lektin DBA: Messung von Δf [Hz] und $\Delta\Gamma$ [Hz], Verwendung von Vollblut der Blutgruppe A₁ im konstanten Fluss

- Vollblut der Blutgruppe A₁ mit 5 Minuten Stopp

Bei der nachfolgenden Stopp-Messung wurde bei Eintreten eines Frequenzabfalls die Pumpe für die Pufferlösung für 5 Minuten gestoppt. Danach wurde die Pufferpumpe mit einer Pumpgeschwindigkeit von 95µl/min wieder in Betrieb genommen. Abbildung 44 zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf von Δf und $\Delta\Gamma$ wie die Messungen mit konstantem Fluss ($\Delta f = -20$ Hz und $\Delta\Gamma = +400$ Hz).

3 Ergebnisse

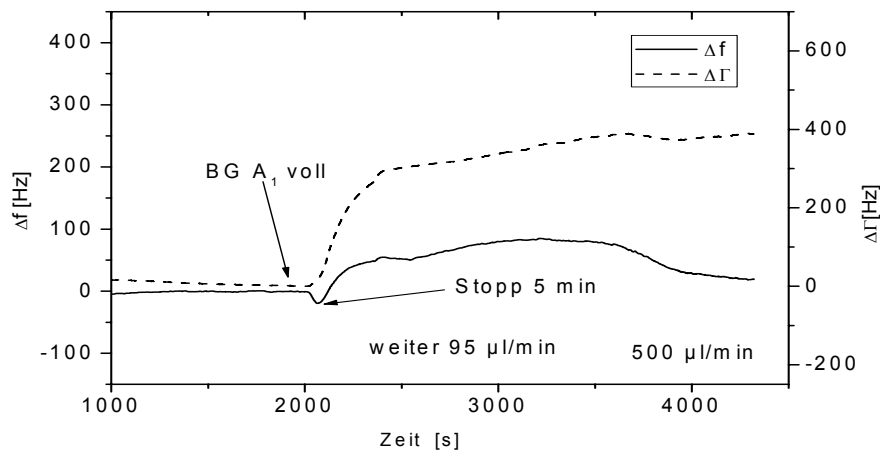


Abbildung 44: Lektin DBA: Messung Δf [Hz] und $\Delta\Gamma$ [Hz], Verwendung von Vollblut der Blutgruppe A_1 mit 5 Minuten Stopp

- Erythrozytensuspension der Blutgruppe A_1 mit Konstantem Fluss

In Abbildung 45 sind die Signale Δf und $\Delta\Gamma$ für Erythrozytensuspension der Blutgruppe A_1 im konstanten Fluss dargestellt. Im Gegensatz zu den obigen Messungen wurden ein deutliches Δf von -2500 Hz und eine ausgeprägtes $\Delta\Gamma$ von +4000 Hz sichtbar.

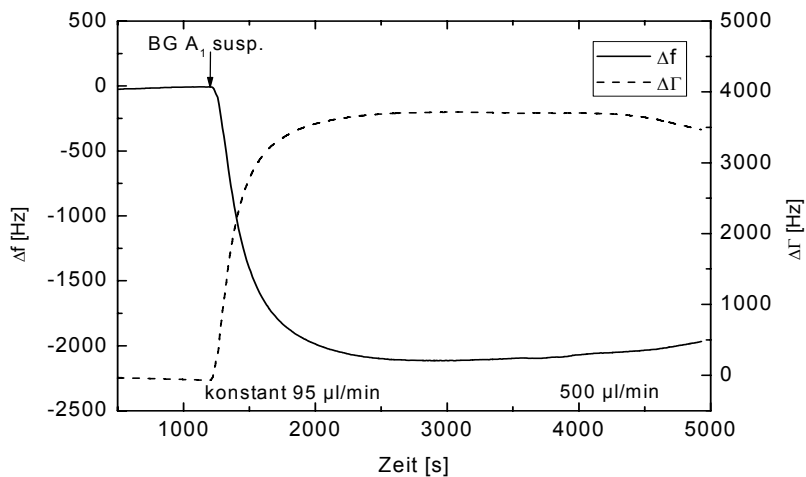


Abbildung 45: Lektin DBA: Messung von Δf und $\Delta\Gamma$, Verwendung von gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension der Blutgruppe A_1 im konstanten Fluss

- Erythrozytensuspension der Blutgruppe A_1 mit 5 Minuten Stopp

Die Signalantwort auf gewaschene Erythrozyten als Erythrozytensuspension bei 5 Minuten Stopp sind in Abbildung 46 dargestellt. Wieder wurde bei Eintreten eines Frequenzabfalls die Pumpe für die Pufferlösung für 5 Minuten gestoppt.

3 Ergebnisse

Anschließend wurde die Pufferpumpe mit einer Geschwindigkeit von 95 $\mu\text{l}/\text{min}$ wieder in Betrieb genommen.

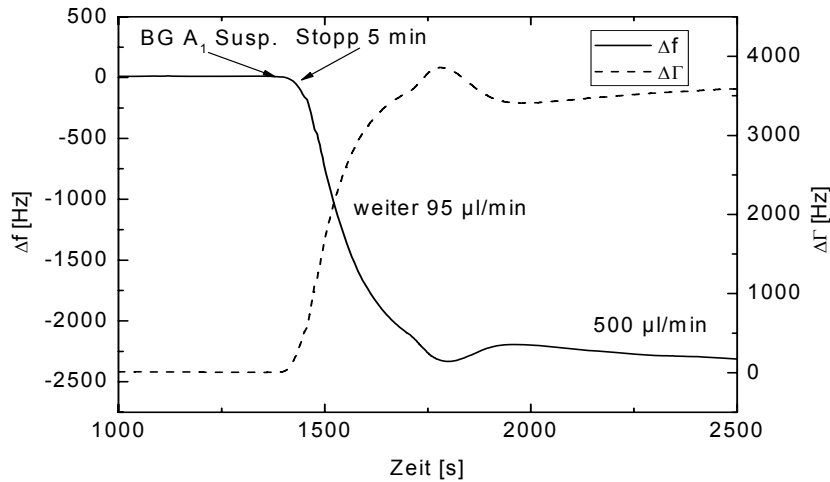


Abbildung 46: Lektin DBA: Messung von Δf und $\Delta \Gamma$, Verwendung von gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension der Blutgruppe A_1 mit 5 Minuten Stopp

In Abbildung 47 und Tabelle 7 sind die unterschiedlichen Messprozeduren (konstant / Stopp) und Probenpräparationen (Vollblut / Suspension) gegenübergestellt. Die Proben mit gewaschenen Erythrozyten als Suspension zeigten für Δf und $\Delta \Gamma$ sehr starke Signaländerungen, weshalb alle weiteren Messungen mit Lektin DBA beschichteten Schwingquarzen mit gewaschenen Erythrozyten durchgeführt wurden. Der Einfluss von Stopp oder Konstantem Fluss ist gering, wegen der besseren Reproduzier- und Steuerbarkeit wurden alle weiteren Messungen mit konstantem Fluss durchgeführt.

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Vollblut + konstanter Fluss	-30	600
Vollblut + 5min Stopp	-20	400
Suspension + konstanter Fluss	-2500	4000
Suspension + 5min Stopp	-2300	3800

Tabelle 7: Lektin DBA: Messwerte der Versuche zu Probenvorbereitung und Messprozeduren

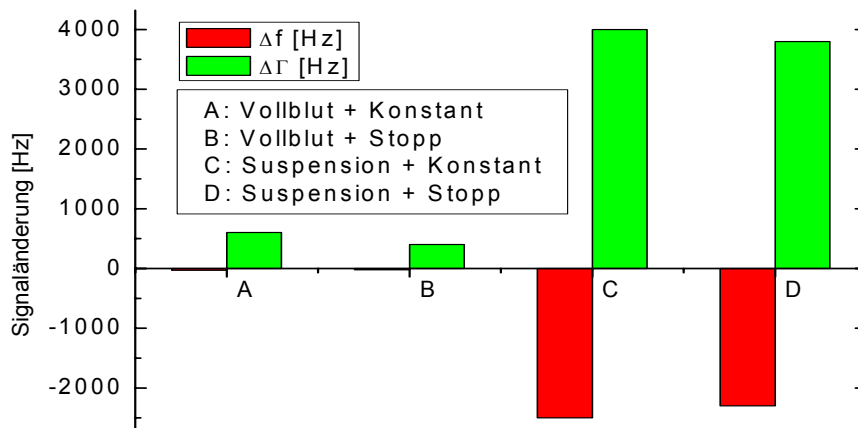


Abbildung 47: Lektin DBA: Zusammenfassung unterschiedlicher Parameter der Probenvorbereitung (Vollblut versus Gewaschene Erythrozyten) und Messbedingungen (Konstanter Fluss versus Stopp)

3.2.1.2 Spezifitätstests des Lektins DBA

Zur Untersuchung der Spezifität des Lektins DBA auf der FidgeType Anlage wurden Lektin DBA beschichtete Schwingquarze mit allen Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B und 0) untersucht, um so die erwartete Spezifität für Erythrozyten der Blutgruppe A_1 zu überprüfen. Alle Messungen hierzu wurden mit gewaschenen Erythrozyten der jeweiligen Blutgruppe als Suspension (1:10 in EDTA-Tris Puffer) und mit konstantem Fluss (95 $\mu\text{l}/\text{min}$) durchgeführt. In Abbildung 48 sind die Signaländerungen Δf und $\Delta \Gamma$ über den verschiedenen Blutgruppen aufgetragen. Die Messungen zeigten eine deutliche Spezifität für Erythrozyten der Blutgruppe A_1 mit einem $\Delta f = -2000$ Hz und $\Delta \Gamma = +4000$ Hz. Alle anderen Blutgruppen zeigten weitaus geringere Signale, wobei der Unterschied in der Frequenzmessung ausgeprägter als für die Dämpfungsmessung ausfiel.

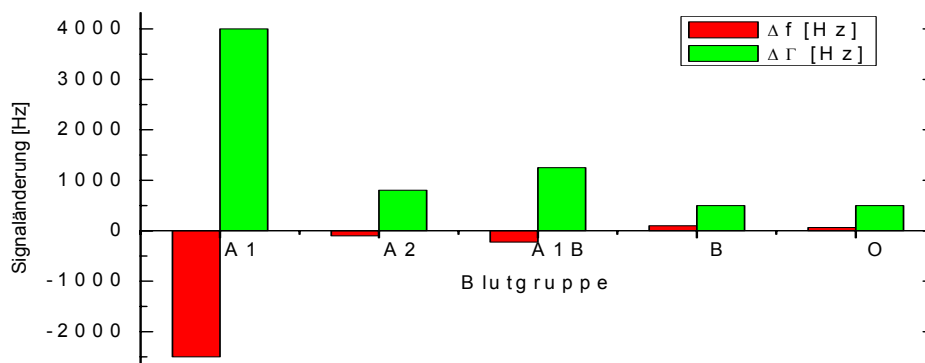


Abbildung 48: Lektin DBA: Überprüfung der Spezifität des Lektins DBA mit Erythrozyten aller Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B, 0) auf der FidgeType Anlage

In Tabelle 8 sind die Signaländerungen für die einzelnen Blutgruppen aufgeführt.

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Blutgruppe A ₁	-2500	4000
Blutgruppe A ₂	-100	800
Blutgruppe A ₁ B	-225	1250
Blutgruppe B	100	500
Blutgruppe 0	65	500

Tabelle 8: Lektin DBA: Messwerte der Spezifitätstests aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B, 0) auf DBA beschichteten Schwingquarzen

3.2.2 Euronymus Europaeus Lektin (ELL) auf FidgeType Anlage

Das Lektin EEL wurde für den spezifischen Nachweis der Blutgruppe B eingesetzt werden. Die folgenden Experimente sollten die Ergebnisse der Optimierungsschritte des Lektins EEL mit der Dummy-Anlage (Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, Inkubationszeit des Blutes) auf die FidgeType Anlage überprüfen. Dazu gehörten Schritte zur Optimierung der Probenvorbereitung der Erythrozyten der Blutgruppe B aus Vollblut bzw. gewaschenen Erythrozyten als Suspension. Des Weiteren wurde zwischen konstantem Fluss bzw. Stopp-Flow variiert (Optimierung der Messprozedur). Anschließend erfolgten die Messungen aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) auf mit Lektin EEL beschichteten Schwingquarzen. Dazu wurden die vorher optimierten Parameter angewandt. Die Beschichtung der Schwingquarze für diese Versuche wurde aus den Dummy-Versuchen übernommen und erfolgte mit 50µl Neutravidin der Konzentration 25µg/ml für 15 Minuten und anschließend mit 50µl EEL der Konzentration 100 µg/ml für 60 Minuten. Die Blutproben aus Vollblut bzw. Erythrozytensuspension wurden 1:10 mit EDTA-Tris Puffer verdünnt. Als Systempuffer wurde EDTA-Tris verwendet. Die Systemtemperatur der FidgeType Anlage wurde auf 25°C eingestellt. Die Messungen erfolgten mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 95µl/min, Messungen mit Stopp wurden für 5 Minuten unterbrochen. Am Ende wurde mit 500µl/min gespült.

3.2.2.1 Probenvorbereitung und Messprozeduren

Die folgenden Messungen sollten die unterschiedlichen Probenvorbereitungen und Messprozeduren vergleichen. Dazu wurde mit Lektin EEL beschichteten Schwingquarzen in der FidgeType Anlage folgende Versuchsreihe durchgeführt:

- Vollblut mit konstantem Fluss
- Vollblut mit 5 Minuten Stopp
- Erythrozytensuspension mit konstantem Fluss
- Erythrozytensuspension mit 5 Minuten Stopp

- Vollblut der Blutgruppe B mit konstantem Fluss versus 5 Minuten Stopp

Die Messungen sollten zeigen, wie sich die Signalintensität verändert, wenn Vollblut im konstanten Fluss (95 μ l/min) oder mit einer Stoppphase von 5 Minuten mit dem Lektin EEL beschichteten Schwingquarz interagiert. Nachdem die Vollblutprobe die Messkammer erreicht hat, kam es kurz zu einer schnellen Signaländerung. Die Messung mit konstantem Fluss zeigte $\Delta f = -1800$ Hz und $\Delta \Gamma = +3500$ Hz. Nach ca. 6 Minuten erfolgten die Änderungen langsam und konstant, nach ca. 60 Minuten stellte sich eine Sättigung ein. Bei den Messungen mit 5 Minuten Stopp konnten ähnliche Kurvenverläufe beobachtet werden. Nach 5 Minuten Stopp konnten $\Delta f = -500$ Hz und $\Delta \Gamma = +2000$ Hz beobachtet werden.

- Suspension der Blutgruppe B mit konstantem Fluss versus 5 Minuten Stopp

Bei diesen Messungen wurde das Verhalten gewaschener Erythrozyten als Suspension untersucht. Es erfolgten Messungen im konstanten Fluss von 95 μ l/min bzw. mit 5 Minuten Stopp. Bei konstantem Fluss waren $\Delta f = -3750$ Hz und $\Delta \Gamma = +4750$ Hz zu beobachten. Die Signaländerungen erfolgten sehr schnell mit steilen Kurvenverläufen, ein Übergang in eine Sättigung erfolgte nach ca. 5 Minuten. Die Signalintensitäten bei 5 Minuten Stopp waren ähnlich ($\Delta f = -3350$ Hz, $\Delta \Gamma = +5400$ Hz). Schnelle Änderungen und steile Kurvenverläufe

waren ebenfalls zu beobachten. Eine Sättigung konnte nach ca. 5 Minuten beobachtet werden.

Eine deutliche Differenz der Signalintensitäten zeigten die vergleichenden Messungen mit Lektin EEL beschichteten Schwingquarzen mit Erythrozyten aus unbehandeltem Vollblut versus gewaschenen Erythrozyten als Suspension. Die unterschiedlichen Messprozeduren (konstanter Fluss versus 5 Minuten Stopp) hatten keinen großen Einfluss auf die Signalintensität. Die Tabelle 9, sowie Abbildung 49 zeigen die Signaländerungen Δf [Hz] und $\Delta \Gamma$ [Hz] unter variierten Bedingungen.

