

Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen

Dissertation

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Reiner Krapf

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2001
Dekan: Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ch. Ziegler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Northoff

meinen Eltern
und meiner Frau Katja

Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen

1	EINLEITUNG UND MOTIVATION	1
2	THEORETISCHER TEIL	4
2.1	Massensensitive Sensoren	4
2.1.1	Piezoelektrischer Effekt	4
2.1.2	Oberflächenbauelemente auf der Basis von Rayleigh-Wellen (SAW)	7
2.1.3	Oberflächentransversalwellenbauelemente (STW)	8
2.1.4	Love-Wellen-Bauelemente	9
2.1.5	Horizontale Scherplattenmode-Bauelemente (SH-APM)	9
2.1.6	Dickenscherschwinger (BAW-TSM)	10
2.2	Schwingquarze als massensensitive Sensoren in der Gasphase	12
2.3	Schwingquarze als massensensitive Sensoren in flüssiger Phase	13
2.4	Mathematische Konzepte für QCMs in Flüssigkeiten	16
2.5	Die Quarzgüte Q	18
2.6	Einfluss ionenreicher Flüssigkeiten auf die Goldelektrode des Quarzes	19
2.7	Eigenschaften und Zusammensetzung von Blut	22
2.8	Die Erythrozytenmembran	25
2.9	Immunglobuline	27
2.9.1	Polyklonale und monoklonale Antikörper	29
2.9.2	Immunglobulin G	30
2.9.3	Immunglobulin M	31
2.10	Protein A und Protein G	31
2.11	Konventionelle Blutanalytik-Methoden	32
3	EXPERIMENTELLES	34
3.1	Chemikalien und Materialien	34
3.1.1	Chemikalien für die Quarzbelegung, Analyte	34

3.1.2	Zubehör zur Quarztechnik	36
3.1.3	Bauteile der FIA	37
3.1.4	Mikroskopaufnahmen	37
3.2	Die FIA-Anlage	37
3.3	Der Quarzhalter	39
3.4	Die Flusszelle	41
3.5	Sensorbeschichtung	43
3.5.1	Ankopplung direkt auf Gold (1)	45
3.5.2	Ankopplung via Protein A (2)	45
3.5.3	Ankopplung via Thiol / Protein A (3)	45
3.5.4	Quarzbelegung mit Humanserum und FCS	46
3.6	Selbstentwickelte Software	46
3.7	Erklärung der erhaltenen Frequenzverläufe	48
3.7.1	Typischer Messzyklus	50
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Quarzbeschichtung, Konzepte	52
4.1.1	Ankopplung direkt auf Gold (1)	53
4.1.2	Ankopplung via Protein A (2)	53
4.1.3	Ankopplung via Thiol / Protein A (3)	54
4.1.4	Messergebnisse der drei getesteten Belegungsverfahren	54
4.2	Quarzbelegung mit Protein A	57
4.2.1	Einfluss der Proteinart	58
4.2.2	Einfluss der Proteinkonzentration	60
4.2.3	Einfluss der Belegungstemperatur	60
4.2.4	Einfluss des Puffers (Solvens)	62
4.2.5	Einfluss des pH-Wertes, Adsorption und Desorption von Protein A bei verschiedenen Lösungsmitteln und Regenerationslösungen	64
4.2.6	Einfluss des Quarzes	67
4.3	Ankopplung von Antikörpern an einen Protein A-belegten Quarz	67
4.3.1	Einfluss der Antikörper-Konzentration	68
4.3.2	Einfluss der Belegungstemperatur	69

4.3.3	Vergleich der Antikörperadsorption an Protein A und an Gold	70
4.4	Blutmessungen	71
4.4.1	Blutgruppe A	71
4.4.2	Konzentrationsreihen der Erythrozytensuspension	73
4.4.3	Regeneration der Quarze	75
4.4.4	Rhesusfaktor-Bestimmung mit Standardquarzen	77
4.4.5	Das Rhesus-Antigen D	78
4.4.6	Rhesus-Bestimmung durch Entfernung der Glykokalix	80
4.4.7	Rhesus-Bestimmung mit Doppel-IgG-Beschichtung	81
4.4.8	Rhesus-Bestimmung mit IgM-Beschichtung	83
4.4.9	Rhesus-Bestimmung mit Druckpulsen	84
4.4.10	Verschiedene Antikörper im Vergleich	86
4.4.11	Schwache Rhesus-Proben (D^{weak})	87
4.4.12	Einfluss des pH-Werts auf die Blutmessungen	89
4.5	Sensitivität des Quarzsystems	89
4.6	Nachweis von Proteinen	91
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	96
5.1	Ergebnisse und Entwicklungen	96
5.1.1	Entwicklung einer FIA	96
5.1.2	Entwicklung einer sensitiven Quarzbeschichtung	96
5.1.3	Bestimmung der Hauptblutgruppe und des Rhesusfaktors	97
5.1.4	Nachweis von Proteinen	98
5.2	Ausblick	98
6	LITERATURVERZEICHNIS	100
7	ANHANG	105
7.1	Technische Zeichnungen	105
7.2	Publikationen	107

Verwendete Abkürzungen

AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
AK	Antikörper
APM	Acoustic Plate Mode (Akustische Plattenmode)
AW	Acoustic Wave (Akustische Welle)
BAW	Bulk Acoustic Wave (Akustische Volumenwelle)
BSA	Bovine Serum Albumin
EDC	N'-(3-Dimethylaminopropyl)N-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FIA	Fließ-Injektions-Anlage
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster Energietransfer Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HP-VEE	Hewlett Packard Visual Engineering Environment
HSB	Humanserum B
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G (wie auch M, A, D, E)
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

Abkürzungsverzeichnis

PEG	Polyethylenglycol
QCM	Quartz Crystal Microbalance (Quarzmikrowaage)
RIA	Radio-Immuno-Assay
RfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SAM	Selbstanordnende Monolage
SAW	Surface Acoustic Wave (Akustische Oberflächenwelle)
SCE	Saturated Calomel Electrode
SH	Shear Horizontal
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonenresonanz)
STW	Surface Transverse Wave (Oberflächentransversalwelle)
SV	Shear Vertical
TRIS	Tris(hydroxymethyl)animomethan
TSM	Transverse Shear Mode (transversaler Schermodus)
UV-VIS	Ultraviolet-Visible

1 Einleitung und Motivation

Die Blutanalytik, insbesondere die Blutgruppen- und Blutantikörperbestimmung, ist ein wichtiger Vorgang in der klinischen Diagnostik, der routinemäßig meist immer noch „von Hand“ durchgeführt wird.

Obwohl seit 100 Jahren bekannt ist, wie man die Hauptblutgruppen bestimmt (Karl Landsteiner publizierte 1900 und 1901 grundlegende Forschungsergebnisse zum Agglutinationsprozess, d.h. zum Vorgang des Verklumpens von Erythrozyten [1]) und unzählige Methoden entwickelt wurden, die Blutgruppe schnell, einfach und sicher zu bestimmen, ist auch heute noch Handarbeit im Diagnosealltag gefordert. Der Grund liegt in der meist optisch verifizierten Detektion des Agglutinationsereignisses, denn da Blut alles andere als ein einheitliches Substanzgemisch ist und sich weitab von einer Standardisierung befindet, gibt es unzählige Gründe, warum Agglutination nicht oder in unzureichender Form stattfindet, sodass optische Systeme in Grenzbereiche kommen.

Darum ist es umso verwunderlicher, dass andere Transduktionsverfahren (ein Transducer ist ein Messwertumsetzer, der die vom Analyten erfassbaren Informationen in ein elektrisch oder optisch auswertbares Signal umwandelt [2]) bisher keinen Einzug in die Labors der Kliniken und Blutbanken gehalten haben. Aber um elektrochemische oder massensensitive Biosensoren zu entwickeln, welche dieselbe oder bessere Detektionseigenschaften besitzen als optische Verfahren, bedarf es einerseits einen enormen Forschungsaufwand im Feld dieser vergleichsweise jungen Bioanalytik, und andererseits klarer Vorteile gegenüber den etablierten Systemen, wie zum Beispiel einer drastischen Senkung der Investitions- und Verbrauchskosten, Miniaturisierbarkeit und einfacher Bedienung.

Diese Problematik wird dann verständlich, wenn man sich die verschiedenen Sensorsysteme im Zusammenhang anschaut: Ausgehend von physikalischen Sensoren, die in der Regel direkt elektrische Signale liefern kommt man zu chemischen Sensoren [3,5], die eine sensitive Schicht auf dem Transducer besitzen, welcher die

Informationen elektronisch zugänglich macht [13]. Hierbei sind Selektivität, Sensitivität und Stabilität die zentralen Anforderungen an eine solche Beschichtung. Geht man weiter zu den Biosensoren, hat man zusätzlich das Problem, dass die sensitive Schicht biologischer Art ist und an eine künstliche Oberfläche (nämlich die des Transducers) angekoppelt werden muss, was meist Folgen für die biologische Aktivität und die sterischen Verhältnisse mit sich bringt [4,6]. Darüber hinaus sind biologische Beschichtungen oft nicht lange stabil und lassen sich meist nicht reversibel verwenden.

Daher konzentriert sich die Forschung im Bereich der Biosensorik vor allem auf Fragen der Ankopplung von biologischen Komponenten auf künstliche Oberflächen oder auf die Suche nach hochspezifischen und äußerst sensitiven, langzeitstabilen Beschichtungen.

Die folgende Tabelle zeigt Beispiele verschiedener Messverfahren auf [8,9]:

Wirkungsweise	Messbare Größe (Beispiele)	Methoden / Messverfahren [11]
physikalisch	Temperatur, Druck, Lichtstärke, Schall Radioaktivität, elektrische und magnetische Parameter, chemische Elementaranalyse, Kristallstrukturen...	Thermometer, Barometer, Luxmeter, Photomultiplier, Spektrometer, Mikrofon, Geigerzähler, Hall-Sonde, AAS, NMR, IR, UV-VIS, Röntgenmethoden...
chemisch	pH, Polarität, Reaktivität, Molekülart und Konzentration...	elektrochemische Verfahren, GC, LC, HPLC, QCM, SPR, RfS...
biologisch	Antigen- Antikörperreaktionen, Pestizid- und Abwasseranalytik mit Antikörpern (Molekülerkennung), biologische Aktivität, Avidität, Blut- und Urinzusammensetzung...	viele der Methoden wie bei chemischen Sensoren, zusätzlich Fluoreszenzverfahren, FRET, RIA, ELISA

Tab. 1.1: Verschiedene Sensorsysteme und Messverfahren im Überblick (s. Abkürzungsverzeichnis)

Ziel dieser Arbeit war es, einen massensensitiven Biosensor zu entwickeln, der mittels einer stabilen, sensitiven und selektiven biologischen Beschichtung in der Lage ist, Blutgruppen schnell, sicher und kostengünstig zu bestimmen. Darüber hinaus sollte diese Beschichtung einen flexiblen Charakter haben, sodass über die Blutgruppendetektion hinaus auch andere Systeme wie Antikörper, Viren und Proteine analysiert werden können.

Ansatz mit massensensitiven Sensoren

Schwingquarze (QCM, quartz crystal microbalance, Quarzmikrowaage) sind als massensensitive Sensoren überall dort verwendbar, wo die Detektion des Analyten mit einer Massenänderung auf der Oberfläche des Quarzes verbunden ist. Dies ist z.B. im gesamten Gebiet der Immunreaktionen der Fall, bei denen Antigene mit entsprechenden Antikörpern reagieren können und somit an Masse zunehmen.

Der Ansatzpunkt des später genauer beschriebenen Verfahrens stützt sich auf einen modifizierten Schwingquarz, auf dessen Oberfläche Blutgruppenantikörper immobilisiert (d.h. gebunden) sind. Dieser Schwingquarz ist mit einer FIA (Fließ-Injektions-Anlage [7]) gekoppelt, sodass Messungen in einem kontinuierlichen Puffer- und Analytfluss möglich sind.

Die auf den Erythrozyten vorhandenen Epitope können mit entsprechenden Antikörpern spezifisch reagieren. Ein mit Anti-A belegter Quarz sollte also in der Lage sein, Erythrozyten „einzufangen“, indem sie an das F_{ab} Fragment des Antikörpers binden. Der Quarz wird durch einen Schwingkreis zum Schwingen angeregt, wobei die aktuelle Schwingungsfrequenz gemessen wird; die verwendeten Quarze schwingen im 10 MHz-Bereich. Diese aktuelle Schwingungsfrequenz ist abhängig von der Masse, die sich auf der Oberfläche des Quarzes befindet: Nimmt die Masse zu, so wird der Quarz „träger“ und die Frequenz nimmt ab. Man spricht daher auch von „Quarzmikrowaage“, weil adsorbierte Massen durch die Frequenzänderung gemessen werden können. Binden Erythrozyten an den immobilisierten Antikörper, so nimmt die Masse auf der Quarzoberfläche drastisch zu, die Frequenz nimmt dementsprechend ab.

2 Theoretischer Teil

In diesem theoretischem Kapitel werden Grundlagen zum verwendeten Transducer, zur Interpretierung der erhaltenen Messkurven (mathematische Beschreibung des Zusammenhangs zwischen adsorbierter Masse und zugehöriger Frequenzänderung) und zu immunologisch relevanten Themenbereichen vermittelt.

2.1 Massensensitive Sensoren

Messwertumsetzer auf Basis akustischer Wellen (Acoustic Waves, AW) bestehen typischerweise aus einem piezoelektrischen Substrat, auf das Metallelektroden aufgebracht sind. Legt man an diese ein elektrisches Wechselfeld an, so kann das Substrat zu Schwingungen im Ultraschallbereich angeregt werden.

2.1.1 Piezoelektrischer Effekt

Im Jahr 1880 entdeckten Pierre und Jacques Curie, dass Kristalle mit einer Gitterstruktur ohne Inversionszentrum bei Ausübung von Druck (griech. $\pi\zeta\varepsilon\nu$ = pizein) in bestimmte Richtungen elektrische Ladungen entwickeln [10]. Diese Ladungen kann man z.B. mit einem Elektrometer messen, indem man an der Kristalloberfläche Metallelektroden befestigt. Da der Effekt reversibel ist, kann man durch Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung den Kristall zum Schwingen bringen – man erhält einen Oszillator.

Betrachtet man die Gitterstruktur von α -Quarz, so kann man leicht den Zusammenhang zwischen ausgeübter Kraft und der Ladungsverschiebung erkennen: Es entsteht ein Dipolmoment in Richtung der polaren Achse (x-Achse), das proportional zur ausgeübten Kraft auf der y-Achse ist [15]

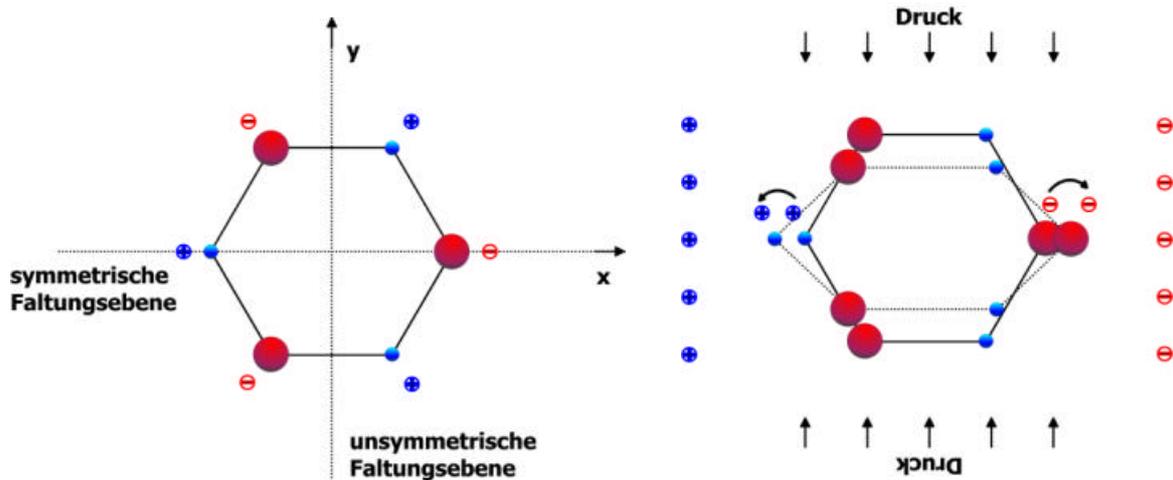


Abb. 2.1: Vereinfachte Strukturzelle eines Quarzeinkristalls SiO₂ (links) und Auftreten der Ladungsverschiebung durch Druck (rechts)

Hierfür kommen Materialien mit polaren Achsen in Frage, was neben α -Quarz auch bei Lithiumniobaten oder Lithiumtantalaten der Fall ist [14].

Der Grad der Energieumwandlung k^2 von piezoelektrisch erzeugter elektrischer Energie w_{em} zur aufgewendeten mechanischen Energie w_m liegt für Lithiumniobat mit

$$k^2 = \frac{w_{em}}{w_m} = 0,045 \text{ deutlich höher als für } \alpha\text{-Quarz (} k^2 = 0,0023 \text{)}.$$

Die Güte Q eines Resonators kann mit einem Frequenzanalysator gemessen werden, wobei sich folgende Beziehung ergibt: $Q = \frac{f_0}{\Delta f_h}$ (f_0 =Frequenz am Resonanzmaximum, Δf_h =Halbwertsbreite der Resonanz).

Betrachtet man einen Quarzeinkristall, so bestimmt der Winkel, mit dem die Quarzscheibe aus dem Kristallkörper geschnitten wird, seine Eigenschaften in Bezug auf Frequenz, Temperaturstabilität, Schwingungsform und elektrische Anregbarkeit. Benutzt man den Quarz als Transducer für massensensitive Fragestellungen, nimmt man im Hinblick auf einen geradlinigen Frequenzverlauf am besten die temperaturunempfindlichste Variante (sog. AT-Schnitt; die Schnittwinkelbezeichnungen AT, BT, CT etc. sind historischer Natur).

Die Frequenz f_0 eines solchen AT-Quarzes wird durch die Dicke der Quarzscheibe (d), die wirksame Masse (d bzw. ρ_q [$=2651 \text{ kg/m}^3$]) und die Elastizität C_{66} bestimmt:

$$f_0 = \frac{1}{2d} \sqrt{\frac{C_{66}}{\rho_q}} \quad (1)$$

Je nach Schnitt, Dicke der Quarzscheibe, Elektrodengeometrie und -anordnung kann man verschiedene Typen der angeregten akustischen Wellen unterscheiden. Die erzeugten Wellen breiten sich entweder ungerichtet im Volumen des Quarzes aus (Volumenwellen) oder werden entlang einer oder mehrere Oberflächen geleitet (Oberflächenwellen). Eine Übersicht über die verschiedenen Wellenarten ist in *Abb. 2.2* abgebildet [16].

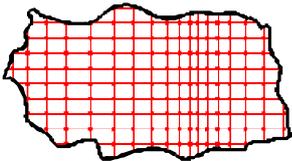
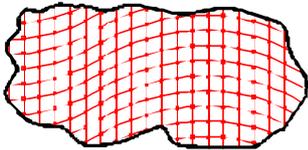
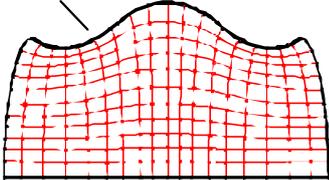
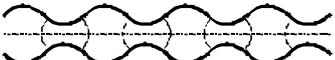
Wellenart	Ausbreitung im Quarz	Ausbreitungsrichtung
Longitudinale Volumenwellen 5000...12000 m/s		
Transversale Volumenwellen 2500...6000 m/s		
Oberflächenwellen Rayleigh-Wellen 2500...6000 m/s	freie Oberfläche 	
Lambwellen: antisymmetrisch 5000...12000 m/s		
Lambwellen: symmetrisch 100...5000 m/s		

Abb. 2.2: Typen akustischer Wellen und deren Ausbreitungsgeschwindigkeit im Quarz

Bei Transversal- oder Scherwellen erfolgt die Teilchenauslenkung senkrecht zur Ausbreitungsrichtung, während bei Longitudinalwellen im Volumen die Teilchenauslenkung parallel zur Ausbreitungsrichtung stattfindet (analog zu Schallwellen). Beträgt die Dicke des Substrats nur einen Bruchteil der akustischen Wellenlänge, so werden Lambwellen erzeugt. Nimmt man die Sensoroberfläche als Bezugsebene, so kann man bei Teilchenauslenkungen transversal zur Wellenausbreitung zusätzlich noch die Wellenausbreitung parallel zur Sensoroberfläche („horizontale Scherwellen“ SH) und senkrecht zur Sensoroberfläche („vertikale Scherwellen“ SV) unterscheiden [12].

Auf Basis dieser verschiedenartigen Ausbreitungsmodi der akustischen Wellen wurden ganz unterschiedliche Bauelemente, die als Sensoren dienen können, entwickelt [17]:

2.1.2 Oberflächenbauelemente auf der Basis von Rayleigh-Wellen (SAW)

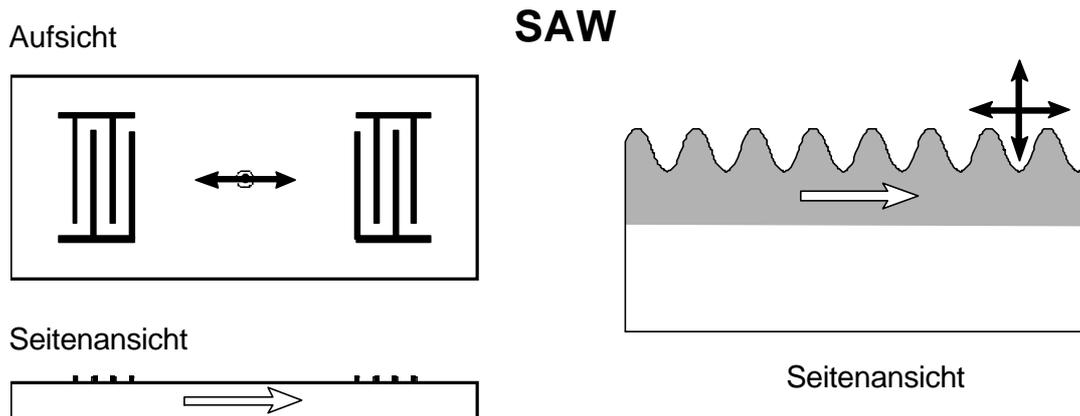


Abb. 2.3: SAW-Bauelement schematisch. Ungefüllte Pfeile zeigen die Wellenausbreitungsrichtung an, gefüllte Pfeile die Teilchenauslenkung

Interdigitalelektroden, die kammartig ineinander greifen, erzeugen Rayleigh-Wellen, die sich auf der Oberfläche eines recht dicken Quarzsubstrates (ST-Schnitt) ausbreiten [12,18]. Rayleigh-Wellen (als vertikale Scherwellen) sind nach Lord Rayleigh benannt, der 1885 die mathematische Methode zur Darstellung eines Typs von Erdbebenwellen beschrieb. Eine Interdigitalstruktur dient als Sender, eine weitere als Empfänger, und als sensitive Schicht dient das Substrat zwischen den beiden Strukturen. Die dabei entstehenden Teilchenauslenkungen finden nicht nur parallel, sondern auch senkrecht zur Sensoroberfläche bis zu einer Tiefe von ca. einer akustischen Wellenlänge statt

(elliptische Form). Resonanzfrequenzen im Bereich von 30-600 MHz werden erreicht, während als Anwendung vor allem das Gebiet der Gassensorik zu nennen ist, weil bei Kontakt mit einer Flüssigkeit die senkrecht zur Oberfläche stehende Komponente der akustischen Welle praktisch vollständig gelöscht wird.

2.1.3 Oberflächentransversalwellenbauelemente (STW)

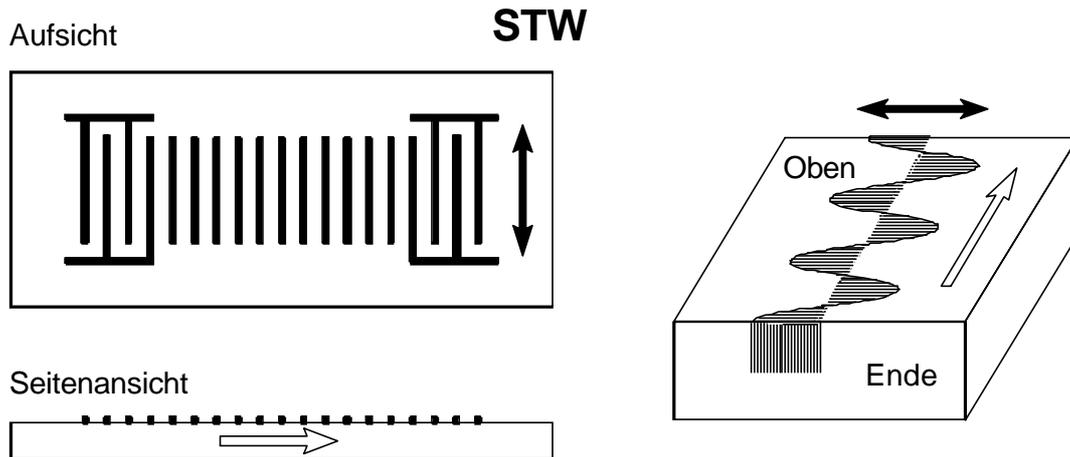


Abb. 2.4: STW-Bauelement schematisch. Ungefüllte Pfeile zeigen die Wellenausbreitungsrichtung an, gefüllte Pfeile die Teilchenauslenkung

Im Prinzip entspricht der Aufbau eines STW dem der SAW-Baugruppe mit dem Unterschied, dass hier nun durch die Wahl eines anderen Kristallschnittes keine vertikalen (Rayleigh-), sondern horizontale Scherwellen erzeugt werden. Dabei findet die Teilchenauslenkung senkrecht zur Wellenausbreitungsrichtung und parallel zur Sensoroberfläche statt [19,20]. Zwischen den Interdigitalstrukturen wird ein Gitter an der Oberfläche angebracht. Dieses leitet die Welle entlang der Oberfläche, sodass die Teilchenauslenkung keine oberflächennormale Komponente besitzt und durch Kontakt mit einer Flüssigkeit nur schwach gedämpft wird. Daher ist ein Einsatz in der Biosensorik möglich.

2.1.4 Love-Wellen-Bauelemente

Realisiert man ein STW-Bauelement, bei dem das Gitter nicht aus Metall besteht, sondern stattdessen durch einen dünnen Film an der Oberfläche ersetzt wird, so entstehen Love-Wellen [21,22]. Der Film verhindert dabei eine Streuung der Wellen ins Substratvolumen, und der Anwendungsbereich dieser Bauteile ist identisch mit den STWs.

2.1.5 Horizontale Scherplattenmode-Bauelemente (SH-APM)

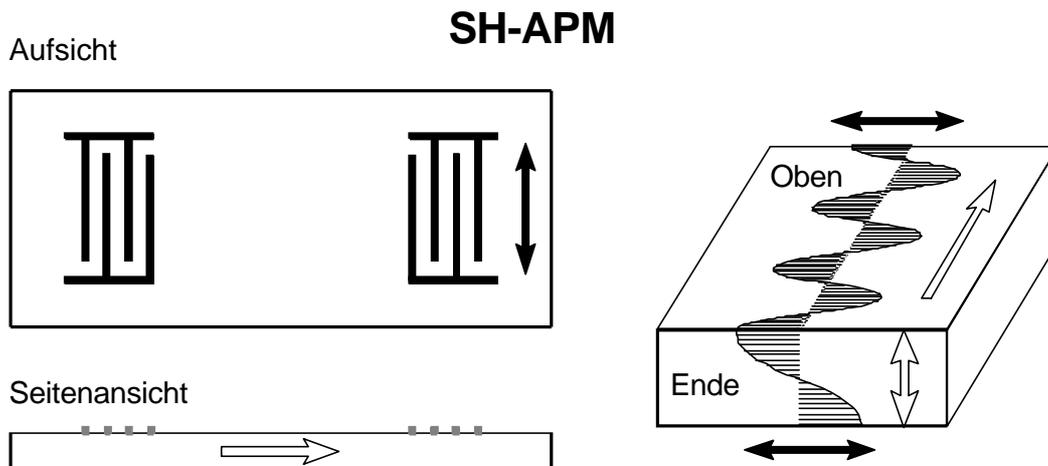


Abb. 2.5: SH-APM-Bauelement schematisch. Ungefüllte Pfeile zeigen die Wellenausbreitungsrichtung an, gefüllte Pfeile die Teilchenauslenkung

Verwendet man bei einem SAW-Aufbau ein sehr dünnes Substrat (nur einige akustische Wellenlängen), so werden zusätzlich zu Rayleigh-Wellen auch horizontale Scherwellen erzeugt, die unter bestimmten Winkeln in das Volumen abstrahlen und mehrfach an den parallelen Oberflächen reflektiert werden [23,24,25]. Durch die Überlagerung dieser Wellen wird eine Anzahl von Plattenmoden ($n=0,1,2,3,\dots$) mit leicht unterschiedlicher Frequenz angeregt, wobei die Auswerteelektronik anschließend eine einzige Mode herausfiltert. Typische Frequenzen liegen zwischen 25 und 200 MHz, und durch die Auswertung der horizontalen Scherwellen werden Anwendungen im Bereich der Flüssigkeiten (Biosensorik; Messungen von Flüssigkeitsparametern wie Viskosität oder Leitfähigkeit) möglich.

2.1.6 Dickenschwinger (BAW-TSM)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Dickenschwinger verwendet, darum sollen diese Bauteile hier ausführlicher beschrieben werden.

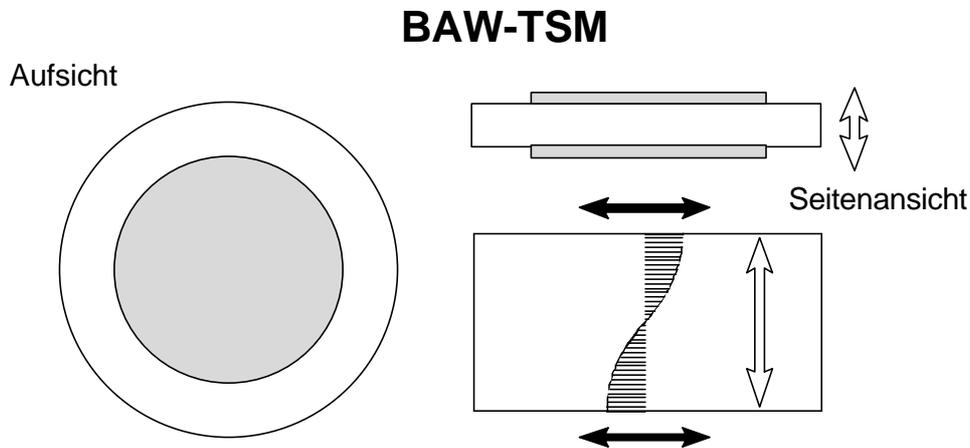


Abb. 2.6: BAW-TSM-Bauelement schematisch. Ungefüllte Pfeile zeigen die Wellenausbreitungsrichtung an, gefüllte Pfeile die Teilchenauslenkung

Eine gewöhnlich als „Schwingquarz“ bezeichnete Quarzeinkristallscheibe (meist im AT-Schnitt) mit aufgedampften kreisrunden Goldelektroden bildet nach Anregung durch einen elektronischen Schaltkreis Volumenwellen (transversale Scherwellen) aus [15,26-31]. Der Name Dickenschwinger bezieht sich auf im Volumen erzeugte akustische Wellen, wobei die Teilchenauslenkung senkrecht zur Wellenausbreitungsrichtung und parallel zur Oberfläche verläuft. Ein anderer Name für dasselbe Bauelement ist Quarzmikrowaage oder QCM (engl. quartz crystal microbalance), weil man es zur Wägung kleinster Massen einsetzen kann (G. Sauerbrey 1959).

Die Dicke des Quarzplättchens bestimmt die Wellenlänge λ der Grund- und Oberschwingung $\lambda = 2d/n$ ($n=1,3,5,\dots$) mit $n=1$ als Grundschwingung. Daher nimmt die Grundfrequenz mit abnehmender Dicke des Plättchens zu; für die Sensorik wird oft ausschließlich die Grundfrequenz verwendet, da Oberschwingungen nur mit großem Aufwand frequenzstabil gehalten werden können. Bei Standardquarzen liegt der erzielbare sinnvolle Frequenzbereich bei 5-120 MHz, wobei Schwingquarze durch die oberflächenparallele Teilchenauslenkung nicht nur in der Gasphase, sondern sehr gut auch in Flüssigkeiten eingesetzt werden können [32,93]. Der Vorteil von QCM im

Vergleich zu den bisher besprochenen Bauteilen liegt in einer äußerst frequenzstabilen und rauscharmen Messung [31].

Elektronische Eigenschaften [30,33,34]

In dieser Arbeit wurde der Quarz mittels einer Rückkopplungsschaltung betrieben, er war also Teil der Schaltung und nicht ein angesteuertes „externes“ Element. Daher wird die elektrische Impedanz (Wechselstromwiderstand) des Quarzes zur entscheidenden Messgröße der gesamten Schaltung. Um die verschiedenen elektrischen Einflüsse zu charakterisieren, wird der Schwingquarz durch ein elektrisches Ersatzschaltbild aus Standardbauteilen beschrieben (s. *Abb. 2.1.7*):

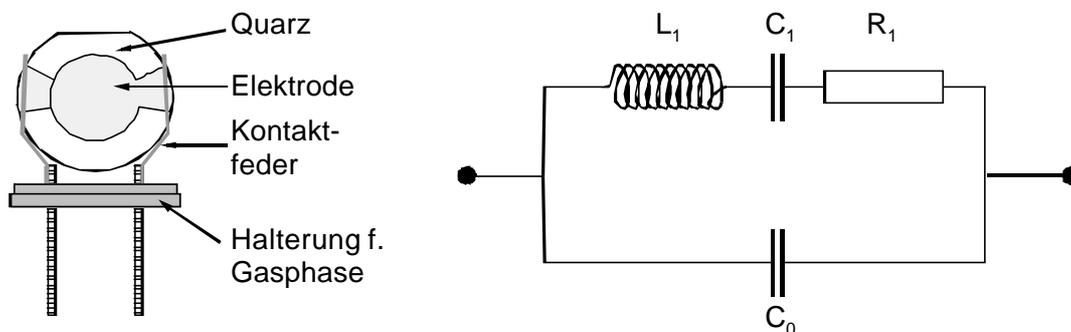


Abb. 2.7 Schwingquarz in Halterung (links) mit dazugehörigem elektrischen Ersatzschaltbild (rechts, Butterworth-Van Dyke [33,34])

Die statische Kapazität C_0 entsteht durch die aufgedampften Elektroden sowie deren Kontaktierung (Streukapazitäten). Der dynamische Zweig der Schaltung, bestehend aus L_1 , C_1 und R_1 resultiert direkt aus den mechanischen Eigenschaften des Quarzes: Die Kapazität C_1 ist ein Maß für die Steifigkeit (Elastizität) des Materials, L_1 entspricht der schwingenden Masse und R_1 dem Verlust an mechanischer Energie (im Fall eines eingebauten Quarzes ist das sowohl die innere Reibung als auch die Energieabgabe an die Quarzhalterung). Diese drei seriellen Bausteine des dynamischen Zweiges bestimmen die serielle Resonanzfrequenz f_s , und nimmt man den statischen Teil C_0 hinzu, erhält man die parallele Resonanzfrequenz f_p .

Wenn nun eine starre Masse auf der Oberfläche des Quarzes angebracht wird (z.B. ein Metallfilm durch Aufdampfen), so ändert sich normalerweise nur L_1 und die Sauerbrey-Gleichung gilt streng. Ist die Masse dagegen nicht starr, wie zum Beispiel im Bereich

der Chemo- und Biosensorik, so ändert sich neben L_1 auch R_1 , was eine direkte Korrelation der Frequenz mit aufgebrachter Masse nicht mehr möglich macht.

Durch die parallel geschaltete Kapazität C_0 erhält man zwei Frequenzen, welche die Resonanzbedingung erfüllen, wobei der Imaginärteil der Impedanz bei Serienresonanz f_s Null ist, bei Parallelresonanz f_p wird er maximal (s. Abb. 2.1.8).

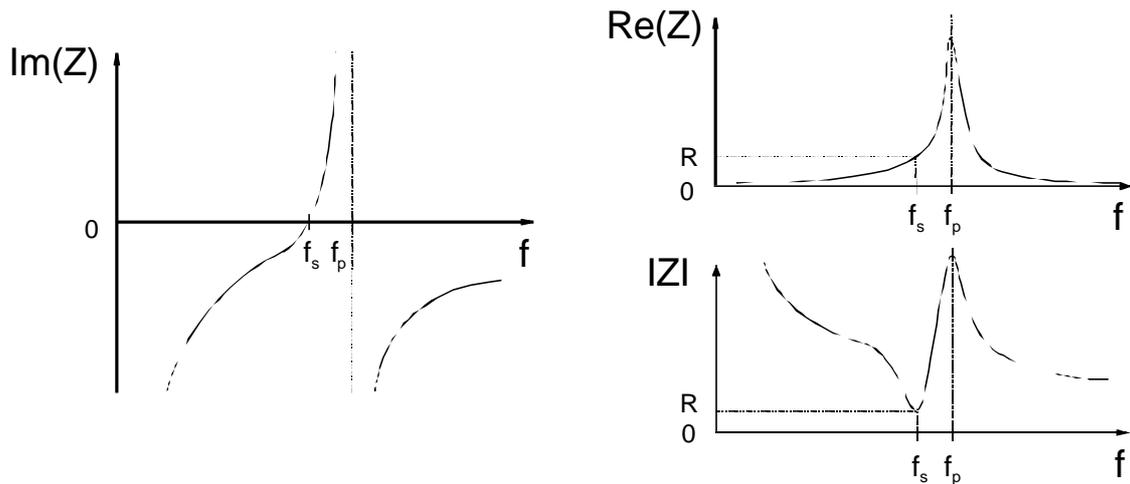


Abb. 2.8: Imaginär- (links) und Realteil (rechts oben) sowie Betrag (rechts unten) der Impedanz eines QCM in der Nähe der Resonanzfrequenzen f_p und f_s als Funktion der Frequenz f

Prinzipiell lassen sich beide Resonanzfrequenzen für die Sensorik nutzen, in dieser Arbeit wurde der Quarz aber immer in Parallelresonanz betrieben, da hier die Frequenzstabilität etwas höher ist.

2.2 Schwingquarze als massensensitive Sensoren in der Gasphase

Bei einer Fremdmassenbelegung mit starren, dünnen Materialien auf die Elektroden eines Quarzes wird prinzipiell nur die Dicke d des Resonators verändert, die mechanischen Eigenschaften des Quarzes ändern sich aber nicht. G. Sauerbrey hat schon 1959 eine Gleichung hergeleitet [35], die den Zusammenhang zwischen Massenzunahme Δm und Frequenzänderung Δf quantitativ beschreibt:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta d}{d} = -\frac{1}{r_Q d} \frac{\Delta m}{A} \quad (2)$$

Hierbei ist f_0 die Grundfrequenz ohne Beschichtung, d die Dicke der Quarzscheibe, A die Elektrodenoberfläche und ρ_0 die Dichte von Quarz ($\rho_0=2651 \text{ kg/m}^3$). Durch die Bedingung für die Resonanzfrequenz der Grundschiwingung ($f_0=c_0/2d$, wobei $c_0=3330 \text{ m/s}$ die Wellenausbreitungsgeschwindigkeit der elastischen Transversalwelle im Quarz ist) kommt man zur Sauerbrey-Gleichung (3):

$$\Delta f = -\frac{2}{c_0 \rho_0 A} f_0^2 \Delta m \quad (3)$$

Da diese Gleichung auch für SAW-Bauteile gilt, wäre es naheliegend zu vermuten, dass die sensorischen Fähigkeiten von SAWs durch ihre höhere Frequenz f_0 (bis 600 MHz) den QCMs (bis 120 MHz) überlegen sind. Dies ist jedoch nicht der Fall, da das Signal-Rauschverhältnis von SAWs durch thermische Effekte und HF-Störungen von außen deutlich schlechter ist [31,36].

2.3 Schwingquarze als massensensitive Sensoren in flüssiger Phase

Breibt man den Quarz in Flüssigkeit (einseitig oder beidseitig), so hat man den zusätzlichen Effekt der Dämpfung durch Energieübertragung auf die quarznahe Flüssigkeit. Die scheinbare Massenerhöhung führt zu einer geringeren Resonanzfrequenz: Bringt man einen an Luft schwingenden Quarz einseitig mit Wasser in Kontakt, sinkt seine Resonanzfrequenz rechnerisch um ungefähr 1,7 kHz (s. Gleichung 4). Dieser Wert ist allerdings rein theoretischer Natur, weil die Art und „Ziehfähigkeit“ der Quarzschiwingung eine wesentliche Rolle spielt. Einige Schaltungen (Schaltung nach Pierce) schwingen überhaupt nicht mehr, die Schaltung nach Colpitts schwingt nur durch manuelles Nachstellen des Ziehkondensators, während die Schaltung nach Hauptmann durch seine Rückkopplung die Dämpfung weitgehend ausgleicht und die Frequenz bei Benetzung mit Flüssigkeit um mehrere Kilohertz sinkt [37]. Kanazawa et al. haben 1985 eine Gleichung aufgestellt, welche die Erniedrigung der Resonanzfrequenz Δf_L bei Verwendung einer Newtonschen Flüssigkeit quantitativ beschreibt [38,39]:

$$\Delta f_L = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{r_L h_L}{\rho r_Q m_Q}} \quad (4)$$

Dabei sind r_L und h_L die Dichte bzw. Viskosität der Flüssigkeit, f_0 die Resonanzfrequenz des Quarzes an Luft und r_Q die Quarzdichte. m_Q beschreibt den elastischen Schermodulus, welcher ein Maß für die Elastizität des Quarzes ist.

Gleichung 4 ist bei der in dieser Arbeit beschriebenen Blutanalytik mit Vorsicht zu behandeln, denn eine Flüssigkeit heißt Newtonsche Flüssigkeit, wenn die Volumenstromstärke (in der FIA) proportional zur Druckdifferenz Δp ist, d.h. wenn die Viskosität sich mit p nicht ändert. Blut ist nicht „newtonsch“, da sich die Erythrozyten bei höherem Druck in Stromrichtung ausrichten. Damit wird die Viskosität kleiner.

Reichweite der Scherwelle in Flüssigkeit

Durch die hohe Dämpfung eines Quarzes in Flüssigkeit stellt sich auch die Frage, wie weit die erzeugte transversale Scherwelle in die Flüssigkeit reicht (d), denn dadurch wird die Sensitivität in z-Richtung beschrieben [42,43]:

$$d = \sqrt{\frac{h_L}{\rho r_L f_0}} \quad (5)$$

Hierbei ist f_0 die Resonanzfrequenz der Grundschiwingung in Flüssigkeit. Typische Werte von d liegen im Bereich von 200 nm bis 1 μm , je nach Art der Quarzbeschichtung. Damit sind biosensorische Messungen mit QCMs bzw. der Nachweis von Antigen-Antikörperbindungen (weit unterhalb von 1 μm) problemlos in Flüssigkeit durchführbar.

Erweiterte elektronische Eigenschaften in Flüssigkeit

Analog zum Ersatzschaltbild eines an Luft schwingenden Quarzes kann auch ein elektrisches Schaltbild für einen in Flüssigkeit schwingenden, belegten Schwingquarz erstellt werden:

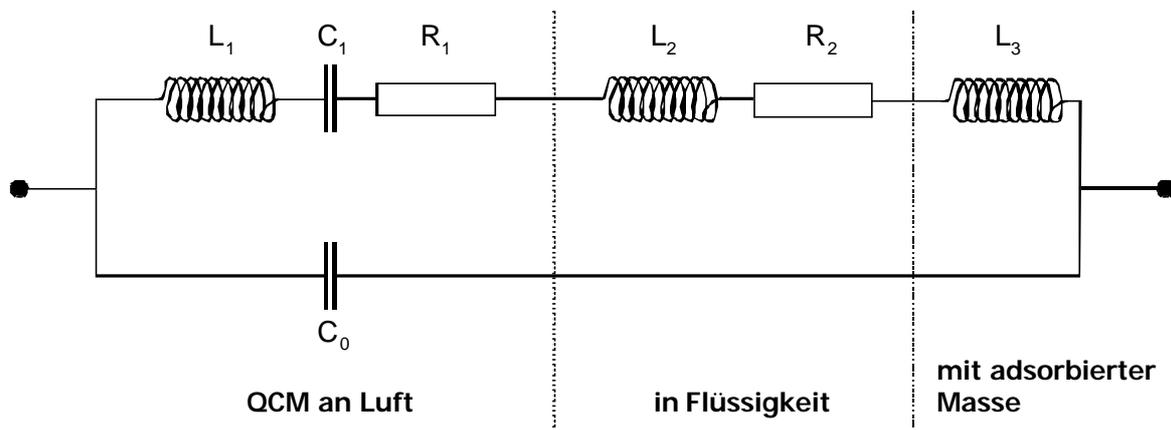


Abb. 2.9: Elektrisches Ersatzschaltbild eines in Flüssigkeit schwingenden, massenbeladenen Quarzes (starre Schicht) [43]

Die Flüssigkeit wird durch die in Serie geschaltete Induktivität L_2 und den Widerstand R_2 beschrieben, während der Einfluss von adsorbierten Massen L_3 beeinflusst. Diese Massen dürfen aber nur starr und nicht zu dick sein, sonst ist die Näherung über die Induktivität L_3 nicht mehr gültig. Da in der Biosensorik v.a. biologische sensitive Schichten verwendet werden, wurde ein weiteres Modell entwickelt, das viskoelastische Schichten besser beschreiben kann (s. Abb. 2.1.10):

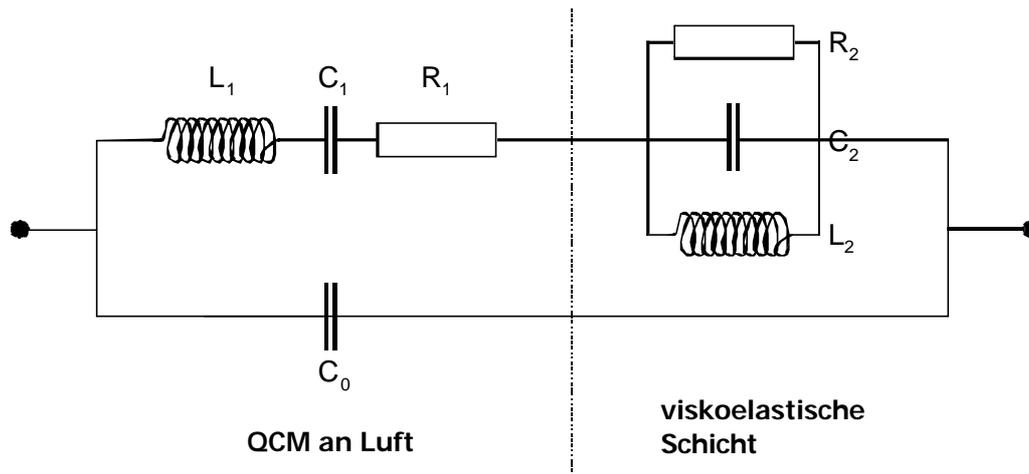


Abb. 2.10: Elektrisches Ersatzschaltbild eines an Luft schwingenden Schwingquarzes, der mit einer nicht-starren Masse belegt ist [46].

Die viskoelastische Massenbelastung verhält sich selbst wie ein gekoppelt schwingendes System und kann durch eine Parallelschaltung von R_2 , C_2 und L_2 beschrieben werden, wobei R_2 der viskosen Dämpfung der Schwingung innerhalb des Adsorbats, C_2 der gespeicherten elastischen Energie und L_2 der gespeicherten kinetischen Energie entspricht. Die Herleitung eines in Flüssigkeit schwingenden Quarzes mit einer viskoelastischen Beschichtung ist ziemlich kompliziert und kann nur mit großem Aufwand als Ersatzschaltbild ausgedrückt werden. Dies macht schon deutlich, dass bei Messung in Flüssigkeiten mit einer wenig rigiden Quarzbeschichtung die Entsprechung $\Delta f \sim \Delta m$ nicht mehr mathematisch exakt beschreibbar ist. Trotzdem gibt es numerische Ansätze, mit der man bei bekannten Parametern der viskoelastischen Schicht näherungsweise eine solche Beziehung berechnen kann. Die gängigsten Theorien sind im nächsten Kapitel zusammengefasst.

2.4 Mathematische Konzepte für QCMs in Flüssigkeiten

In der Gasphase besitzt die von *Sauerbrey* [35] hergeleitete Formel (s. *Gleichung 3*) Gültigkeit, aber auch er hat schon einige Vereinfachungen benutzt. So geht er von unendlich großen Quarzplatten aus, außerdem gilt die Gleichung nur im Vakuum.

Kanazawa et al. [38,39] entwickelten eine entsprechende Beziehung bei Einsatz des Quarzes in Flüssigkeiten (s. *Gleichung 4*). Die Dämpfung der Flüssigkeit führt zu einem veränderten Schwingverhalten des QCMs, bei dem als größte Einflussquellen die

Viskosität und Dichte der Flüssigkeit ausgemacht wurden. Vereinfacht wurde hier allerdings angenommen, dass sich keine zusätzliche Masse auf den Quarzelektroden befindet.

Einen Schwingquarz in Flüssigkeit, der immerhin mit einer starren Schicht belegt sein darf, beschreibt die Gleichung von *Martin et al.* [43]. Die Verifizierung des Modells durch Admittanz-Messungen (Fitting der Frequenzkurven) gelang recht gut. Allerdings können die gemachten Randbedingungen (Newtonsche Flüssigkeit; starre, dünne Schicht; unendlich dünne Elektroden) bei realen Messungen und v.a. in der Biosensorik praktisch nicht eingehalten werden. Man sieht aber schon, dass die Formel recht

komplex wird:

$$\Delta f = \frac{2f_s^2}{N\sqrt{c_{66}}\mathbf{r}_Q} \left[\mathbf{r}_s + \sqrt{\frac{\mathbf{r}_L \mathbf{h}_L}{4\mathbf{p}_s^c}} \right] \quad (6)$$

Shana et al. [44] erweiterten dieses Modell, indem sie feststellten, dass die Elektrodengeometrie einen entscheidenden Einfluss auf den Frequenzverlauf besitzt. Dies geschieht durch eine Wechselwirkung des elektrischen Feldes an den Rändern der Elektrode mit der leitfähigen Flüssigkeit. Sie leiteten folgende Gleichung her, wobei A und A_1 verschiedene Elektrodenflächen sind und H mechanische und elektrische Parameter beinhaltet:

$$\Delta f = f_0 \left[\sqrt{\frac{f_0 \mathbf{r}_L \mathbf{h}_L}{\mathbf{p}_Q c_{66}}} + \frac{AH}{2A_1} \right] \quad (7)$$

Beschichtete Schwingquarze im Kontakt mit einer Newtonschen oder Maxwell'schen Flüssigkeit behandeln die numerischen Näherungen von *Bandey et al.* [45]. Deren Modell beschreibt recht gut, wie man Eigenschaften der Beschichtung wie Dichte, Viskosität und Dicke mit mechanischen und elektrischen Impedanzänderungen des Quarzes korreliert. Da bei viskoelastischen Beschichtungen viele verschiedene Parameter in die totale Impedanz eingehen, wird dem hier Rechnung getragen, indem eine nichtlineare Behandlung der Einzeleffekte zur Gesamtsumme berücksichtigt wird.

2.5 Die Quarzgüte Q

Wie schon im letzten Kapitel behandelt, lässt eine reine Frequenzmessung bei biologisch beschichteten Quarzen nur eine unzureichende Aussage darüber zu, wie viel Masse wirklich auf der Quarzoberfläche gebunden hat. Der entscheidende Grund dafür ist, dass sich beim Eintauchen des Quarzes in die Flüssigkeit nicht nur die Frequenz erniedrigt (Dämpfung, scheinbare Massenzunahme), sondern dass sich auch das gesamte Frequenzspektrum ändert [40,41]. Ist noch eine viskoelastische Masse als sensitive Schicht adsorbiert, kommen noch weitere Effekte wie gekoppelte Schwingungen (s. Kap. 2.3) dazu. Dadurch wird nicht nur die Resonanzfrequenz verschoben, sondern die Frequenzkurve verbreitert sich, wird flacher und f_0 wird immer mehr „verwaschen“, befindet sich nicht mehr auf einem spitzen Kurvenmaximum (s. Abb. 2.11):

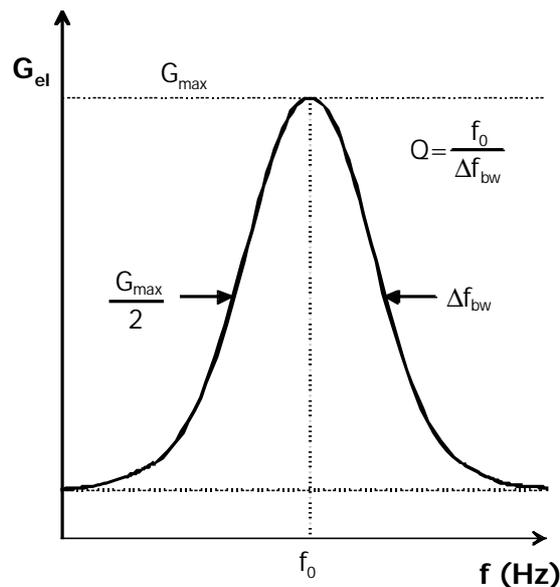


Abb. 2.11: Elektrische Leitfähigkeit G (bzw. Realteil der Admittanz) in Abhängigkeit von der Quarzfrequenz. Die Resonanzfrequenz ist beim Maximum von G , wobei der Q -Faktor von der Schärfe der Kurve abhängt (Halbwertsbreite).

Während sich bei starren Quarzbeladungen nur die Frequenz verschiebt (Sauerbrey), ändert sich bei Quarzen mit viskoelastischer Beschichtung bzw. Quarzen in Flüssigkeit auch die Quarzgüte Q (s. Abb. 2.12) [77]:

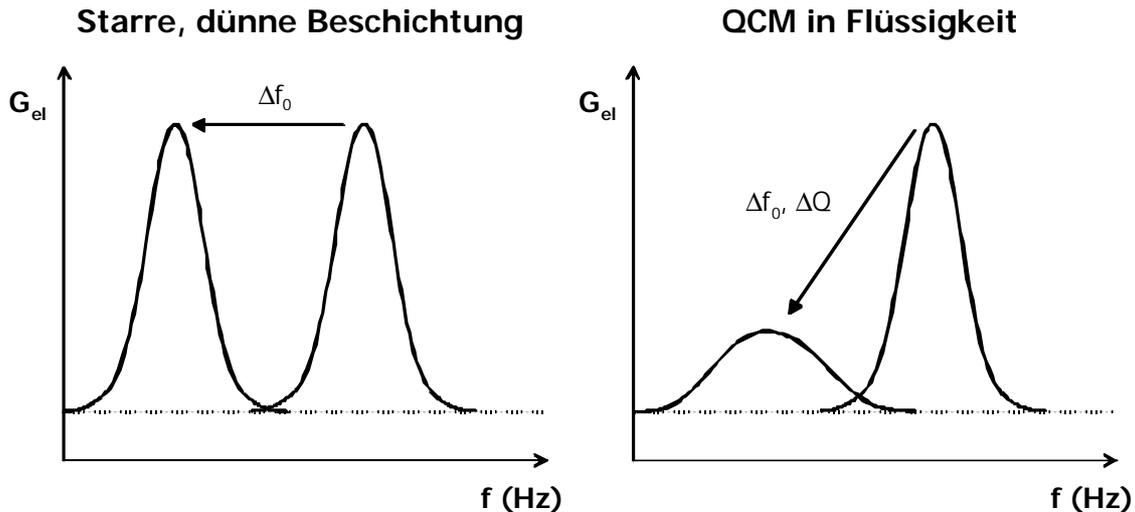


Abb. 2.12: Änderung des Q-Faktors durch viskoelastische Dämpfung

Die Güte Q im Allgemeinen ist ein Qualitätsmerkmal für einen Bandpass. Der Quarz ist auch ein Bandpass mit sehr hoher Güte und kann mit den Bauteilen aus dem elektrischen Ersatzschaltbild berechnet werden:

$$Q = \frac{\omega L_1}{R_1} \quad (8)$$

Eine andere Beschreibung der Quarzgüte erfolgt über energetische Betrachtungen. So wird Q als Verhältnis der im Oszillator gespeicherten Energie E_{in} gegen die innerhalb einer Schwingung abgegebene Energie E_{out} beschrieben [47]:

$$Q = 2\pi \frac{\Delta E_{in}}{\Delta E_{out}} \quad (9)$$

2.6 Einfluss ionenreicher Flüssigkeiten auf die Goldelektrode des Quarzes

Die in dieser Arbeit verwendeten Quarze waren mit Goldelektroden versehen, die gegenüber den industriellen Massenquarzen (Elektroden aus Aluminium oder Silber) den Vorteil haben, dass sie nicht korrosionsanfällig sind und damit nicht „vorgealtert“ werden müssen, um stabile Frequenzen zu zeigen. Gerade bei Messungen in Flüssigkeit ist Gold gut geeignet, da es sich weitgehend inert und chemisch indifferent verhält. Allerdings wird in der Biosensorik viel mit Puffern gearbeitet, die Chloridionen

enthalten (isotonische Kochsalzlösung, PBS). Viele Anwender beachten nicht, dass es gerade durch Chloridionen langfristig zu Veränderungen an der Goldoberfläche kommt (Änderung der Rauigkeit, Korrosionserscheinungen). Auch beeinflusst die Ionenadsorption an Gold die Adsorption (Physi- oder Chemisorption) biologischer Komponenten. Daher soll an dieser Stelle ein kurzer Einschub über die Auswirkungen von Chloridionen an Gold gegeben werden:

Zur Simulation der Adsorption hydratisierter Halogenidionen (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) auf geladenen Metalloberflächen benutzten Glosli und Philpott [48] ein Modellsystem mit 214 Wassermolekülen und zwei Ionen (Li^+ und X^-) in einem Kasten der Kantenlänge 2.362 nm. Die Ladungen an den Kastenwänden betrug $\pm 0.11 \text{ e/nm}^2$, welches einem elektrischem Feld von $2 \cdot 10^7 \text{ V/cm}$ entspricht. Die Rechnungen wurden mit dem Stillinger ST2 Wassermodell [49] bei $T=290 \text{ K}$ durchgeführt, indem die Parameter auf das Vorhandensein von Alkalihalogeniden angepasst wurden. Während bei dem vorgegebenen Feld Li^+ und F^- zu jeder Zeit vollständig solvatisiert blieben, bevorzugten Br^- und I^- die Adsorption am Metall (Kontakt); Cl^- zeigte ein Verhalten, das zwischen diesen beiden Grenzfällen liegt: Teilweise blieben diese Ionen vollständig hydratisiert in Lösung, teilweise physisorbierten sie jedoch direkt am Metall, ohne dass Wassermoleküle zwischen Cl^- und Metall zu finden waren. Diesen Sachverhalt stellen folgende Skizzen (s. Abb. 2.13) grafisch dar:

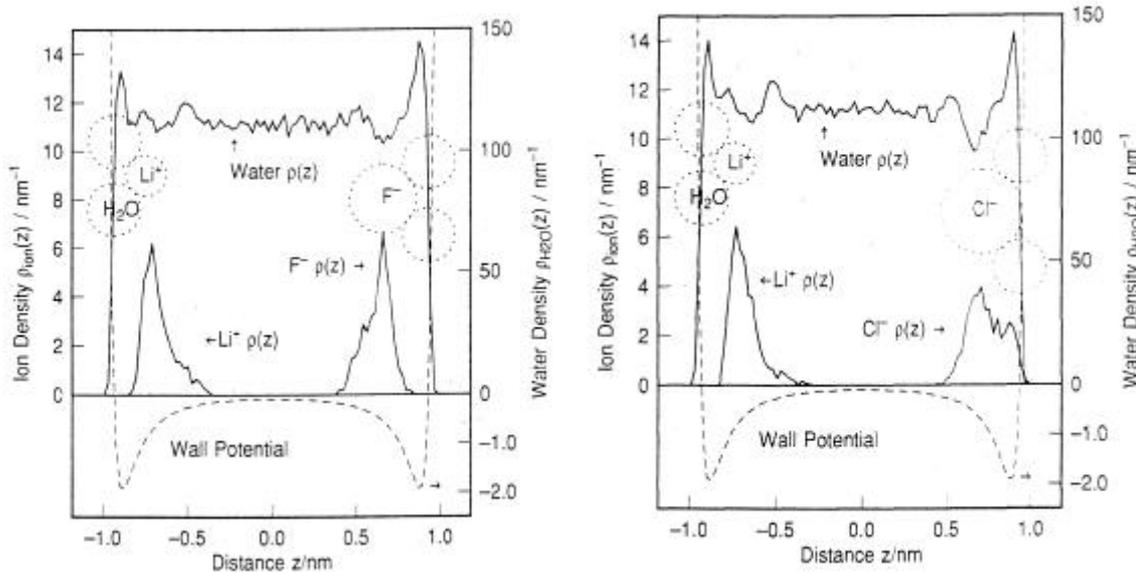


Abb. 2.13: Simulation von Halogenidadsorption auf geladenen Metalloberflächen (links F^- , rechtes Diagramm Cl^-) [49]

Wie man erkennen kann, berührt das Chloridion (Lennard-Jones-Radius) in der Simulation gerade die Metalloberfläche (rechts, Kastenwand).