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Vollblut mit konstantem Fluss	-1800	3500
Vollblut mit 5 min Stopp	-500	2000
Suspension mit konstantem Fluss	-3750	4750
Suspension mit 5 min Stopp	-3350	5400

Tabelle 9: Lektin EEL: Messwerte der Untersuchungen zu variabler Probenvorbereitung und Messprozeduren

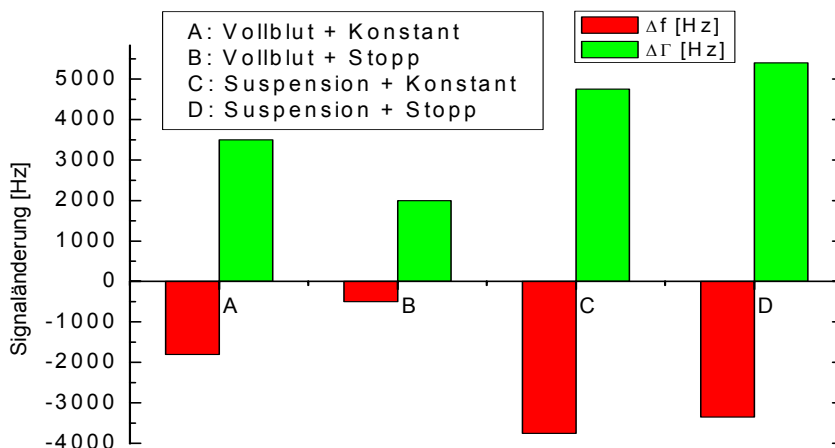


Abbildung 49: Lektin EEL: Vergleich der unterschiedlichen Probenvorbereitung (Vollblut versus gewaschene Erythrozyten) und der unterschiedlichen Messbedingungen (konstanter Fluss versus 5 Minuten Stopp), Messung von Δf und $\Delta \Gamma$

Die Proben mit gewaschenen Erythrozyten als Suspension im konstanten Fluss zeigten eine sehr starke und stabile Signale Δf und $\Delta \Gamma$, dies diente als Basis für weitere Messungen mit Lektin EEL beschichteten Schwingquarzen. Die weiteren Messungen mit Lektin EEL wurden mit konstantem Fluss (95 μ l/min) durchgeführt (vgl. Abbildung 50).

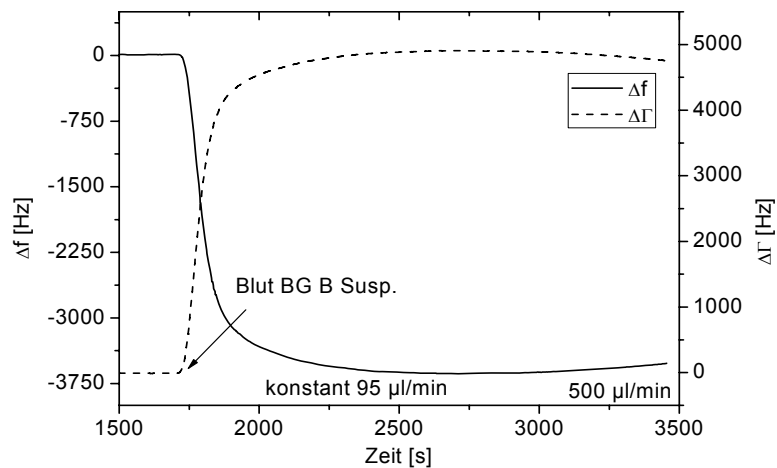


Abbildung 50: Lektin EEL: Messung Δf und $\Delta \Gamma$ unter Verwendung gewaschener Erythrozyten der Blutgruppe B im konstanten Fluss

3.2.2.2 Spezifitätstests des Lektins

Zur Untersuchung der Spezifität des Lektins auf der FidgeType Anlage wurden mit Lektin EEL beschichtete Schwingquarze mit allen Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B und 0) getestet. Alle folgenden Messungen wurden mit gewaschenen Erythrozyten der jeweiligen Blutgruppe als Suspension (1:10 in EDTA-Tris Puffer) und mit konstantem Fluss (95 μ l/min) durchgeführt. Tabelle 10 und Abbildung 51 zeigen die Messungen zur Spezifität. Für das Lektin EEL waren mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B die stärksten Signale (Δf und $\Delta \Gamma$) und die schnellste Reaktion (2 Minuten bis zum maximalen Signal) zu beobachten. Die Blutgruppen 0 und A_2 zeigten geringere Signale. Bei Blutgruppe A_1 wurden kaum Signaländerungen beobachtet.

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Blutgruppe A_1	-140	1400
Blutgruppe A_2	-800	2600
Blutgruppe A_1B	-3000	4500
Blutgruppe B	-3750	4750
Blutgruppe 0	-1600	3500

Tabelle 10: Lektin EEL: Messwerte der Untersuchungen zur Spezifität des Lektins EEL auf der FidgeType Anlage mit allen Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B und 0)

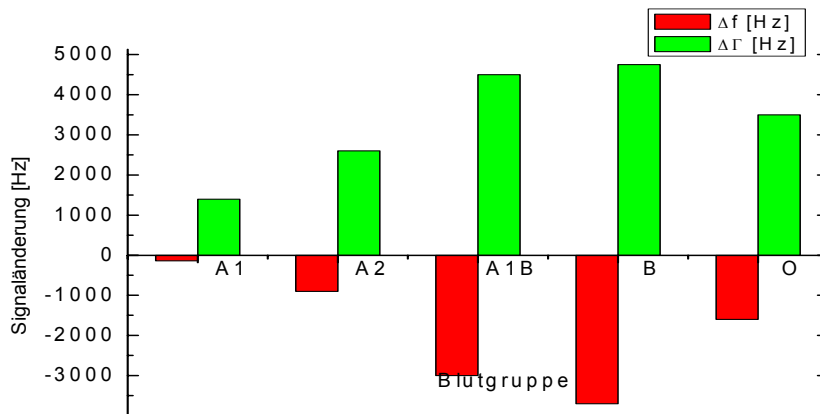


Abbildung 51: Lektin EEL: Überprüfung der Spezifität des Lektins EEL auf der FidgeType Anlage mit allen Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und O)

3.2.3 Concanavalin Agglutinin (CON-A) auf FidgeType Anlage

Das Lektin CON-A bindet Erythrozyten aller Blutgruppen unspezifisch. Durch die folgenden Experimente sollten die Ergebnisse der Optimierungsschritte des Lektins CON-A mit der Dummy-Anlage (Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, Inkubationszeit des Blutes) auf der FidgeType Anlage überprüft werden. In der Dummy-Anlage wurde bereits die Probenvorbereitung (Erythrozyten aus Vollblut oder gewaschenen Erythrozyten als Suspension, verschiedene Pufferlösungen) optimiert, so dass die folgenden Experimente ausschließlich mit gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension im Puffer Tris-NaCl+Ca+Mn durchgeführt wurden. Zur Untersuchung des Einflusses der Messprozedur (konstanter Fluss oder Stopp) wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0 verwendet. Im letzten Schritt wurde die Selektivität des CON-A mit Erythrozyten aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und O) unter optimierten Parametern überprüft. Die Beschichtung der Schwingquarze für diese Versuche wurde aus den Dummyversuchen übernommen. Die Blutproben aus gewaschenen Erythrozyten als Suspension wurden 1:10 mit Tris-NaCl+Ca+Mn Puffer verdünnt. Als Systempuffer wurde Tris-NaCl+Ca+Mn verwendet. Die Systemtemperatur der FidgeType Anlage wurde auf 25°C eingestellt. Die Fluss-Messungen erfolgten mit konstanter Fließgeschwindigkeit von 95µl/min. Bei Messungen mit Stopp wurde für 10 Minuten der Fluss unterbrochen. Am Ende wurde mit 500µl/min gespült.

3.2.3.1 Messprozedur

Die folgenden Messungen sollten die unterschiedlichen Messprozeduren (konstanter Fluss und 10 Minuten Stopp) vergleichen. Dazu wurden Schwingquarze mit Lektin CON-A der Konzentration 6,25µg/ml (in Dummy-Anlage optimiert) beschichtet und gewaschene Erythrozyten der Blutgruppe 0 verwendet. Die Messungen mit konstantem Fluss und mit 10 Minuten Stopp brachten keine befriedigenden Ergebnisse (vgl. Tabelle 11 und Abbildung 52). Aus diesem Grund erfolgten erneute Messungen mit Lektin CON-A der Konzentration 100µg/ml beschichteten Schwingquarzen. Die dabei zu beobachtenden Signaländerungen waren ausgeprägter ($\Delta f = -1800\text{Hz}$, $\Delta \Gamma = +3500\text{Hz}$ im konstanten Fluss). Ein Stopp von 10 Minuten zeigte keine Signalverbesserung, deshalb erfolgten alle weiteren Messungen mit konstantem Fluss von 95µl/min.

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
CON-A 6,25µg/ml im konstanten Fluss	-250	1700
CON-A 6,25µg/ml mit 10 Minuten Stopp	-120	1500
CON-A 100µg/ml im konstanten Fluss	-1800	3500
CON-A 100µg/ml mit 10 Minuten Stopp	-650	1800

Tabelle 11: Lektin CON-A: Vergleich der unterschiedlichen Messprozeduren (Konstanter Fluss versus 10 Minuten Stopp) mit variablen Lektinkonzentrationen (6,25µg/ml versus 100µg/ml)

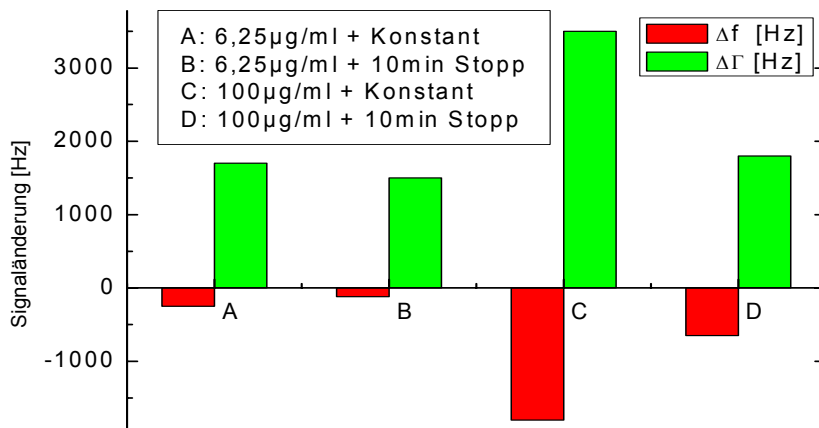


Abbildung 52: Lektin CON-A: Vergleich der unterschiedlichen Messprozeduren (Konstanter Fluss vs. 10 min Stopp) mit variablen Lektinkonzentrationen (6,25 $\mu\text{g/ml}$ vs. 100 $\mu\text{g/ml}$)

3.2.3.2 Spezifitätstests des Lektins auf der FidgeType Anlage

Zur Untersuchung der Bindungselektivität wurden Lektin CON-A (100 $\mu\text{g/ml}$) beschichte Schwingquarze mit allen Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B und 0) auf der FidgeType Anlage gemessen. In Tabelle 12 und Abbildung 53 sind die Ergebnisse der Messungen zur Spezifität dargestellt. Dabei konnte keine Selektivität für eine bestimmte Blutgruppe beobachtet werden.

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Blutgruppe A_1	-1600	3000
Blutgruppe A_2	-1800	3000
Blutgruppe A_1B	-1800	3600
Blutgruppe B	-2100	3500
Blutgruppe 0	-1800	3500

Tabelle 12: Lektin CON-A: Messergebnisse der Untersuchungen zur Spezifität mit allen Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B und 0) auf der FidgeType Anlage

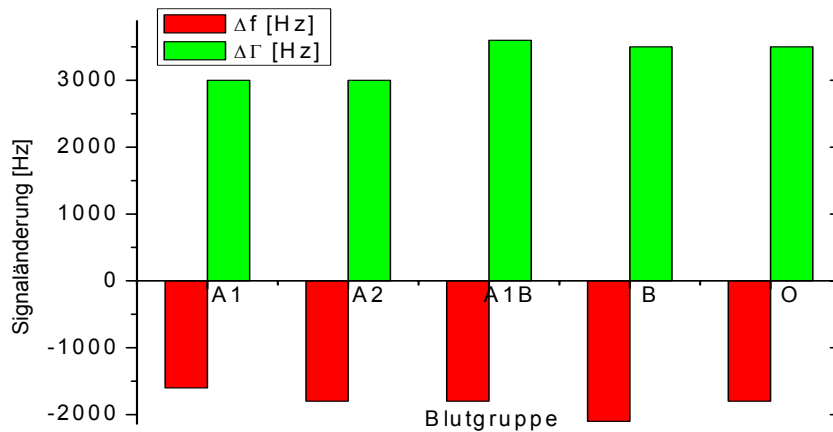


Abbildung 53: Lektin CON-A: Spezifitätstest mit den Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, B und O

3.2.4 Phaseolus vulgaris Agglutinin (PHA-E) auf FidgeType Anlage

Das Lektin PHA-E bindet unspezifisch Erythrozyten aller Blutgruppen. Durch die folgenden Experimente sollten die Ergebnisse der Optimierungsschritte des Lektins PHA-E mit der Dummy-Anlage (Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, Inkubationszeit des Blutes) auf die FidgeType Anlage übertragen werden. Die Probenvorbereitung (Erythrozyten aus Vollblut oder gewaschenen Erythrozyten als Suspension, verschiedene Pufferlösungen) wurde bereits in der Dummy-Anlage optimiert, so dass die folgenden Experimente ausschließlich mit gewaschenen Erythrozyten als Erythrozytensuspension im Puffer Tris-NaCl+Ca+Mn durchgeführt wurden. Zur Untersuchung des Einflusses der Messprozedur (konstanter Fluss oder Stopp) wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0 verwendet. Im letzten Schritt wurde die Selektivität des Lektins PHA-E mit Erythrozyten aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und O) unter optimierten Parametern überprüft.

Die Beschichtung der Schwingquarze für diese Versuche wurde aus den Dummyversuchen übernommen und erfolgte mit 50 μ l Neutraavidin der Konzentration 25 μ g/ml für 15 Minuten und anschließend mit 50 μ l PHA-E der Konzentration 12,5 μ g/ml für 5 Minuten. Die Blutproben aus gewaschenen Erythrozyten als Suspension wurden 1:10 mit Tris-NaCl+Ca+Mn Puffer verdünnt. Als Systempuffer wurde Tris-NaCl+Ca+Mn verwendet. Die Systemtemperatur der FidgeType Anlage wurde auf 25°C eingestellt. Die Fluss-

Messungen erfolgten mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 95µl/min. Bei Messungen mit Stopp wurde der Fluss für 5 Minuten unterbrochen. Abschließend wurde mit 500µl/min gespült.

3.2.4.1 Messprozedur

Die folgenden Messungen sollten die unterschiedlichen Messprozeduren (konstanter Fluss oder 5 Minuten Stopp) miteinander vergleichen. Der verschiedenen Messprozeduren (konstanter Fluss oder Stopp) zeigten keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 13 und Abbildung 54). Ein Stopp von 5 Minuten lieferte keine Signalverbesserung. Aus diesem Grund erfolgten alle weiteren Messungen mit konstantem Fluss (95µl/min).

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
konstanter Fluss	-1500	3250
5 min Stopp	-1300	3750

Tabelle 13: Lektin PHA-E: Vergleich der unterschiedlichen Messprozeduren (Konstanter Fluss versus 5 Minuten Stopp) auf der FidgeType Anlage

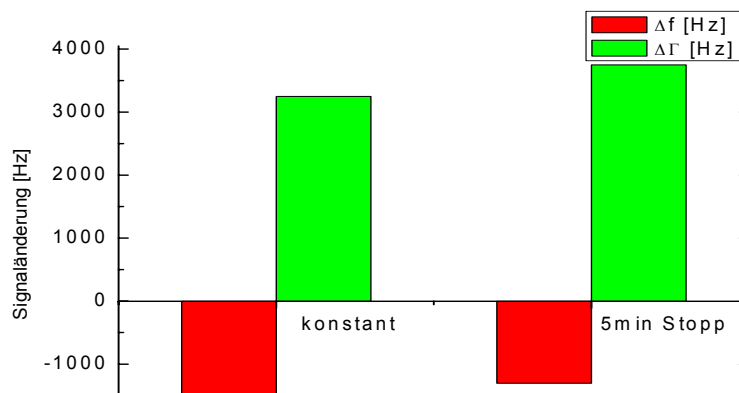


Abbildung 54: Lektin PHA-E: Vergleich der unterschiedlichen Messprozeduren (konstanter Fluss versus 5 min Stopp) auf der FidgeType Anlage

3.2.4.2 Spezifitätstest

Zur Überprüfung der Spezifität des Lektins PHA-E wurden Erythrozyten aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) auf der FidgeType Anlage untersucht.

In Abbildung 55 und Tabelle 14 werden die Messungen zur Überprüfung dargestellt. Es konnte keine Selektivität für Erythrozyten einer bestimmten

Blutgruppe beobachtet werden. Alle Blutgruppen zeigten Signale zwischen $\Delta f = -1500$ Hz und -1800 Hz, sowie $\Delta \Gamma = 3200$ Hz und 3800 Hz (vgl. Tabelle 14).

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Blutgruppe A ₁	-1800	3500
Blutgruppe A ₂	-1800	3800
Blutgruppe A ₁ B	-1600	3500
Blutgruppe B	-1500	3500
Blutgruppe 0	-1500	3250

Tabelle 14: Lektin PHA-E: Untersuchung der Spezifität mit Erythrozyten aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) auf der FidgeType Anlage

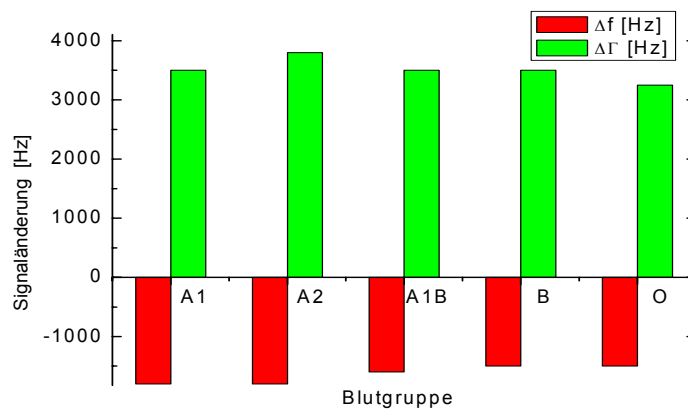


Abbildung 55: Lektin PHA-E: Untersuchung der Spezifität mit Erythrozyten aller Blutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) auf der FidgeType Anlage

3.3 Wiederverwendung der Schwingquarze und Einflüsse des Plasmas

Zunächst soll eine Strategie zur Wiederverwendung der Schwingquarze entwickelt werden und dann der Einfluss des Plasmas auf das Bindungsverhalten der Erythrozyten an das Lektin untersucht werden.

3.3.1 Elutions- und Inhibitionsversuche mit Zucker

Die Elutions- und Inhibitionsversuche mit Zucker sollten untersuchen, in wie weit das Bindungsverhalten der Erythrozyten an die Lektinschicht durch den jeweiligen Zucker beeinflusst wurde. Die ersten Versuche erfolgten mit Lektin (DBA, EEL, CON-A und PHA-E) beschichteten Schwingquarzen im Dummy-

System. Im Anschluss sollten die Ergebnisse auf die FidgeType Anlage übertragen werden. Exemplarisch wurde das Lektin CON-A gewählt. Der Einfluss der Viskosität der Zuckerlösungen auf das Messsignal der FidgeType Anlage wurde ebenfalls untersucht.

Folgende Versuchsreihen wurden im Dummy-System durchgeführt:

Elution: Einfaches Einwirken bzw. Absinken der Zuckerlösung (ohne Mischschüttler) für 15 Minuten, im Folgenden als „Stase“ Messung bezeichnet.

Elution: Mit Hilfe mechanisch erzeugter Schwingungen mittels Mischschüttler für 15 Minuten, im Folgenden als „Schüttler“ Messung bezeichnet.

Inhibition: Vorinkubation des Lektin beschichteten Schwingquarzes mit Zucker für 15 Minuten

Folgende Versuchsreihen wurden in der FidgeType Anlage exemplarisch für das Lektin CON-A durchgeführt: Viskosität mit α -MG und α -MM, Elution mit α -MM, Inhibition mit α -MM.

3.3.1.1 Lektin DBA – Zuckertest im Dummy-System

Zur Untersuchung der Einflüsse des Elutions- und Inhibitionszuckers N-Acetylgalactosamin wurden die Schwingquarze mit Lektin DBA beschichtet (100 μ g/ml für 60 Minuten). Es wurden 250 μ l Erythrozyten aus Vollblut der Blutgruppe A₁ und 50 μ l des Zuckers N-Acetylgalactosamin 200mM verwendet.

Elutionsversuche: Lektin DBA beschichtete Schwingquarze wurden für 15 Minuten mit Erythrozyten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Zuckers N-Acetylgalactosamin mit 15 Minuten Einwirkzeit bei Raumtemperatur bzw. 20 Stunden Einwirkzeit bei 7°C. Nach 15min hatten sich nur wenige Erythrozyten gelöst (Restbelegungsdichte ca. 12,4/ μ m²*10⁻³), nach 20 Stunden bei 7°C verblieb eine deutlich reduzierte Erythrozytendichte auf dem Schwingquarz (ca. 4/ μ m²*10⁻³, Startbelegungsdichte ca. 20,5/ μ m²*10⁻³).

Inhibitionsversuche: Ein mit Lektin DBA beschichteter Schwingquarz wurde zuerst mit N-Acetylgalactosamin und anschließend mit Erythrozyten jeweils für 15 Minuten inkubiert. Bei diesem Versuch war eine geringere Belegungsdichte mit Erythrozyten auf dem Schwingquarz zu beobachten (ca. 17/ μ m²*10⁻³). In Abbildung 56 wird der Einfluss des Elutions- und Inhibitionszuckers

N-Acetylgalactosamin auf das Bindungsverhalten der Erythrozyten gezeigt. Dabei zeigten sich bei Elution und Inhibition geringere Belegungsdichten.

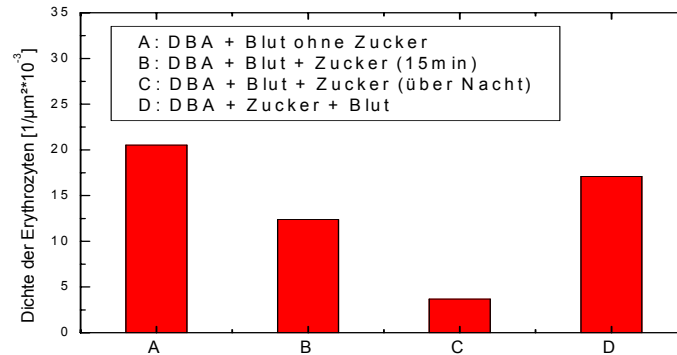


Abbildung 56: Lektin DBA: Einfluss des Elutions- und Inhibitionszuckers N-Acetylgalactosamin auf die Erythrozytendichte (Vollblut der Blutgruppe A₁)

3.3.1.2 Lektin EEL – Zuckertest im Dummy-System

Zur Untersuchung der Einflüsse der Elutions- und Inhibitionszucker Lactose und Galactose wurden die Schwingquarze mit Lektin EEL beschichtet (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 60 Minuten). Es wurden 250 μl Erythrozyten aus Vollblut der Blutgruppe B aufgebracht. Für die folgenden Versuche wurden jeweils 50 μl Lactose bzw. Galactose 200mM verwendet.

Elution: Lektin EEL beschichtete Schwingquarze wurde für 15 Minuten mit Erythrozyten und anschließend für 15 Minuten mit Lactose bzw. Galactose inkubiert. Es wurden zwei Verfahren zum Ablösen der Erythrozyten getestet: einfache Stase für 15 Minuten, mechanisch erzeugte Schwingungen mittels Schüttler für 15 Minuten. Dabei zeigte Lactose ein etwas besseres Lösungsvermögen mit Restbelegungsdichten der Erythrozyten von 15,7 bis 11,8/ $\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$, nach Inkubation mit Galactose waren 12,4 bis 16/ $\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ Erythrozyten auf dem Schwingquarz verblieben (vgl. Abbildung 57).

Inhibition: Zur Sättigung des Lektins wurde der beschichtete Schwingquarz für 15 Minuten mit Lactose bzw. Galactose vorinkubiert, anschließend wurde Blut aufgebracht. Beide Zucker bewirkten eine geringere Anbindung der Erythrozyten, bei Galactose banden nur ca. 5/ $\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$. In Abbildung 57 wird deutlich, dass alle Verfahren leichte Lösungstendenzen von 40 bis 50% der

gebundenen Erythrozyten zeigten, wobei der Lösungsvorgang des Zuckers Lactose mit mechanischer Unterstützung die besten Ergebnisse erbrachte.

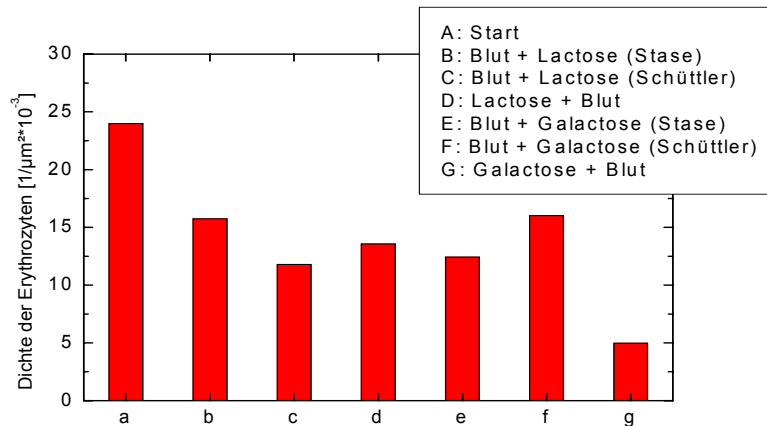


Abbildung 57: Lektin EEL: Einfluss der Elutions- und Inhibitionszucker Lactose und Galactose auf das Bindungsverhalten der Erythrozyten (Vollblut der Blutgruppe B)

3.3.1.3 Lektin CON-A – Zuckertest im Dummy-System

Zur Untersuchung der Wirkung der Elutions- und Inhibitionszucker α -Methyl-Glucose (α -MG) und α -Methyl-Mannosit (α -MM) auf das Bindungsverhalten der Erythrozyten an das Lektin CON-A wurden die optimierten Beschichtungsparameter verwendet (50 μ l Lektin CON-A der Konzentration 6,25 μ g/ml für 5 Minuten). Die Inkubationszeit für 250 μ l Erythrozytensuspension der Blutgruppe 0 betrug 5 Minuten. Die Durchführung der folgenden Versuche erfolgte jeweils mit 50 μ l einer 200mM Lösung von α -MG, α -MM und α -MG / α -MM im Verhältnis 1:1.

Elution: Dafür wurden die Schwingquarze nach der Erythrozyteninkubation und Spülen mit Puffer mit Zuckerlösung (α -MG, α -MM, α -MG / α -MM 1:1) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit der Methodik Stase und Schüttler inkubiert. Bei allen Versuchen zeigten sich nur geringe Abweichungen von der Startbelegung ($24,7/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$) und die Restbelegungsichten der Erythrozyten schwankten zwischen $24,1$ und $19,6/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$.

Inhibition: Die Lektin beschichteten Schwingquarze wurden für 15 Minuten mit α -MG, α -MM und α -MG / α -MM 1:1 vorinkubiert. Anschließend erfolgte das Einwirken der Erythrozyten im Dummy-System. Die Restbelegungsichten unterschieden sich mit $22,3$ bis $24/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ kaum von der Startdichte

($24,7/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$). Abbildung 58 zeigt diese Versuche. Die Erythrozyten hafteten fast vollständig am Schwingquarz, eine leichte Lösungstendenz war nur bei der Mischung α -MG / α -MM 1:1 sichtbar.

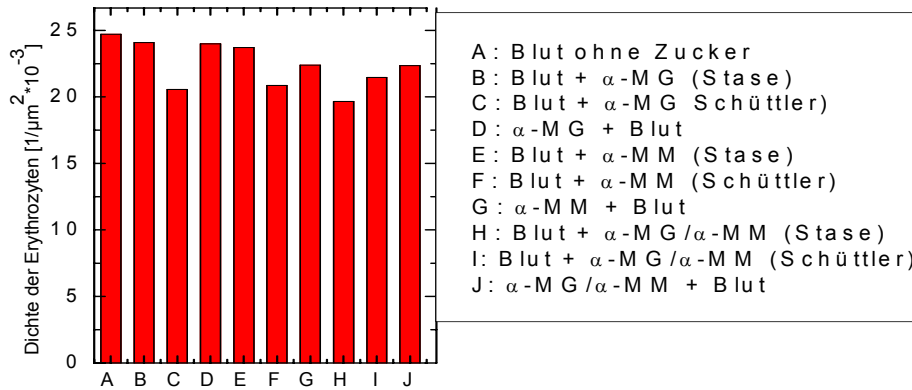


Abbildung 58: Einfluss des Elutionszucker α -Methyl-Glucose (α -MG) bzw. α -Methyl-Mannosid (α -MM) auf das Ablöseverhalten der Erythrozyten und der damit verbundenen Erythrozytendichte.

3.3.1.4 Lektin PHA-E – Zuckertest im Dummy-System

Zur Untersuchung der Einflussnahme des Elutions- und Inhibitionszuckers Galactose auf die Bindung von Erythrozyten an das Lektin PHA-E, wurden Schwingquarze mit Lektin PHA-E beschichtet ($50\mu\text{l}$ Lektin der Konzentration $12,5\mu\text{g}/\text{ml}$ für 5 Minuten). Für sämtliche Lösungsversuche wurden $50\mu\text{l}$ Galactose 200mM und $250\mu\text{l}$ Erythrozytensuspension der Blutgruppe 0 verwendet.

Elution: Der beschichtete Schwingquarz wurde für 5 Minuten mit gewaschenen Erythrozyten inkubiert. Anschließend wurden die zwei Verfahren zum Ablösen der Erythrozyten angewendet: einfache Stase für 15 Minuten und mechanisch erzeugte Schwingungen mittels Schüttler für 15 Minuten.

Inhibition: Zur Sättigung des Lektins wurde der beschichtete Schwingquarz 15 Minuten mit Galactose vorinkubiert und anschließend mit der Erythrozytensuspension benetzt.

In Abbildung 59 wird deutlich, dass kein Verfahren eine Lösungstendenz der gebundenen Erythrozyten zeigt. Im Vergleich zur Startbelegungsichte von

24,3/ $\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ Erythrozyten haften nach den Versuchen mit Galactose mehr Erythrozyten am Schwingquarz (24,7 bis 25/ $\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$).

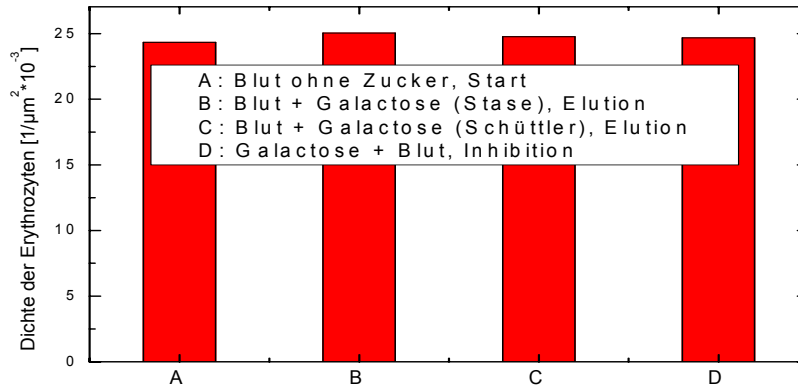


Abbildung 59: Einfluss des Elutions- und Inhibitionszucker Galactose auf das Bindungsverhalten von gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe 0

3.3.1.5 Lektin CON-A – Zuckertest in der FidgeType Anlage

Nach Durchführung der Elutions- und Inhibitionsversuchen im Dummy-System sollten die Ergebnisse auf die FidgeType Anlage übertragen werden. Exemplarisch wurde das Lektin CON-A gewählt. Der Einfluss der Viskosität der Zuckerlösungen auf das Messsignal der FidgeType Anlage wurde im Vorfeld untersucht. Es wurden folgende Zuckerlösungen untersucht: α -Methyl-Glycosid (α -MG) als einfacher Zucker und α -Methyl-Mannosid (α -MM) als komplexer Zucker. Als Systempuffer diente Tris-NaCl+Ca+Mn mit einer Geschwindigkeit von 95 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei einer Systemtemperatur von 25°C.

- Viskositätsversuche

Zu Beginn der Versuche sollte der Einfluss der Viskosität der jeweiligen Zuckerlösungen (α -MG und α -MM) auf das Messsignal beleuchtet werden. Die Schwingquarze waren unbeschichtet. Es wurden jeweils 250 μl einer 200mM Lösung der Zucker α -MG und α -MM verwendet. Die gemessenen Signaländerungen betragen $\Delta f = -100$ bis -180 Hz und $\Delta \Gamma = 120$ bis 140 Hz (vgl. Abbildung 60 / Tabelle 15).