Diesen Rechnungen stehen weitere Untersuchungen anderer Autoren gegenüber, die eine Chemisorption von Chlorid auf Au(111)-Oberflächen feststellen [52]. Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Metallen (Gold, Silber, Quecksilber) v.a. mittels Cyclovoltammetrie durchgeführt und belegen, dass Chlorid an Gold deutlich besser adsorbiert (chemisorbiert) als an Silber oder Quecksilber.

Andere Autoren wie Shi und Lipkowski [50] beobachten eine Umordnung der Chloridadsorptionsschicht bei verschiedenen Elektrodenpotentialen und verweisen auf die damit übereinstimmenden Röntgenstrukturanalysen von Magnussen et al. [51]. Außerdem berichten sie, dass schon ab 0 V/SCE Chlorid auf Goldelektroden adsorbiert.

Inwieweit man diese Ergebnisse auf die verwendeten Quarzelektroden mit 10 MHz Wechselspannung (± 2.5 V) übertragen kann, muss noch genauer untersucht werden; es erscheint jedoch als wahrscheinlich, dass sich Anionen je nach Ionensorte auf Goldoberflächen anlagern können oder dass zumindest Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Elektrode und Ionen nicht mehr vernachlässigbar sind.

2.7 Eigenschaften und Zusammensetzung von Blut

In den folgenden Kapiteln sollen grundlegende Eigenschaften von Blut und dessen Komponenten beschrieben werden, weil in dieser Arbeit hauptsächlich Blut oder Komponenten davon als Analyt und als sensitive Beschichtung verwendet wurden.

Das Blut eines Menschen macht etwa 8 Prozent des Körpergewichtes aus, das entspricht zwischen 5 und 6 Litern einer Substanz, die zu 55 Prozent aus Plasma, der flüssigen Komponente besteht, während sich der Rest aus verschiedenartigen Zellen zusammensetzt (s. *Tab. 2.1* und *Abb. 2.14*) [53,60].

Blutplasma (55%)	
Albumine	60-80 %
Globuline	20-40 %
Fibrinogen	4 %
Korpuskuläre Bestandteile (45 %)	
Erythrozyten	$5-6 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$
Leukozyten	5000 – 10.000 / μl
Thrombozyten	250.000 – 400.000 / μl

Tab. 2.1: Zusammensetzung des menschlichen Blutes.

Außerhalb des Körpers gerinnt Blut; hauptsächlich sind dafür das Fibrinogen und die Gerinnungsfaktoren II, V und VIII verantwortlich [55]. Fibrinogen ist ein Eiweiß des Blutplasmas mit hohem Molekulargewicht. Durch Zugabe von Natriumcitrat, -oxalat oder EDTA lässt sich die Gerinnung außerhalb des menschlichen Körpers verhindern. Der Hauptgrund dafür ist das Abfangen von Ca^{2+} -Ionen, die bei einigen Mechanismen der Gerinnungskette benötigt werden. Daher empfiehlt es sich, Blutmessungen in einer FIA mit EDTA-Puffer durchzuführen.

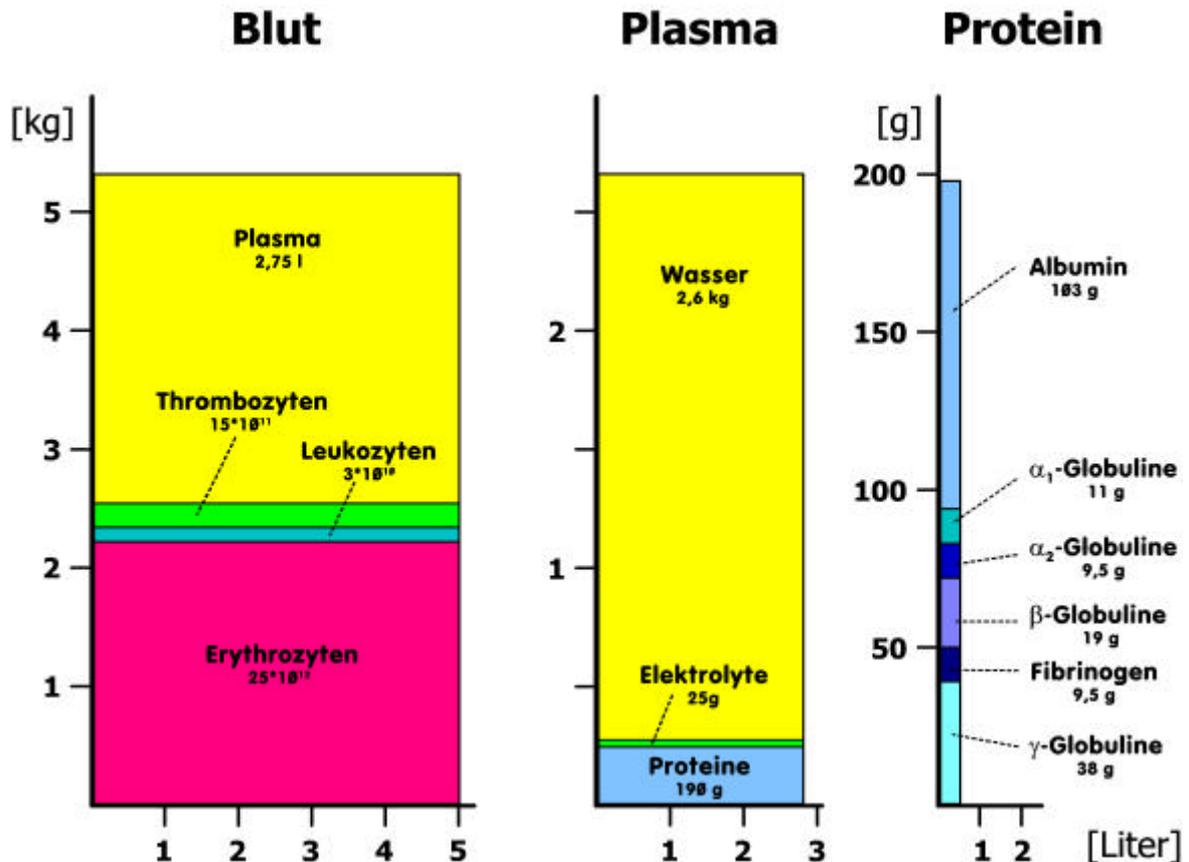


Abb. 2.14: Quantitative Zusammensetzung des menschlichen Blutes (links), des darin enthaltenen Plasmas (Mitte) sowie der Plasmaproteine (rechts) [53]

Einige Eigenschaften der korpuskulären Blutbestandteile sollen im Folgenden beschrieben werden [54,55]:

Erythrozyten (rote Blutkörperchen)

Erythrozyten sind kernlose, bikonkave Scheiben („Diskozyten“) mit einem Durchmesser von ca. 7-8 μm und einer Dicke von ca. 2 μm . Sie entstehen hauptsächlich im roten Knochenmark und besitzen eine Lebensdauer von 120 Tagen. Die Hauptaufgabe im Körper liegt in der Sauerstoffversorgung: Jeder Erythrozyt enthält ca. 270 Mio. Hämoglobinmoleküle, welche molekular Sauerstoff und CO_2 binden und auch wieder abgeben können. Die Hämoglobinkonzentration beim Menschen beträgt ca. 150 g/l. Das Molekül selbst besteht aus vier Polypeptidketten mit je einer Farbstoffgruppe, dem Häm (MW=64.500), welches eine Protoporphyrinstruktur aufweist.

Die sehr flexible Zellmembran trägt unter anderem auch die Antigene für die Hauptblutgruppen (ABO). Ändert sich die osmotische Umgebung, so kann ein Erythrozyt seine Form verändern. In hyperosmolalem Medium nimmt er eine Stechapfelform an, bei hypoosmolalen Verhältnissen schwillt er zur Kugelform an und platzt im Extremfall auf („Hämolyse“ unterhalb von 180 mosm/l). Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn man Erythrozyten in destilliertes Wasser gibt. Sie platzen auf und die Lösung färbt sich durch das Hämoglobin schnell gleichmäßig rot, während die ehemaligen Zellmembranen als „Ghosts“ übrigbleiben [67].

Leukozyten (weiße Blutkörperchen)

Leukozyten sind in der Regel farblose Zellen, die amöboide Bewegungen ausführen können und etwas größer sind als die Erythrozyten. Sie sind integraler Bestandteil der Immunabwehr und erledigen als Gedächtniszellen Aufgaben wie die Eliminierung von Bakterien und Viren oder regen die Bildung von Antikörpern an. Der Ausdruck „Leukozyt“ ist ein Sammelbegriff für folgende Zellen: Monozyten, Lymphozyten und verschiedene Granulozyten. Die Unterscheidung der einzelnen Granulozyten-Arten erfolgt durch Anfärben und anschließender Betrachtung unter dem Mikroskop (Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten).

Thrombozyten (Blutplättchen)

Die Thrombozyten sind unregelmäßige zytoplasmatische Fragmente mit einer Länge von ca. 2 µm. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung und besitzen eine Lebensdauer von 7-10 Tagen.

Auf untenstehendem Bild sind alle drei Zellarten abgebildet. Zentrifugiert man Blut, so erhält man als Überstand das Blutplasma. Im Blutplasma sind u.a. auch die Antikörper, die im nächsten Kapitel behandelt werden. Das Blut*plasma* enthält im Gegensatz zum Blut*serum* noch Fibrinogen.

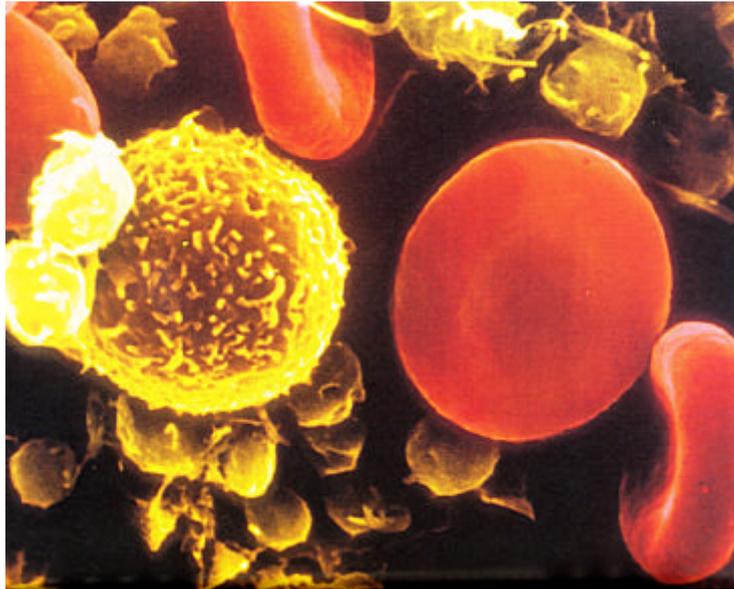


Abb. 2.15: Leukozyt, Erythrozyten, Thrombozyten (aus „Blut – Von der Magie zur Wissenschaft“, Spektrum Verlag Heidelberg 1996)

2.8 Die Erythrozytenmembran

Die Zellmembran der Erythrozyten besteht aus einer doppelten Schicht von Phospholipiden, wobei eingelagerte Cholesterinmoleküle die Doppelschicht stabilisieren. Verschiedenartige Glykolipide (Lipide mit Kohlenhydratseitenketten) wie auch kugelförmige Glykoproteine ragen aus der äußeren Schicht hervor – auf ihnen sind die Hauptblutgruppenantigene (A, B, H) lokalisiert [60,61]. Beim Rhesussystem (D) befinden sich die Antigene jedoch in der Membran selbst, was die sterische Zugänglichkeit erschwert.

Einige der (erythrozytären) Blutgruppenantigene kommen auch auf Thrombo- und Leukozyten vor, allerdings in reduzierter Zahl. Letztere besitzen jeweils einen Satz an eigenen spezifischen Antigenen. Das ist auch ein Grund, warum nach der Blutspende das Blut in diese drei Komponenten aufgetrennt und separat voneinander gelagert wird.

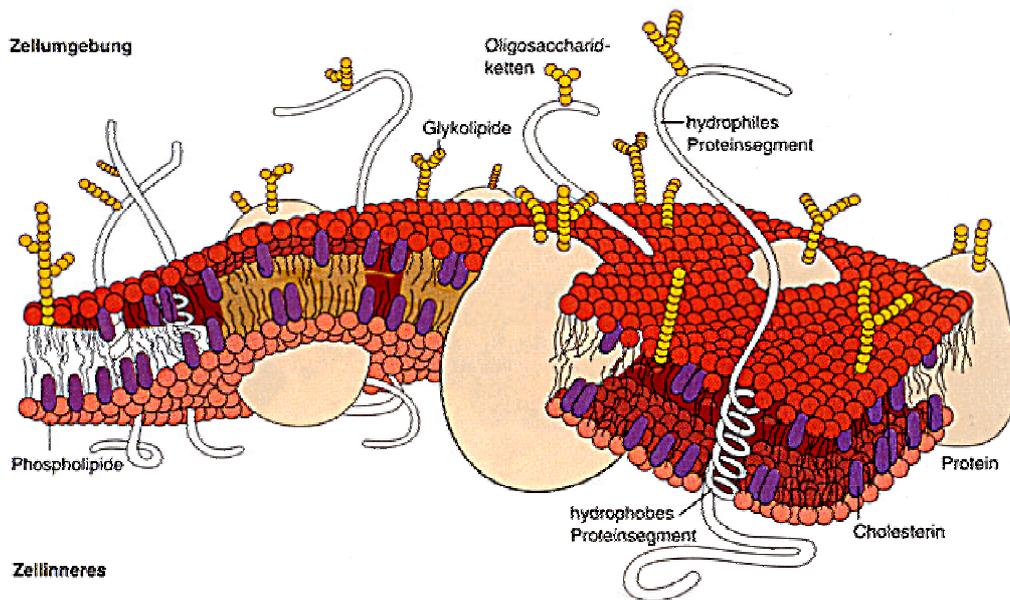


Abb. 2.16: Ausschnitt aus der Zellmembran eines Erythrozyten (aus „Blut – Von der Magie zur Wissenschaft“, Spektrum Verlag Heidelberg 1996)

Die Blutgruppen spielen eine große Rolle bei Bluttransfusionen. So darf nur Blut derselben Blutgruppe oder Blut einer kompatiblen Gruppe transfundiert werden, da es sonst zur Agglutination (Verklumpung) oder Hämolyse (Aufplatzen der Erythrozytenmembran) kommen kann. Besitzt ein Mensch Blutgruppe A, so hat er automatisch Antikörper gegen Blutgruppe B in seinem Serum und umgekehrt. Tabelle 2.2 zeigt die Zusammenhänge zwischen Blutgruppe und dazugehörigen Antikörpern im AB0-System auf [60].

Blutgruppe	A	B	AB	0
Antigene auf Erythrozyten	A	B	A und B	H, weder A noch B
Antikörper im Blut	anti-B	anti-A	weder anti-A noch anti-B	anti-A und anti-B
Kann Blut empfangen von	A und 0	B und 0	A, B, AB und 0	0
Kann Blut spenden an	A und AB	B und AB	AB	A, B, AB und 0

Tab. 2.2: AB0-Blutgruppen und ihre Bedeutung für die Bluttransfusion

2.9 Immunglobuline

Immunglobuline (Ig) oder Antikörper werden von B-Lymphozyten produziert und reagieren spezifisch mit ihrem korrespondierenden Antigen. Sie machen ca. 20 % des im Blutserum enthaltenen Plasmaproteins aus und werden aufgrund ihrer Wanderung im elektrischen Feld auch als γ -Globuline bezeichnet [54,57].

Antikörper sind bifunktionelle Moleküle, die im wesentlichen zwei Aufgaben zu erfüllen haben: Einerseits die Antikörpererkennung und andererseits die Interaktion mit Effektormolekülen und -zellen, damit die gebundenen Antigene auch wirksam eliminiert werden können. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, bestehen die Immunglobuline aus einem variablen Teil (Fab-Fragment), der je nach Antikörperspezifität verschieden ist, und einem konstanten Teil (Fc-Fragment), der die Effektormechanismen auslöst.

Die verschiedenen Antikörperklassen und Subklassen, die gemeinsam als Isotypen bezeichnet werden, sind Glykoproteine, die alle dieselbe Grundstruktur aufweisen (s. Abb. 2.17 und Abb. 2.18) [59].

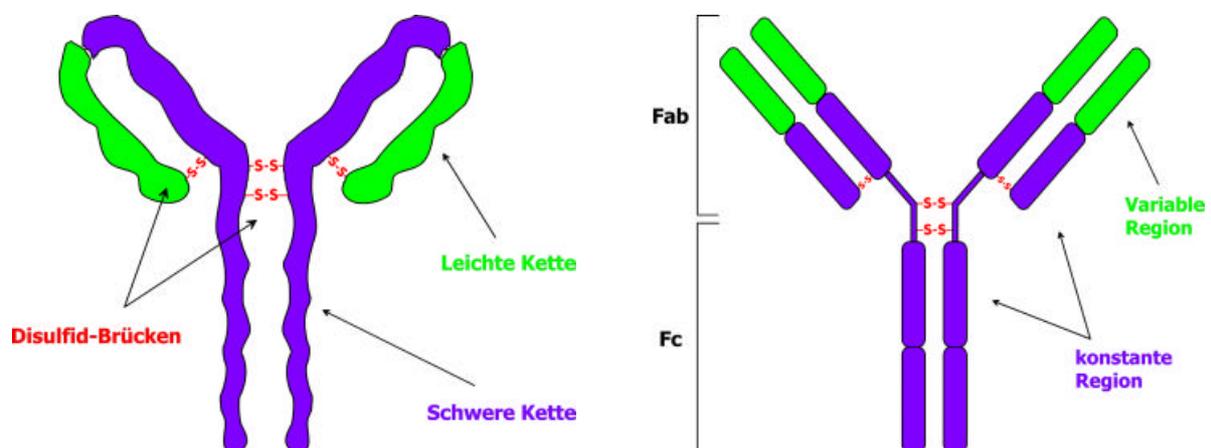


Abb. 2.17: Grundstruktur der Immunglobuline. Leichte und schwere Ketten sind links dargestellt, konstante und variable Region rechts (schematisch)

Diese wird von vier Ketten gebildet, zwei schweren Ketten (H-Ketten, 50-70 kDa) und zwei leichten Ketten (L-Ketten, 25 kDa), also $(H_2L_2)_n$, wobei n zwischen den Immunglobulinklassen variiert. Die H- und L-Ketten werden durch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken und Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert.

Beim Menschen unterscheidet man 5 Klassen von Immunglobulinen: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA, wobei man die zugehörigen H-Ketten entsprechend als μ , δ , γ , ϵ und α bezeichnet [54]. Wie aus *Tab. 2.3* ersichtlich, ist IgG die mit Abstand häufigste Immunglobulinklasse im menschlichen Blut (75 % des Gesamtimmunglobulins); es spielt als Standardantikörper der sekundären Immunantwort eine entscheidende Rolle.

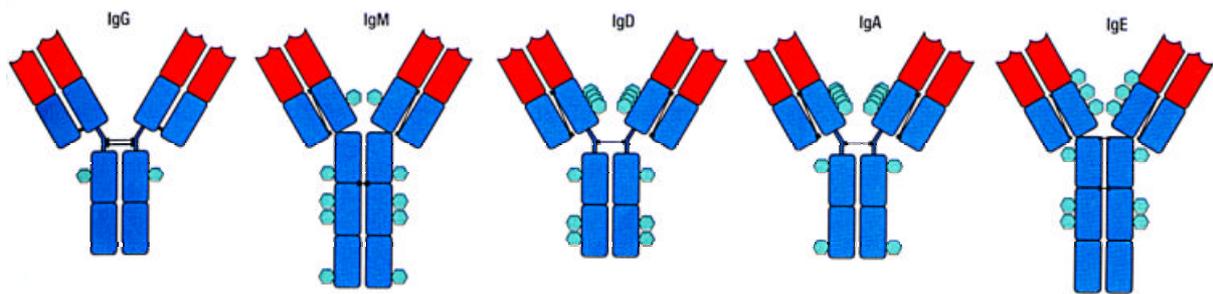


Abb. 2.18: Unterschiedliche schwere Ketten g , m , d , g , a und e (von links) bei Immunglobulinen

Immunglobulin G ist die einzige Ig-Klasse, welche durch die Plazenta transportiert wird und dadurch einen wichtigen immunologischen Schutz für den Embryo bzw. das Neugeborene darstellt. Man unterscheidet innerhalb der Immunglobuline G vier verschiedene Unterklassen IgG1-IgG4 mit verschiedenen schweren Ketten γ_1 bis γ_4 in veränderlicher Konzentration im Serum, wobei die Effizienz des Plazentatransfers nicht für alle Klassen gleich ist (IgG2 wird langsamer transferiert). Zuständig sind die IgGs v.a. für das Aufspüren (Markieren) von Krankheitserregern durch Andocken ihres Fab-Fragmentes, wobei das Fc-Fragment danach z.B. an Makrophagen oder auch Killer-Zellen binden kann und somit der Krankheitserreger eliminiert wird (Antikörper der sekundären Immunantwort).

Immunglobuline M werden als Antikörper der primären Immunantwort schnell gebildet und sind daher bei Virusinfektionen ein Indiz für eine Erstinfektion. IgM können nicht mit Leukozyten direkt kooperieren, können jedoch sehr effizient die Komplementkaskade des Serums aktivieren. IgMs sind Pentamere und besitzen durch die 10 Antigenbindungsstellen eine hohe Avidität (=Bindungsstärke zu Antigenen).

Immunglobulin A kann monomer, dimer oder trimer auftreten und kommt vor allem im Speichel, in Tränen, Intestinalsekreten oder auf Schleimhäuten vor. Hier bildet es eine erste Barriere gegen Infektionen.

Die Funktion von **Immunglobulin D** ist bislang noch nicht vollständig bekannt. Es spielt in der B-Zell-Entwicklung eine Rolle und kommt nur geringfügig als Monomer im Plasma vor.

Das in geringster Konzentration monomer im Serum vorkommende Immunglobulin ist das **IgE**. Es ist an basophile Granulozyten (eine Leukozytenart) und an Mastzellen gebunden und spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten. Allerdings spielt es auch im Zusammenhang mit allergischen Überreaktionen wie Heuschnupfen eine Rolle.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
schwere Kette	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α	α	δ	ϵ
Molekulargewicht (kD)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serumspiegel (mg/ml)	9	3	1	0.5	1.5	3	0.5	0.03	$5 \cdot 10^{-5}$
Halbwertszeit im Serum (d)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Form im Serum	monomer				penta mer	monomer/ dimer/trimer		mono mer	mono mer

Tab. 2.3: Die verschiedenen Immunglobulin-Isotypen im Überblick [57]

2.9.1 Polyklonale und monoklonale Antikörper

In der Natur vorkommende Antikörper z.B. gegen das Blutgruppe A-Antigen bestehen nicht aus einer einzigen Molekülsorte. Untersucht man die [A-Erythrozyt]---[Anti-A]-Bindungen, so kann man eine große Bandbreite von Bindungsaffinitäten erkennen. Dies liegt daran, dass Antikörper mit gemeinsamer Spezifität normalerweise heterogen sind, weil sie von vielen verschiedenen antikörperproduzierenden Zellen (Klonen) erzeugt werden. Sie werden dementsprechend als polyklonale Antikörper bezeichnet.

Dies kann für die Analytik ein großes Problem sein, da jedes Individuum ein anderes Spektrum von Antikörpern auch innerhalb einer Spezifität produziert.

Einen Ausweg hieraus bildet die von Köhler 1975 entwickelte Hybridomatechnik [56]. Dabei wird eine Maus mit dem entsprechenden Antigen immunisiert und nach einigen Wochen ihre Milz entnommen. Daraus erhaltene Lymphozyten und Plasmazellen fusioniert man *in vitro* mit Myelomzellen (Krebszellen). Hybridomzellen, die sowohl Antikörper produzieren als auch das autonome Wachstum der Myelomzelllinie besitzen, werden angezüchtet und nach einiger Zeit selektiert. Man sucht sich die Zellen heraus, welche die gewünschte Spezifität gegen das anfangs gespritzte Antigen zeigen und isoliert sie. Diese nur von einem Klon abstammenden Zellen werden anschließend in einem Kulturmedium angezüchtet und produzieren monoklonale Antikörper.

Im Handel erhältlich sind monoklonale Antikörper nicht nur als Mausantikörper, sondern man erhält auch Antikörper menschlichen Ursprungs (human) oder von einer Ziege, Schaf, Kaninchen usw.

In dieser Arbeit wurden humane und Maus-Immunglobuline IgG und IgM verwendet, daher soll in den folgenden beiden Kapiteln kurz auf die sterischen Verhältnisse eingegangen werden, da diese sich in der Analytik auswirken.

2.9.2 Immunglobulin G

Die IgGs liegen im Serum als Y-förmige Moleküle mit einer Masse von 150 kD vor. Die Scharniere der beiden F_{ab} -Ketten erlauben eine Beweglichkeit von ca. 30° gegenüber dem F_c -Fragment (s. *Abb. 2.19*).

Hat ein IgG gebunden, so liegt es in der T-Form vor und besitzt eine Spannweite von 14 nm. Ältere Arbeiten gingen von 24 nm aus, was sich aber als falsch herausstellte [58]. Die Höhe eines solchen IgGs wird mit 8.5 nm beziffert.

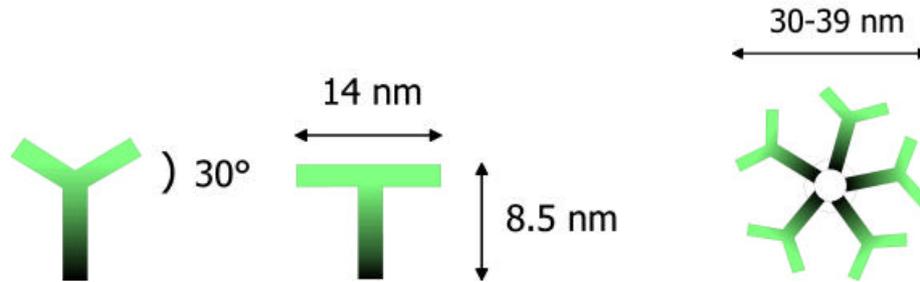


Abb. 2.19: Dimensionen von IgG- (links) und IgM-Antikörpern (rechts, nicht maßstabsgerecht)

2.9.3 Immunglobulin M

IgMs sind Pentamere, die F_{ab} -Fragmente sind kreisförmig angeordnet. Das gesamte Molekül hat einen Durchmesser von 30-39 nm (s. Abb. 2.19). Die Antigen-Antikörperbindung ist schwächer als bei IgGs; durch die fünffache Zahl an Epitopen ist aber eine multiple Bindung möglich – auch Quervernetzungen sind deutlich begünstigt.

2.10 Protein A und Protein G

Protein A wird extrazellulär an der Außenseite der Zellmembran von *Staphylococcus aureus* (ein Bakterium, das im Rinderdünndarm vorkommt) gebildet [62]. Das Polypeptid-Einzelstrangprotein mit dem Molekulargewicht von 42 kD kann IgG-Antikörper am Fc-Fragment binden und wird oft zur Isolierung oder Aufreinigung von Antikörperlösungen oder Kulturrückständen verwendet. Die Bindung wird recht schnell realisiert, nur in einigen Fällen können 30 Minuten bis zur vollständigen Bindung vergehen. Durch die ausschließliche Bindung am Fc-Fragment bleiben beide Fab-Fragmente frei und sind für eine spezifische Antigenerkennung verfügbar. Starke Bindungen werden ausgebildet bei IgG-Antikörpern von Meerschweinchen, Kaninchen und vom Menschen, schwächere Bindungen kommen bei Rinder- und Maus-IgGs sowie menschlichen IgAs, IgEs und IgMs vor.

Protein G wird von Streptokokken gebildet [63] und bindet mit seinen 2 Andockstellen im Gegensatz zu Protein A spezifisch IgGs, während IgA, IgM und IgE nicht gebunden wird. Damit wäre es noch geeigneter in der Analytik als Protein A, ist aber teurer und besitzt keine so starke Affinität zu Gold wie Protein A (10^8 M^{-1} , van-der-Waals-Kräfte). Durch die gute Bindung an Gold kann Protein A effektiv und dauerhaft an

Goldelektroden eines Sensors gekoppelt werden und richtet dabei die Antikörper sterisch günstig aus.

2.11 Konventionelle Blutanalytik-Methoden

Allein in der Transfusionsmedizin der Uniklinik Tübingen werden jährlich mehr als 40.000 Blutuntersuchungen durchgeführt. Dabei gibt es 4 Standardverfahren, mit denen die Labors arbeiten [64]:

- Mikrotiterplatte
- Tüpfelplatte
- Röhrenmethode
- Gelzentrifugation

Bei der **Mikrotiterplatte** werden vorgefertigte, mit Antikörpern beschichtete 96-well-Mikrotiterplatten benutzt, mit Blutproben gefüllt, inkubiert und anschließend optisch ausgelesen.



Abb. 2.20: Gefüllte Mikrotiterplatte (links), Pipettierautomat zur Befüllung der Platten (Mitte), automatischer optischer Ausleser der inkubierten Platten (rechts)

Die Funktionsweise ist recht einfach: Eine Agglutination wird optisch detektiert. Vorteil ist der hohe Parallelisierungsgrad, schlecht hingegen ist die Tatsache, dass der Zeitbedarf einer kompletten Messung zwischen 45 und 60 Minuten liegt und es sich erst ab 6 Blutproben lohnt, die Geräte zu benutzen.