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Ohne Beschichtung + α -MG	-100	120
Ohne Beschichtung + α -MM	-180	140
CON-A (100 μ g/ml) Beschichtung + Blut + α -MM (Elution)	-1300	4250
CON-A (100 μ g/ml) Beschichtung + α -MM + Blut (Inhibition)	-2200	4300
CON-A (100 μ g/ml) Beschichtung + Blut in α -MM (Inhibition)	-2000	3500

Tabelle 15: CON-A: Messungsergebnisse zu Viskosität, Elution und Inhibition mit α -Methyl-Glycosid (α -MG) und α -Methyl-Mannosit (α -MM)

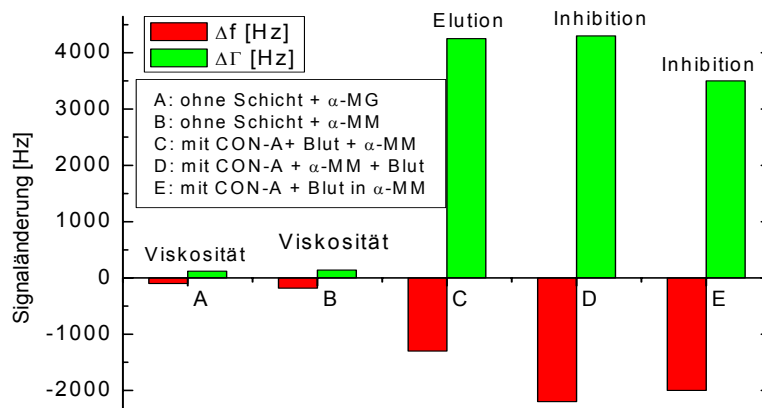


Abbildung 60: CON-A: Zusammenfassung der Messungen zu Viskosität, Elution und Inhibition mit α -Methyl-Glucose (α -MG) und α -Methyl-Mannosit (α -MM)

- Elutions- und Inhibitionsversuche

Zur Betrachtung der Wirkung des Elutions- und Inhibitionszuckers α -Methyl-Mannosit (α -MM) auf die Bindungseigenschaften der Erythrozyten an das Lektin CON-A wurden Schwingquarze mit Lektin CON-A 100 μ g/ml für 5 Minuten inkubiert. Es wurde je 250 μ l der Zuckerlösungen (200mM) und 250 μ l einer Erythrozytensuspension der Blutgruppe B verwendet. Für die Erythrozyten-Zucker-Lösung wurden gewaschene Erythrozyten mit α -MM im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die in Abbildung 61 dargestellten Messungen zeigen den Versuch der Elution. Dazu wurde der beschichtete Schwingquarz in der FidgeType Anlage mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B als

Suspension benetzt ($\Delta f = -2500$ Hz, $\Delta \Gamma = 4500$ Hz). Nach einem Spülvorgang wurde die Messkammer über separate Kanäle mit dem Zucker α -MM befüllt. Es konnten $\Delta f = 1300$ Hz und $\Delta \Gamma = 4250$ Hz beobachtet werden. Nach ca. 25 Minuten wurde erneut mit Puffer Tris-NaCl+Ca+Mn gespült. Die Werte für Δf und $\Delta \Gamma$ gingen auf die Ausgangswerte vor der Inkubation mit Zuckerlösung zurück ($\Delta f = -1300$ Hz, $\Delta \Gamma = -4250$ Hz).

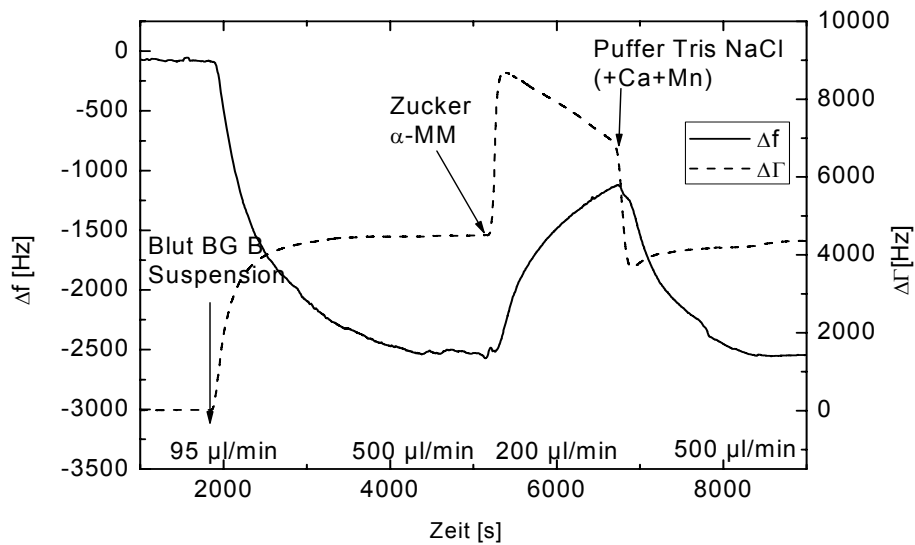


Abbildung 61: Lektin CON-A: Elutionsversuch mit α -MM, Messung Δf und $\Delta \Gamma$

In Abbildung 62 werden die Messungen zur Blockierung der Lektinschicht mit Zucker vor der Inkubation mit Erythrozyten dargestellt. In der FidgeType Anlage wurden beschichtete Schwingquarze zuerst mit Zucker α -MM benetzt ($\Delta f = -100$ Hz, $\Delta \Gamma = 75$ Hz). Nach einem Spülvorgang wurde die Messkammer über separate Kanäle mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B als Suspension befüllt ($\Delta f = -2200$ Hz, $\Delta \Gamma = 4300$ Hz).

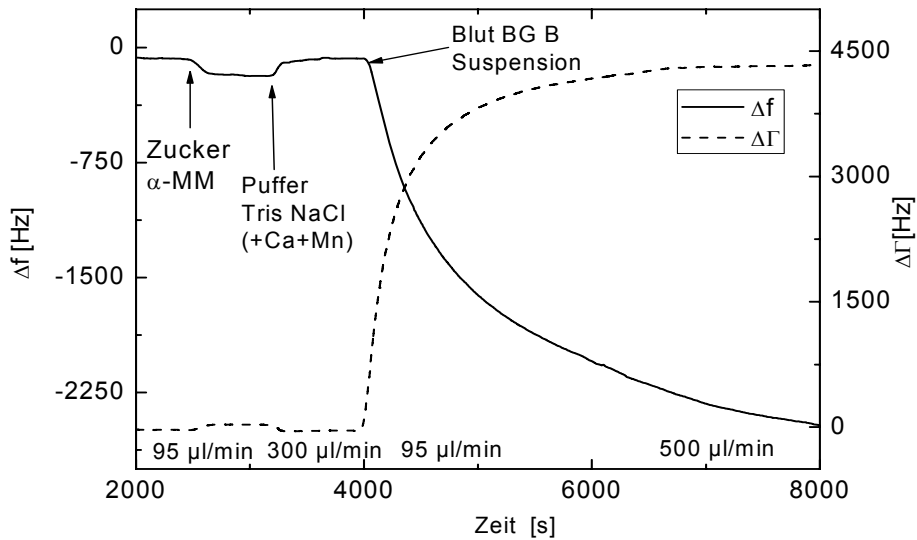


Abbildung 62: Lektin CON-A: Inhibitionsversuch mit α -MM, Messung Δf und $\Delta\Gamma$

Abbildung 63 stellt die Messungen zum Versuch der Inhibition unter Verwendung einer Erythrozyten-Zucker-Lösung dar. Es wurden beschichtete Schwingquarze in der FidgeType Anlage mit einer Erythrozyten-Zucker-Lösung inkubiert ($\Delta f = -2000$ Hz, $\Delta\Gamma = 3500$ Hz). Das Messsignal verändert sich nicht im Vergleich zu Messungen ohne Zusatz von α -MM.

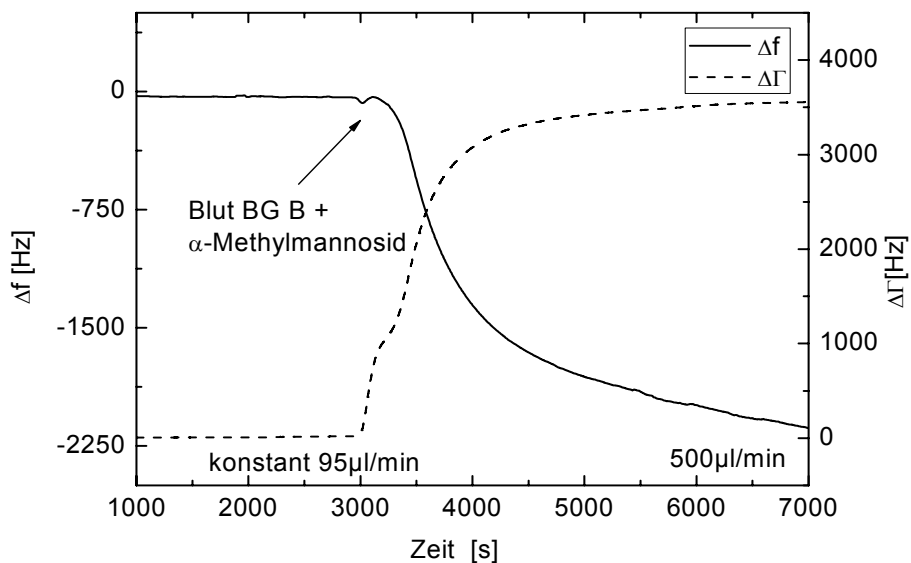


Abbildung 63: Lektin CON-A: Inhibitionsversuch mit Erythrozyten-Zucker-Lösung, Messung $\Delta f / \Delta\Gamma$

Ausgehend von den Messungen zur Untersuchung der Spezifität aller Blutgruppen kann man bei dem Lektin CON-A mit Frequenzänderungen zwischen $\Delta f = -1600$ und -2100 Hz rechnen. Die Vorinkubation des Lektins CON-A mit dem Inhibitionszucker α -MM zeigt keine Signaländerung im Vergleich zu Messungen ohne Inhibitionzucker.

3.3.2 Regeneration von Schwingquarzen

Diese Messungen beschäftigen sich mit der Möglichkeit Schwingquarze zu regenerieren, um sie mehrfachen Messungen unterziehen zu können. Es existieren verschiedene Methoden, hier werden zwei Verfahren vorgestellt (Reinigung mit NaOH und Helmanex®). Exemplarisch wurden recycelte Schwingquarze mit dem Lektin PHA-E in der FidgeType Anlage gemessen. Dazu wurden die Schwingquarze nach dem optimierten Protokoll beschichtet in der FidgeType Anlage mit einer Erythrozytensuspension der Blutgruppe 0 überprüft (siehe Tabelle 16 und Abbildung 64). Diese Methoden entfernten die Lektinbeschichtungen vollständig, aus diesem Grund mussten die Schwingquarze neu beschichtet werden. Die Beschichtungen und Messungen erfolgen nach dem optimierten Protokoll aus den Standardmessungen für das Lektin PHA-E. Diese Versuche zeigten, dass zwischen den einzelnen Messungen kaum ein Unterschied bestand und dass somit die regenerierten Schwingquarze auf der FidgeType Anlage ebenfalls gute Ergebnisse erzielten.

	Frischer Schwingquarz	Schwingquarz regeneriert mit: NaOH und Ultraschallbad	Schwingquarz regeneriert mit: Helmanex® und Ultraschallbad
Δf [Hz]	-1500	-1500	-1350
$\Delta \Gamma$ [Hz]	3250	3000	2800

Tabelle 16: Vergleich frischer unbenutzter Schwingquarze mit unterschiedlichen Regenerationsmethoden (NaOH / Helmanex) in Bezug auf die Signalintensität (Δf und $\Delta \Gamma$)

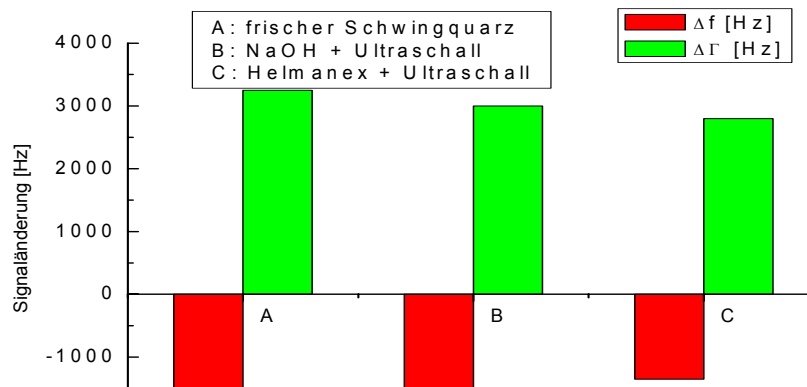


Abbildung 64: Vergleich frischer unbenutzter Schwingquarze mit unterschiedlichen Regenerationsmethoden (NaOH / Helmanex) in Bezug auf die Signalintensität (Δf und $\Delta \Gamma$)

3.3.3 Online-Beschichtung in der FidgeType Anlage

Um das Verhalten der einzelnen Komponenten der Lektinbeschichtung und den Ankopplungsvorgang der Erythrozyten auf der FidgeType Anlage zu analysieren, wurde eine sogenannte Online-Beschichtung am Beispiel des Lektins EEL durchgeführt. Dazu wurde der gereinigte unbeschichtete Schwingquarz in die Messkammer der FidgeType Anlage eingebaut und anschließend die einzelnen Komponenten (Neutravidin, Lektin und Blut) nacheinander über getrennte Fließkanäle in die Messkammer geführt und damit auf den Schwingquarz gebracht. Die einzelnen Komponenten wurden mit 19 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgebracht. Der Systempuffer wurde der jeweiligen Beschichtungsstufe angepasst, d.h. für Neutravidin PBS-Puffer, für EEL HEPES-Puffer und für Blut EDTA-Puffer. Der Pufferwechsel zwischen den einzelnen Komponenten erfolgte mit konstanter Flussgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Blutprobe aus Vollblut wurde 1:10 mit EDTA-Tris Puffer verdünnt. Die Systemtemperatur der FidgeType Anlage wurde auf 25°C reguliert. Am Ende wurde mit 300 bis 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ gespült. In Abbildung 65 sind die einzelnen Beschichtungsstufen zu erkennen. Nach Aufbringen von Neutravidin und Lektin EEL waren geringe Frequenzänderungen zu beobachten, Γ hingegen änderte sich kaum. Sobald das Blut die Messkammer erreichte, nahm die Signalintensität rapide zu ($\Delta f = -1400$ Hz, $\Delta \Gamma = 2900$ Hz).

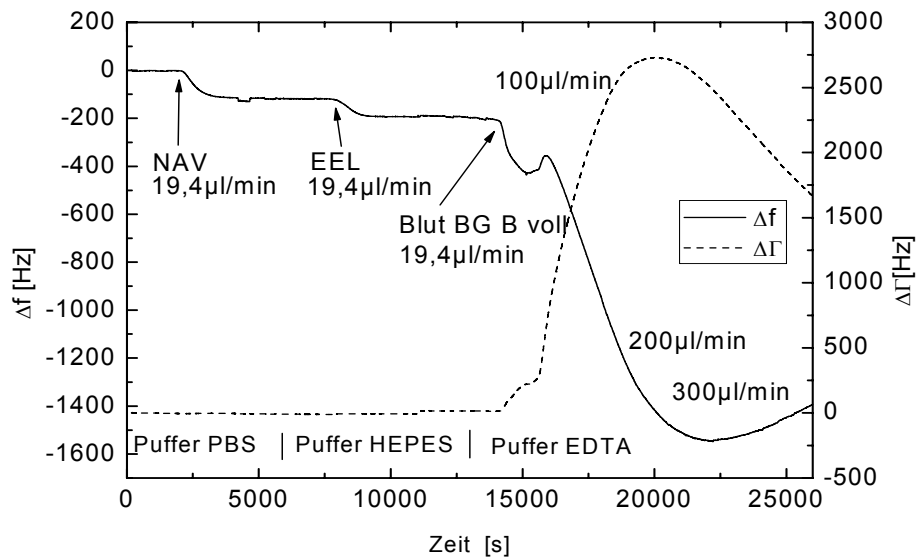


Abbildung 65: Lektin EEL: Online Beschichtung (NAV, EEL, Blut) mit Erythrozyten der Blutgruppe B

3.3.4 Einflüsse des Plasmas

Das Lektin DBA wurde bereits auf das spezifische Bindungsvermögen an die Erythrozyten der Blutgruppe A₁ getestet.

3.3.4.1 Messungen mit DBA

- Negativprobe (Blutgruppe 0) → Positivprobe (Blutgruppe A₁)

Der mit Lektin DBA beschichtete Schwingquarz wurde in der FidgeType Anlage zuerst mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe 0 inkubiert. Nach einer Spülperiode mit EDTA-Tris Puffer erfolgte danach eine weitere Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten, diesmal der Blutgruppe A₁. Es ließ sich ein geringer Anstieg der Frequenz nach Zugabe von Erythrozyten der Blutgruppe 0 beobachten, was dem Vorversuch entspricht. Nach dem Spülvorgang war der Schwingquarz leicht matt (also nicht blank, als Zeichen für eine geringe Agglutination). Nach Inkubation mit Erythrozyten der Blutgruppe A₁ war kein Abfall der Frequenz ($\Delta f = 50$ Hz und $\Delta \Gamma = 400$ Hz) zu beobachten, siehe Abbildung 66. Nach 30 Minuten Spülen mit EDTA-Tris Puffer war der Schwingquarz makroskopisch und mikroskopisch leer.

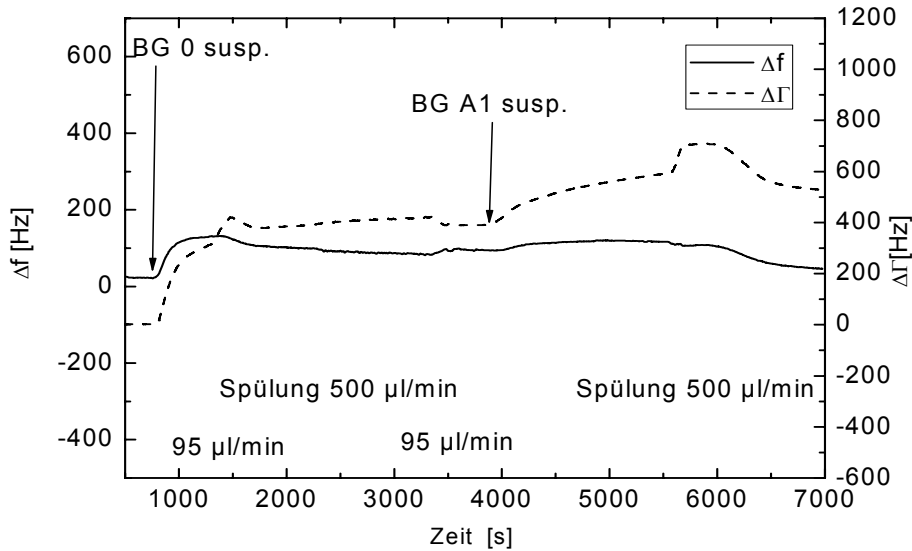


Abbildung 66: Lektin DBA: Messung Δf und $\Delta\Gamma$, Negativmessung mit Blut der Blutgruppe 0 und anschließend Blutgruppe A₁

- Reihentestung: Blutgruppe B → Blutgruppe A₁

Dieses Experiment soll überprüfen, ob mehrere Messungen unterschiedlicher Blutgruppen in Reihenschaltung möglich sind. Dazu wurde ein mit Lektin DBA beschichteter Schwingquarz zuerst mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B inkubiert ($\Delta f = 100$ Hz und $\Delta\Gamma = 500$ Hz). Nach einer längeren Spülperiode mit EDTA-Tris Puffer erfolgte die visuelle Überprüfung der Agglutination unter dem Mikroskop. Es waren kaum Erythrozyten gebunden. Der Schwingquarz wurde erneut in die Messkammer der Anlage eingefügt. Es erfolgte eine Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁. Die Signaländerungen betragen $\Delta f = 80$ Hz und $\Delta\Gamma = 750$ Hz. Die folgende Abbildung 67 und Tabelle 17 zeigen einen Überblick über die einzelnen Messungen: ohne Vorinkubation und mit mehrfacher Inkubation von Erythrozyten unterschiedlicher Blutgruppen. Es wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0 bzw. B als erste Inkubation vorangestellt, anschließend jeweils Messung mit Erythrozyten der Blutgruppe A₁. Es zeigte sich deutlich, dass alle Messungen mit vorangegangener Blutinkubation die Signalintensität für die Blutgruppe A₁ senken.

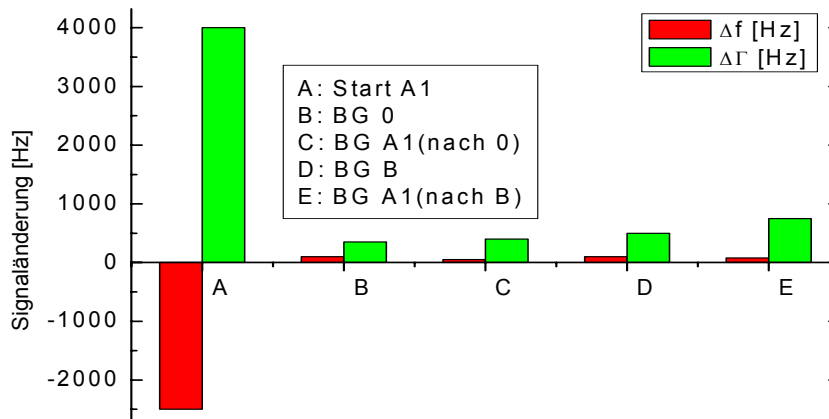


Abbildung 67: DBA: Mehrfachmessungen auf einem beschichteten Schwingquarz, vorangestellt Blutgruppe 0 bzw. B, anschließend Blutgruppe A₁

	Δf [Hz]	ΔΓ [Hz]
Blutgruppe A ₁ (Start)	-2500	4000
Blutgruppe 0	100	350
Blutgruppe A ₁ (nach 0)	50	400
Blutgruppe B	100	500
Blutgruppe A ₁ (nach B)	80	750

Tabelle 17: Lektin DBA: Mehrfachmessungen auf einem beschichteten Schwingquarz

- Sekretoren / Nicht-Sekretoren

Die folgenden Messungen untersuchten den Einfluss des Sekretorstatus auf die Signalintensität. Dazu wurden Plasmaproben auf ihre Lewisgruppen untersucht, um den Status Sekretor oder Nicht-Sekretor zu ermitteln. Mit Lektin DBA beschichtete Schwingquarze wurden in der Anlage zuerst mit 200µl Plasma (Sekretor bzw. Nicht-Sekretor) inkubiert. Nach erfolgter Spülung mit Puffer wurde der Schwingquarz anschließend mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ inkubiert. Die Signalstärke ohne Vorbehandlung mit Plasma betrug Δf= -2500 Hz und ΔΓ= 4000 Hz. Abbildung 68 und Tabelle 18 zeigen alle Messungen mit Plasmavorbehandlung, dabei wurden deutlich geringere Signalintensitäten (Δf= 100 bis 140 Hz und ΔΓ= 160 bis 600 Hz) gemessen.

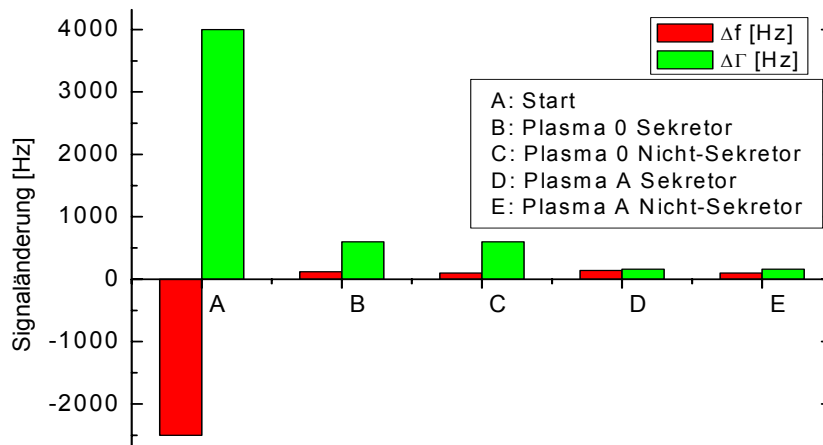


Abbildung 68: Lektin DBA: Vorinkubation mit Plasma 0 bzw. A, Sekretor / Nicht-Sekretor

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Blutgruppe A ₁ (Start)	-2500	4000
Plasma 0 Sekretor + Blut A ₁	120	600
Plasma 0 Nicht-Sekretor + Blut A ₁	100	600
Plasma A Sekretor + Blut A ₁	140	160
Plasma A Nicht-Sekretor + Blut A ₁	100	160

Tabelle 18: Lektin DBA: Vorinkubation mit Plasma 0 bzw. A, Sekretor / Nicht-Sekretor

3.3.4.2 Messung EEL

- Negativprobe (Blutgruppe 0) → Positivprobe (Blutgruppe B)

Der Versuch, der Messung Lektin EEL beschichteter Schwingquarze eine Negativprobe voranzustellen (Blutgruppe 0) mit anschließender Positivprobe (Blutgruppe B), war nicht möglich. Lektin EEL beschichtete Schwingquarze auf der FidgeType Anlage zeigten bei Blutgruppe 0 bereits ein Signal von $\Delta f = -1600$ Hz und $\Delta \Gamma = 3500$ Hz, noch bevor die Positivprobe (Blutgruppe B) den Quarz erreicht.

- Neutralisierung mit Plasma (Pool) der Blutgruppe 0

Zur Neutralisierung des Lektins wurde der mit Lektin EEL beschichtete Schwingquarz zuerst mit Plasma (Pool) der Blutgruppe 0 unter konstanter Fließgeschwindigkeit (95 $\mu\text{l}/\text{min}$) inkubiert. Zu beobachten waren $\Delta f = -160$ Hz und $\Delta \Gamma = 45$ Hz. Nach einer Spülphase mit 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ erfolgte die Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B (95 $\mu\text{l}/\text{min}$). Anschließend wurde

mit 500 μ l/min gespült. Es konnten Signalamplituden von $\Delta f = 150$ Hz und $\Delta \Gamma = 700$ Hz beobachtet werden (vgl. Abbildung 69).

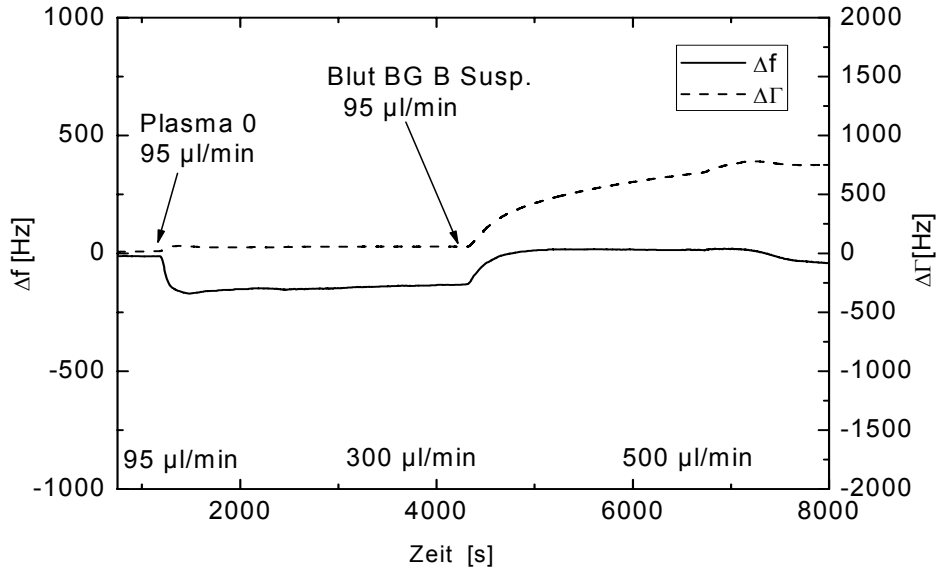


Abbildung 69: Lektin EEL: Darstellung der Neutralisierung von Lektin EEL mit Plasma 0 und anschließender Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B, Messung Δf und $\Delta \Gamma$

- Neutralisierung mit Plasma (Pool) der Blutgruppe AB

Analog zur oben beschriebenen Messung wurde der mit Lektin EEL beschichtete Schwingquarz zuerst mit Plasma (Pool) der Blutgruppe AB unter konstanter Fließgeschwindigkeit (95 μ l/min) inkubiert. Die zu beobachtende Signale betragen $\Delta f = -100$ Hz und $\Delta \Gamma = 50$ Hz. Nach einer Spülphase mit 300 μ l/min erfolgte die Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B (95 μ l/min). Anschließend wurde mit 500 μ l/min gespült. Es konnten Signalamplituden von $\Delta f = 80$ Hz und $\Delta \Gamma = 700$ Hz beobachtet werden (siehe Abbildung 70).

3 Ergebnisse

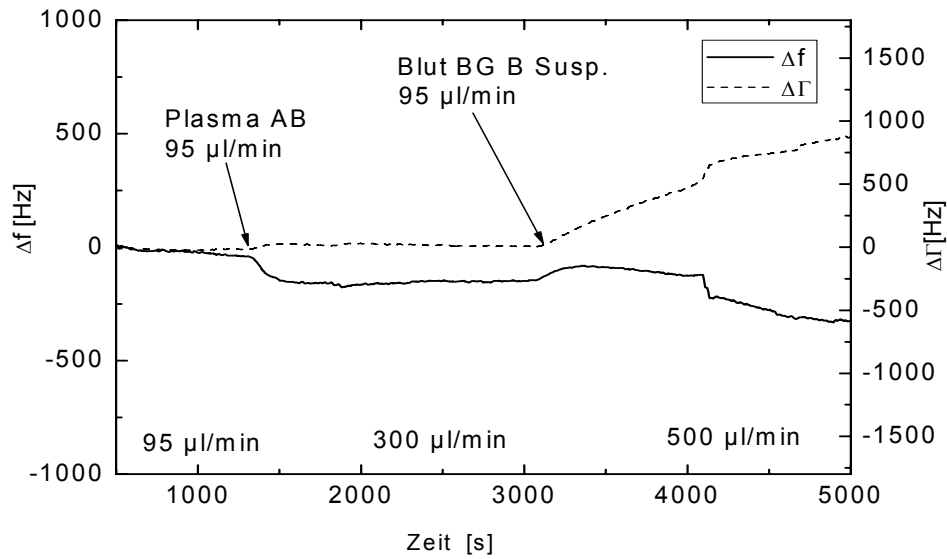


Abbildung 70: Lektin EEL: Darstellung der Neutralisierung von Lektin EEL mit Plasma AB und anschließender Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B, Messung Δf und $\Delta \Gamma$

In Abbildung 71 und Tabelle 19 werden die Versuche zur Neutralisierung des Lektins EEL mit Plasma 0 bzw. AB und anschließender Inkubation mit Erythrozyten der Blutgruppe B zusammenfassend dargestellt. Dabei wird deutlich, dass alle Neutralisierungsversuche einen abschwächenden Einfluss auf die Signale Δf und $\Delta \Gamma$ hatten.

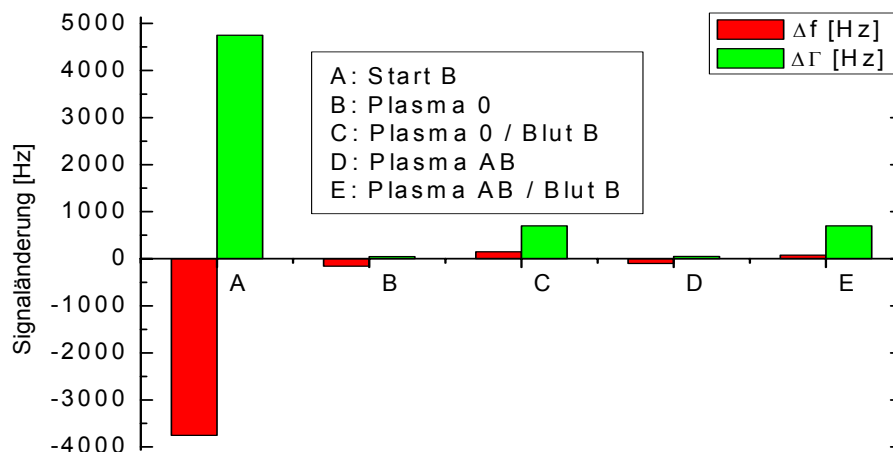


Abbildung 71: Lektin EEL: Vergleich verschiedener Neutralisierungsschritte mit Plasma (0 bzw. AB) und anschließender Inkubation von Erythrozyten der Blutgruppe B

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Blutgruppe B (Start)	-3750	4750
Plasma 0	-160	45
Plasma 0 / Blutgruppe B	150	700
Plasma AB	-100	50
Plasma AB / Blutgruppe B	80	700

Tabelle 19: Lektin EEL: Vergleich verschiedener Neutralisierungsschritte mit Plasma (0 bzw. AB) und anschließender Inkubation mit Erythrozyten der Blutgruppe B

- Sekretoren / Nicht-Sekretoren

Zur weiteren Untersuchung der Beeinflussung der Bindungseigenschaften durch Lewis-Antigene wurden Plasmaproben auf den Sekretorstatus für untersucht und nach Sekretor / Nicht-Sekretor der Blutgruppen 0 und B ausgewählt. Für den Versuch wurde der mit Lektin EEL beschichtete Schwingquarz zuerst mit Plasma (Sekretor bzw. Nicht-Sekretor) der Blutgruppe 0 bzw. B unter konstanter Fließgeschwindigkeit (95 μ l/min) inkubiert. Nach einer Spülphase mit 300 μ l/min erfolgte die Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B (95 μ l/min). Anschließend wurde mit 500 μ l/min gespült. Es konnten Signalamplituden von $\Delta f = -1400$ bis -3400 Hz und $\Delta \Gamma = 2500$ bis 4400 Hz beobachtet werden (vgl. Abbildung 72 und Tabelle 20).