Die **Tüpfelplatten-Methode** ist die klassische Methode von Hand. Auf einer Plastikplatte mit Mulden wird die Blutprobe direkt mit Antikörperlösung versetzt und

abgewartet, ob sich eine Agglutination zeigt (s. *Abb. 2.21 links*). Die Methode ist schnell (5 Minuten), kann aber nicht parallelisiert werden und ist sehr arbeitsintensiv. Ähnliches gilt für die zweite klassische Methode, die **Röhrchen-Methode**. Hier wird der Reaktionsansatz im Röhrchen inkubiert, zentrifugiert und abgelesen.

Bei der **Gelzentrifugations-Methode** werden kleine Karten benutzt. Diese besitzen 6 kleine Röhren, in denen ein Gel eingearbeitet ist, welches mit Antikörpern versetzt wurde (s. *Abb. 2.21 rechts*). Die Blutprobe wird oben auf das Gel gegeben, inkubiert und zentrifugiert. Bei einer spezifischen Bindung können die durch Antikörper agglutinierten Erythrozyten nicht ungehindert durch das Gel nach unten wandern und bleiben im Gel hängen, während die Erys bei negativer Reaktion sauber pelletiert werden. Die Vorteile der Methode liegen im geringen Analytbedarf, die Nachteile in der Analysezeit (25-30 Minuten) und der geringen Parallelisierbarkeit.

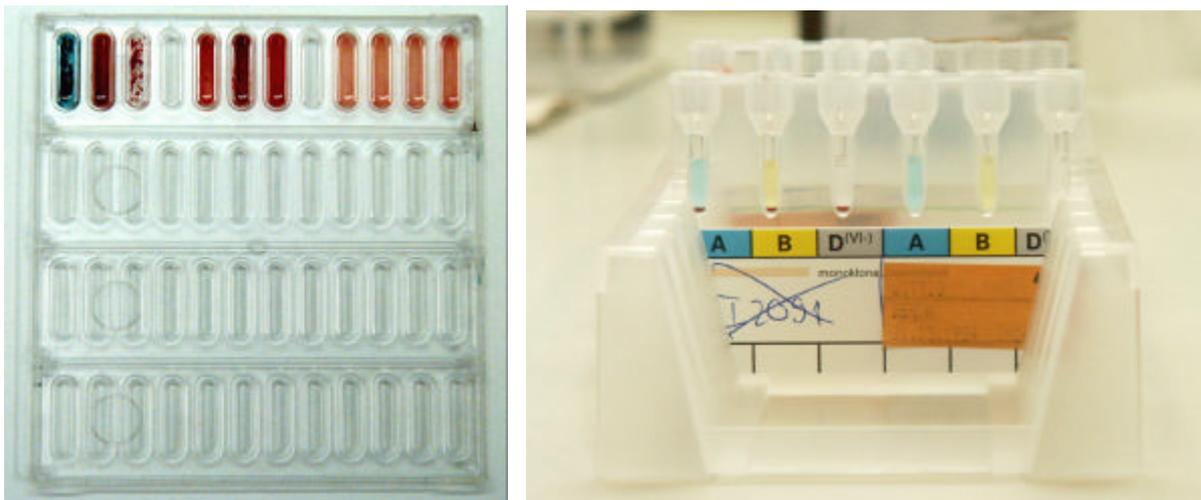


Abb. 2.21: Teilweise befüllte Tüpfelplatte (Bioplate, links), Gel-Kärtchen nach der Zentrifugation (Diamed, rechts)

Daran lassen sich auch die Anforderungen an ein modernes Blutanalysesystem ablesen. Es muss sicher, schnell, günstig, parallelisierbar und vielseitig sein.

3 Experimentelles

3.1 Chemikalien und Materialien

3.1.1 Chemikalien für die Quarzbelegung, Analyte

Für die Quarzbelegung wurden folgende Chemikalien verwendet:

Thiolbeschichtung: 11-Mercaptoundecansäure 95%; 3-Mercaptopropionsäure; 16-Mercaptohexadecansäure (M580-1; 44,830-3; 45,056-1, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen).

Kopplungsreagenzien für Thiolbeschichtung: N-Hydroxysuccinimid [NHS]; N'-(3-Dimethylaminopropyl)N-ethylcarbodiimid Methojodid 98% (13,067-2; 16,534-4, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen).

Protein A-Beschichtung: Protein A, 1 mg, lyophilisiert, salzfrei (P3838, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen; 150052; 150050; 153891 ICN Biomedicals GmbH, Eschwege).

Protein G-Beschichtung: Protein G, Recombinant, E.coli, 1 mg (539303, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach)

Blockierung der Oberfläche: Albumin, Bovine [BSA] (A7638, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen); Polyethylenglycol [PEG] 200, 400, 1000, 4000 (8.17001.1000; 8.07485.1000; 8.17006.1000; 8.17009.1000 Merck GmbH, Darmstadt).

Puffer: Der Fluss- und Belegungspuffer bestand aus: Natriumchlorid [NaCl] 99.5% für die Molekularbiologie; Tris(hydroxymethyl)-aminomethan [TRIS] 99.8% p.a.; Ethylendinitrilotetraessigsäure [EDTA] 99.0% für die Molekularbiologie; NaOH rein (1.01540.0500; 1.08382.0500; 1.12029.0100; 007 C754962 Merck GmbH, Darmstadt).

Zum Ansatz von PBS: Kaliumchlorid [KCl] 99.5%; Kaliumdihydrogenphosphat 99.5%; di-Natriumhydrogenphosphat 99% (60125; 60218; 71643 Fluka Chemie AG, Neu-Ulm).

Außerdem wurden als Tenside folgende Chemikalien verwendet: Tween 20; 40; 80; Triton X-100 (93773 Fluka Chemie AG, Neu-Ulm; 8.22185.0500; 8.17061.1000; 1.12298.0101 Merck GmbH, Darmstadt).

Weiterhin wurde selbsthergestelltes bidestilliertes Wasser und destilliertes Wasser „aqua ad iniectabilia Delta-Pharma“ (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) verwendet.

Antikörper: Die Firma Biotest AG (Dreieich) stellte freundlicherweise den monoklonalen Anti-A-Antikörper BS-66 (Maus-IgG3, 33 µg/ml, in RPMI ohne Phenolrot + 8% FCS + 0.1% NaN₃) und die monoklonalen Anti-D-Antikörper BS 221, BS 227, BS 228, BS 229 und BS 231 (human-IgG1 in RPMI + 8% FCS + 0.1% NaN₃, Konzentration unbekannt) zur Verfügung.

Weiterhin wurden die Biotest-Produkte „Seraclone Anti-D“ (BS232 und BS226, monoklonale human-IgM) und folgende Produkte der Fa. Immucor GmbH, Rödermark: „immuclone Anti-B“ (monoklonal ES4), „immuclone Anti-A“ (monoklonal Birma-I) und „immuclone Anti-D rapid“ (human IgM, monoklonal RUM-1).

Antikörper für die Sandwich-Beschichtung: Von der Firma Dianova GmbH (Hamburg) wurden folgende Antikörper (alles IgGs) des Herstellers „Jackson ImmunoResearch“ (West Grove, USA) bezogen: anti-human-IgG-Fc [Kaninchen]; anti-human-IgG-Fc min X [Maus]; anti-human-IgM Fc min X [Kaninchen]; anti-Maus-IgG-Fc min X [Kaninchen]; anti-Maus-IgM-Fc min X [Kaninchen] (309-005-008; 209-005-098; 309-005-095; 315-005-046; 315-005-049).

Analyte: gereinigte Erythrozytensuspension (Blutgruppe A und 0, jeweils ca. $1 \cdot 10^9$ /ml) und Vollblut wurde vom Kooperationspartner Dr. Christof Weinstock bzw. Prof. Dr. Hinnak Northoff, Transfusionsmedizin der Uniklinik Tübingen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Erythrozytensuspension wurde durch dreimaliges Zentrifugieren und Waschen mit PBS (pH=7.4) und anschließendem Verdünnen in PBS hergestellt. Tiefgefrorenes Humanserum B [HSB] und fetales Kälberserum [FCS] wurden ebenfalls von der Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt.

Vorbereitung der Erythrozyten: Modifiziertes Bromelin „ID-Diluent 1“ (DiaMed AG, Bensheim)

Regeneration der Quarze: NaOH rein, Plätzchen (C754962 Merck GmbH, Darmstadt).

Reinigung der Quarze: Ethanol absolut (1.00983.1000, Merck GmbH Darmstadt), als Druckgas zum Trockenblasen und Grobreinigen wurde Argon 4.8 der Firma Messer-Griesheim, Krefeld verwendet. „Piranha“ wurde aus 3 Teilen konzentrierter Schwefelsäure (98%) und einem Teil wässriger Wasserstoffperoxidlösung (30%) hergestellt.

Reinigung der FIA: Natriumhypochlorit, wässr. Lösung 4% (23.930-5, , Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen).

3.1.2 Zubehör zur Quarztechnik

Quarze: Die Quarze wurden von Vectron International (KVG), Neckarbischofsheim bezogen, mit den folgenden Spezifikationen: Polierte Quarzscheiben ohne Facette, AT-Schnitt, Durchmesser 8,5 mm, Frequenz 10 MHz, mit Goldelektrode (100nm) auf Chrom Haftschrift (Durchmesser 5 mm), XA1600; Kontaktfähnchenwinkel 180°.

Kontaktierung der Schwingquarze: Leitsilber G302 (Plano GmbH, Wetzlar).

Geräte zur Quarztechnik: Zur Frequenzmessung wurde der Frequenzzähler HP 53132A, zur Messung von Impedanzkurven die Impedanz-/Spektrumanalysatoren HP4192 bzw. HP4195A, beide von Hewlett Packard, verwendet. Die Quarze wurden von SMD-Oszillatorschaltungen (Hauptmann-Typ) angesteuert, die von Dr. Gerd Nötzel entworfen und von Dr. Michael Kaspar (beide AK Prof. Göpel/Ziegler, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Tübingen) weiterentwickelt wurden.

Computersteuerung: Das Auslesen des Frequenzzählers wurde mit einer IEEE-ISA-Steckkarte vom Typ HP-IB 82340 (Hewlett Packard) realisiert und die Ansteuerung der Ventile geschah mit einer Digital I/O-Karte ME-1400A PCI mit Timer von Meilhaus

Electronic, Puchheim. Die gesamte Ansteuerung der Geräte erfolgte durch ein selbstgeschriebenes Programm unter MS-Windows 95 innerhalb der Laborentwicklungssoftware HP-VEE 4.0 (ehemals Hewlett-Packard, nun Agilent, Palo Alto, USA bzw. Böblingen).

3.1.3 Bauteile der FIA

Ventile: Es wurden 2 Ventile der Firma Valco Instruments Co. Inc. (Houston, USA) mit elektronischer Steuereinheit verwendet. Für die Probeninjektion war ein 2-Wegeventil mit 6 Ports zuständig (C2-2006EH cheminert, 1/16" ZDV, 0.25 mm), die Auswahl der Proben übernahm ein 8-Wege Probengeberventil des Typs C5-2008EMT cheminert, 1/16", 0.25 mm, beide aus Edelstahl und von der Fa. Ziemer GmbH, Mannheim vertrieben. Die komplette Anlage wurde in 1/16"-Technik aufgebaut, wobei die Schläuche aus Teflon waren und einen Innendurchmesser von 1 mm besaßen.

Pumpen: Zwei Peristaltikpumpen wurden verwendet, eine Pufferflusspumpe und eine Probenschleifenpumpe, beide vom Typ Reglo-Digital MS-4/8-100 der Firma Ismatec, Wertheim. Die Pumpschläuche derselben Firma waren vom Typ TYGON.

Thermostatisierung: Zur Stabilisierung der Temperatur der Flusszelle, der Ventile und der Probenschleife war ein wasserbetriebener Kühlthermostat, Modell F25 von Julabo, Seelbach zuständig, der bis auf 0.01 K genau regeln kann.

3.1.4 Mikroskopaufnahmen

Alle Lichtmikroskopaufnahmen wurden auf dem Stereomikroskop BX60 der Firma Olympus, Hamburg gemacht. Die Bilder wurden von einer aufgesetzten CCD-Kamera aufgenommen und mit einer angepassten Software weiterbearbeitet.

3.2 Die FIA-Anlage

Um für den Anwendungsbereich der Biosensorik ein optimales Messsystem zur Verfügung zu haben, wurde die Fließ-Injektions-Anlage selbst entwickelt [7]. Oberstes Gebot war hierbei die Einhaltung der Biokompatibilität: Viele biologische Komponenten wie Proteine, Zellen usw. bleiben an Metallen und Plastik (PE, PP, PU...) adhäsiv

„kleben“ und verunreinigen dadurch die Flussanlage durch Verschleppungen. Außerdem bilden sich in einem mit Puffer betriebenen System schnell Bakterienkulturen an diesen Adsorbaten und verfälschen Messergebnisse oder verstopfen gar die Schläuche. Da Blut als Analyt verwendet werden sollte, musste weiterhin der hohen Viskosität von Erythrozytensuspensionen und Vollblut Rechnung getragen werden, was sich in hohen Schlauch-Innendurchmessern niederschlägt. Leider ergibt sich daraus ein Konflikt mit der benötigten Probenmenge, denn je größer der Schlauchdurchmesser, desto mehr Analyt wird benötigt. Als bester Kompromiss wurde folgende Konfiguration gewählt:

- Schlauchmaterial ausschließlich Teflon
- Schlauchdurchmesser $\varnothing=1$ mm
- Probenschleife $V=450$ μ l
- Kompakte Anordnung, daher kurze Wege und wenig Analytverbrauch: Flüssigkeitsvolumen von der Probenschleife bis in die Zelle nur 45 μ l

Der gesamte Aufbau ist in Abb. 3.1 im Überblick dargestellt.

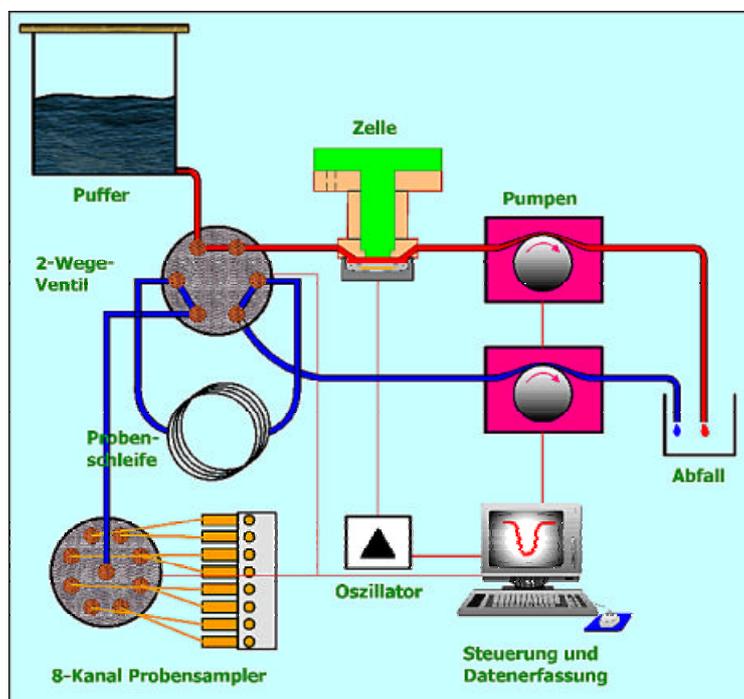


Abb. 3.1: FIA mit 2 Ventilen und 2 Pumpen. Durch Umschalten des 2-Wege-Ventils wird die Probe injiziert.

Kernstück der Anlage ist das 2-Wege-Ventil, das im Ruhezustand einen Pufferfluss durch die Zelle und gleichzeitig eine Befüllung der Probenschleife mit Analyt zulässt. Betätigt man das Ventil, wird die Probe injiziert, während man den Probensampller bis zur Probenschleife spülen kann. Durch das 8-Wege-Ventil können bis zu 8 verschiedene Analyte angewählt und automatisch eingespritzt werden. Die Zelle ist wie die Probenschleife extra thermostatisiert, damit beim Durchfluss von Puffer oder Probe keine thermisch bedingten Frequenzänderungen auftreten. Statt einer können auch mehrere Zellen gleichzeitig betrieben werden, wenn man zwischen 2-Wege-Ventil und Zellen ein Manifold (Splitter) einbaut. Die Drehzahl der Peristaltik-Pumpen ist elektronisch gesteuert und wird vom Programm geregelt. Der Betriebsbereich der Pufferflussspumpe lag zwischen 70 μl und 6 ml (stufenlos) und ließ eine hohe Variation während der Messung zu (langsame Injektion der Probe, stopped flow, schnelles Spülen). Die Ventile, Pumpen und das Auslesen der Oszillatorschaltung konnte per Software gesteuert werden. Das extra zu diesem Zweck geschriebene Programm wurde mit der objektorientierten Programmiersprache HP/Agilent VEE 4.0 realisiert.

3.3 Der Quarzhalter

Das Herz dieser Analysetechnik ist der Schwingquarz. Es wurden Quarze mit einem Durchmesser von $\varnothing=8.5$ mm und einer Dicke von $d=168$ μm ($f=10$ MHz) verwendet. Die Elektroden bestanden aus einer Goldschicht (ca. 90 μm), die auf Chrom als Haftvermittler (<10 μm) im Hochvakuum vom Hersteller aufgedampft worden war. In der Gasphase werden die Quarze durch einen speziellen Quarzhalter mit dünnen Federkontaktföhnchen kontaktiert, der sicherstellt, dass die Dämpfung des Quarzes (und damit eine Verringerung der Güte Q) möglichst gering bleibt (s. *Abb. 2.7*). Dies ist beim Betrieb in Flüssigkeit nicht möglich, da niemals beide Elektroden eines Quarzes in derselben (leitfähigen) Flüssigkeit sein dürfen, um elektrischen Kurzschluss zu vermeiden. Also muss der Quarzhalter den Quarz wasserdicht umschließen, was man durch Kleben oder Abdichten mit einem O-Ring erreichen kann. In *Abb. 3.2* sind beide Systeme abgebildet, sie wurden ausführlich getestet. Die Halterung aus Teflon wurde von Dipl. Physiker (TH) Aleksandar Vidic [37], die Metallkonstruktion von Dr. Michael Kaspar [65] entworfen.



Abb. 3.2: Quarzhalter aus Teflon ohne (links) und mit Quarz (incl. Viton-O-Ring, Mitte) sowie aus Metall (geklebt, rechts)

Die Güte des Quarzhalters mit Quarz, ausgedrückt in Q , wurde für vier Systeme ermittelt:

- 1) Freischwinger Quarz (dünne Golddrähte waren als Kontakte angebunden, am Ende der Drähte wurde der Quarz in Luft „hängengelassen“)
- 2) Quarz in kommerzieller Gasphasenhalterung (s. *Abb. 2.7*) mit Kontaktfederstiften festgeklemmt und gekapselt
- 3) Quarz in Edelstahlhalter mit Epoxidkleber geklebt (rundherum)
- 4) Quarz in Teflonzelle, mit O-Ring in einer Teflonflusszelle geklemmt

Folgende Ergebnisse wurden erhalten (s. *Abb. 3.3* und *Tab. 3.1*):

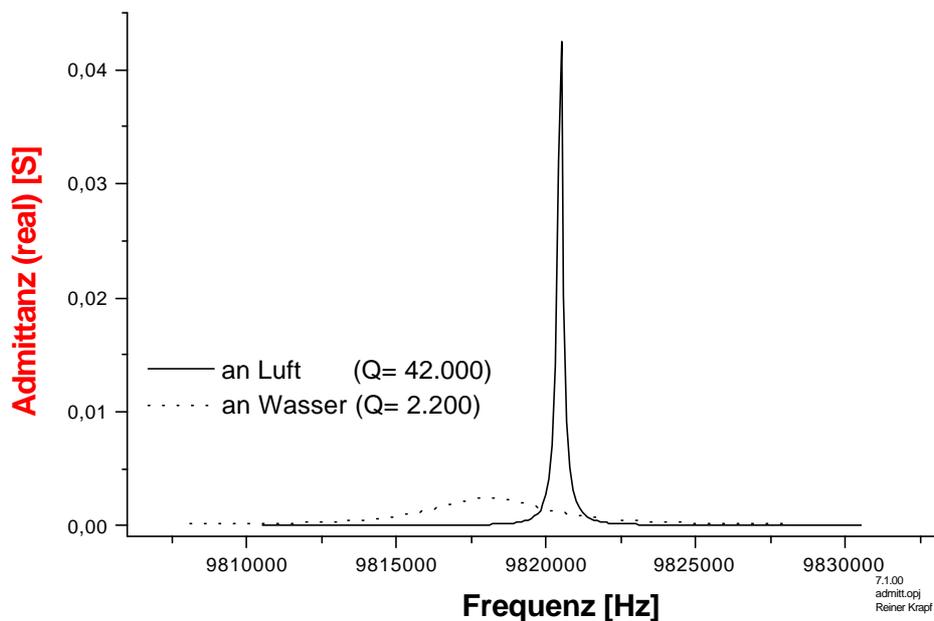


Abb. 3.3: Quarz in Teflonzelle, geklemmt mit Viton-O-Ring, jeweils an Luft und in Wasser schwingend

Nr.	Haltersystem	Quarzgüte Q
1	Freischwinger Quarz	119.000
2	Gasphasenhalterung (geklemmt)	110.000
3	Edelstahlhalterung (geklebt)	9.000
4	Teflonhalterung (geklemmt)	42.000

Tab. 3.1: Auswirkungen verschiedener Quarzhaltersysteme auf die Quarzgüte Q im Überblick

Als Ergebnis bleibt anzumerken, dass jede Halterung das Schwingverhalten des Quarzes dämpft. Daher ist es wichtig, einen Quarzhalter zu konstruieren, der die Quarzoszillation so wenig wie möglich behindert. Beim in dieser Arbeit verwendeten Halter liegt der Quarz auf Teflon auf und wird von oben mit einem Viton-Ring durch eine Klemmeinrichtung abgedichtet. Man kann erkennen, dass durch den elastischen Viton-Ring der Quarz deutlich weniger gedämpft wird als bei dem Klebeverfahren. Durch Wahl eines weicheren O-Ring-Materials und weniger Anpressdruck könnte man bei der Teflonhalterung durchaus noch bessere Werte erzielen. Bei den oben ermittelten Werten wurde genau die Zelle verwendet, mit der auch später gemessen wurde.

Die ermittelten Werte in Tab. 3.1 stellen jedoch nur Richtwerte dar, welche von Quarz zu Quarz leicht schwanken können. Der Wert von $Q=42.000$ ist für ein Flüssigphasen-Haltersystem sehr gut. Flutet man die Zelle mit Wasser, so sinkt der Wert erwartungsgemäß stark ab und beträgt beim Edelstahl-System (geklebt) nur noch $Q=1900$, beim Teflon-System noch $Q=2.200$. Auch das stellt einen guten Wert dar, ist doch der in Flüssigkeiten theoretisch maximal erreichbare Wert $Q=2.500$.

3.4 Die Flusszelle

Mindestens genauso wichtig für die FIA-Eigenschaften wie der Quarzhalter ist das Design der Flusszelle. Sie wird charakterisiert durch das Material, das Flüssigvolumen und die Strömungseigenschaften. Beim Material wurde hier wieder Teflon verwendet, da es sich chemisch indifferent verhält und vergleichsweise wenig biologische Adsorption stattfindet. Dadurch sind auch Reinigungszyklen innerhalb der

Flussapparatur möglich, sodass z.B. Bakterien mit Natriumhypochlorid-Lösung entfernt werden können, wie das in anderen medizinischen Geräten der Fall ist. Da anfangs das optimale Volumen der Gesamtzelle für die Analytik nicht klar war, wurde ein Teflongrundkörper entwickelt (rund), den man nach oben hin mit einem Plexiglasstempel abdichtet (s. Kap. 7.1). Dies lässt einerseits einen Blick in die Vorgänge innerhalb der Flusszelle zu (visuelle Kontrolle), andererseits kann durch die Tiefe des Einschraubens das effektive Innenvolumen variiert werden. Ein Bild der Zelle ist in Abb. 3.3 gezeigt. Das optimale Volumen wurde durch Probemessungen ermittelt und beträgt $V=30\ \mu\text{l}$; hier war der Kompromiss von benötigtem Probenvolumen und Signalhöhe am geeignetsten.

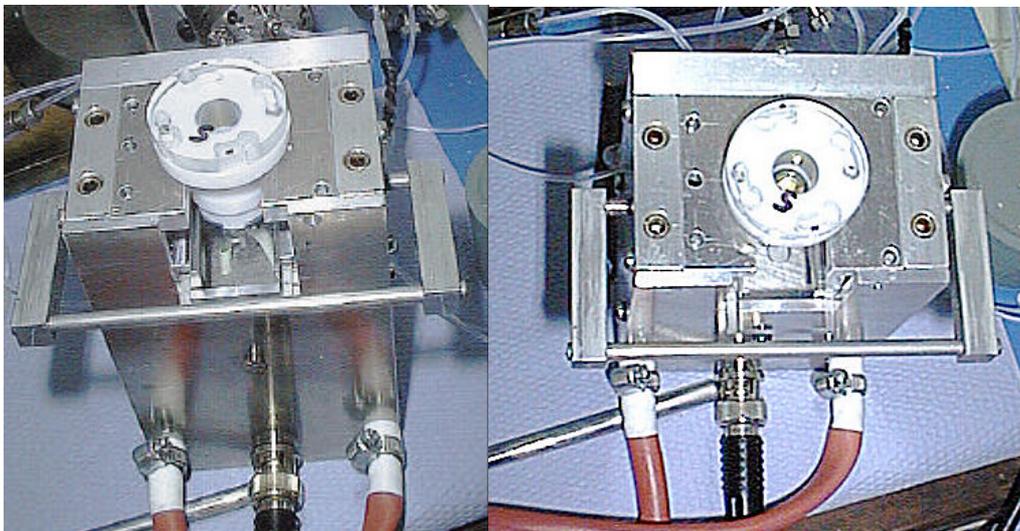


Abb. 3.4: Komplette Flusszelle (weiß) mit Plexiglas-Stempel und -Schieber zum Wechseln der Quarze (Klemmvorrichtung). Die Edelstahlhalterung ist thermostatisiert; unten ist die Oszillatorschaltung integriert, während innen eine Teflonschlauch-Rolle als thermostatisierte Probenschleife eingebaut ist

Natürlich ist auch die Art der Fluidik essentiell daran beteiligt, wie gut Antigene an einem mit Antikörper beschichteten Quarz binden und sich nachher wieder wegspülen lassen (Regenerationszyklus). Ein anderer Aspekt sind Störungen im Frequenzverlauf durch Druck- und Strömungsphänomene. Der Quarz ist extrem druckempfindlich und darf daher mechanisch nicht belastet werden. Deswegen wurde der Flüssigkeitseinlass und -auslass nicht von oben, sondern von links bzw. von rechts realisiert. So kann die Flüssigkeit parallel zum Quarz fließen und Pumpeneffekte (Änderung der Strömungsgeschwindigkeit, stopped flow) werden minimiert: Schaltet man die Pumpe

bei einem vorherigen Fluss mit 70 $\mu\text{l}/\text{min}$ ab, so ergibt sich eine kurzfristige Störung von ca. 2 Hz; schaltet man sie wieder an, so beträgt die Störung ca. 3 Hz (s. *Abb. 4.18*). Die Thermostatisierung der gesamten Zelle wurde auf wenige hundertstel Kelvin genau eingehalten. Dabei wurden nicht nur die Zelle (mit Oszillatorschaltung und Probenschleife), sondern auch die Ventile und die Pufferzuleitungs-Schläuche thermostatisiert, allerdings mit etwas geringerer Genauigkeit (± 0.1 K).

3.5 Sensorbeschichtung

Um mit einem goldbeschichteten Quarz Blutanalytik betreiben zu können, muss er spezifisch beschichtet werden. Dabei muss eine Methode gefunden werden, um Antikörper fest an die Oberfläche zu immobilisieren. Aus der Literatur sind mehrere Verfahren bekannt, drei davon wurden innerhalb dieser Arbeit getestet:

- (1) Antikörperlösung direkt auf Gold geben [66,79]
- (2) Quarz mit Protein A belegen und Antikörperlösung hinzugeben (Bindung am Fc-Fragment) [73-77]
- (3) Quarz mit funktionalisierten Alkanthiolen belegen und Protein A an den funktionalen Gruppen chemisch anbinden, danach Antikörperlösung hinzugeben [69,71,72]

In *Abb. 3.4* ist eine schematische Übersicht über diese drei Methoden gegeben, in den folgenden Kapiteln werden Belegungsvorschriften für jede Methode kurz beschrieben. Eine vergleichende Betrachtung aller drei Methoden mit Diskussion über sterische Aspekte findet sich in [68].