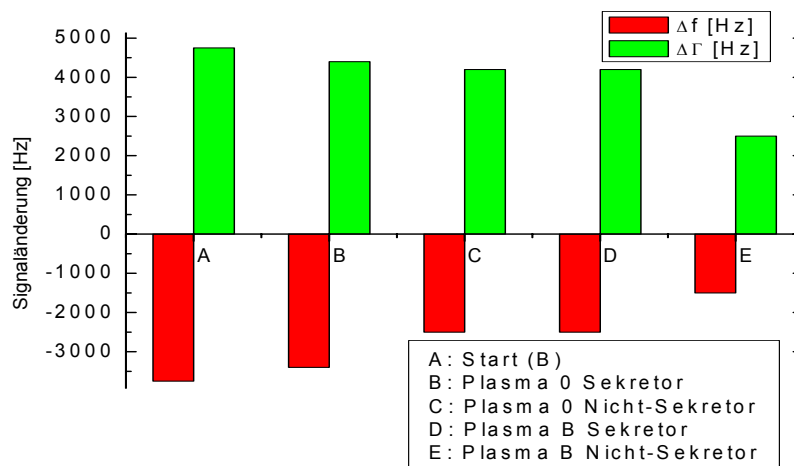


Abbildung 72: Lektin EEL: Sekretor bzw. Nicht-Sekretor der Blutgruppe 0 bzw. B und Blut der Blutgruppe B

3 Ergebnisse

	Δf [Hz]	$\Delta \Gamma$ [Hz]
Blutgruppe B (Start)	-3750	4750
Plasma 0 Sekretor + Blut B	-3400	4400
Plasma 0 Nicht-Sekretor + Blut B	-2500	4200
Plasma B Sekretor + Blut B	-2500	4200
Plasma B Nicht-Sekretor + Blut B	-1500	2500

Tabelle 20: Lektin EEL: Sekretor bzw. Nicht-Sekretor der Blutgruppe 0 bzw. B und Erythrozyten der Blutgruppe B

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, weitere Grundlagen für eine Blutgruppenanalyse mit Schwingquarzsensoren zu schaffen. Die spezifische Erythrozytenankopplung wurde über Beschichtungen mit Lektinen ermöglicht. Dazu wurden einzelne Lektine zuerst mit dem Dummy-System optimiert, diese Ergebnisse sollten dann auf die FidgeType Anlage übertragen werden. Zum Schluss erfolgte die Betrachtung spezieller Fragestellungen bezüglich Ablösen oder Inhibieren der Erythrozyten durch geeignete Zucker, Einfluss des Sekretorstatus und der Einfluss einer Neutralisierung (Sättigung) mit Plasma 0 und A (bzw. B).

4.1 Stand der Wissenschaft

Bisher wurden für die Blutgruppenanalytik mit Schwingquarzen Protein A Schichten mit Antikörpern verwendet [11, 12, 17, 24, 40, 74]. Diese Methode ist sehr wirkungsvoll, aber auch kostenintensiver als die in dieser Arbeit verwendete Methode mit Lektinen. Ebenfalls wurden Versuche durchgeführt, indem Antikörper direkt auf die Goldelektrode gebracht wurden oder Alkanthiol mit Protein A und Antikörper auf der Goldschicht immobilisiert wurden. Als am besten geeignet hat sich bisher die Beschichtung Protein A mit Antikörpern gezeigt [40]. Die Analyse von Blutgruppen mit Hilfe von Lektinen in einem Mikrofluidiksystem wurde von Kline [36] erprobt. Insgesamt stellt die Schwingquarzsensoren für die Blutgruppenbestimmung ein interessantes Feld dar, dabei wurden die Lektine zu Unrecht vernachlässigt. Der Vorteil der Lektine ist ökonomischer, da sie kostengünstig sind, und praktischer Natur, da sie gut lagerbar sind.

4.2 Diskussion der Methode

Es ist bekannt, dass Lektine blutgruppenspezifisch oder -unspezifisch Erythrozyten binden können. Für diese Arbeit wurde eine Beschichtungstechnik mit Neutraavidin (Avidin) und biotinylierten Lektinen gewählt. Vorversuche zeigten, dass ohne Zusatz von Neutraavidin kein Lektin am Schwingquarz haftete [29]. Vorteilhaft für die einfache Durchführung der Versuche zeigte sich

die industrielle Herstellung biotinylierter Lektine. Durch die Cystein bzw. thiolhaltigen Bausteine des Avidins kommt es zu einer spontanen Adsorption an die Goldoberfläche. Die tetramere Struktur des Avidin ermöglicht die Bindung von vier Biotin-Molekülen bzw. vier biotinylierten Lektin-Molekülen, mit einer hohen Affinität (konstante Affinität $> 10^{15} \text{ M}^{-1}$) für Biotin [4, 29, 56].

4.3 Diskussion der Ergebnisse im Dummy-System

Die einzelnen Lektine DBA, EEL, CON-A und PHA-E wurden zunächst auf das generelle Bindungsverhalten der Erythrozyten an Lektine untersucht [57-60]. Es wurden initiale Tests durchgeführt, die eine Ankopplung von Erythrozyten an mit Lektin beschichteten Schwingquarzen zeigen sollen. Für diese ersten Versuche eignete sich die Dummyanlage sehr gut, da der Aufbau dieser Versuchskonstruktion einfach und durch fehlende Messelektronik weniger anfällig für Bedienungsfehler war.

Die Untersuchungen in der Dummyanlage umfassten als erstes die Optimierung der Neutravidinschicht, welche dann für alle weiteren Messungen als Optimum angenommen wurde. Es ist davon auszugehen, dass für die Beschichtung mit Lektinen eine vollständige Bedeckung des Schwingquarzes mit Neutravidin optimal ist, da Neutravidin als Haftvermittler zwischen Schwingquarz und Lektin fungiert. Auf Grund dieser Annahme wurden die einzelnen Maxima für Neutravidin und Lektin nacheinander bestimmt. Für jedes Lektin folgten Tests zur Optimierung der Lektinkonzentration, Optimierung der Inkubationszeit des Lektins und zur Optimierung der Inkubationszeit für Blut, sowie Untersuchungen der Spezifität, indem die beschichteten Schwingquarze mit Erythrozyten aller Hauptblutgruppen (A₁, A₂, A₁B, B und 0) inkubiert wurden.

4.3.1 Neutravidin

Die Optimierung der Neutravidinschicht als Haftvermittlerschicht wurde als Grundlage für alle weiteren Messungen genommen. Dabei zeigten die Versuche ab einer Neutravidinkonzentration von 25µg/ml mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten bereits eine maximale Belegung des Schwingquarzes mit Erythrozyten. Das biotinylierte Lektin wurde in maximaler Konzentration (100µg/ml) verwendet. Alle Lektine wurden in biotinylierter Form

verwendet. Die Bindung des Lektins an die Neutravidinschicht erfolgte über die Bindung des Biotins an das Neutravidin [29]. Dadurch ist die Neutravidinkonzentration auf alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Lektine übertragbar.

4.3.2 DBA

Das Lektin DBA wurde für den spezifischen Nachweis von Erythrozyten der Blutgruppe A₁ eingesetzt. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben [67, 68, 75].

Der Beschichtungsvorgang mit dem Lektin DBA konnte optimiert werden (Lektin-Konzentration: 100µg/ml, Lektin Inkubationszeit: 45min, Blut-Inkubationszeit 7min). Die durchgeführten Spezifitätstests zeigten eine deutliche Differenz des Bindungsverhaltens der Erythrozyten der verschiedenen Blutgruppen. Die Erythrozyten der Blutgruppe A₁ haben am stärksten an den mit Lektin DBA beschichteten Schwingquarz gebunden. Bei der Blutgruppe A₂ war nur eine geringe Belegungsdichte zu beobachten. Alle anderen Blutgruppen (A₁B, B und 0) wiesen fast keine Anbindung auf, die Schwingquarze waren makroskopisch und mikroskopisch leer. Damit konnte die Spezifität des Lektins DBA für Erythrozyten der Blutgruppe A₁ gezeigt werden.

Insgesamt erscheint das Lektin DBA eher als langsam reagierendes Lektin.

4.3.3 EEL

Das Lektin EEL wurde für den spezifischen Nachweis von Erythrozyten der Blutgruppe B eingesetzt. Diese Spezifität wurde bereits von [67, 68, 75] beschrieben. Es ist eine gewisse Affinität des Lektins EEL zur H-Substanz der Erythrozyten bekannt.

Für das Lektin EEL ließen sich die einzelnen Beschichtungsschritte nicht weiter optimieren. Daraus lässt sich schließen, dass das Lektin EEL eine relativ hohe Konzentration und Inkubationszeit benötigt, um eine hohe Erythrozytenankopplung zu erzielen. Auch die relativ lange Einwirkzeit des Blutes deutet auf eine sehr langsame Ankopplungsreaktion hin.

Die Untersuchungen der Spezifität zeigten keine eindeutigen Ergebnisse. Gesucht war ein Lektin, welches einen eindeutigen Nachweis für Erythrozyten

der Blutgruppe B erbringt. Das Lektin EEL zeigte eine sehr hohe Bindung von Erythrozyten der Blutgruppe B mit einer Erythrozytendichte von ca. $27/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$. Erythrozyten der Blutgruppe A₁B koppelten mit einer Dichte von $7,39/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ an, was ca. 27% entspricht. Dies erfolgte durch den B-Anteil der Erythrozyten. Erythrozyten der Blutgruppe 0 haben mit einer Erythrozytendichte von $12,66/\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-3}$ gebunden, was ca. 47% entspricht. Die Bindung von Erythrozyten der Blutgruppe 0 ist auf eine Affinität des Lektins EEL an die H-Substanz der Erythrozyten zurückzuführen. Trotz deutlicher Anteile von H-Substanz auf den Erythrozyten der Blutgruppe A₂ [15] zeigten diese kein gesteigertes Bindungsverhalten an den mit EEL beschichteten Schwingquarz. Es wird deutlich, dass die Erythrozyten der Blutgruppe B am stärksten an das Lektin EEL binden. Erythrozyten der Blutgruppe A₁B und 0 binden weniger stark an das Lektin EEL. Sie sind aber trotzdem nachweisbar. Somit kann nicht von einer absoluten Spezifität des Lektins EEL für Erythrozyten der Blutgruppe B ausgegangen werden.

4.3.4 CON-A

Das Lektin CON-A bindet unspezifisch Erythrozyten aller Blutgruppen. Erste Untersuchungen mit Blutproben aus Vollblut in EDTA-Tris Puffer bestätigten die Angaben aus der Literatur [57], dass das Lektin CON-A unter Einwirkung des Chelators EDTA keine Erythrozyten bindet. CON-A benötigt zur Erythrozytenbindung Ca und Mn Ionen, welche durch EDTA komplexiert werden und damit nicht mehr für die Bindung der Erythrozyten an das Lektin zur Verfügung stehen.

Insgesamt zeigt das Lektin CON-A ein sehr starkes Bindungsverhalten. Es sind nur sehr geringe Lektinkonzentrationen von $6,25\mu\text{g/ml}$ nötig, die Bindung der Erythrozyten erfolgt sehr rasch bei kurzen Inkubationszeiten von 3 bis 5 Minuten für das Lektin und 3 bis 5 Minuten für das Blut.

Im Gegensatz zur Literatur [25, 26] scheint für die rasche Bindung eine Vorbehandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase nicht nötig zu sein.

4.3.5 PHA-E

In der Literatur ist das Lektin PHA-E für sein unspezifisches Erythrozytenbindungsvermögen aller Blutgruppen bekannt [67]. Jedoch zeigten mit Lektin PHA-E beschichteten Schwingquarzen eine proben- und pufferabhängige Bindungsaktivität. Dies wurde in Verbindung mit den Spezifitätstests weiter untersucht.

Insgesamt zeigt das Lektin PHA-E ein vergleichbar starkes und unselektives Bindungsvermögen wie das Lektin CON-A, mit geringen Lektinkonzentrationen und rascher Bindung der Erythrozyten bei sehr kurzen Inkubationszeiten.

Die Überprüfung der Spezifität des Lektins PHA-E mit Erythrozyten aller Blutgruppen A₁, A₂, A₁B, B und 0 zeigte bei Verwendung von unbehandeltem Vollblut und Puffer EDTA-Tris anders als in [60, 67] beschrieben eine Bindungsdifferenz für Erythrozyten der Blutgruppen mit A-Anteil gegenüber Erythrozyten der Blutgruppen B und 0. Diese zeigten ein deutlich gemindertes Bindungsverhalten (ca. 40%). Bei Verwendung einer Suspension aus gewaschenen Erythrozyten mit dem Puffer Tris-NaCl konnte ein unspezifisches Bindungsverhalten der Erythrozyten aller Blutgruppen gezeigt werden. Daraus geht hervor, dass das Lektin PHA-E nur unselektiv Erythrozyten bindet, wenn Puffer Tris-NaCl bzw. Tris-NaCl+Ca+Mn verwendet wird.

Lektine ähneln sich in der Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren, gehören aber unterschiedlichen Proteinfamilien an [67]. Auf Grund dieser Tatsache wurde ein unterschiedlichen Reaktions- bzw. Agglutinationsverhalten gegenüber Erythrozyten angenommen. Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Lektinen wurden deshalb die gleichen Optimierungsschritte durchgeführt. Die unterschiedlichen optimalen Beschichtungsparameter bestätigen diese Annahme.

4.4 Diskussion der Ergebnisse in der FidgeType Anlage

In Teil 3.2 dieser Arbeit sollten die vorangegangenen Ergebnisse der Schichtoptimierung der einzelnen Lektine mit dem Dummy-System (Teil 3.1) auf die FidgeType Anlage übertragen werden. Dies wurde bereits bei Döring mit

anderen Beschichtungssystemen, welche andere Blutgruppeneigenschaften adressieren, durchgeführt [17]. Es wurden die gleichen Parameter wie im Dummy-System für Konzentration und Inkubationszeit des Lektins, sowie die Inkubationszeit des Blutes verwendet. Den Versuchen mit den Lektinen DBA und EEL wurden Untersuchungen zur Probenvorbereitung (Erythrozyten aus Vollblut oder gewaschene Erythrozyten als Suspension) vorangestellt, welche für die Lektine CON-A und PHA-E entfielen, da diese bereits mit dem Dummy-System durchgeführt wurden. Für alle Lektine wurde die Messprozedur (konstanter Fluss oder Stopp-Flow) variiert. Insgesamt zeigte die in anderen Arbeiten [11, 24, 40, 74] verfolgte Strategie der Stopp-Flow Messung bei den Messungen mit Lektinen keinen Vorteil. Ein kurzzeitiger Stopp sollte eine Störung der Erythrozytenbindung an das Lektin durch den Fluss minimieren. Durch den konstanten Fluss ist das Messsignal stabiler und besser reproduzierbar. Die Überprüfung der Selektivität auf Erythrozyten der verschiedenen Blutgruppen (A_1 , A_2 , A_1B , B und 0) erfolgte unter optimierten Parametern. Gemessen wurden jeweils Δf [Hz] (Frequenzänderung) und $\Delta\Gamma$ [Hz] (eine zur Dämpfung proportionale Größe, welche als halbe Halbwertsbreite der Impedanzkurve definiert ist).

4.4.1 DBA

Die Untersuchungen zur unterschiedlichen Probenvorbereitung (Erythrozyten aus Vollblut oder gewaschenen Erythrozyten als Suspension) zeigte abweichend zu den Versuchen im Dummy-System (3.1.2) kein intensives Signal bei Messung mit Erythrozyten aus Vollblut. Die Messung mit gewaschenen Erythrozyten hingegen lieferte das erwartete Signal von $\Delta f = -2500\text{Hz}$ und $\Delta\Gamma = 4000\text{Hz}$. Möglicherweise haben die sich im Blutplasma befindenden Substanzen einen Einfluss auf die Bindungsstabilität. Die Selektivität des Lektins DBA auf Erythrozyten der Blutgruppe A_1 [67, 68, 75, 80] konnte bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Dummy-Versuchen zeigte sich bei der Spezifitätsprüfung eine geringe Bindungsbereitschaft für Erythrozyten der Blutgruppe A_1B . Man könnte annehmen, dass der geringere Anteil A_1 der Blutgruppe A_1B dafür verantwortlich ist. Weitere Experimente mit einer Lektin

DBA Beschichtung niedrigerer Konzentration oder die Verwendung stärker verdünnter Blutproben, könnten darüber Aufschluss geben.

4.4.2 EEL

Abweichend zu den Versuchen im Dummy-System (3.1.3) konnte kein intensives Signal bei Messung mit Erythrozyten aus Vollblut beobachtet werden. Hingegen stieg bei Verwendung von gewaschenen Erythrozyten die Signalintensität rasch auf $\Delta f = -3750\text{Hz}$ und $\Delta \Gamma = 4750\text{Hz}$. Diese Ergebnisse gleichen denen der Versuche mit Lektin DBA auf der FidgeType Anlage. Dies bekräftigt die Annahme der möglichen Störung der Bindung durch Substanzen aus dem Blutplasma. Die Untersuchungen zur Selektivität des Lektins EEL bestätigten die Ergebnisse aus dem Dummy-System. Die Messsignale für Erythrozyten der Blutgruppen B und A₁B waren ähnlich hoch (Blutgruppe B: $\Delta f = -3750\text{Hz}$, $\Delta \Gamma = 4750\text{Hz}$; Blutgruppe A₁B: $\Delta f = -3000\text{Hz}$, $\Delta \Gamma = 4500\text{Hz}$), die für Erythrozyten der Blutgruppe 0 weniger stark. Somit konnte die Bindungsaffinität zu Erythrozyten mit B-Anteil, aber keine absolute Spezifität für Blutgruppe B, gezeigt werden. Die erhöhten Messsignale für Erythrozyten der Blutgruppe 0 zeigten Relevanz der Bindungsaffinität des Lektins zur H-Substanz der Erythrozyten. Abschließend ist festzuhalten, dass sich das Lektin EEL nicht für den spezifischen Nachweis von Erythrozyten der Blutgruppe B eignet. Damit zeigt sich die begrenzte Aussagekraft der mikroskopischen Begutachtung auf die Bindungsstärke der Erythrozyten an den Schwingquarz, da nicht alle im Mikroskop sichtbaren Erythrozyten starr an die Lektinschicht gebunden sein müssen [67].

4.4.3 CON-A

Die direkte Übertragung der Optimierungsschritte aus den Versuchen mit dem Dummy-System gelang nicht vollständig. Die Messsignale der Erythrozytenankopplung auf Schwingquarzen mit geringen Beschichtungskonzentrationen des Lektins CON-A zeigten keine befriedigenden Ergebnisse. Bei Erhöhung der Beschichtungskonzentrationen des Lektins konnten befriedigende Signale für Δf und $\Delta \Gamma$ beobachtet werden (vgl. 3.2.1). Eine mögliche Erklärung für diese Differenz könnte die geringe

Schichtdicke sein, die für das schwingende System zu instabil ist, so dass die Erythrozyten nicht fest genug haften. Die Unselektivität für Erythrozyten aller Blutgruppen [67] konnte ebenfalls mit durchweg hohen Signalen bestätigt werden. Das Lektin CON-A wurde bereits bei [75] als reaktionsschnelles und – starkes Lektin beschrieben. Im Vergleich zu den Lektinen DBA und EEL zeigt es aber eher schwächere Signale für die Frequenz- und Dämpfungsänderung. Möglicherweise ist die Bindung der Erythrozyten an das Lektin im schwingenden System nicht stabil genug. Ein möglicher Ansatz wäre die Vorbehandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase. Gokhale zeigte in seinen Versuchen eine verbesserte Agglutination von vorbehandelten Erythrozyten [25, 26].

4.4.4 PHA-E

Die direkte Übertragung der Optimierungsschritte aus den Versuchen mit dem Dummy-System war problemlos möglich. Die Unselektivität für Erythrozyten aller Blutgruppen [67] konnte mit durchweg hohen Signalen $\Delta f = -1500\text{Hz}$ bis -1800 Hz , sowie $\Delta \Gamma = 3200\text{Hz}$ bis 3800Hz (vgl. Tabelle 14) bestätigt werden. Damit zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit den Versuchen im Dummy-System und eine gute Übertragbarkeit vom Dummy-System auf die FidgeType Anlage.

4.5 Diskussion der Ergebnisse zum Recycling und Einfluss des Plasmas

In Teil 3.3 dieser Arbeit wurden unter ökonomischen Aspekten Methoden zur Wiederverwendung der Schwingquarzsensoren entwickelt. Zunächst wurde versucht, die gebundenen Erythrozyten durch eine Zuckerlösung zu entfernen [22, 67] und den so regenerierten Schwingquarz mit erhaltener Lektinbeschichtung in der FidgeType Anlage wieder zu verwenden. In einem zweiten Experiment wurde die grundsätzliche Recyclingfähigkeit des Schwingquarzes untersucht, in dem dieser zunächst mit NaOH bzw. Helmanex® von allen organischen Substanzen gereinigt wurde, um dann neu

beschichtet zu werden. Mit diesen recycelten Schwingquarzen wurden ebenso Messungen in der FidgeType Anlage vorgenommen.

Unter ökonomischen Gesichtspunkten ist eine Möglichkeit zur online Beschichtung in der FidgeType Anlage von höchstem Interesse. Dabei wird der Quarz durch Software gesteuerte Fluidikprozessschritte mit den einzelnen Komponenten (NAV, Lektin, Blut) beschichtet. Gegenüber der manuellen Beschichtung hat die Online Beschichtung den großen Vorteil, dass die einzelnen Prozessschritte durch die Schwingquarzschnale online überprüft werden können. Das stellt zum einen eine reproduzierbare Qualität der Beschichtung sowie eine optimal minimierte Prozessdauer sicher.

Im letzten Abschnitt wird der Einfluss des Plasmas auf das Bindungsverhalten der Erythrozyten an die Lektine untersucht.

4.5.1 Zuckermessungen

Nach Rüdiger und Gabius [22, 67, 68] wird ein vollständiges Ablösen der Lektin gebundenen Erythrozyten erwartet, da bei Zugabe des Inhibitionszuckers im Überschuss die Bindung zwischen Lektin und Zucker der Erythrozytenblutgruppe gelöst wird, indem der Zucker des Erythrozyten kompetitiv aus der Bindungstasche des Lektins verdrängt wird. So sollten die Erythrozyten vom Lektin gelöst werden, ohne die Beschichtung zu zerstören, was mehrere Messzyklen auf einer Beschichtung ermöglichen sollte. Versuche zur Inhibition dienten zur Klärung der Frage, ob der Inhibitionszucker das Lektin sättigen kann und damit die weitere Ankopplung der Erythrozyten auf dem beschichteten Schwingquarz verhindert. Alle Versuche zeigten Restbelegungen mit Erythrozyten, wobei sich deutliche Unterschiede zwischen den Lektinen ergaben. Die Inhibitionszucker des Lektin CON-A konnten nur ca. 3 bis 20% der gebundenen Erythrozyten lösen, die Ankopplung an das Lektin wurde um ca. 10% gesenkt. Bei dem Lektin PHA-E wurde die Dichte der angekoppelten Erythrozyten sogar um 1 bis 3% erhöht. Die Inhibitionszucker der spezifischen Lektine DBA und EEL zeigten ein höheres Lösungsvermögen. Der Zucker N-Acetylgalactosamin für DBA konnte mit normaler Stase ca. 40% der Erythrozyten lösen. Nach 24-stündiger Inkubation verblieben ca. 17% der

Erythrozyten auf dem Schwingquarz. Dabei ist nicht klar abzugrenzen, ob die Erythrozyten abgelöst oder ob sie durch die lange Einwirkung des Zuckers zerstört wurden. Die Elutions- und Inhibitionsversuche des Lektins EEL zeigten ebenfalls Lösungstendenzen von 40-50%, wobei sich keine Präferenz für einen Zucker herauskristallisieren lies. Die Zuckermessungen des Lektins CON-A wurden exemplarisch vom Dummy-System auf die FidgeType Anlage übertragen. Der Einfluss der Viskosität der Zuckerlösung zeigte sich als sehr gering und damit vernachlässigbar im Vergleich zum erwarteten Signal. Der Ablösevorgang konnte weder am Messsignal noch an der anschließenden mikroskopischen Betrachtung nachgewiesen werden. Die Schwingquarze waren nach den Ablöseversuchen weiterhin dicht mit Erythrozyten belegt.

Zusammenfassend scheinen die Elutionseigenschaften der bisher bekannten Zucker [22, 67, 68, 75] nicht ausreichend zu sein, um die Beschichtung der Schwingquarze zu regenerieren, damit so mehrfache Messungen ohne Schichterneuerungen möglich sind. Ein möglicher Ansatz wäre die Vorbehandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase, um die Bindungsstellen den Zuckermolekülen zugänglicher zu machen [25, 26]. Zu beachten ist, dass bisherige Untersuchungen in Lösung erfolgten, wohin gegen hier der Festphasenfall untersucht wurde und damit nur eine bedingte Übertragung der Ergebnisse erfolgen kann [22, 67, 68, 75].

4.5.2 Recycling

In vorangegangenen Arbeiten [11, 24, 40] wurden bereits einige Verfahren zum Recycling der Schwingquarze im Dummy-System untersucht. In dieser Arbeit wurde das Verfahren mit NaOH aufgegriffen und die recycelten Schwingquarze nach erneuter Beschichtung mit Lektin PHA-E auf der FidgeType Anlage getestet. Die Ergebnisse zeigten nur einen geringen Unterschied im Vergleich zu einem neuen Schwingquarz. Ein weiteres Verfahren stellte die Behandlung mit Helmanex® dar. Die erneute Beschichtung mit Lektin PHA-E und der Test auf der FidgeType Anlage brachten ähnlich gute Messsignale wie das Recyclingverfahren mit NaOH. Zwischen den einzelnen Verfahren konnten geringe Signalunterschiede von $\Delta f = 150\text{Hz}$ und $\Delta F = 450\text{Hz}$ beobachtet werden.

Die Signalunterschiede können zum einen auf eine durch das Recyceln veränderte Goldoberfläche zurückzuführen sein. Zum anderen gibt es trotz strengem Messprotokoll Einflussfaktoren, wie beispielweise den Anpressdruck des Quarzes in der Messkammer, die nicht vollständig erfasst werden können. Da die Signale bei erfolgreicher Erythrozytenankopplung deutlich höher sind, könnten Schwingquarze mit wenigen Recyclingzyklen ebenfalls für Beschichtungen mit Lektinen verwendet werden.

4.5.3 Online-Beschichtung

Zur Klärung der Frage, ob die Beschichtung eines gereinigten Schwingquarzes mit Hilfe des Fluidikapparates der FidgeType Anlage möglich ist, wurde auf Grund von Vorexperimenten das NAV-EEL-System gewählt. Während der Online-Beschichtung waren nach Aufbringen von NAV und EEL Signalsprünge von jeweils ca. $\Delta f = -100$ Hz zu beobachten, $\Delta \Gamma$ änderte sich nicht signifikant. Das Verhalten festangekoppelter dünner Schichten ist durch das Sauerbrey Modell beschreibbar [71]. In der anschließenden Spülphase mit Blut traten vergleichbare Signaländerungen ($\Delta f = -1400$ Hz, $\Delta \Gamma = 2900$ Hz) wie bei den außerhalb der Anlage beschichteten Quarzen auf. Daraus lässt sich ableiten, dass die Online-Beschichtung ein äquivalentes Verfahren zu herkömmlichen Beschichtungsmethoden ist. Betrachtet man den Zeitverlauf der Signaländerung Δf in Abbildung 65, kann der Online-Beschichtungsprozess durch Variation der Parameter (Fließgeschwindigkeit und Wartezeiten) sicherlich noch eine Verkürzung der Prozessdauer um den Faktor fünf bis zehn erreicht werden. Damit stellt die Online-Beschichtung auch eine unter ökonomischen Gesichtspunkten höchst attraktive Alternative dar.

4.5.4 Einflüsse der Plasmas

Da die Lektin EEL Beschichtung nur mit gewaschenen Erythrozyten eindeutige Ergebnisse zeigte, wurde eine systematische Untersuchung zur Klärung der möglichen Einflussgrößen durchgeführt. Zunächst wurden die Quarze mit gepooltem Plasma 0 bzw. Plasma AB und danach mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B inkubiert. Dabei wurde kein Anbinden der Erythrozyten an den Schwingquarz beobachtet. Die Untersuchung nicht

gepoolter Plasmaproben getrennt nach Sekretorstatus zeigte vergleichbare Signaländerungen zu den Ausgangsmessungen (EEL mit gewaschenen Erythrozyten der Blutgruppe B).

Ebenso wurde für DBA eine Auftrennung der Einflussgrößen versucht.

Im Gegensatz zu EEL konnte nach Spülung mit Plasma 0 bzw. Plasma A unabhängig vom Sekretorstatus keine Signalveränderung beobachtet werden. Da die Referenzmessung mit gewaschenen Erythrozyten die Spezifität von Lektin DBA auf Blutgruppe A₁ gezeigt hatte, müssen sowohl in Plasma 0 sowie in Plasma A unabhängig vom Sekretorstatus Substanzen enthalten sein, die die spezifischen Bindungsstellen belegen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das gepoolte Plasma eine starke inhibitorische Wirkung hat. Die Diskrepanz der inhibitorischen Eigenschaften zwischen gepoolten und ungepoolten (Sekretor / Nicht-Sekretor) Proben zeigt, dass kein Zusammenhang mit dem Sekretorstatus besteht. Für die inhibitorische Eigenschaft müssen also andere Glycoproteine im Serum verantwortlich sein.

4.5.5 Schlussfolgerungen

Das Dummy-System ist geeignet für die Optimierung des Beschichtungsprozesses, da die Ergebnisse in die FidgeType Anlage übertragen werden können. In der FidgeType Anlage ist mit Lektinen der spezifische Nachweis einzelner Blutgruppen auf Schwingquarzen im schwingenden System möglich. Die Messmethode im konstanten Fluss führt zu stabileren und reproduzierbaren Messsignalen. Als Proben sind gewaschene Erythrozyten aus dem Vollblut vorzuziehen. Das schichterhaltende Regenerieren der Biosensoren durch ablösen der Erythrozyten mit den jeweiligen Elutions- und Inhibitionszuckern war nicht in ausreichendem Maß möglich. Das Recycling der Schwingquarze durch Behandlung mit NaOH bzw. Helmanex® und anschließender Neubeschichtung ist möglich. In der FidgeType Anlage ist eine Online-Beschichtung der Schwingquarze möglich. Zusammen mit dem Recyceln der Schwingquarze erlaubt dies einen geschlossenen Betrieb der Anlage.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines lektinbeschichteten Schwingquarzsensors zur Blutgruppenanalyse. Dazu wurden zunächst in einem Dummy-System mit mikroskopischer Bewertung die einzelnen Beschichtungsschritte optimiert und die Ergebnisse auf die FidgeType Anlage übertragen. Im Anschluss wurde erfolgreich eine Recycling-Strategie und eine Methode zur Online-Beschichtung entwickelt. Als Abschluss wurden grundlegende Experimente zur Analyse des Einflusses des Plasmas auf das Bindungsverhalten eines Erythrozyten an den Schwingquarz durchgeführt.

Die im Dummy-System bezüglich Konzentration und Inkubationszeit optimierten Beschichtungen der Schwingquarze mit Neutravidin und den Lektinen DBA, EEL, CON-A und PHA-E konnten in der FidgeType Anlage erfolgreich eingesetzt werden.

Der Messprozess der FidgeType Anlage wurde zwischen konstantem Fluss und Stopp variiert. Dabei erwies sich die Messmethode mit konstantem Fluss als stabiler und reproduzierbarer. Die Probenaufbereitung wurde dahingehend verbessert, dass anstatt Vollblut gewaschene Erythrozyten eingesetzt wurden. Damit war der Nachweis von an den Schwingquarz gebundenen Erythrozyten möglich. Die Untersuchung der Lektine auf ihre Blutgruppenspezifität ergab für DBA einen spezifischen Nachweis für A₁, für EEL einen Nachweis der Blutgruppen B und 0 und für die Lektine CON-A und PHA-E einen blutgruppenunspezifischen Nachweis der Erythrozyten. Somit ist mit Lektinen prinzipiell der spezifische Nachweis einzelner Blutgruppen auf Schwingquarzen im schwingenden System möglich.