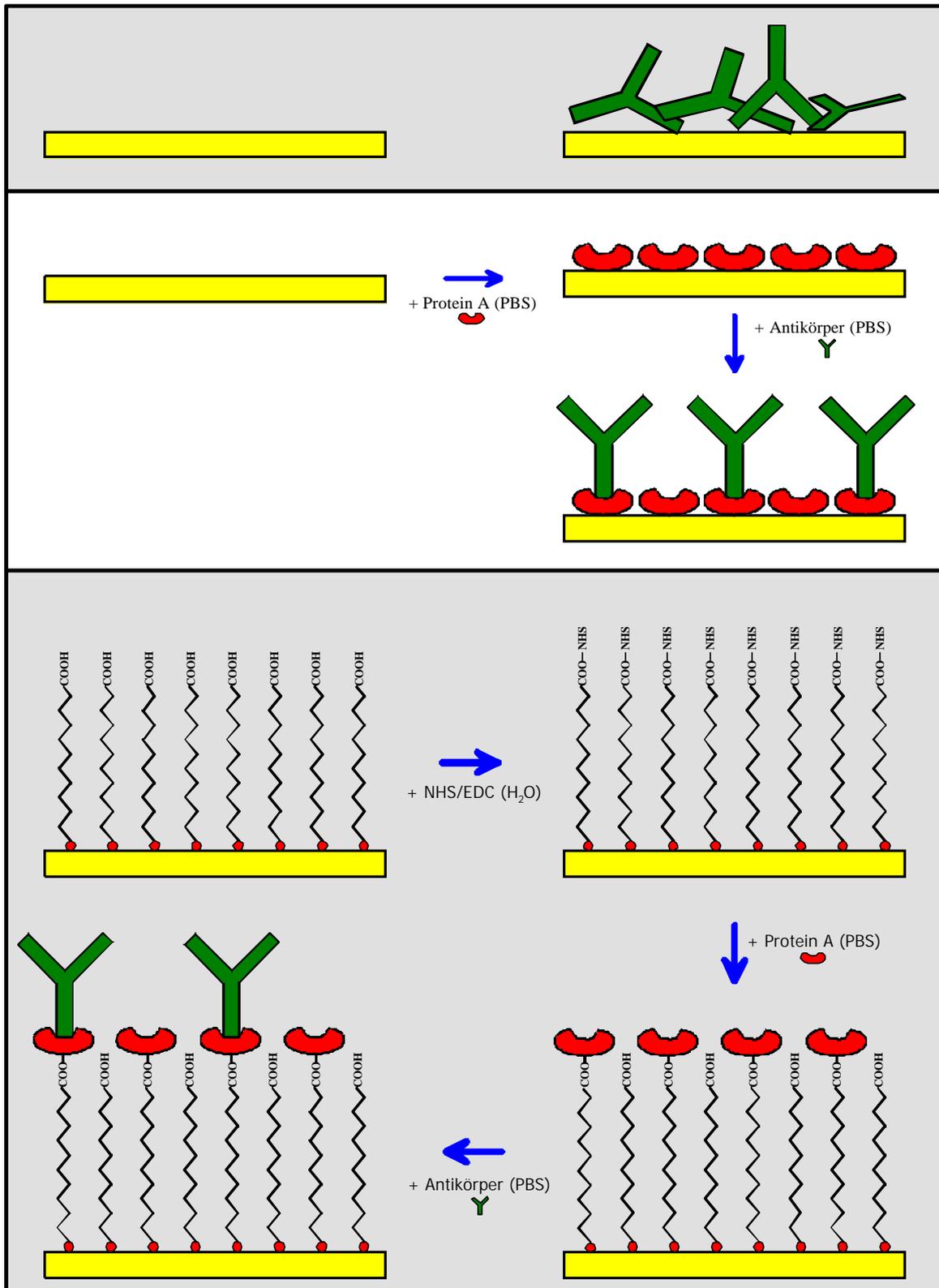


Abb. 3.5: Quarz-Beschichtungstechniken: Direkt auf Gold (oben), via Protein A (Mitte) und via Thiol / Protein A (unten)

3.5.1 Ankopplung direkt auf Gold (1)

Der Quarz wird vor der Belegung 1 Minute mit frischem Piranha behandelt. Danach wird mit bidestilliertem Wasser gespült und eine Ultraschallbehandlung in reinem Ethanol durchgeführt (ca. 15 Minuten). Nach Trockenblasen mit Argon wird die Antikörperlösung hinzugegeben. Der Belegungsvorgang sollte mindestens 30 Minuten, maximal 2 Stunden dauern. Danach wird der Quarz mit destilliertem Wasser gespült und sofort vermessen.

3.5.2 Ankopplung via Protein A (2)

Der Quarz wird vor der Belegung 1 Minute mit frischem Piranha behandelt. Danach wird mit bidestilliertem Wasser gespült und eine Ultraschallbehandlung in reinem Ethanol durchgeführt (ca. 15 Minuten). Nach dem Trockenblasen mit Argon sollte die Belegung sofort beginnen.

50 µl einer Lösung von Protein A in PBS (2 mg/ml) wird auf die Quarzoberfläche gegeben. Durch die im Ergebnisteil beschriebenen Erkenntnisse wurde später nicht mehr PBS als Puffer, sondern NaCl/EDTA/TRIS-Puffer zum Auflösen von Protein A verwendet. Nach 2 Stunden wird mit bidestilliertem Wasser gewaschen und 50 µl der Antikörperlösung wie geliefert auf den Quarz gegeben. Nach mindestens 30 Minuten kann der Quarz mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in die FIA eingesetzt werden. Die Belegungszeiten hängen stark von der Temperatur ab. Für eine grobe Messung reicht eine Zeit von jeweils 15 Minuten völlig aus. Will man jedoch reproduzierbare (Vergleichs-) Messungen erzielen, empfiehlt sich sowohl bei der Protein A- als auch bei der Antikörperbelegung eine Immobilisierungszeit von 2 Stunden. Der Quarz sollte sofort vermessen werden. Falls das nicht möglich ist, kann er im Kühlschrank aufbewahrt werden, verliert aber dadurch während einiger Tage an Reaktivität.

3.5.3 Ankopplung via Thiol / Protein A (3)

Der Quarz wird vor der Belegung 1 Minute mit frischem Piranha behandelt. Danach wird mit bidestilliertem Wasser gespült und eine Ultraschallbehandlung in reinem

Ethanol durchgeführt (ca. 15 Minuten). Nach dem Trockenblasen mit Argon sollte die Belegung sofort beginnen.

50 µl einer 2 mM ethanolischen 11-Mercaptoundecansäure werden zugegeben, die Quarzhalteröffnungen abgedeckt (Vermeidung von Verdunstung) und für 14 Stunden stehen gelassen. Nach Reinigung mit Ethanol wird 50 µl einer Mischung aus 0.2 M EDC und 0.05 M NHS in bidestilliertem Wasser zugegeben, um die Carbonsäuregruppen zu verestern (Aktivierung). Nach 2 Stunden wird mit bidestilliertem Wasser gewaschen und 50 µl einer Lösung von Protein A in PBS (2 mg/ml) zugegeben. Nach wiederum 2 Stunden wird mit bidestilliertem Wasser gewaschen und 50 µl der Antikörperlösung wie geliefert auf den Quarz gegeben. Nach mindestens 30 Minuten kann der Quarz mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in die FIA eingesetzt werden. Der Quarz sollte sofort vermessen werden. Falls das nicht möglich ist, kann er im Kühlschrank aufbewahrt werden, verliert aber dadurch innerhalb einiger Tage an Reaktivität.

3.5.4 Quarzbelegung mit Humanserum und FCS

Da Antikörperlösung sehr teuer ist, wurden viele Versuche ersatzweise mit humanem Blutserum durchgeführt, wo eine IgG-Konzentration von ca. 7-16 g/l vorliegt. Unter anderem wurden damit Versuche zur Regenerierbarkeit des mit Protein A belegten Quarzes durchgeführt (Anzahl der maximal möglichen Zyklen) sowie Vergleiche mit fetalem Kälberserum (FCS), das außer der fehlenden Immunglobuline (Antikörper) ungefähr dieselbe Zusammensetzung aufweist.

Die Belegung erfolgte analog zu *Kap. 3.5.1*.

3.6 Selbstentwickelte Software

Zur Ansteuerung der Ventile und Pumpen sowie zum Auslesen der Frequenz wurde unter der grafischen Entwicklungsumgebung HP/Agilent VEE (Windows 95) eine Software geschrieben [78]. Dabei wurden die Pumpen über eine Digital-I/O-Karte angesteuert, während die Pumpen über die serielle Schnittstelle (RS 232C) angeschlossen werden konnten. Sie wurden allerdings nicht in die aktive Benutzerschnittstelle implementiert, da fast jede Messung andere Parameter bezüglich

Flussgeschwindigkeit / stopped flow beinhaltete und eine manuelle Steuerung einfacher war. Das Auslesen der Frequenz erfolgte über eine IEEE-Karte vom Frequenzzähler. Folgende Features wurden in die Software integriert:

- Eingabe der zeitlichen Auflösung bei der Aufnahme der Frequenzkurve (in Sekunden). Bei kinetisch interessanten Reaktionen kann bis auf 1 Messwert pro Sekunde reduziert werden, während bei Langzeitmessungen die Dateigröße durch größere Messintervalle minimiert werden können.
- Eingabe eines individuellen Dateinamens (lange Dateinamen) mit dazugehöriger ausführlicher Beschreibung der Messung (Analyte, pH-Wert, Sensorbeschichtung etc.)
- Während der Messung: Echtzeitaktualisierung der grafischen Anzeige des Frequenzverlaufes, individuelle Autoskalierung (x, y, xy), Echtzeit-Zoom und Zoom-out im Grafikfenster
- Injektionszeiteinstellung (wie lange die Analysesubstanz injiziert wird, bevor wieder automatisch auf Pufferfluss umgeschaltet wird), manuelle Ventilkontrolle in Echtzeit
- Anzeigen: Verstrichene Gesamtzeit im min:sek-Format und als Gesamtsekunden, verbleibende Restzeit der Messung, aktuelle gemittelte Frequenz (auf 0.01 Hz genau), aktuelles Frequenzrauschen (auf 0.001 Hz genau), verbleibende Injektionszeit, Dateiname und Beschreibung der Messung

Die Frequenz wird mit einem 100 ms-Gate ausgelesen, 10 Werte gesammelt und gemittelt. Dadurch bekommt man jede Sekunde einen gemittelten Frequenzwert sowie als Standardabweichung des Mittelwertes eine Angabe des Rauschens.

Eine speziell entwickelte Peak-Eliminations-Routine blendet Störungspeaks (z.B. durch elektromagnetische Störfelder, Spannungspulse im Stromnetz etc.) wirkungsvoll aus. Bei großen Frequenzänderungen warnt das Programm vor möglichen Pannen wie Undichtigkeit oder Verstopfung der FIA, Zerschlagen des Quarzes oder elektronischen Defekten mittels eines gelben Pop-up-Fensters.

Durch den eingebauten Webserver kann die gesamte Frontend-Benutzeroberfläche über das Internet mit jedem herkömmlichen Internetbrowser betrachtet werden (s. Abb. 3.6). So kann man die Messung ständig beobachten, auch wenn man sich nicht im Messraum befindet.

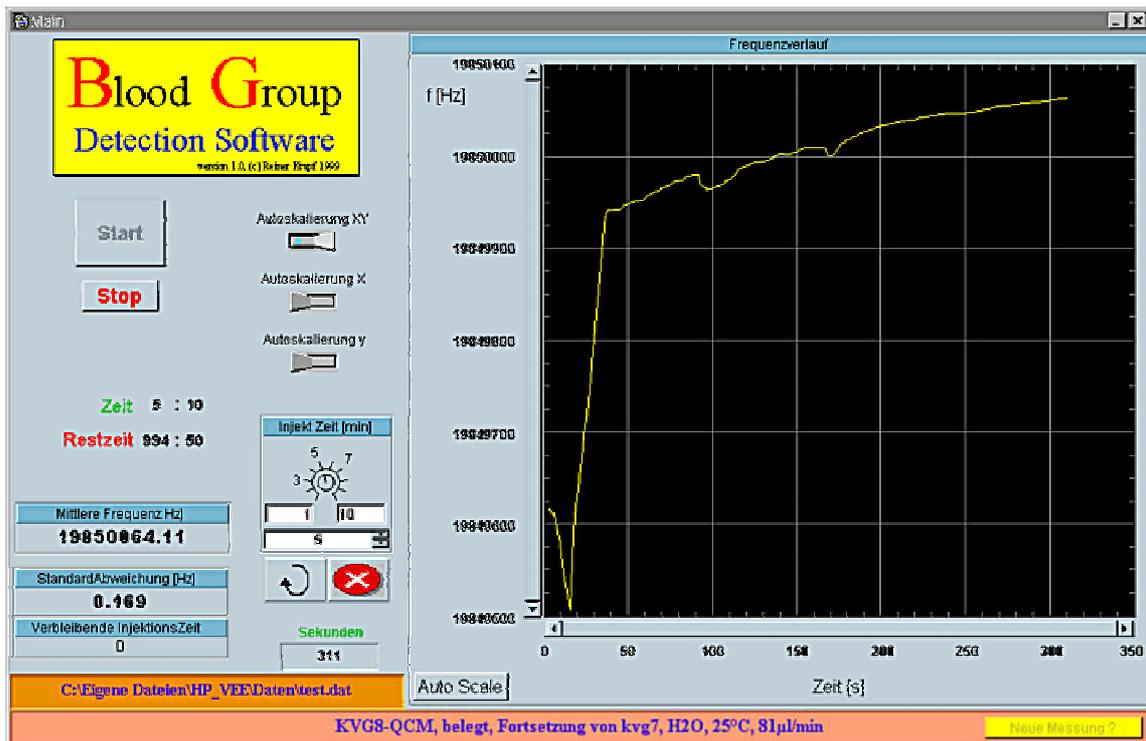


Abb. 3.6: Screenshot der Benutzeroberfläche des entwickelten Mess- und Steuerprogramms. Dieser Screenshot ist auch immer aktuell über das Internet verfügbar

Dieses Programm lief auf einem PC mit Pentium 133 MHz-Prozessor, 32 MB RAM und 2 MByte Festplatte unter Windows 95/Novell Netware Client.

3.7 Erklärung der erhaltenen Frequenzverläufe

In diesem Kapitel soll kurz gezeigt werden, wie typische Messungen verlaufen und wie man die erhaltene Frequenzkurve interpretieren kann. Dabei soll als Beispielmessung ein Protein A-belegter Quarz dienen, der in der FIA die Anlagerung von IgG-Antikörpern registriert (s. Abb. 3.7):

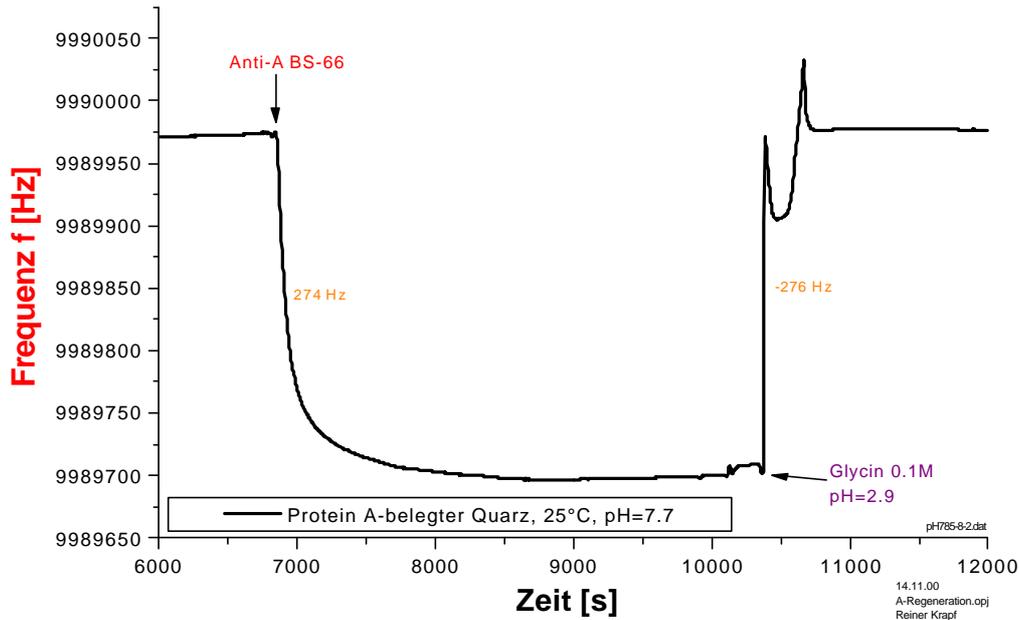


Abb. 3.7: Anbindung von IgG-Antikörpern an einen Protein A-belegten Quarz im Durchfluss

Im Anfangsbereich der Messung sieht man einen relativ stabilen Frequenzverlauf, der sicherstellt, dass die Thermostatisierung funktioniert und der Pufferfluss mit 70 $\mu\text{l}/\text{min}$ gleichmäßig vonstatten geht (keine Frequenzdrift). Kurz vor der Injektion wird die Probenschleife mit Analyt gefüllt (450 μl) und danach das 2-Wege-Ventil umgeschaltet (bei ca. 7000 Sekunden, s.o.). Nun dauert es 40 Sekunden, bis die Antikörperlösung die Zelle erreicht. Es erfolgt nun normalerweise eine extreme Änderung der Frequenz, weil die Analytlösung eine andere Viskosität besitzt als der Puffer. Erst nach einigen zehn Sekunden setzt der Masseneffekt ein, bei dem sich Antikörper an das Protein A anlagern. Daher ist die Steigung der Kurve kurz nach dem Einspritzen einer Probesubstanz maximal steil und flacht dann langsam ab, bis die Oberfläche des Quarzes vollständig belegt ist. In der Beispielmessung (s. Abb. 3.7) ist ab ca. 8800 Sekunden ein Gleichgewichtszustand erreicht. Nimmt man die Differenz der aktuellen Frequenz minus der Frequenz vor dem Einspritzen, so hat man immer den Massen- und den Viskositätseffekt zusammen. Möchte man den Anteil der Viskosität weitestgehend entfernen, muss man das 2-Wegeventil wieder auf Pufferfluss umschalten und die kurze steile Frequenzänderung abwarten. Es stellt sich wieder ein (Puffer-) Gleichgewichtszustand ein, der sich zum stabilen Anfangsbereich der Messung nur aufgrund der angelagerten Masse unterscheidet. Natürlich hat man

wegen der Adsorption von biologischem Material (Antikörper) immer noch einen kleinen Fehler durch die veränderten Oberflächeneigenschaften (andere Rigidität, Polarität, Ladung). Dieser Fehler ist aber bei den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen prozentual sehr gering, weil Blut extreme Masseneffekte im Kilohertzbereich verursacht.

Die Überlagerung von Viskositäts- und Masseneffekt [77] sieht man in *Abb. 3.7* sehr deutlich in der Regenerationsphase: Hier werden die Antikörper sauer vom Protein A abgelöst; die Masse nimmt schnell ab, wobei die Frequenzkurve kurz oszilliert (10.400-10.800 Sekunden). Danach stabilisiert sich die Frequenz im Pufferfluss wieder rasch. Wie man erkennen kann, ist die Regenerierung erfolgreich verlaufen: Die Frequenz am Ende der Messung ist identisch mit der vor der Injektion von Antikörper und es wurde kein Protein A vom Quarz abgelöst.

3.7.1 Typischer Messzyklus

Eine typische Blutgruppenbestimmung wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 1) Der Quarz wird außerhalb der FIA mit Protein A beschichtet und dann in die Flusszelle eingebaut.
- 2) Bei Pufferfluss mit 70-90 $\mu\text{l}/\text{min}$ wird abgewartet, bis eine stabile Frequenz-Basislinie erreicht wird.
- 3) Die Antikörperlösung wird eingespritzt und 2 Minuten injiziert (max. 5 Minuten je nach verwendeter Probenschleife möglich). Dann wird die Pumpe abgeschaltet (stopped flow) und die Belegung mit Antikörper online verfolgt (bis zu 2 Stunden). Ist der Quarz vollständig belegt, wird die Pumpe wieder eingeschaltet und das Ventil auf Pufferfluss gestellt.
- 4) Bei Messungen mit Vollblut wird nun Humanserum B eingespritzt, damit eventuell freie Protein A-Andockstellen vollständig mit IgG-Antikörpern besetzt werden. Wird mit Erythrozytensuspension gemessen, ist dieser Schritt nicht nötig.

- 5) Die Blutprobe wird injiziert und je nach Bedarf im Fluss (5 Minuten Injektionszeit) oder im stopped flow (z.B. bei der Rhesusfaktor-Bestimmung) durch die Flusszelle geleitet. Danach wird wieder auf Pufferfluss umgeschaltet.
- 6) Ist die Frequenz stabil, kann nun mit Natronlauge oder Glycin/HCl regeneriert werden – im Idealfall ist der Quarz anschließend von Blutzellen und Antikörpern befreit und kann erneut mit Antikörperlösung für die nächste Messung belegt werden [80].

Je nach Anforderung wurden die Quarze aber auch außerhalb der FIA mit Antikörpern belegt, da so eine etwas höhere Belegungsdichte bei deutlich geringerem Substanzverbrauch (nur 30 μ l) erreicht werden konnte. Eine Blockierung der Oberfläche mit BSA oder PEG zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen [66] führte zu keiner Verbesserung der Analytik.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse im Einzelnen beschrieben werden. Da während der gesamten Forschungszeit immer neue Ergebnisse erhalten wurden und sowohl die FIA als auch die Art der Quarzbelegung und Pufferzusammensetzung ständig optimiert wurden, sind die absoluten Frequenzwerte, die in verschiedenen Kapiteln beschrieben werden, teilweise nicht miteinander vergleichbar. Es wurde aber darauf Wert gelegt, dass innerhalb eines Kapitels alle Messungen untereinander vergleichbar bleiben.

4.1 Quarzbeschichtung, Konzepte

Die sensitive Beschichtung des Quarzes ist der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche Biosensorik. Ziel einer solchen Beschichtung muss sein:

- Vollständige, dichte Belegung der Oberfläche (Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen, hohe Sensitivität)
- Sehr gute Selektivität (dies hängt v.a. vom verwendeten Antikörper sowie von eventuell vorhandenen unspezifischen Wechselwirkungen ab)
- Gute Regenerierbarkeit
- Kostengünstige und einfache Realisierung für einen kommerziellen Einsatz
- Langzeitstabilität und Beständigkeit gegenüber Pufferfluss und Analyteinflüssen
- Universelles Konzept für Multikanalsysteme mit Detektion vieler verschiedener Parameter (nicht nur Blutgruppe)

Viele dieser Punkte lassen sich mit einer Antikörperbeschichtung verwirklichen, und es muss ein Weg gefunden werden, wie man Antikörper dauerhaft und gleichzeitig reversibel an der Goldelektrode des Quarzes immobilisieren kann. Drei Konzepte sind hierbei möglich und in der Literatur beschrieben:

(1) Antikörperlösung direkt auf Gold geben (Physisorption) [66,79]

(2) Quarz mit Protein A belegen (Physisorption) und Antikörperlösung hinzugeben (Bindung am Fc-Fragment v.a. durch lokale elektrostatische Wechselwirkungen) [73-77]

- (3) Quarz mit funktionalisierten Alkanthiolen belegen und Protein A an den funktionalen Gruppen chemisch anbinden, danach Antikörperlösung hinzugeben [69,71,72]

Eine schematische Übersicht darüber und die experimentelle Umsetzung bei der Quarzbelegung finden sich in *Kap. 3.5*. Im Folgenden sollen die erwarteten Vor- und Nachteile jeder Methode beschrieben und anschließend ein Vergleich mit erhaltenen Daten aufgezeigt werden:

4.1.1 Ankopplung direkt auf Gold (1)

Die Methode einer Ankopplung der Antikörper direkt an die Goldelektrode hat einen entscheidenden Vorteil: Sie ist einfach und schnell durchführbar. Man geht davon aus, dass die Schwefelbindungen der IgG-Antikörper an Gold binden. Dadurch ist eine hohe Belegungsdichte möglich. Die Nachteile sind eine ungeordnete Beschichtung und schlechte Regenerierbarkeit, weil Schwefel-Gold-Bindungen nicht leicht zu lösen sind.

4.1.2 Ankopplung via Protein A (2)

Da Protein A IgG-Antikörper am Fc-Fragment binden kann und somit eine in die Lösung gerichtete Sensorbeschichtung möglich ist, besitzt diese Art der Ankopplung Vorteile gegenüber einer Direktbelegung des Quarzes mit Antikörpern. Außerdem ist eine Regenerierung gut möglich, da die Antikörper leicht durch saure oder basische Medien vom Protein A abgelöst werden können. Die Belegungsdichte ist besser als bei Methode (3), aber schlechter als bei (1).

Die Protein-Gold-Bindung wird ebenfalls durch Schwefel-Gold-Bindungen realisiert, wobei der Schwefel bei Protein A sowie bei vielen anderen Proteinen aufgrund von Cystein-Bausteinen in der Aminosäuresequenz oftmals vorkommt. Die Stärke der Bindung von Protein A zu Gold ist entscheidend dafür, ob sich dieses System in einer Flussanlage verwenden lässt oder ob sich die Beschichtung durch den Pufferfluss mit der Zeit ablöst. Die Affinitätskonstante von Protein A an Goldkolloide wurde zu 10^8 M^{-1} bestimmt [70] – dies ist sicherlich genug, um als permanente Sensorbeschichtung zu fungieren.

4.1.3 Ankopplung via Thiol / Protein A (3)

Dass Alkanthiole auf Gold eine selbstanordnende Monolage (SAM) ausbilden und damit als Sensorbeschichtung geeignet sind, ist schon lange bekannt [69]. Hierbei werden funktionalisierte Alkanthiole auf Gold immobilisiert, während mit der funktionellen Gruppe Standard-Kopplungsreaktionen aus der Peptidchemie möglich sind (Bindung an Amino- bzw. Carboxylgruppen). Denkbar wäre eine direkte Ankopplung der Antikörper an die Thiole. Da dies aber dieselben Nachteile wie Methode 1 aufweisen würde (ungerichtete Orientierung, schlechte Regenerierbarkeit), scheint eine Ankopplung von Protein A an die Alkanthiole die bessere Wahl. Hier würde als Vorteil zu Methode (2) durch die chemische Immobilisierung ein Wegspülen im Pufferstrom verhindert werden; außerdem könnten bei der Regenerierung rauere Bedingungen angewendet werden.

4.1.4 Messergebnisse der drei getesteten Belegungsverfahren

Alle drei Belegungsmethoden wurden auf neuen, frisch gereinigten Quarzen in der FIA getestet. Darüber hinaus wurden externe Versuche unternommen, um die Belegungsdichte zu ermitteln.

Um die Methoden (2) und (3) direkt miteinander zu vergleichen, wurden zwei Quarze in einer Zweikanal-FIA parallel betrieben, einer über die Thiol-Spacer-Ankopplung, der andere durch direkte Immobilisierung des Protein A (2 mg/ml) auf der Goldoberfläche. Beidesmal wurde Anti-A immobilisiert. Die A-Erythrozytensuspension wurde 1:5 verdünnt (Stammkonzentration $1 \cdot 10^6$ Zellen/ μ l) und als Analyt verwendet (s. *Tab.* 4.1).

Während der Frequenzabfall des Thiol-gekoppelten Quarzes lediglich bei 196 Hz lag, lieferte der direkt mit Protein A belegte Quarz einen Signalabfall von 2235 Hz, also mehr als das 10-fache. Betrachtet man *Abb.* 3.5 genauer, so versteht man, warum dies so ist: Durch die Thiol-Belegung entsteht eine viel „grobmaschigere“ Oberfläche, sodass das Protein A nicht in der belegungstechnisch günstigsten „Packung“ auf der Oberfläche immobilisiert. Die Thiolunterlage bildet ein „Ankerplatz-Raster“, auf dem sich anscheinend das Protein A nicht dicht gepackt binden lässt. Sind diese Ankerplätze auch noch durch unvollständige Aktivierung der endständigen Carbonsäuren gar nicht

zur Bindung fähig, so werden geeignete Bindungsplätze für das Protein A deutlich verringert. Dies wurde in [81] untersucht, wo sich zeigte, dass durch die NHS/EDC-Methode oftmals nur 40% der Carbonsäuren aktiviert werden können. Es immobilisiert also deutlich weniger Protein A als bei direkter Zugabe auf eine Goldoberfläche.

Eine direkte Belegung von Antikörpern auf Gold (Methode (1)) führte zu keiner Bindung der Erythrozyten. Daraufhin wurde getestet, ob Antikörper überhaupt auf der Goldoberfläche adsorbieren. Dazu wurde ein goldbeschichteter Siliziumwafer direkt mit FITC-gelabelten Anti-A-Antikörpern [82], ein anderer erst mit Protein A, dann mit den gleichen Antikörpern 30 Minuten belegt und danach mit bidestilliertem Wasser abgespült. Diese Wafer wurden unter einem Fluoreszenz-Lichtmikroskop untersucht (Vergrößerung 20x). Das Ergebnis verwunderte zuerst, denn nur die Fläche, die direkt mit dem Antikörper beschichtet worden war, fluoreszierte. Es hatte also eine Bindung der Antikörper an Gold stattgefunden, während via Protein A nichts gebunden hatte. Bei weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass die Markierung FITC (Fluorescein Isothiocyanat) am Fc-Fragment der Antikörper gebunden war und dadurch die Anbindung an Protein A unmöglich wurde.

Nachdem sichergestellt werden konnte, dass die Antikörper an Gold physisorbieren können [80], wurde der Frage nachgegangen, warum die adsorbierten Antikörper keine Erythrozyten einfangen können. Dafür wurde ein einleuchtender Grund gefunden: Schaut man sich in Abb. 2.17 die Beschaffenheit eines IgG-Antikörpers an, so erkennt man, dass die Schwefelatome vor allem als Brückenbindungen im IgG-Gerüst vorkommen. IgGs besitzen die Form eines Ypsilon und sind relativ „flach“. Es erscheint unter diesen Umständen ziemlich unwahrscheinlich, dass die Antikörper aufrecht am Fc-Fragment immobilisiert werden - im Gegenteil muss angenommen werden, dass sie sich „flach hinlegen“, denn so binden möglichst viele Schwefelatome an Gold. Das bedeutet aber, dass sich auch die Fab-Fragmente nur knapp über der Goldoberfläche befinden und keine Antigene mehr binden können (sterische Hinderung sowie elektrostatische Störung durch die Goldoberfläche). Diese Annahme wird umso wahrscheinlicher, wenn man andere Publikationen hinzuzieht, wo direkt auf Gold adsorbierte IgG-Antikörper durchaus eingeschränkt in der Lage waren, andere IgG-

Antikörper oder kleine Antigene (Haptene) in Lösung einzufangen [79]. Die Erythrozyten sind einfach zu groß und besitzen eine Glykokalix, die als „Abstandshalter“ fungieren kann [83]. Zusammenfassend kann man feststellen, dass eine solche Beschichtung direkt auf Gold bei der Detektion von größeren Antigenen oder Zellen nicht eingesetzt werden sollte.

Nr.	Beschichtung	Frequenzabfall [Hz]
(1)	Antikörper direkt auf Gold	0
(3)	Antikörper über Thiol angekoppelt	196
(2)	Antikörper über Protein A angekoppelt	2235

Tab. 4.1: Mit Anti-A-Antikörpern belegte Quarze messen die Ankopplung von A-Erythrozyten

Ein noch zu berücksichtigender Punkt ist die Affinität des Protein A zu Gold. Wäre sie zu gering, so würde das Protein A mit der Zeit durch die Strömung in der FIA „weggeschwemmt“. Dieser Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden; in der Literatur wird von einer sehr starken Affinität zu Gold berichtet [70]. Weiterhin zeigte sich in Kap. 4.4.3, dass durch die Regeneration mit höherkonzentrierter Natronlauge schwachgebundene Anteile an Protein A von der Goldelektrode abgelöst werden, eine wirklich vollständige Entfernung ist nicht einmal mit Piranha-Lösung möglich.

Da die Methode (1) nun ausgeschlossen werden konnte, wurden weitere Vergleiche zwischen der Thiol- und der Protein A-Beschichtung unternommen.

Im Fall der Methode (2) und (3) wurden Siliziumwafer mit Gold bedampft (100 nm) und eine Immobilisierung von Anti-A-Antikörper vorgenommen. Danach wurden die Wafer mit bidestilliertem Wasser gespült und A-Erythrozytenlösung dazugegeben, 15 Minuten gewartet und danach mit Puffer vorsichtig ab gespült. Die so behandelten Goldwafer wurden in einem Lichtmikroskop untersucht und die Anzahl der beobachteten gebundenen Erythrozyten betrachtet. Es zeigte sich, dass im Fall des thiolbeschichteten Quarzes die Anzahl der Erythrozyten auf der Goldoberfläche gering war. Einzelne Zellen waren zu erkennen, aber keine vollständige Bedeckung. Dazu ganz im Gegensatz war die Oberfläche der Protein A-Wafer komplett mit Erythrozyten belegt.

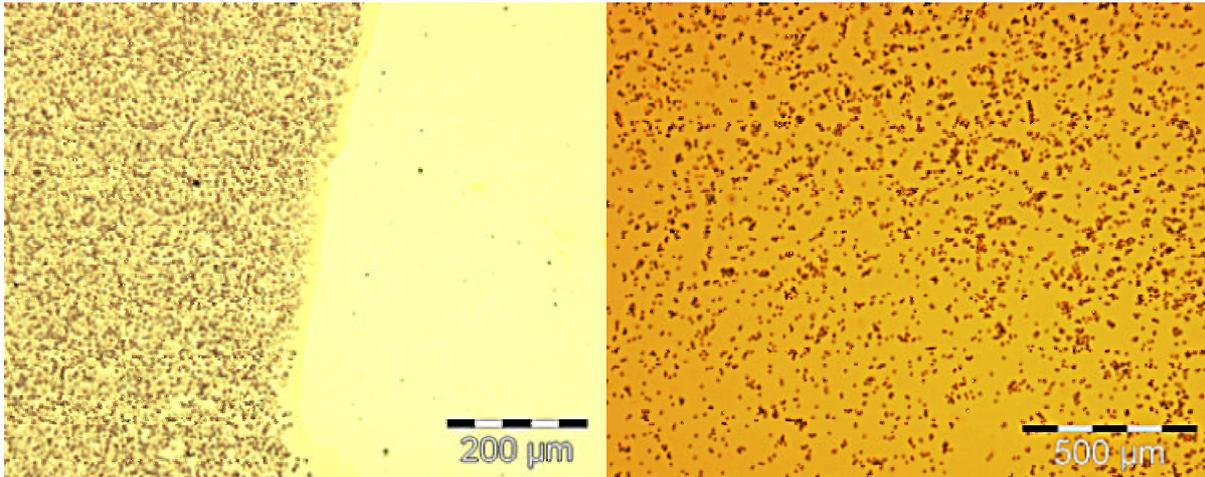


Abb. 4.1: Erythrozyten auf Gold, linkes Bild: Protein A und Anti-A, rechts der Grenze nur Anti-A (ohne Protein A); rechtes Bild: Thiol-Protein A und Anti-A

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit nur mit der Protein A-Beschichtung gearbeitet, da sie einfach handzuhaben ist, die Antikörper sterisch günstig ausrichtet, fest an Gold bindet und Erythrozyten spezifisch und effektiv binden kann.

4.2 Quarzbelegung mit Protein A

Nachdem nun die Strategie für die Immobilisierung von Antikörpern über Protein A feststand, wurde untersucht, welchen Einflüssen die Belegung der Quarze während dem Belegungsvorgang ausgesetzt ist. Es wurden fünf Kriterien ermittelt:

- Art des Proteins
- Konzentration des Proteins
- Belegungstemperatur
- Art des Puffers, pH
- Art des Quarzes

Es ist wichtig, diese Kriterien zu untersuchen, um eine optimale, dichte Quarzbeschichtung zu erhalten, vor allem in Hinblick auf die Sensitivität und auf unspezifische Wechselwirkungen von Analytlösung mit eventuell freier Goldelektrode. In den nächsten sechs Kapiteln wird auf jeden dieser Punkte einzeln eingegangen.

4.2.1 Einfluss der Proteinart

Für die Versuche zur Proteinadsorption wurden folgende Analyten verwendet: Protein A, BSA, Humanserum B (HSB) und Fetales Kälberserum (FCS). Immer wurde mit H₂O als Flussmittel gearbeitet, um ionische Wechselwirkungen auszuschließen. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in *Tab. 4.2* zusammengefasst. Vorsicht ist in der absoluten Angabe der Frequenzen gegeben – hier handelt es sich ausschließlich um Mittelwerte, weil die Reproduzierbarkeit solcher Versuche von zu vielen Faktoren abhängt, als dass man sie immer exakt einhalten könnte (Reinigung der Quarze, verstrichene Zeit bis zur Belegung, Temperatur- und Druckschwankungen innerhalb der FIA, Anpressdruck des Quarzes in der Zelle usw). Streuungen von 10-20 Hz sind in diesem Bereich normal.

Belegungsanalyt	Frequenzabfall [Hz]
BSA (2mg/ml)	80
Protein A (1.67 mg/ml)	85
Fetales Kälberserum	160
Humanserum B	2000

Tab. 4.2: Bindungsversuche verschiedener Analyten auf eine blanke Quarzoberfläche

Die Proteinkonzentration von HSB ist nicht genau bestimmt worden, liegt aber im üblichen Bereich von 60-80 mg/ml (s. *Abb. 2.14*); FCS enthält dazu im Vergleich etwas weniger Protein. In weiteren Versuchen mit PBS als Flusspuffer zeigte sich, dass Protein A sogar bis zu 130 Hz adsorbierte – trotz Chloridionen. Wird jedoch der Quarz vor Belegung mit Protein A länger in einer chloridhaltigen Lösung aufbewahrt, so verschlechtert sich das Ergebnis. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei einer solchen Vergleichsmessung ist die vorangegangene Reinigung der Quarzoberfläche. Wird die Goldelektrode vor der Belegung nicht mit Piranha gereinigt, zu kurz oder zu lang gereinigt oder vergeht zwischen der Reinigung und der Belegung zu viel Zeit (> 2 Stunden), so adsorbiert weniger Protein. Der Unterschied von fetalem Kälberserum zu Humanserum besteht in der Abwesenheit von Antikörpern bei FCS. Die obige Messung zeigt, dass durchaus sehr viel Antikörper (HSB) adsorbieren, dass also eine Direktbelegung von Antikörpern auf Gold tatsächlich möglich ist, allerdings mit den in

Kap. 4.1.4 besprochenen Nachteilen. Es scheint wahrscheinlich, dass sich hier aufgrund der großen Konzentration vieler unterschiedlicher Proteine und Antikörper keine Monolagen, sondern dickere Schichten auf der Goldelektrode anlagern (Protein-Protein-Bindungen). Protein A und BSA sind sich in ihrem Belegungsverhalten recht ähnlich, daher kann man bei grundlegenden Versuchen (z.B. Konzentrationsreihen) das viel billigere BSA anstatt Protein A verwenden.

Es zeigte sich weiterhin, dass Protein A nicht gleich Protein A ist, sondern dass je nach Hersteller und Methode der Gewinnung unterschiedliche Aktivitäten resultieren. Das Polypeptid kann entweder durch Isolation aus der Bakterienzellwand von *Staphylococcus aureus* oder durch das Kulturmedium eines Protein A-abscheidenden Bakterienstamms gewonnen werden. Je nach Herstellungsmethode und Aufreinigung sind folgende Substanzen kommerziell erhältlich:

- Protein A mit Bindungskapazität von ca. 8 mg IgG/mg Festsubstanz
- Protein A mit höheren Bindungskapazitäten bis 15 mg IgG/mg.

Viele Hersteller geben einen Bereich an, z.B. 8-14 mg IgG/mg Festsubstanz, somit ist es schwierig, die tatsächliche Aktivität anzugeben.

Es zeigte sich, dass Protein A von ICN (Cowan Stamm, lyophilisiert, salzfrei, Nr. 150052, 11-14 mg IgG/mg) deutlich mehr Antikörper (Anti-D) immobilisieren konnte als die von Sigma bezogene Substanz (Cowan Stamm, lyophilisiert, salzfrei, Nr. P3838, 7-14 mg IgG/mg). Hier eine Übersicht:

Verwendetes Protein A auf Goldelektrode immobilisiert	Frequenzabnahme bei Anti-D-Zugabe (IgG)
ICN Nr. 150052	200 Hz
ICN Fc binding grade 153891	70 Hz
Sigma P3838	40 Hz

Tab. 4.3: Protein A-Substanzen verschiedener Hersteller wurden auf Quarze immobilisiert, während als Analyt der IgG-Antikörper BS-221 (Anti-D) der Fa. Biotest verwendet wurde

Alle folgenden Messungen wurden daher mit ICN Nr. 150052 durchgeführt.

4.2.2 Einfluss der Proteinkonzentration

Um die optimale Belegungskonzentration zu ermitteln, wurde BSA als Analyt verwendet und eine Konzentrationsreihe gefahren, indem Konzentrationen von 0.05, 1, 2, 5 und 10 mg/ml BSA in H₂O verwendet wurden. Während bei $c=0.05$ mg/ml BSA nur 11 Hz Frequenzabnahme beobachtet wurden, lag dieser Wert bei 1 mg/ml bei 80 Hz, bei 2 mg/ml bei 90 Hz und stieg auch nicht mehr bei höheren Konzentrationen. Somit ist die zur Belegung der Quarze verwendete Protein A-Konzentration von 2 mg/ml vollkommen ausreichend.

4.2.3 Einfluss der Belegungstemperatur

Unabhängig vom verwendeten Flussmittel ist eine Proteinadsorption auf Goldoberflächen auch temperaturabhängig. Der Einfluss der Temperatur bei Adsorption von Humanserum B auf eine frische QCM-Goldelektrode wurde im Bereich von 10° bis 40° Celsius untersucht. Wie in *Kap. 4.2.1* beschrieben, adsorbieren beim Humanserum vor allem die Antikörper und aufgrund der hohen Konzentration von Antikörpern lassen sich hier Temperatureinflüsse bei der Belegung besonders gut beobachten, da große Frequenzdifferenzen zu erwarten sind und andere Faktoren wie Druck- und Temperaturschwankungen geringeren Einfluss auf die Messung haben.

Je tiefer die Temperatur lag, desto mehr Antikörper adsorbierten auf dem Quarz (s. *Abb. 4.2*). Bei hohen Temperaturen ($> 35^{\circ}\text{C}$) kann man nach der Injektion und Adsorption des Analyten einen Drift in Richtung höherer Frequenzen beobachten; es scheint als ob sich die Proteine langsam bis zu einem bestimmten Grad wieder ablösen. Dies ist verständlich, da nach der Injektion wieder H₂O als Flussmittel über den Quarz geleitet wird und sich ein Gleichgewicht von De- und Adsorption einstellt. Da die Proteine bei höheren Temperaturen anscheinend eine schlechtere Bindung mit Gold eingehen (weniger Adsorption insgesamt), ist diese Äquilibrierungszeit länger als bei starker Bindung, wo auch durch den Fluss weniger weggeschwemmt werden kann.

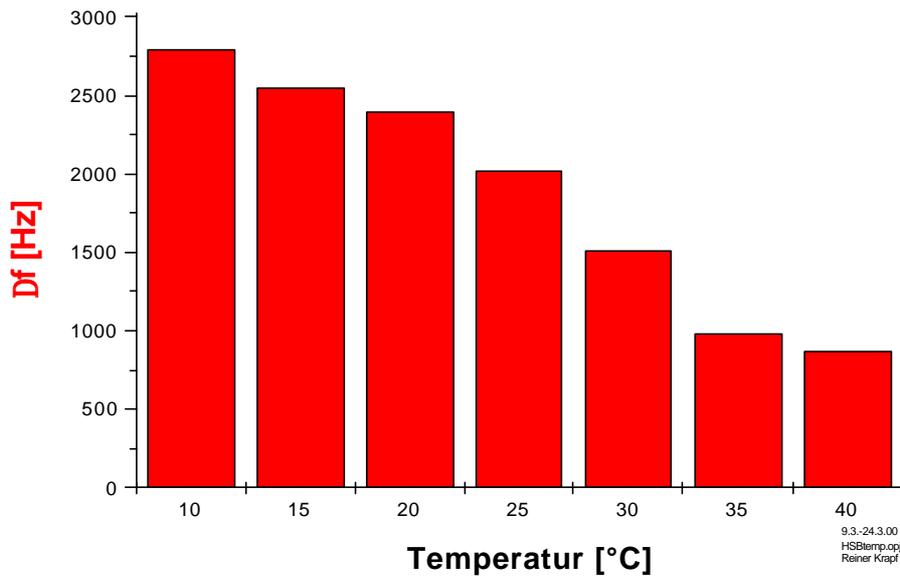


Abb. 4.2: Einfluss der Temperatur bei Belegung eines blanken Quarzes mit Humanserum B

Diese Einschätzung wird auch durch Messungen untermauert, in denen bei tiefen Temperaturen (20 °C) HSB adsorbierte, dann die Temperatur auf 35 °C erhöht und der Quarz anschließend mit Natronlauge regeneriert wurde (s. Abb. 4.3). In Vorversuchen konnte sichergestellt werden, dass eine Regeneration mit Natronlauge vollständig verläuft. Wie erwartet, löst sich nach der Temperaturerhöhung einiges vom Quarz ab, jedoch erstaunlich wenig. Während bei der Adsorption 2405 Hz gemessen wurde, ergab die Regenerierung eine Ablösung von –2100 Hz. Das würde bedeuten, dass durch die Temperaturerhöhung von 20°C auf 35°C gerade mal 305 Hz an Substanz abgelöst wird bzw. dass sich mit diesem Belegungsverfahren immer noch 2100 Hz Substanz bei 35°C auf der Oberfläche befindet. Dieser Wert liegt deutlich über dem, was ein bei 35°C belegter Quarz normalerweise adsorbiert (980 Hz).

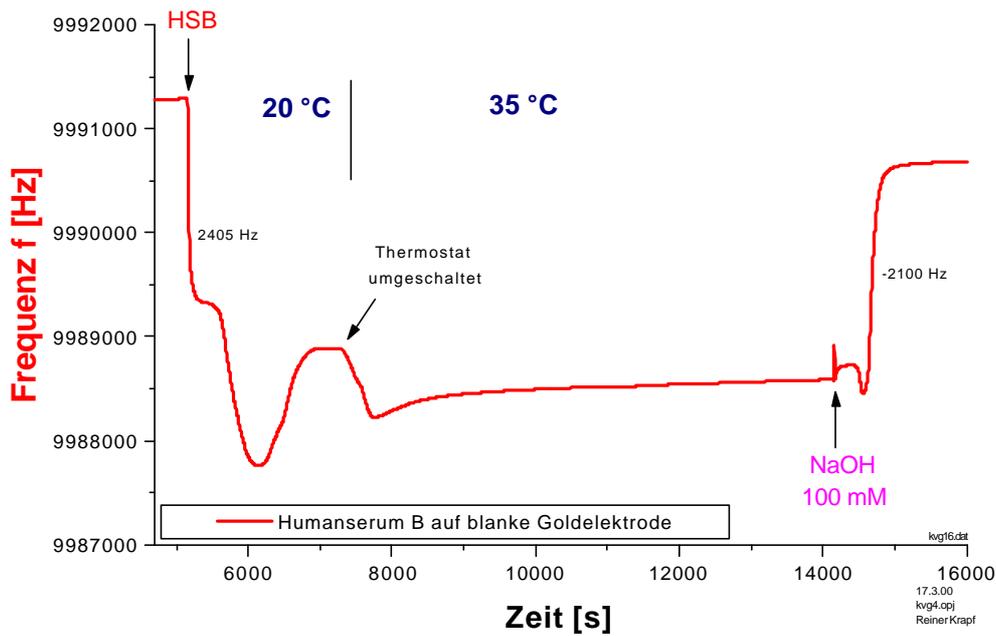
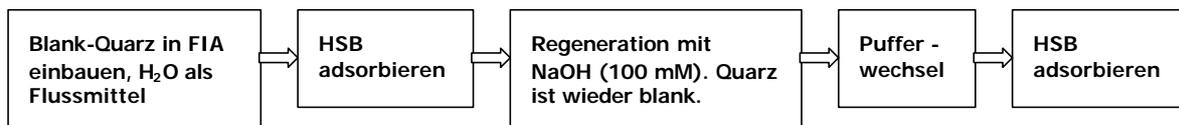


Abb. 4.3: Adsorption von Humanserum B auf einen unbelegten Quarz bei 20°C, danach Temperaturerhöhung auf 35°C

Am sinnvollsten scheint somit eine Quarzbelegung bei tiefen Temperaturen zu sein, wo viel adsorbiert wird: Auch wenn die Temperatur während der Messung höher liegt als die Belegungstemperatur, hat mehr Protein an der Goldelektrode gebunden.

4.2.4 Einfluss des Puffers (Solvens)

In diesem Kapitel wurde untersucht, ob der während der Quarzbelegung mit Proteinen verwendete Puffer (bzw. bei Belegung innerhalb der FIA der Flusspuffer) einen Einfluss auf die Belegung bzw. auf die erhaltenen Frequenzabfälle besitzt.



Es ergaben sich prinzipiell (unabhängig von der Proteinart) große Unterschiede im beobachteten Frequenzabfall, je nachdem mit welchem Flussmittel bei der FIA-Online-Belegung gearbeitet wurde. Wurde destilliertes Wasser verwendet, so ergaben sich bis zu 10-fach größere Frequenzabfälle bei Proteinzugabe auf einen blanken Quarz als z.B. bei PBS als Puffer. Da man durch den Einfluss der Viskosität des Flussmittels diesen Frequenzabfall nicht in direkte Korrelation zur Massenzunahme auf der Quarzoberfläche setzen kann, wurden umfangreiche vergleichende Messreihen mit

PBS, H₂O, NaCl, K₂SO₄ und Phosphatpuffer durchgeführt. Es zeigte sich, dass beim Wechsel des Flussmittels von H₂O auf eine salzhaltige Lösung grundsätzlich ein Frequenzabfall von ca. 800-1000 Hz auftrat, unabhängig von der Salzkonzentration oder –art. Ob dies eine konkrete Massenzunahme durch Adsorption von Ionen auf die Quarzoberfläche ist, ein Einfluss der Viskosität oder durch Ladungen auf der Goldelektrode verursacht wird, kann nur schwer abgeschätzt werden. Daher wurde jeweils vor und nach dem Pufferwechsel eine Messung mit Humanserum B als Referenz durchgeführt, wobei in H₂O auf einem frischen Quarz mehrmals zuverlässig eine Frequenzabnahme von 2 kHz gemessen wurde. Die Ergebnisse der Messreihen sind in *Tab. 4.4* übersichtlich dargestellt:

	Df [Hz] bei Pufferwechsel von H ₂ O	Df [Hz] der HSB-Adsorption auf den Quarz.
H ₂ O	0	2000
NaCl 0,9% (150 mM)	930	170
NaCl 0,45% (75 mM)	955	390
PBS	945	100
K ₂ SO ₄ (150 mM)	790	380
Phosphatpuffer pH=7.4 (10 mM)	850	1765

Tab. 4.4: Einfluss des Flussmittels auf Adsorption von Humanserum auf Gold.

Als Deutung der Ergebnisse bieten sich einerseits Ladungseffekte auf der Goldelektrode an, die durch den Wechsel von nichtleitendem Wasser auf salzhaltige Lösungen egal welcher Konzentration verursacht werden (Coulomb-Wechselwirkungen). Dies würde verständlich machen, dass die Frequenzabnahme beim Pufferwechsel überall in demselben Bereich liegt. Nicht erklären ließen sich aber die unterschiedlichen Adsorptionswerte, außerdem wäre ungeklärt, wie diese Ladungseffekte zustande kommen und die Frequenzmessung stören. Eine andere Deutung wäre, dass grundsätzlich Anionen auf der Goldelektrode adsorbieren, die Stärke der Bindung aber ionensortenabhängig ist und bei schwacher Bindung das Humanserum die Ionen verdrängen kann.

Ein weiterer Test wurde durchgeführt, bei dem zuerst H₂O als Flussmittel verwendet wird, danach Humanserum B adsorbiert und erst dann der Pufferwechsel vorgenommen wurde – bei schon belegter Oberfläche also. Nach Adsorption von HSB in H₂O (1290 Hz, der Quarz war schon länger in Gebrauch) wurde auf PBS umgestellt, welches bei einem unbelegten Quarz zum Frequenzabfall von 945 Hz führen würde, hier in diesem Fall jedoch nur 340 Hz ergab, also deutlich weniger. Dies bestätigt einerseits die Vermutung, dass eine direkte Wechselwirkung von Ionen mit der freien Goldoberfläche stattfindet, andererseits zeigt sie auf, dass die Belegung mit Humanserum B nicht zu einer vollständigen Schicht führt bzw. zumindest teilweise für Chloridionen durchgängig ist.

4.2.5 Einfluss des pH-Wertes, Adsorption und Desorption von Protein A bei verschiedenen Lösungsmitteln und Regenerationslösungen

Eine ganz andere Frage ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse des letzten Kapitels mit der für diese Arbeit wichtigen Adsorption von Protein A auf Gold. Es wurden Belegungsversuche mit Protein A in H₂O, PBS und Phosphat unternommen. Die dabei erhaltenen Adsorptionsfrequenzen liegen alle zwischen 70 und 95 Hz. Allein bei einem Phosphatpuffer mit pH=4.5 wurden 120 Hz erhalten (s. *Tab. 4.5*).

Für folgende Versuche wurden jeweils neue Quarze verwendet, alle Messungen wurden mit H₂O als Flussmittel, bei 25°C und 22 µl/min Fließgeschwindigkeit (20 Minuten Injektionszeit) durchgeführt. Die Protein A-Konzentration betrug überall 2 mg/ml.

Hersteller Protein A	Lösungsmittel	pH-Wert	Δf Adsorption [Hz]	Δf Desorption [Hz]	Desorptionsmittel
ICN	H ₂ O	7.0	78-95	22	100 mM NaOH
ICN	PBS	7.4	95	21	100 mM NaOH
Sigma 3838	PBS	7.4	75	55	3 M NaOH
ICN	Phosphat 10 mM	7.4	67	54	3 M NaOH
ICN	PBS/Acetat	5.5	87	79	3 M NaOH
ICN	Phosphat 10 mM	4.5	120	75	3 M NaOH

Tab. 4.5: Einfluss des Solvens auf die Protein A-Adsorption auf Gold; Erfolg der Regeneration bzw. des Quarzrecyclings mit Natronlauge

Die erste Messung in H₂O wurde mehrmals wiederholt, um den Einfluss des jeweils neu verwendeten Quarzes zu ermitteln. Dabei zeigten sich leichte Abweichungen, die aber insgesamt alle im begrenzten Bereich von 78-95 Hz Adsorption blieben. Somit verstehen sich die in dieser Tabelle ermittelten Daten als Richtwerte und führen zum Ergebnis, dass die Adsorption von Protein A nur bei Verwendung eines Phosphatpuffers mit pH=7.4 unter dem Durchschnitt, bei pH=4.5 deutlich darüber liegt. Laut Literatur von [84] ist eine Proteinadsorption an Gold am isoelektrischen Punkt besonders günstig. Kinam Park [85] fand teilweise abweichende Ergebnisse bei Versuchen, kolloidale Goldpartikel mittels Proteinen zu stabilisieren (auch im pH-Bereich über bzw. unter dem isoelektrischen Punkt adsorbieren Proteine gut an Gold). Anscheinend ist eine Protein A-Adsorption bei pH=4.5 besser als am isoelektrischen Punkt des Protein A (pH=5.5).

Die Messungen zur Desorption von Protein A wurden aus zwei Gründen gleich mitgemessen: Erstens sollte der Einfluss der NaOH-Konzentration auf die (bei einer Regeneration unerwünschte) Ablösung von Protein A von Gold bestimmt werden, andererseits sollte die Möglichkeit eines Quarzrecyclings durch vollkommene Ablösung des Protein A durch hochkonzentrierte NaOH getestet werden.

Die Desorption ist nicht nur vom Desorptionsmittel abhängig, sondern auch vom Bedeckungsgrad der Goldoberfläche, wie Horisberger und Clerk beobachteten [86]: Bei hohen Bedeckungsgraden fanden sie eine Desorption von 47.6% innerhalb von 84

Tagen (Ablösen ohne Desorptionsmittel), bei kleinem Bedeckungsgrad war die Desorption jedoch vernachlässigbar. Bei den hier durchgeführten Messungen kann man festhalten, dass bei 100 mM NaOH 25% Protein A abgelöst wird, bei 3M NaOH sind es zwischen 62 und 90%. Eine Regenerierung der Quarze sollte also bei möglichst niedrigen NaOH-Konzentrationen durchgeführt werden (10 mM), um die Protein A-Beschichtung mehrmals nutzen zu können.

Weitere Versuche zeigten, dass nach einer radikalen Regenerierung (3M NaOH) nichts mehr von der Quarzoberfläche abgelöst wird, auch wenn man die Regenerierung mehrmals wiederholt (gemäß Horisberger und Clerk: bei kleiner Bedeckung ist irgendwo eine Grenze erreicht, bei der sich nichts mehr ablösen lässt). Ein einmal mit Proteinen belegter Quarz kann nie vollständig regeneriert werden, ohne die Goldoberfläche anzugreifen. Der Versuch mit Phosphat und pH=4.5 wurde fortgesetzt, indem eine Piranha-Reinigung (1 min.) angeschlossen und danach nochmals Protein A im selben Puffer adsorbiert wurde. Wurde auf dem neuen Quarz 120 Hz adsorbiert, so waren es nach der Reinigung nur noch 100 Hz. Also löst auch frisch hergestelltes, heißes Piranha nicht alles von der Goldoberfläche herunter.

Die Versuche zeigen weiterhin, dass vom Sigma-Protein A weniger adsorbiert wird als vom ICN-Protein A – die Vermutung aus Kap. 4.2.1, dass das ICN-Protein A besser geeignet ist als das Sigma-Produkt, scheint sich hier zu bestätigen.

Ein Vergleich dieser in der FIA erhaltenen Werten mit einem im *Batch* belegten Quarz (auch 20 min. Einwirkzeit) bei pH=4.5 und 10mM Phosphatpuffer zeigt, dass die Belegung im Fluss grundsätzlich schlechter ist: Im Fluss wurden 120 Hz gemessen, im *Batch* 160 Hz. Allerdings sind *Batch*-Messungen deutlich unzuverlässiger, weil die Zelle geöffnet werden muss und sich der Quarzanpressdruck verändern kann.

Als Ergebnis der Kap. 4.2.1 bis 4.2.5 kann man folgende idealen Belegungsbedingungen ermitteln: Maximale Belegung mit Protein A findet bei 10 mM Phosphatpuffer pH=4.5, mindestens 20 min. Einwirkzeit im *Batch* mit ICN-Protein A unter möglichst tiefer Temperatur (10°C) statt. Allerdings sollte man berücksichtigen,

dass die Belegungszeiten aufgrund schlechterer Adsorptionskinetik bei tiefen Temperaturen deutlich höher liegen müssen als z.B. bei Raumtemperatur. Daher wurden die Quarze (um wirklich reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten) in dieser Arbeit 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit Protein A (ICN) belegt.

4.2.6 Einfluss des Quarzes

Für die ersten Messungen wurden 10 MHz-Quarze der Fa. RSG (Offenbach) [87] bestellt (Durchmesser 8.5 mm) und im Vakuum erst mit einer dünnen Schicht Titan (< 10 nm) als Haftvermittler, dann mit Gold (100 nm) bedampft.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden kommerzielle, schon bedampfte Quarze der Firma Vectron International (KVG, Neckarbischofsheim) [88] verwendet. Da die Goldelektrode denselben Durchmesser (5 mm) besaß, sollte zu erwarten sein, dass allein die Güte der Goldschicht (Rauigkeit) einen Unterschied in den messbaren Frequenzunterschieden bewirken kann. Es zeigte sich jedoch, dass im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede erkennbar waren (HSB adsorbierte auf beiden Quarztypen im Bereich von 2 kHz), allein das Rauschen der Vectron-Quarze war dreimal so hoch wie das der RSG-Quarze [65]. Für die Analytik hat dies aber keine Auswirkungen. Quarze können bei gleicher Güte durchaus von verschiedenen Herstellern bezogen werden, ohne dass eine „Kalibrierung“ der erhaltenen Frequenzkurven vorgenommen werden muss.

4.3 Ankopplung von Antikörpern an einen Protein A-belegten Quarz

Nachdem nun eine optimale Vorschrift zur Belegung des Quarzes mit Protein A gefunden war, muss eine geeignete Funktionalisierung mit Antikörpern erfolgen. Eigentlich reicht es, einfach Antikörperlösung dazuzugeben. Trotzdem stellt sich die Frage nach der benötigten Konzentration der Antikörperlösung, der Kopplungszeit und der Belegungstemperatur. Diese drei Faktoren wurden genauer untersucht.

4.3.1 Einfluss der Antikörper-Konzentration

Auf einen Protein A-belegten Quarz wurden im Fluss verschiedene Verdünnungen der Antikörperlösung BS-66 (Anti-A) gegeben und die direkte Adsorption aufgezeichnet. Aus den Kurven ersieht man nicht nur, ob die Belegung erfolgreich war, sondern aus der Steigung (Frequenzabfall) auch die Kinetik der Reaktion (s. Abb. 4.4).