Die spezifischen Lektine benötigen eine relativ hohe Lektinkonzentration und lange Einwirkzeit für Lektin und Blut, lassen sich aber besser durch Zucker ablösen. Sie liefern auf der FidgeType Anlage deutlich höhere Signale.

Die unspezifischen Lektine binden sehr schnell an das Neutravidin, es ist nur eine geringe Konzentration und kurze Einwirkzeit für Lektin und Blut nötig. Jedoch lassen sich die Erythrozyten durch den jeweiligen Zucker nur wenig ablösen.

Da der Einsatz der jeweiligen Elutions- und Inhibitionszucker nicht zu einem ausreichenden Ablösen der Erythrozyten von den Lektinen geführt hat, war auf diese Art das schichterhaltende Regenerieren der Biosensoren nicht möglich. Als Alternativstrategie wurde das Reinigen der Schwingquarze mittels NaOH bzw. Helmanex® und nachfolgender Neubeschichtung erfolgreich verfolgt.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
CON-A	Concanavalin Agglutinin
d.h.	das heißt
DBA	Dolichorus biflorus Agglutinin
EDTA	Ethylendinitroltetraessigsäure
EEL	Eunonymos Europaeus Lectin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
MHC	englisch: <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibilty <u>C</u> omplex
NAV	Neutravidin
PBS	englisch: <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> olution
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
QCM	englisch: <u>Q</u> uartz <u>C</u> ystal <u>M</u> icrobalance
RPM	englisch: <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute
Tab.	Tabelle
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZKT	Zentrum für klinische Transfusionsmedizin

7 Literaturverzeichnis

- [1] Aizawa M, Kato S, Suzuki S (1980). Electrochemical typing of blood using affinity membranes. *J Membr Sci* 7: 1-10
- [2] Anderson RA, Paquette S, Lovrien R (2002). Lectin-erythrocyte interaction with external transmembran glycoporphin saccharides controlling membrane internal cytoskeleta. *J Agric Food Chem* 23; 50(22): 6599-604
- [3] Ballantine D WR, Martin S. (1997). *Acoustic Wave Sensors*. Academic Press, San Diego
- [4] Bayer EA, Wilchek M, Skutelsky E. (1976). Affinity Cytochemistry: The Localization of Levtin ans Antibody Receptors on Erythrcytes via the Avidin-Biotin Complex, *FEBS Letters* 68(2): 240-244
- [5] Bender K. (1987). *Das HLA-System*. Biotest Mitteilungen Sonderheft 3
- [6] Bernstein F (1925). Zusammenfassende Betrachtungen über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. *Z. induct. Abstamm. u. Vererb.Lehre* 37, 237
- [7] Boyd WC, Shapleigh E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins), *Sience* 119, 419
- [8] Burmester G, Pezzutto A (2006). *Taschenatlas der Immunologie*, Thieme Verlag, Stuttgart
- [9] Cans AS, Hook F, Shupliakov O, Ewig AG, Eriksson PS, et al. (2001). Measurement of the dynamicx of exocytosis and vesicle retrieval at cell populations using a quartz crystal microbalance. *Anal Chem* 73: 5805-11
- [10] Caruso F RE, Furlong D. (1996). Orientational Aspects of Antibody Immobilation and immunological Activity on Crystal Micro Balance Electrodes. *J Coll Interfac Sci*: 1004-15
- [11] Claußen J (2007). *Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren*, Dissertation, Universität Kaiserslautern
- [12] Cluss S (2007). *Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten*, Dissertation, Universität Tübingen
- [13] Cooper M, Dultsev F, Minson T, Ostanin V, Abell C, Klenerman D. (2001). Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning. *Nature Biotechnol* 19: 833-7
- [14] Curie M, P (1880), Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémiédres à faces inclinés, *Bull. Sec. Min. Paris*, 90-93
- [15] Dahr W, Müller-Eckhardt C (Hrsg.) (1988). *Transfusionsmedizin*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [16] Delamarche E SG, Biebuyck G, Michael B, Gerber C. (1966). Immobilization of Antibodies on s Photoactive Self-Assembled Monolayer on Gold. *Langmuir*. 12: 1997-2006
- [17] Döring JS (2008). *Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz-Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor*, Dissertation, Universität Tübingen

- [18] Eckstein R (2005). Immunhämatologie und Transfusionsmedizin, 5. Auflage Urban & Fischer Verlag, München, Jena
- [19] Eckstein R, Strohscheer I, Beyer J, Lenz K, Wittmann G, et al. (1992). Attempts in developing a standardized test system of immunologic reactivity. *Beitr Infusionsther* 30: 332-7
- [20] Flexner S, Noguchi H (1902). Snake venom in relation to haemolysis, Bacteriolysis and Toxicity. *J.Exp. Med.* 6, 277-301
- [21] Fredriksson R, Kihlman S, Rodahl M, Kasemo B (1992). The piezoelectric quartz crystal mass and dissipation sensor: a means of studying cell adhesion. *Langmuir* 14: 248-51
- [22] Gabius HJ et al. (2004). Chemical Biology of the Sugar Code. *ChemBioChem* 5: 740-764
- [23] Geckeler KE, Eckstein H (1999). Bioanalytische und biochemische Labormethoden, vieweg Lehrbuch, Braunschweig
- [24] Gehring FK (2006). Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten – Entwicklung eines Blutanalysegerätes. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- [25] Gokhale SM, Metha NG (1987). Concanavalin A binding to human erythrocytes leads to alterations in properties of the membrane skeleton. *Biochem J.* 241(2): 521-5
- [26] Gokhale SM, Metha NG (1987). Glycophorin A interferes in the agglutination of human erythrocytes by Concanavalin-A. Explanation of the requirement for enzymic pregestion. *Biochem J.* 241(2): 521-5
- [27] Grate J, Frye G. (1992). Acoustic wave sensors, update. Weinheim
- [28] Grate J, Martin S, White R. (1993). Acoustic wave microsensors: part I. *Anal Chem* 65: 940-5
- [29] Haindl C (2003). Amperometrischer Immunosensor auf Basis von Interdigitalstrukturen und Anwendung als in vitro Allergietest. Dissertation, Technische Universität München
- [30] Huang M, Shen Z, Zhang Y, Zeng X, Wang PG (2007). Alkanethiol containing glycopolymeres: a tool for the detection of lectin binding. *Bioorg Med Chem Lett.* 17(19): 5379:83
- [31] Imai S, Mizuno H, Suzuki M, Takeuchi T. (1994). Total urinary protein sensor based on piezoelectric quartz crystal. *Anal Chem Acta* 292: 65-70
- [32] Iseki S, Masaki S, Shibasaki K (1957). Studies on Lewis Blood Group System, I. Le^c Blood Group Factor, *Proceedings of the Japan Academy* 33(8): 492-497
- [33] Kaspar M, Stadler H, Weiss T, Ziegler C (2000). Mass-sensitive devices in bioanalysis. *Fres J Anal Chem* 366: 602-10
- [34] Kaspar M, Stadler H, Weiss T, Ziegler C. (2000). Mass-sensitive devices in bioanalysis. *Fres J Anal Chem* 366: 602-10
- [35] Kiefel V, Greinacher A (2007). Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, URL: www.tmed.med.uni-rostock.de/tmed.pdf
- [36] Kline TR, Runyon MK, Pothiwala M, Ismagilov RF (2008). AB0, D Blood Typing and Subtyping Using Plug-Based Microfluidics. *Anal Chem.* 80: 6190-7
- [37] Klinker R, Silbernagl S (2003). Lehrbuch der Physiologie, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- [38] König G, Grätzel M (1993). Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of human erythrocytes. *Anal Chim Acta* 276: 329-33
- [39] König G, Grätzel M (1994). Long-term stability and improved reusability of a piezoelectric immunosensor for human erythrocytes. *Anal Chim Acta* 230: 37-41
- [40] Krapf R (2001). *Blutanalytik und Biosensorik*. Dissertation, Universität Tübingen
- [41] Landsteiner K (1900). Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserums und der Lymphe. *Zbl Bakt*: 257
- [42] Landsteiner K (1901). Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute. *Wien. Klin. Wochenschrift* 14, 1132
- [43] Landsteiner K, Raubitschek H (1907). Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 45, 600-607
- [44] Landsteiner K, Wiener AS (1940). An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 43, 223
- [45] Marx KA (2003). Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules* 4: 1099-120
- [46] Mitchel SW (1860). Observation of blood coagulation by rattlesnacke venom. *Smithsonian Contrib. Knowledge.* XII, 89-90
- [47] Muramatsu H, Dicks JM, Tamiya E, Karube I (1987). Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins. *Anal Chem* 59: 2760-3
- [48] Muramatsu H, Romanschin A, Thompson M (1997). Adhesion of human platelets to collagen detected by 51 Cr labelling and acoustic wave sensor. *Anal Chim Acta* 342: 23-9
- [49] Muramatsu H, Tamiya E, Karube I (1988). Viscosity monitoring with a piezoelectric quartz crystal and its application to determination of endotoxin by gelation of *Limulus* amoebocyte lysate. *Anal Chim Acta* 215: 91-8
- [50] Neubing D, Briese W (1997). *Das große Quarzkochbuch*. Poing: Franzis Verlag, Poing
- [51] Nivens D, Chambers J, Anderson T, White D (1993). Long-term, on-line monitoring of microbial biofilms using a quartz crystal microbalance. *Anal Chem* 65: 65-9
- [52] Nowell PC (1977). Phytohemagglutinin – Initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Current Contents* 20(42), 13
- [53] O'Sullivan C, Gibault G (1999). Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. *Biosens Bioelectron* 14: 663-70
- [54] Pei Y, Yu H, Pei Z, Theurer M, Ammer C, André S, Gabius HJ, Yan M, Ramström O (2007). Photoderivatized polymer thin films at quartz crystal microbalance surfaces: sensors for carbohydrate-protein interactions. *Anal Chem.* 79(18): 6897-902
- [55] Pei Z, Anderson H, Aastrup T, Ramström O (2005). Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron.* 21(1): 60-6

- [56] Product specifications: Biotin-(Strept)avidin Systems (2007) Vector Laboratores
- [57] Product specifications: Biotinylated Concanavalin A (CON-A) Lectins (2007); Vector Laboratores
- [58] Product specifications: Biotinylated Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA), Lectins (2007); Vector Laboratores
- [59] Product specifications: Biotinylated Euonymus Europaeus Lectin (EEL), Lectins (2007); Vector Laboratores
- [60] Product specifications: Biotinylated Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E), Lectins (2007); Vector Laboratores
- [61] Puzstai A, Bardocz S (1996). Biological Effects of Plant Lectins on the Gastrointestinal Tract: Metabolic Consequences and Applications, Trends Glycosci. Glycotechnol.8: 149-65
- [62] Ramos MV, Grangeiro TB, Cavada BS, Shepherd I, de Melo Lopez RO, Sampaio AH (2000). Carbohydrate / Glycan-binding specificity of legumes lectins in respect to their proposed biological functions. Braz. Arch. Boil. Technol. 43 (4) Curitiba 2000
- [63] Redepenning J, Schlesinger TK, Mechalke EJ, Puleo DA, Bizios R (1993). Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance. Anal Chem 65: 3378-81
- [64] Richtlinien zur Gewinnung von Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten, neu bearbeitete Fassung (2000). Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
- [65] Rickert J, Hayward G, Cavic B, Thopson M, Göpe W (1999). Biosensor based acoustic wave devices. Weinheim: Wiley VCH, Weinheim
- [66] Roederer J, Bastiaans G (1983). Microgravimetric Immunoassay with piezoelectric crystal. Anal Chem 55: 2333-6
- [67] Rüdiger H (1978). Lectine, pflanzliche zuckerbindende Proteine. Naturwissenschaften 65, 239-244
- [68] Rüdiger H, Gabius HJ (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications, Glycoconj J. 18(8): 589-613
- [69] Rump G, Braun R, Jahn U (2003). Transfusionsmedizin kompakt. Thieme Verlag Stuttgart
- [70] Saphire EO, Parren P (2001). Listening for viral infection. Nature Biotechnol 19: 823-4
- [71] Sauerbrey G (1957). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, Zeitschrift für Physik 1959, 155 (2), 206-222
- [72] Scheller F, Schmid R (1992). Biosensors: Fundamental, Technologies and Applications. Weinheim: VHC
- [73] Scheller F, Schubert F (1997). Frontiers in Biosensoric III. Birkhäuser Verlag. Berlin
- [74] Scheufele B (2008). Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen, Dissertation, Universität Kaiserslautern
- [75] Sharon N, Lis H (2003). Lectins, second edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Bosteon, London

- [76] Shen Z, Huang M, Xiao C, Zeng X, Wang PG (2007). Nonlabeld quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. *Anal Chem.* Mar 15;79(6): 2312-9
- [77] Stillmark H (1888). Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus comm. L.* und anderen Euphorbiaceen. Dissertation, Schnackenburg's Buchdruckerei, Dorpat
- [78] Sumner JB (1919). The globulins of the Jack bean, *Canavalin ensiformis*, *J. Biol. Chem.* 37, 137-42
- [79] Sumner JB, Howell SF (1936). The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with *concanavalin A*, *J. Bacteriol.* 32, 227-27
- [80] Sung LA, Kabat EA (1994). Agglutination-induced erythrocyte deformation by two blood group A-specific lectins: studies by light and electron microscopy, *Biorheology*, Jul-Aug, 31(4): 353-64
- [81] Tan L, Jia X, Jiang X, Zhang Y, Tang H, Yao S, Xie Q (2008). Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. *Anal Biochem.* 2008 Aug 3. (Epub ahead of print)
- [82] Tatami A, Hon YS, Matsuo I, Takatani M, Koshine H, Ito Y (2007). Analyses of carbohydrate binding property of lectin-chaperone calreticulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 364(2): 332-7
- [83] Watkins WM, Morgan WTJ (1953). The Inhibition of the hemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars, *Br J Exp Pathol* 34, 94-103
- [84] Weisch W, Klein C, von Schickfus M, Hunklinger S (1996). Development of a surface acoustic wave immunosensor. *Anal Chem* 68: 2000-4

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hinnak Northoff, für die Bereitstellung des Themas, sowie für die Hilfestellung und die Anregungen während meiner Arbeit.

Dr. Frank Gehring danke ich für die direkte Betreuung in allen Phasen und die intensiven Diskussionen.

Im besonderen Maße möchte ich mich bei der „Biosensorikgruppe“ in Tübingen bedanken: Dipl.-Chem. Lothar Müller für die Anleitung zum selbstständigen Arbeiten und bei der Hilfestellung in allen chemischen Fragen. Dr. Bernd Scheufele danke ich für die fruchtbaren Diskussionen während der gemeinsamen Nachtschichten im Labor und Dr. Hartmut Drechsel für die geduldige Lösung aller EDV-Probleme. Dipl.-Biol. Daniela Kömpf danke ich für ihre Unterstützung und aufmunternden Worte.

Den Mitarbeiterinnen des Zentrums für klinische Transfusionsmedizin danke ich für die unkomplizierte Organisation der Blutproben.

Frau Zimmermann, der Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen danke ich für ihren außergewöhnlichen Einsatz beim Bereitstellen der Plasma- und Sekretorenproben.

Herrn Peter Gärtner danke ich für die Programmierung der Auswertesoftware und das geduldige Korrekturlesen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Manuela Schoch
Geburtsdatum und -ort	13.03.1974 in Bautzen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1980 – 82	Grundschule Geschwister Scholl, Puschwitz
1982 – 87	POS Paul Neck, Neschwitz
1987 – 90	POS F.J. Curie, Bautzen
1995 – 96	Abendgymnasium Bautzen
1996 – 98	Kolleg, Freiberg Abschluss Allgemeine Hochschulreife Juli 1998

Berufsausbildung

1990 – 1993	Ausbildung zur Krankenschwester
-------------	---------------------------------

Studium

2004 – 2010	Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
21.03.2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.05.2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

1993 – 96	Krankenschwester Innere Medizin (Intermediatecare) Kreiskrankenhaus Bautzen
1999 – 2000	Krankenschwester im Leasingbereich Stuttgart
Seit 2000	Krankenschwester Herz-Thorax-Gefäß Chirurgie (Intermediatecare) Universitätsklinik Tübingen