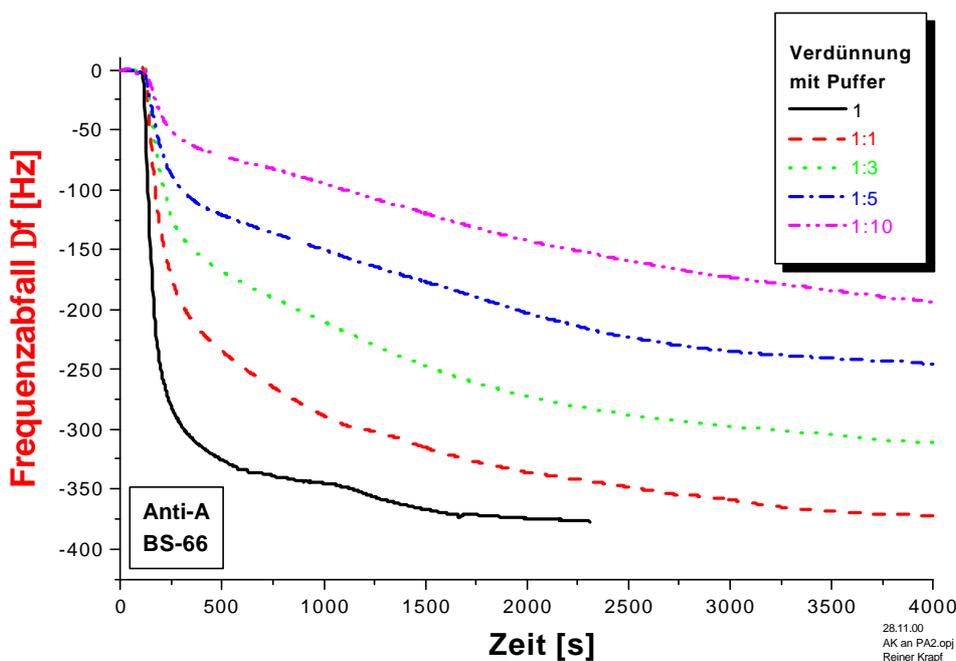


Abb. 4.4: Antikörperbindung bei verschiedenen Verdünnungen der BS 66-Lösung auf einen Protein A-beschichteten Quarz (25°C)

Die Messung der unverdünnten Probe wurde nach 2400 Sekunden gestoppt, weil sich ein Gleichgewichtszustand einstellte und keine weitere Adsorption mehr erkennbar war. Als Ergebnis kann man zusammenfassen, dass die Antikörperlösung möglichst konzentriert sein sollte, um einen Quarz schnell und vollständig belegen zu können. Durch Vergleich der unverdünnten und der 1:1-Lösung ist ersichtlich, dass eine Antikörperkonzentration von 33 µg/ml ausreichend ist, denn es wurde letztendlich dieselbe Menge an Antikörper gebunden, wobei die 1:1-Verdünnung dafür knapp doppelt so lange brauchte. Andererseits scheint es sinnvoll zu sein, eine noch konzentriertere Antikörperlösung zu benutzen, denn die Belegungszeit ließe sich wahrscheinlich noch deutlich verringern, auch wenn nicht mehr Substanz immobilisiert wird. Eine solche hochkonzentrierte Lösung könnte innerhalb einer FIA immer wieder verwendet werden (rückführende Probeschleife). Im Gegensatz dazu lohnt es sich

nicht, die kommerziellen (teuren) Antikörperlösungen zu verdünnen, um zu sparen – vielmehr sollte man die unverdünnte Lösung mehrmals einsetzen.

4.3.2 Einfluss der Belegungstemperatur

Der Einfluss der Belegungstemperatur von Anti-A auf einen Protein A-belegten Quarz fällt nicht so groß aus wie bei der Protein A-Belegung auf die blanke Goldelektrode (s. Abb. 4.5):

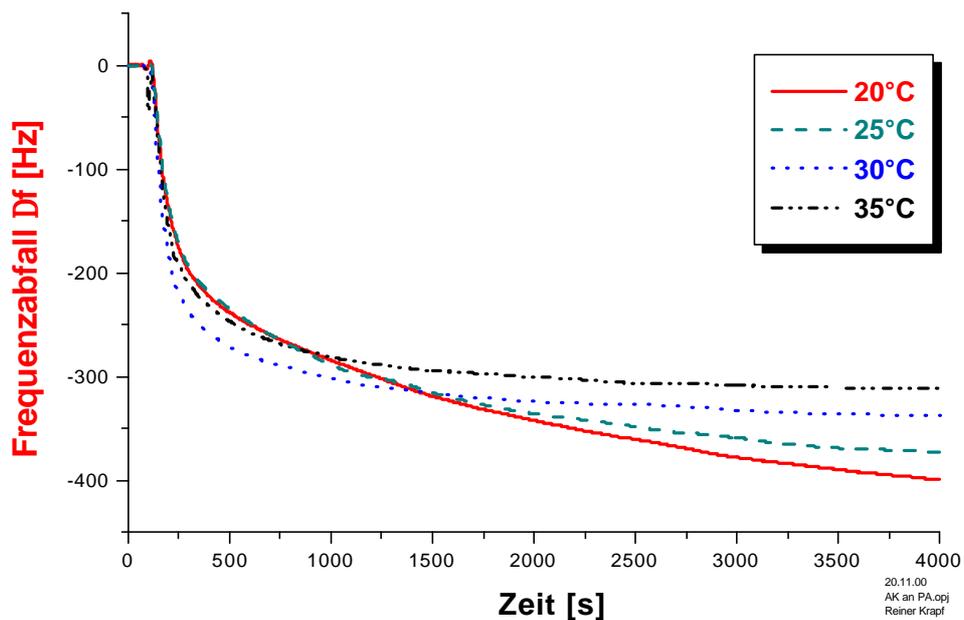


Abb. 4.5: Adsorption von Anti-A an einen Protein A-belegten Quarz bei verschiedenen Belegungstemperaturen

Auch hier zeigt sich, dass es besser ist, bei tiefen Temperaturen zu belegen, um die Oberfläche größtmöglich zu besetzen. Allerdings wird die Kinetik erwartungsgemäß schlechter, je tiefer die Temperatur ist. Somit ist es eine Frage der Priorität, wie man beschichten möchte: schnell oder vollständig. Weitere Messungen zeigten, dass bei 25°C nach 2 Stunden (7200 Sekunden) eine vollständige Belegung der Oberfläche gegeben war. Allerdings waren ohne großen Signalverlust auch nach einer Belegungszeit von nur 20 Minuten oder weniger ebenfalls gute Messungen möglich – hier hängt es allerdings von der Anwendung ab: Bei Messung der Hauptblutgruppe ABO funktioniert eine eindeutige Bestimmung schon nach wenigen Minuten Belegungszeit, bei Detektion des Rhesusfaktors ist dies nicht mehr möglich. Dort sollte

mindestens 20 Minuten bis 2 Stunden belegt werden (je nach Antikörper und –konzentration).

4.3.3 Vergleich der Antikörperadsorption an Protein A und an Gold

Da durch Kapitel 4.2.1 bis 4.2.5 erwiesen war, dass Antikörper nicht nur auf Protein A-belegten Oberflächen binden, sondern auch auf blankem Gold [68], wurde hier als Vergleich die Adsorption von Anti A (BS 66) auf einen frisch belegten Protein A-Quarz bzw. auf einen neuen, frisch gereinigten Blank-Quarz aufgezeichnet (s. Abb. 4.6).

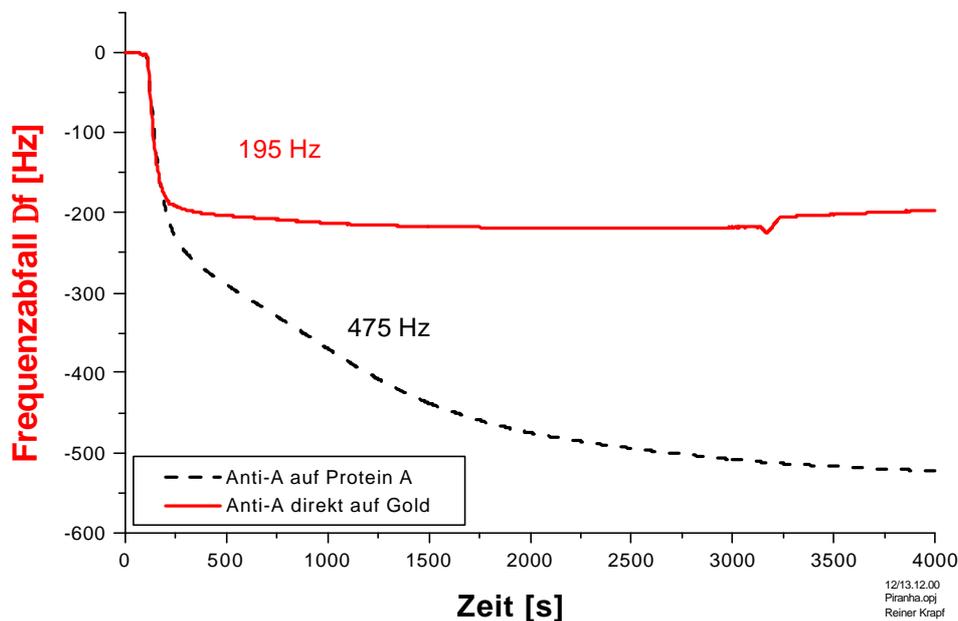


Abb. 4.6: Vergleich der Adsorption von Anti-A auf einen Protein A-belegten Quarz bzw. auf einen neuen Goldquarz (blank)

Die Kinetik in den ersten 4 Minuten der Adsorption ist dieselbe, danach jedoch ist die blanke Goldelektrode praktisch gesättigt, während der Protein A-belegte Quarz deutlich mehr IgG-Antikörper fassen kann. Hier zeigt sich der Erfolg der optimierten Protein A-Belegungsvorschrift: Es findet eine „Oberflächenvergrößerung“ statt und man kann annehmen, dass nicht mehr viel freie Goldfläche vorhanden ist, was sich positiv bei der Unterdrückung von unspezifischen Wechselwirkungen bemerkbar macht. Dieser Test zeigt, dass nun eine optimale Beschichtung des Quarzes sowohl mit Protein A als auch mit Antikörper entwickelt wurde und die Quarze für einen Sensoreinsatz bereit sind.

4.4 Blutmessungen

Nachdem nun die optimalen Parameter für die Quarzbeschichtung feststanden, konnten Messungen realer Proben vorgenommen werden. Dabei wurde anfangs eine Erythrozytensuspension verwendet, um Wechselwirkungen des Serums und anderer Blutbestandteile auszuschließen. Die Suspensionen wurden hergestellt, indem Vollblut drei Mal zentrifugiert und jeweils mit PBS gewaschen wurde. Die Stammkonzentration wurde auf $1 \cdot 10^6$ Erythrozyten/ μl bei $\text{pH}=7.4$ eingestellt. Später wurden Wege gefunden, wie unspezifische Wechselwirkungen einfach und wirkungsvoll unterdrückt werden können, und es wurde direkt Vollblut verwendet (antikoaguliertes Spenderblut, ca. $4\text{-}7 \cdot 10^6$ Erythrozyten/ μl), das meist mit dem verwendeten Flusspuffer verdünnt wurde. Typische Verdünnungen lagen im Bereich von 1:5 und 1:1000.

In den folgenden Kapiteln werden Messungen zur Bestimmung der Hauptblutgruppen ABO sowie zur Detektion des Rhesus-Faktors (D-Antigen) gezeigt. Ein Erythrozyt der Blutgruppe A besitzt ca. 1 Mio. A-Antigene auf der Oberfläche, bei Blutgruppe B sind es 250.000 B-Antigene. Da keine B-Antikörper zu Verfügung standen, wurde auch die Blutgruppe A_2 getestet, die ebenfalls nur 250.000 Antigene auf der Erythrozytenoberfläche aufweist und damit mit B vergleichbar ist. Rhesus-Bestimmungen sind wesentlich schwieriger zu realisieren, da D-Antigene lediglich in der Größenordnung von 10.000-30.000 in der Erythrozytenmembran vorkommen.

Alle gezeigten Frequenzkurven sind unbearbeitete Rohdaten, es wurde keinerlei Glättung oder Driftkorrektur durchgeführt, da dies aufgrund der optimierten FIA-Anlage nicht mehr nötig war. Typisches Rauschen lag in der Größenordnung von 70-300 mHz, die Drift lag pro Stunde bei 3-10 Hertz.

4.4.1 Blutgruppe A

Ein mit Protein A- und Anti-A (BS 66) belegter Quarz wurde in die FIA eingebaut und NaCl/EDTA/TRIS-Puffer verwendet. Der pH-Wert lag bei 8.3, die Flussgeschwindigkeit bei 70 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vollblut wurde 1:200 verdünnt, das entspricht ca. 25.000 Erythrozyten/ μl . Am Anfang der Messung (s. Abb. 4.7) wurde Humanserum B zur

Blockierung der Oberfläche injiziert. Dies ist bei Verwendung von Vollblut nötig, da sich im Serum große Mengen an IgG-Antikörpern befinden, die noch an eventuell vorhandene freie Protein A-Andockstellen binden können. Mit 163 Hz Bindung zusätzlicher Antikörper zeigte sich aber, dass der Quarz gut belegt war, und im Vergleich zu den 5600 Hz an spezifischer Bindung ist dieser Effekt als gering einzustufen.

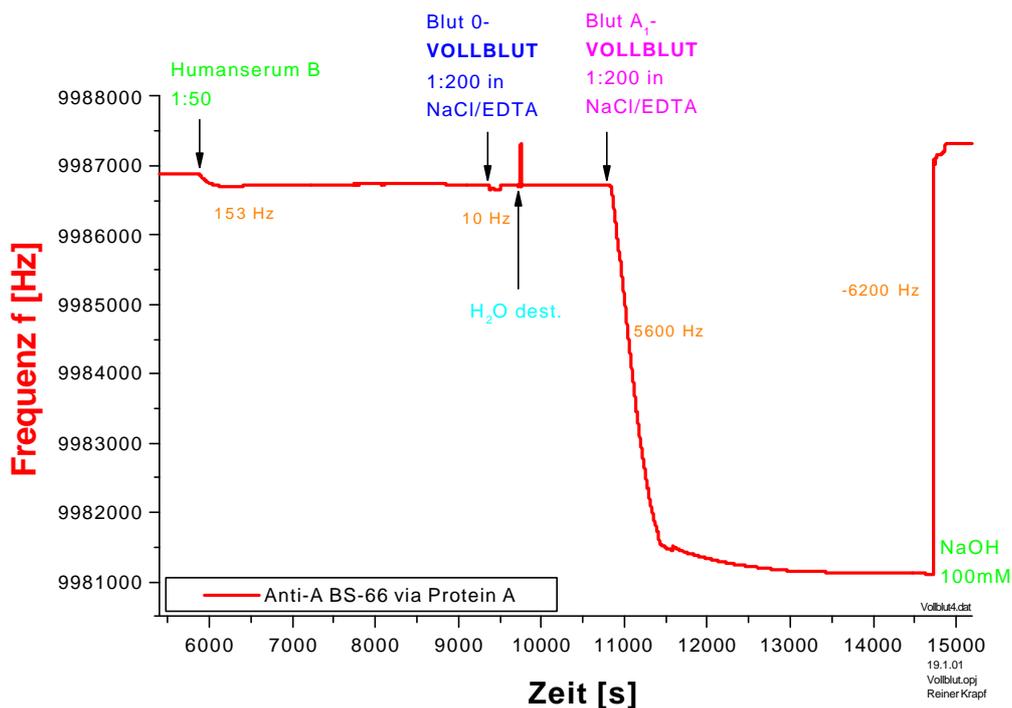


Abb. 4.7: Bestimmung der Blutgruppe A mit einem Anti-A-belegten Quarz. Unspezifische Wechselwirkungen (hier im Test mit Blutgruppe 0) sind praktisch nicht vorhanden

Die Negativprobe ergibt kaum ein Signal; nach einem viskositätsbedingten Abfall der Frequenz während der Injektion kehrt die Frequenzkurve bis auf 10 Hz wieder auf die Ausgangslinie zurück. Anschließend wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült, um eventuell festklebende Erythrozyten im Schlauchsystem oder in der Flusszelle durch Hämolyse (Aufplatzen) unschädlich zu machen [67]. Die darauffolgende Injektion der Analytlösung mit Blutgruppe A lässt die Frequenz in kurzer Zeit um 5600 Hz abfallen. Die Injektionen der Blutlösungen dauerten 10 Minuten. Betrachtet man im Fall der Blutgruppe A den Frequenzabfall, so ist die Frequenz nach einer Minute um 480 Hz, nach zwei Minuten um mehr als 1 kHz gesunken. Eine Injektionszeit von einer oder höchstens zwei Minuten reicht also vollkommen aus, um die Blutgruppen 0 und A

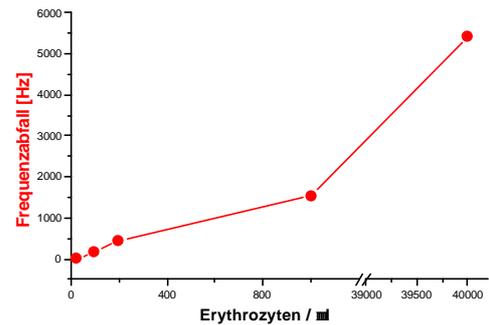
sicher voneinander unterscheiden zu können. Die anschließende Regeneration mit 100 mM NaOH löst Substanz entsprechend 6200 Hz ab. Diese Art der basischen Regeneration greift die Bindung zwischen Protein A und IgG-Antikörpern an und löst sie [90]. Damit sollte ein regenerierter Protein A-Quarz übrigbleiben. Zählt man die Frequenzen der Adsorption zusammen (Anti-A: ca. 400 Hz+HSB: 153 Hz+Blut 0: 10 Hz+Blut A: 5600 Hz = Gesamt 6163 Hz) und vergleicht sie mit der Ablösefrequenz (6200 Hz), so liegen diese Werte sehr nahe zusammen, sodass man die Regeneration als erfolgreich betrachten kann.

Wichtig ist in jedem Falle ein erhöhter pH-Wert des Puffers, der sich besonders bei bromelinbehandelten Erythrozyten auswirkt: Diese binden durch die zerstörte Glykokalix sehr unspezifisch an allen Oberflächen. Eine ungewollte Bindung lässt sich nur durch ein leicht basisches Umfeld verhindern (pH>8, maximal 8.8, s. Kap. 4.4.12). Vermutlich werden dadurch die Oberflächenladungen der Erythrozyten verändert (Hydrophilie nimmt zu). Eine Beeinträchtigung der Messungen durch den höheren pH-Wert, z.B. schlechtere Bindung von Proteinen oder Antikörpern oder unspezifische Effekte wurde während der ganzen Arbeit an keiner Stelle sichtbar, sodass bislang keine Nachteile dieser leicht unphysiologischen Messbedingungen eruiert werden konnten. Das Signalverhältnis von negativer zu positiver Probe beträgt in obiger Messung 1:560 und ist damit ein zuverlässiger Wert für den sensiblen Bereich der Blutanalytik, in dem Fehler in einer Analyse weitreichende Folgen haben können.

4.4.2 Konzentrationsreihen der Erythrozytensuspension

Obwohl bei dieser Art der Analytik ein linearer Konzentrations-Signalzusammenhang nicht erforderlich ist (es reicht prinzipiell eine ja/nein-Antwort), wurden Messungen durchgeführt, um die optimale Erythrozytenkonzentration für Messungen zu bestimmen (s. Tab. 4.6). Dabei wurde mit Vollblut der Blutgruppe A₂ gearbeitet.

Erythrozyten-Verdünnung	Df [Hz] Negativprobe 0	Df [Hz] Positivprobe A
1:25	50	5410
1:1.000	38	1540
1:5.000	8	440
1:10.000	0	170
1:40.000	0	15



Tab. 4.6: Zusammenhang zwischen Konzentration der Blutprobe und der erhaltenen Frequenzänderung. Die Stammprobe enthielt $1 \cdot 10^6$ Erythrozyten/ml

Es wurden mehrere Verdünnungen der Blutprobe (antikoaguliertes Vollblut) angefertigt (1:25 bis 1:40.000). Dabei zeigte sich, dass mit der Blutgruppe A₂ (und damit auch mit Blutgruppe B) eine Detektion von Blutverdünnungen bis 1:40.000 möglich sind. Das entspricht in der verwendeten FIA einem benötigtem Probevolumen von 50 nl für eine Hauptblutgruppenbestimmung (ABO). Bei kurzen Inkubationszeiten ist ein nichtlinearer Zusammenhang von Frequenz und Zellenkonzentration, besonders bei sehr hohen Erythrozytenkonzentrationen zu erkennen. Je höher die Erythrozytenkonzentration, desto „besser“ scheinen die Erythrozyten an die Antikörper binden zu können. Vermutlich tritt ab einer bestimmten Konzentration eine Quervernetzung der Erythrozyten ein, welche die Oberfläche rigider macht und dadurch höhere Frequenzen vortäuscht. Dies erscheint zusammen mit der in Kap. 4.3.3 gefundenen Oberflächenvergrößerung auch durchaus möglich (rauere Oberflächen mit „Tälern“ und „Bergen“ lassen eine mehrfache Bindung der Erythrozyten auch an der Seite zu, da IgGs zwei Fab-Fragmente haben). Die Vorstellung, es binde nicht nur eine Monolage, sondern die Erythrozyten würden sich bei hohen Konzentrationen in mehreren Schichten ablagern (Bi- oder Multilagen), konnte durch Mikroskopaufnahmen entkräftet werden. Es wurde nie mehr als eine Monolage gefunden.

Die sinnvolle Erythrozytenkonzentration bei einer Messung ist jedoch nicht von der erhaltenen maximalen „Frequenzausbeute“ abhängig, sondern vom Signalverhältnis negativer zu positiver Probe. Dieses wiederum ist von dem zu detektierenden Antigen und von einer Vorbehandlung der Erythrozyten abhängig. Bei Bromelinbehandlung zum Beispiel muss eine möglichst geringe Erythrozytensuspension verwendet werden,

weil die unspezifische Bindung erhöht ist. In dieser Arbeit wurde die Erythrozytenkonzentration an das analytische Problem angepasst und befand sich meist in einem Bereich zwischen 1:5 und 1:1000.

4.4.3 *Regeneration der Quarze*

Ein wichtiger Aspekt für ein Blutanalyse-System mittels Sensoren ist die Regeneration derselben: Nur so können die Kosten für einen Bluttest niedrig und die Analysezeiten kurz gehalten werden. Außerdem ist nur so eine vollständige Automatisierung der Anlage möglich.

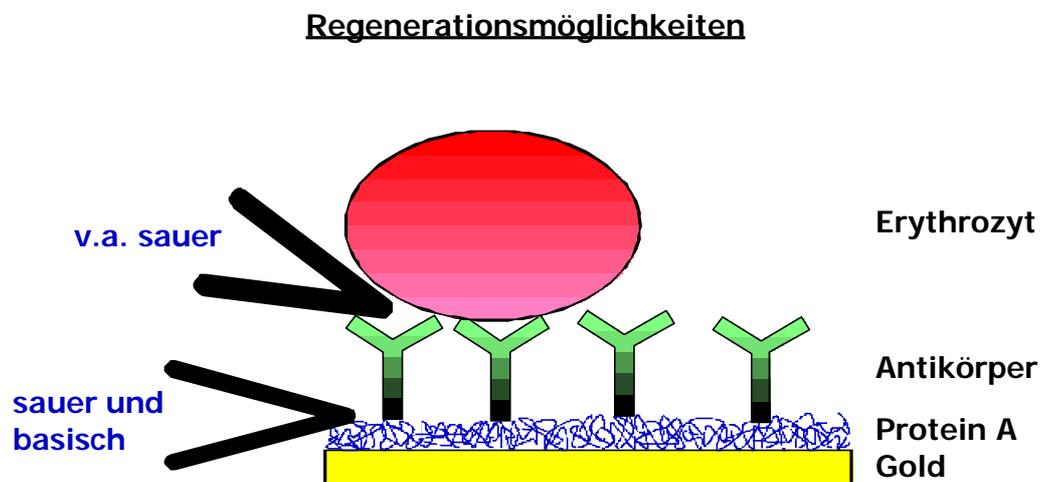


Abb. 4.8: Möglichkeiten der Regeneration eines Quarzes nach der Messung

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Regeneration: Entweder wird die Bindung *Erythrozyt-Antikörper* oder *Antikörper-Protein A* gelöst (s. Abb. 4.8). Ersteres hätte natürlich den Vorteil, dass die Sensoren nicht nach jeder Messung neu mit Antikörper belegt werden müssen; es ist aber fast unmöglich, diese Bindung (sauer) aufzuschließen, ohne die Bindung des Antikörpers zum Protein A zu lösen. Versuche mit Natrium-Acetat-Puffer (pH 3 und pH 5.5) sowie mit HCl (pH=1.5) führten nicht zum Erfolg. Daher wurde mit NaOH (10-100 mM) gearbeitet, was die Bindung des Antikörpers zum Protein A sehr schnell und praktisch vollständig löst (s. Abb. 4.7). Die Sensoren konnten bei einer Langzeitmessung ohne gravierenden Aktivitätsverlust 7 mal über 24 Stunden verteilt verwendet werden. Dies ist auch noch öfters möglich, aus technischen Gründen mussten die Messungen aber nach 24 Stunden abgebrochen werden (Sicherheitssperre in der Software). Die NaOH-Konzentration wurde bis auf

100 mM erhöht, wobei eine noch bessere Ablösung der Antikörper zu beobachten war. Während bei 10 mM NaOH ein zweiter Regenerationsschritt noch einmal eine leichte Frequenzabnahme bewirkte, ist dies bei 100 mM NaOH nicht der Fall.

Beachten sollte man aber, dass die in Kap. 4.2.5 gefundenen Ergebnisse anzeigen, dass sich bei dieser Regenerationstechnik, v.a. mit 100 mM NaOH, auch etwas Protein A ablöst. Dadurch kommt es bei der Neubelegung mit Antikörpern zu einer direkten Adsorption von Antikörpern auf die nun teils freie Goldoberfläche (welche aber keine Erythrozyten binden können, s. Kap. 4.1.4); daher resultiert wahrscheinlich auch der leichte Signalverlust, der nach den ersten beiden Messungen registriert wird (s. Tab. 4.7).

Messung Blut A	Frequenzabfall [Hz]
1	214
2	209
3	194
4	194

Tab. 4.7: Vier direkt aufeinanderfolgende Blutmessungen (Blutgruppe A) mit Regeneration durch 10 mM NaOH. Gezeigt ist der Frequenzabfall der Erythrozytenadsorption – diese Messung wurde allerdings in einer noch nicht optimierten FIA durchgeführt (niedrigere Absolutfrequenzen)

Eine Ablösung von Protein A durch NaOH wurde immer nur beim ersten Regenerationsschritt gefunden, was darauf hindeutet, dass ein kleiner Teil Protein A nur schwach gebunden hat. Ist er einmal entfernt, so löst sich kein weiteres Protein A mehr ab. Die optimale NaOH-Konzentration liegt zwischen 10 und 100 mM und muss auf das erforderliche analytische Problem abgestimmt werden: Bei Bestimmung der Hauptblutgruppe ABO kann mit sehr geringen Erythrozytenkonzentrationen gearbeitet werden (Vollblut in der Verdünnung 1:10.000 und weniger), sodass die Quarzoberfläche gar nicht vollständig belegt wird. Einige Testmessungen dieser Art zeigten, dass mehrere Messungen hintereinander möglich waren, ohne den Quarz zu regenerieren; erst danach war die Bindungskapazität der Beschichtung erschöpft und der Quarz konnte mit 15 mM NaOH regeneriert werden. Zum Beispiel binden A₂-Erythrozyten in der Blutverdünnung 1:20.000 mit 70 Hz an die Quarzoberfläche, eine

Negativprobe mit 0-Erythrozyten bei 1:20.000 ergibt hingegen überhaupt kein Signal. Wenn man davon ausgeht, dass der Frequenzabfall eines voll belegten Quarzes bei 5 kHz liegt (konservative Annahme), so könnten über 70 Messungen hintereinander stattfinden, bis die Oberfläche belegt wäre. Dies ist natürlich ein sehr theoretischer Wert, weil mit zunehmender Belegung die Konzentration von freien Antikörpern auf dem Quarz abnimmt (und damit die Wahrscheinlichkeit einer Bindung). Praktisch erreichbar sind schätzungsweise 10-20 Messungen ohne Regenerierung.

Anders sieht die Lage bei Rhesus-Messungen aus. Dort müssen höhere Blutkonzentrationen angewendet werden (1:25 bis 1:500), dadurch verringert sich die Zahl der Messungen ohne Regenerierung dementsprechend. Aber auch hier sind mehrere Regenerationszyklen mit NaOH möglich (analog zu den AB0-Messungen).

Ist keine weitere Regeneration möglich, kann der Quarz recycled werden. Einerseits kann man (z.B. durch heißes Piranha, s. *Kap.* 3.1.1) alle organischen Substanzen vom Gold ablösen; dies verläuft aber nicht hundertprozentig (s. *Kap.* 4.2.5) und kann wegen Veränderung der Oberfläche nicht oft wiederholt werden (3-4 mal, je nach Einwirkzeit in Piranha). Ein so gereinigter Quarz kann durchaus noch für Blutmessungen verwendet werden, die erhaltenen Frequenzen sind allerdings ca. 10% geringer als bei einem neuen Quarz. Andererseits kann man die Goldelektrode entfernen (z.B. mit heißer Salpetersäure/Salzsäure) und den Quarz neu mit Gold bedampfen.

4.4.4 Rhesusfaktor-Bestimmung mit Standardquarzen

Wie schon im vorigen Kapitel angedeutet, ist die Bestimmung des Rhesusfaktors (D-Antigen) mit höherem Aufwand verbunden als die Analyse im AB0-System. Erste Messungen schlugen fehl, weil die unspezifischen Wechselwirkungen zu groß waren (durch die verminderte Anzahl der D-Antigene pro Erythrozyt muss das Analytblut in höherer Konzentration vermessen werden als bei AB0-Messungen). Ein typischer Frequenzverlauf ist in *Abb.* 4.9 gezeigt. Hier wurde ein Quarz mit Protein A und dem Antikörper BS 221 belegt und Rhesus-negative Blutproben injiziert. Die anschließende Messung mit Rhesus-positiv-Blut rief keine spezifische Bindung mehr hervor:

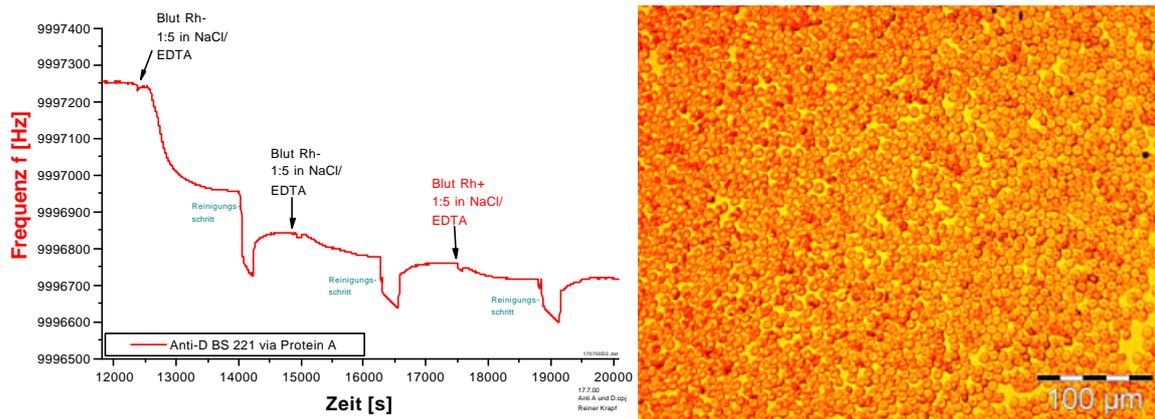


Abb. 4.9: Erhaltene Kurve bei „normaler“ Rhesus-Bestimmung. Die unspezifischen Wechselwirkungen sind größer als die spezifische Bindung (rechts: Mikroskopaufnahme des Quarzes der Rhesus-Messung (links), Vergrößerung 20x)

Wenn man auf einen frisch belegten Quarz direkt Rhesus-positives Blut einspritzt, so liegt der erhaltene Frequenzabfall in der selben Größenordnung wie die in Abb. 4.9 gezeigte erste Rhesus-negative Antwort. Des weiteren wurden noch Versuche unternommen, mit Albumin- oder Reaktionsverstärker-Zusätzen (1:1) [58] die Agglutination zu fördern; diese Ansätze brachten aber keine Verbesserungen.

Eine Bestimmung des Rhesusfaktors ist mit dem bisher vorgestellten Ansatz nicht möglich.

4.4.5 Das Rhesus-Antigen D

Schaut man sich die sterischen Verhältnisse in der Region des Rhesus-Antigens auf der Erythrozytenoberfläche an, so versteht man, warum keine Anbindung an auf Festphasen gebundene IgG-Antikörper stattfindet. Wie schon im Theorie-Kapitel 2.8 erläutert, ist Rhesus ein Membranantigen und nicht wie die A- und B-Antigene außerhalb der Membran lokalisiert (s. Abb. 4.10) [83,91]. D ist ein Membranprotein der Masse 30-32 kDa, das die Erythrozytenmembran mehrmals durchdringt und außerhalb der Membran an 6 Stellen auftritt und somit für Antikörper zugänglich ist. Allerdings ist durch diese Topografie das D-Antigen nur schlecht zugänglich, es ist also mit sterischen Behinderungen bei der Detektion zu rechnen.

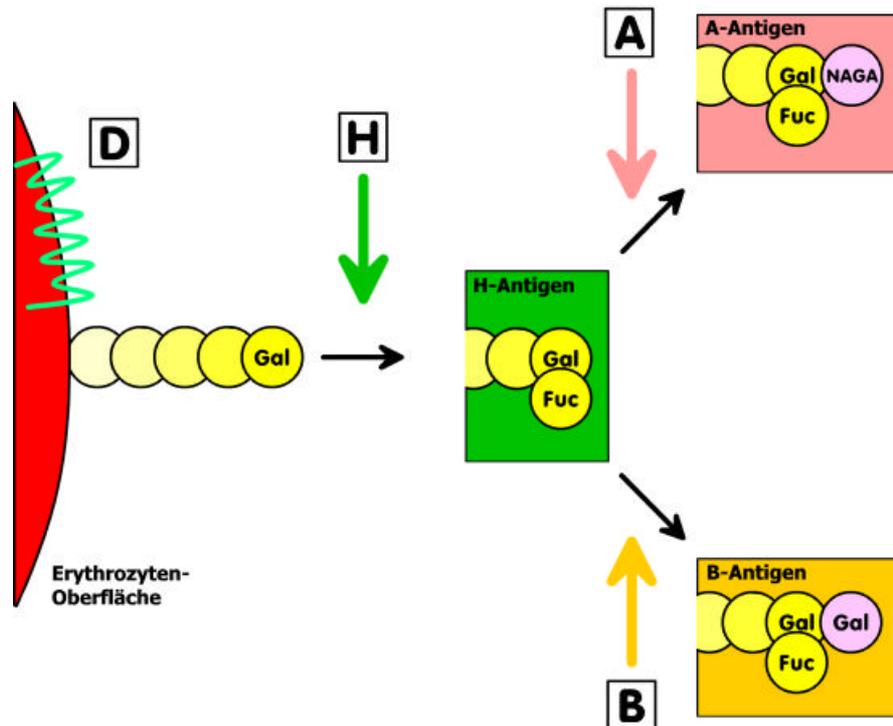


Abb. 4.10: Antigene D sowie H („0“-Antigen), A und B auf der Erythrozytenmembran [60]

Wie schon in *Abb. 2.16* angedeutet, besitzt die Erythrozytenmembran einen negativ geladenen „Abstandshalter“ (Glykokalix) aus Proteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden, der in einer Höhe von 12.5 nm über die Membran herausragt (hydrophile Anteile) und eine Agglutination innerhalb des Blutkreislaufes oder eine Adsorption an die Arterien- und Venenwand verhindert [83]. Zieht man zum Vergleich die sterischen Verhältnisse von IgG- und IgM-Antikörpern (*Abb. 2.19*) hinzu (IgG: 8.5 nm, IgM: ca. 30 nm), so wird verständlich, dass IgGs, die an einen Quarz gekoppelt sind, durch die Glykokalix nicht bis zum Membranprotein D vordringen können.

Um dieses Problem zu lösen, gibt es auf den ersten Blick drei Möglichkeiten:

- Entfernung der Glykokalix
- Doppel-IgG-Beschichtung (Sandwich, $2 \cdot 8.5 = 17$ nm)
- IgM-Beschichtung (30-39 nm)

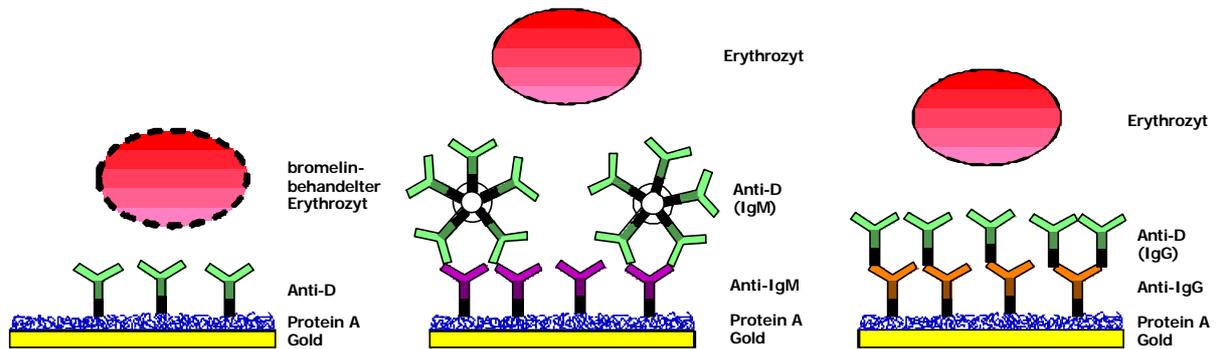


Abb. 4.11: Verschiedene Ansätze zur optimierten Rhesusfaktor-Bestimmung: Bromelinbehandlung des Blutes bei Standardbeschichtung (links), IgM-beschichteter Quarz (Mitte) und IgG-Sandwich-Beschichtung (rechts)

Alle drei Verfahren wurden untersucht, eine weitere auf Druckpulsen basierende Methode wird in Kapitel 4.4.9 beschrieben.

4.4.6 Rhesus-Bestimmung durch Entfernung der Glykokalix

Die Glykokalix eines Erythrozyten kann mit proteolytischen Enzymen, z.B. Bromelin aus der Ananas oder Papain aus der Papaya, entfernt werden [89]. Dieses Verfahren wird oft in Routinemessungen von Labors und Blutspendezentralen angewandt, um eindeutigere Signale zu erhalten (dort allerdings meist mit optischen Messtechnologien). Die Anwendung ist denkbar einfach: Zur Blutprobe wird etwas Enzym gegeben, 10-20 Minuten bei 37°C inkubiert, und dann kann die Messung gestartet werden. Bei Papain ist allerdings meist ein Waschschriff nötig, da Papain auch Antikörper zersetzen kann. Deshalb wurde in dieser Arbeit ausschließlich Bromelin verwendet. Durch die Entfernung des Erythrozyten-„Abstandhalters“ nimmt die Adhäsion der Zellen untereinander und an Schläuche und Ventile zu. Dies kann zu ungewünschten unspezifischen Wechselwirkungen führen, da eine ungerichtete Adhäsion am Quarz stattfindet (Frequenzabnahmen von mehreren Kilohertz bei Negativ-Proben). Aber auch hier wirkt die pH-Methode: Durch erhöhten pH-Wert von >8 nimmt die Adhäsion stark ab. Zur Unterstützung wurden im Puffer Tenside beigemischt (Tween), die einen besseren Fluss in der FIA ermöglichen.

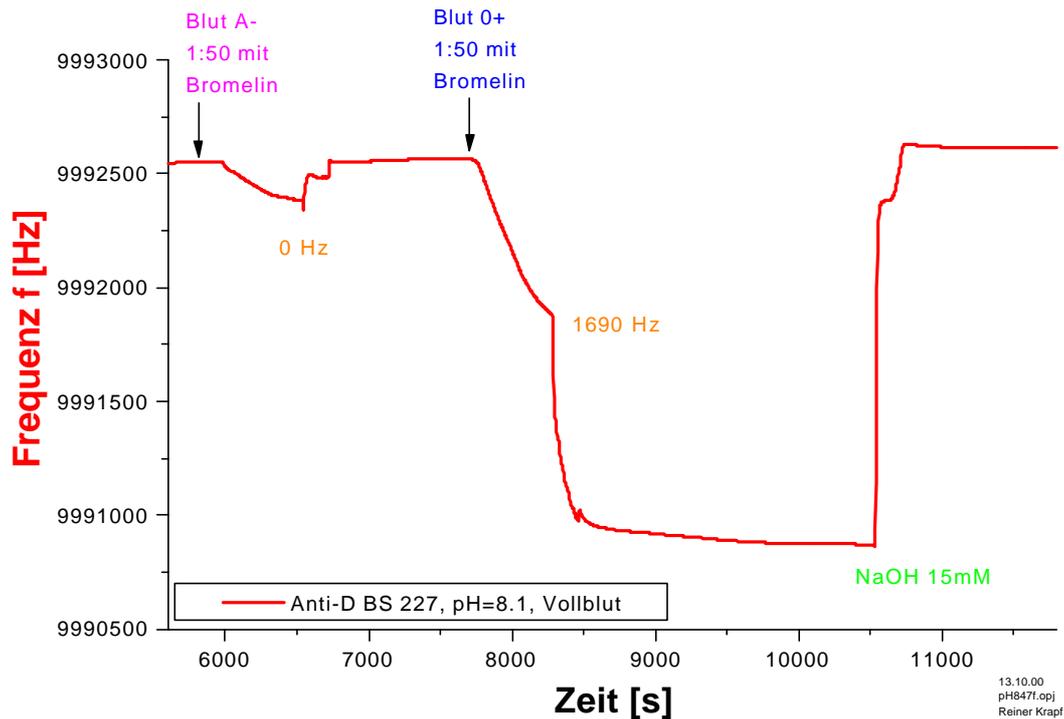


Abb. 4.12: Rhesusfaktorbestimmung mit Bromelin-Vorbehandlung der Vollblutprobe

Wie aus *Abb. 4.11* ersichtlich ist, funktioniert die Messung nun einwandfrei, unspezifische Wechselwirkungen sind eliminiert. Die spezifische Anlagerung von Zellen an den Anti-D-beschichteten Quarz ist aufgrund der drastisch geringeren Anzahl von Antigenen auf der Erythrozytenoberfläche weniger stark ausgeprägt (ca. 1700 Hz) als bei den Messungen zur Blutgruppe A (>5600 Hz). Trotzdem ist eine eindeutige und rasche Bestimmung des Rhesusfaktors möglich. Der steile Abfall der Kurve bei 8400 Sekunden beruht auf Druckeffekten, denn hier wurde die Pumpe zum Spülen der Zelle auf Maximallast geschaltet (wie auch bei 6600 Sekunden - weitere Erklärungen zu Druckeffekten siehe *Kap. 4.4.9*).

4.4.7 Rhesus-Bestimmung mit Doppel-IgG-Beschichtung

Der zweite Ansatz zur Umgehung sterischer Probleme bei der Zugänglichkeit des Rhesus-Antigens durch die kleinen IgG-Antikörper beruht auf einer doppelten IgG-Beschichtung (Sandwich) [90]. Dadurch wird die Reichweite der Antikörper in Richtung der Lösung verdoppelt. An der Grundbeschichtung des Quarzes ändert sich dabei nichts, es wird erst Protein A angekoppelt und danach der IgG-Antikörper. Dies ist jedoch in diesem Falle nicht der Blutgruppenantikörper, sondern ein gegen das

humane Fc-Fragment gerichteter Anti-IgG-Antikörper. Als dritter Schritt wird das eigentliche Anti-Rhesus-IgG (human) hinzugefügt. Es wurden Messungen mit Vollblut als Analyt durchgeführt (s. Abb. 4.13).

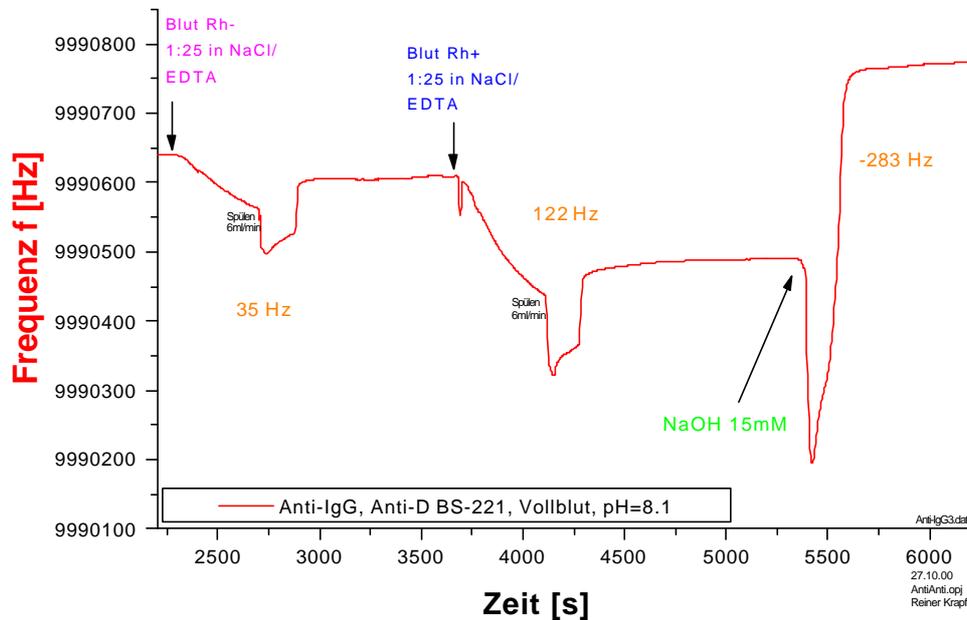


Abb. 4.13: Messungen mit einem Doppel-IgG-Quarz (Sandwich) zur Rhesus-Detektion

Im Gegensatz zur einfachen IgG-Beschichtung kann man hier nun deutlich zwischen negativer und positiver Probe unterscheiden. Verwendet man bromelinbehandeltes Vollblut, so wird der Unterschied noch deutlicher: 65 Hz unspez. Bindung stehen 1165 Hz an spezifischer Bindung gegenüber.

Eine Sandwich-Beschichtung ist bei Schwingquarzen im Allgemeinen aus zwei Gründen nicht so sensitiv wie eine Einfachbeschichtung: Einerseits ist die Quarzoberfläche nicht so dicht mit spezifischen Antikörpern belegt (2 Belegungsschritte verlaufen selten vollständig, ein ähnliches Problem wie bei Verwendung von Thiolen anstatt Protein A), andererseits nimmt mit steigendem z-Abstand (je weiter man sich von der Goldelektrode in die Lösung entfernt) die Quarzsensitivität ab (s. Kap. 2.3). Die Methode könnte sicherlich noch verbessert werden, indem eine höhere Konzentration der Anti-IgG-Antikörper verwendet wird. Leider geben viele Hersteller kommerzieller Anti-IgG-Lösungen verschiedene, nicht miteinander vergleichbare

Konzentrationsangaben an (z.B. den Titer, dem man keine absolute Konzentration in mg Substanz/ml Lösung zuordnen kann).

4.4.8 Rhesus-Bestimmung mit IgM-Beschichtung

Die dritte Methode zu einem erfolgversprechenden Rhesus-Nachweis führt über eine Doppelbeschichtung mit IgM [53,59]. Das Problem an IgM ist, dass es von Protein A nicht festgehalten wird. Daher muss ein IgG zum Einsatz kommen, das IgM binden kann (Anti-IgM). Die Belegung erfolgte analog zur Doppel-IgG-Beschichtung. Immunglobulin M besitzt 5 Antigen-Bindungsstellen und sollte durch seine Größe in der Lage sein, bis zum D-Antigen in der Erythrozytenmembran durchzudringen.

Zuerst wurde betrachtet, ob die Bindung Anti-IgM – IgM erfolgreich verläuft (s. Abb. 4.14).

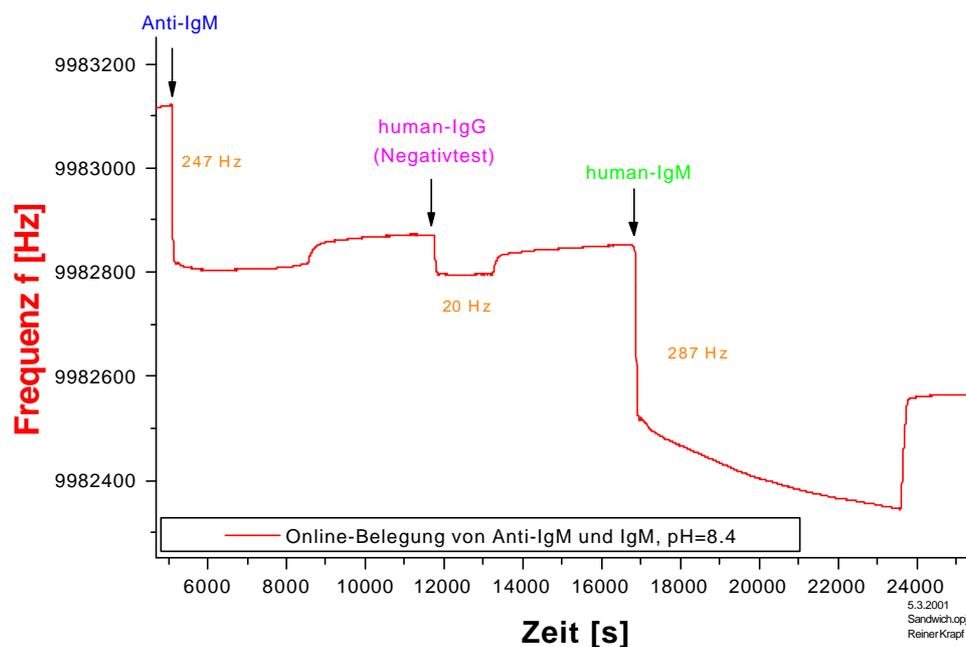


Abb. 4.14: Online-Belegung eines Protein A-beschichteten Quarzes mit Anti-IgM und anschließend mit IgM

In die FIA wurde ein Protein A-beschichteter Quarz eingebaut und Anti-IgM (ist selbst ein IgG) injiziert. Dies ergab einen Frequenzabfall von ca. 250 Hz. Danach wurde IgG (BS 229) eingespritzt um zu sehen, ob die Protein A-Oberfläche bereits belegt oder ob das Anti-IgM nicht konzentriert genug war. Bis auf kleine Stellen (20 Hz) scheint die Quarzoberfläche vollständig belegt gewesen zu sein. Anschließend hinzugegebenes

IgM wurde mit 287 Hz angebunden, was angesichts einer Sandwich-Doppelbelegung einen guten Wert darstellt. Allerdings darf man nicht vergessen, dass das Molekulargewicht von IgM (ca. 970) ein Vielfaches von IgG (ca. 146) beträgt; damit relativiert sich dieses Ergebnis. Die nachfolgende Messung mit Vollblut verlief erfolgreich (s. Abb. 4.15).

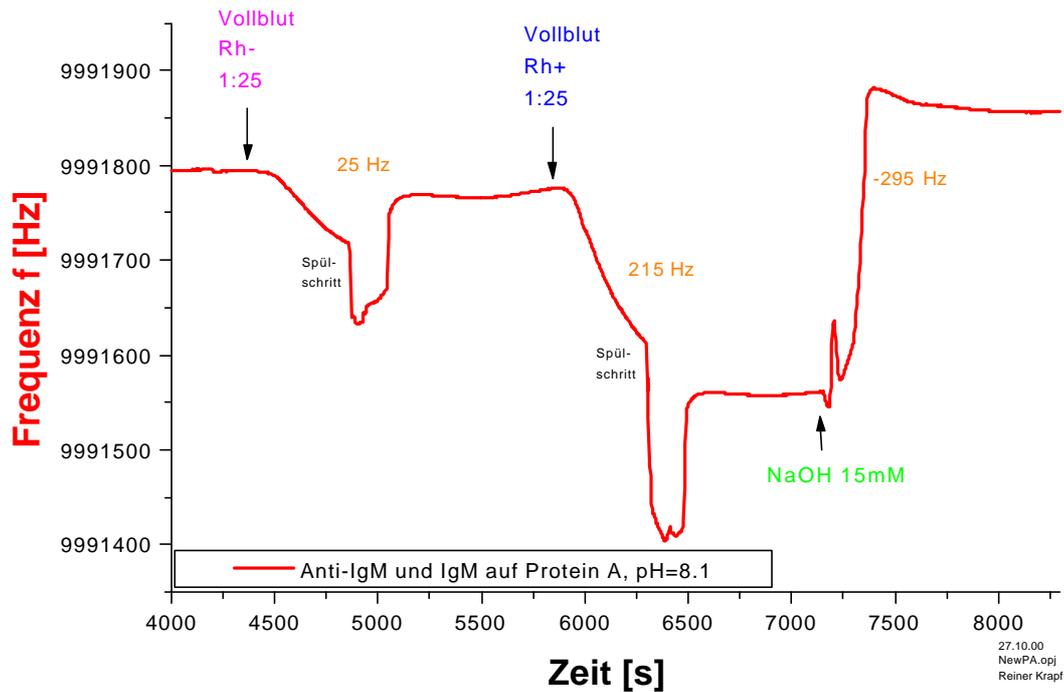


Abb. 4.15: Erfolgreiche Rhesus-Bestimmung mit einer Anti-IgM / IgM-Beschichtung

Unspezifischen Wechselwirkungen von 25 Hz stehen 215 Hz bei positiver Bindung gegenüber, was im Vergleich zur Doppel-IgG-Beschichtung eindeutig besser ist. Auch hier ist also eine Rhesus-Bestimmung mit unbehandeltem Vollblut möglich.

4.4.9 Rhesus-Bestimmung mit Druckpulsen

Bei den vorangegangenen Messungen wurde meist mit gleichmäßigem Pufferfluss gearbeitet (70 $\mu\text{l}/\text{min}$ bzw. 81 $\mu\text{l}/\text{min}$), wobei nach 3 Minuten Probeninjektion die Pumpen für mehrere Minuten abgeschaltet wurden (stopped flow), um genügend Zeit für die Antikörper-Erythrozyten-Bindung zur Verfügung zu stellen. Anschließend wurde die Flusspumpe auf Maximallast gestellt (6 ml/min), um ungebundene Erythrozyten aus dem Schlauchsystem und der Messzelle zu entfernen. Dabei konnte beobachtet werden, dass während diesem Spülschritt oftmals eine weitere Ankopplung von

Erythrozyten auf die Quarzoberfläche stattfindet. Dies lässt sich mit dem enormen kurzzeitigen Druckpuls erklären, der in der gesamten Anlage beim Einschalten der Pumpen auftritt und dadurch die Erythrozyten in der Nähe der Elektrode an die Antikörperbeschichtung heranpresst. Er wirkt somit bindungsverstärkend ähnlich der Zentrifugation, die in der klassischen Erythrozytenserologie eingesetzt wird.

Ausgehend von diesem Effekt wurde die Idee näher verfolgt, ob nicht doch eine Rhesus-Bestimmung mit der IgG-Standardbeschichtung stattfinden kann, wenn man diesen Druckpuls ausübt und damit das Rhesus-Membranantigen kurzzeitig an die immobilisierten Antikörper heranpresst (s. Abb. 4.16):

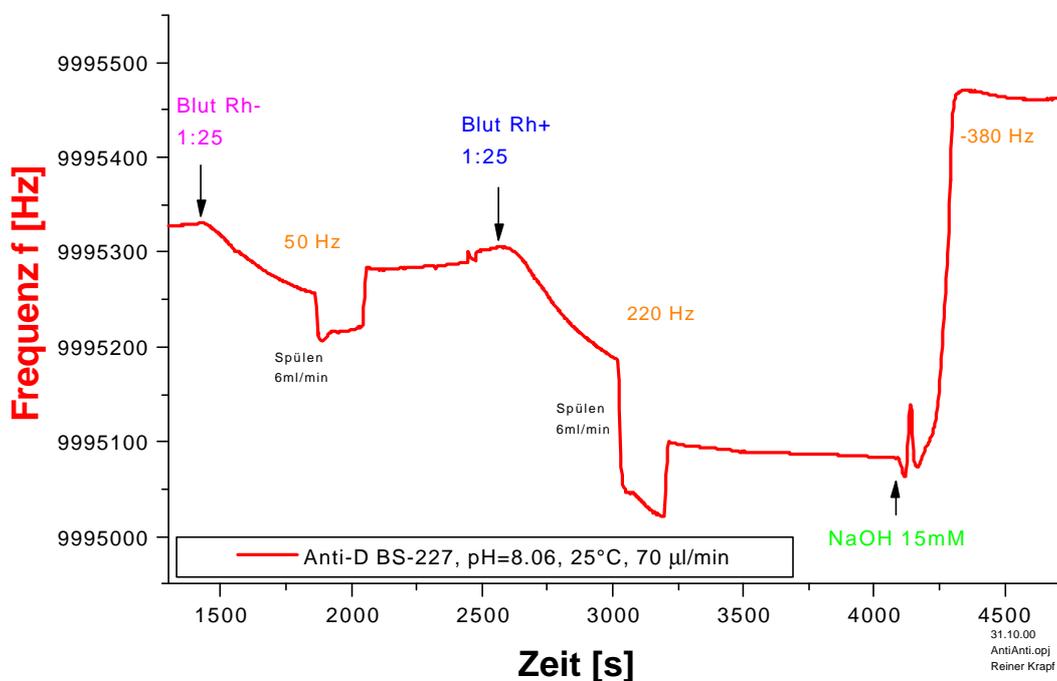


Abb. 4.16: Rhesus-Bestimmung mit der Druckmethode. Es wurde ein Standard-Quarz mit Protein A / IgG-Beschichtung und unbehandeltes Vollblut verwendet

Wie vermutet, werden beim Spülvorgang die Erythrozyten aus der Messzelle entfernt, wobei die Frequenz im Falle der unspezifischen Bindung (1800 Sekunden) nach dem Spülvorgang höher liegt als vorher (schwach adsorbierte Zellen werden vom Quarz gewegewaschen), im Falle der spezifischen Bindung jedoch deutlich tiefer liegt. Hier haben also noch zusätzliche Zellen gebunden; eine Detektion des Rhesusfaktors mit unbehandeltem Blut wird mit dieser Druckmethode problemlos möglich.

Bei solchen stopped-flow-Messungen ist eigentlich zu befürchten, dass sich z.B. bei einer Bindungszeit von 10 oder 20 Minuten ohne Fluss Erythrozyten auf der Quarzoberfläche durch die Schwerkraft „ablegen“ und so zu einem unspezifischen Frequenzabfall führen (Prinzip der Mikrowägung). Dies ist aber kaum der Fall. Am Beispiel der Messung aus *Abb. 4.7* kann gezeigt werden, dass 10 Minuten nach der Blutinjektion (Injektion → 2 Minuten Fluss, damit die Zelle vollständig mit Analyt gefüllt ist → 8 Minuten ohne Fluss → dann Spülen) vor dem Spülen nur 5 Hz an Signal bei der Negativprobe anfällt, bei der spezifischen Probe jedoch 5000 Hz. Viele weitere Messungen bestätigen dieses Ergebnis und als Erklärung bietet sich die Art des Schwingverhaltens eines AT-geschnittenen Quarzes an: Er schwingt in der Ebene (s. *Abb. 2.6*) und nicht nach oben und unten. Bei einer biologischen Beschichtung mit Protein A und Antikörpern können die Erythrozyten aufgrund ihrer Trägheit nicht mitschwingen, wenn sie nicht fest angebunden sind.

Dadurch wird ein Quarzsensoren auch zu einem Sensor für die Bindungsstärke: Es konnte bei verschiedenen Anti-D-Antikörpern ein unterschiedliches Verhalten beim Spülvorgang beobachtet werden: Je avider der Antikörper, desto mehr Frequenzgewinn wird durch die Druckmethode erhalten. Aber auch die Steilheit des Frequenzabfalls während der stopped-flow-Phase liefert Aufschlüsse über die Stärke der Bindung, die meist mit der Kinetik des Bindungsvorganges übereinstimmt. Bei einer langsamen Bindungskinetik konnte anschließend weniger Frequenzgewinn durch den Spülvorgang erhalten werden als bei einem schnelleren Abfallen der Bindungskurve. Ein Vergleich der verschiedenen Anti-D-Antikörper findet sich im nächsten Kapitel.

4.4.10 Verschiedene Antikörper im Vergleich

Zur Rhesusfaktor-Bestimmung standen 5 verschiedene Antikörper zur Verfügung. Sie wurden als Standardbeschichtung (Protein A – IgG) mit bromelinbehandeltem Blut bei identischem Puffer, pH und gleichen Flussparametern miteinander verglichen. Dabei wurde Vollblut der Verdünnung 1:50 im stopped flow (Inkubationszeit 10 Minuten) verwendet (s. *Tab. 4.6*). Durch Verwendung eines anderen Puffers ist diese Messreihe

nicht mit der Messung aus Kap. 4.4.6 vergleichbar, dadurch entstehen beim Antikörper BS 227 andere Werte.

Verwendeter Antikörper (Fa. Biotest)	Unspezifische Wechselwirkungen (Rh -) [Hz]	Spezifische Wechselwirkungen (Rh +) [Hz]	Titer
BS 221	0	1065	4096
BS 227	210	480	8192
BS 228	325	1125	2048
BS 229	380	555	4096
BS 231	25	790	4096

Tab. 4.8: Vergleich verschiedener Rhesus-Antikörper mit bromelinbehandeltem Vollblut in einem Flusspuffer mit pH=8.28

Wie man sieht, scheint der Antikörper BS 221 die besten Eigenschaften zu besitzen (keine unspezifischen Wechselwirkungen, großes spezifisches Signal). Allerdings sind solche Vergleichsmessungen schwierig zu interpretieren, weil die Parameter der Messung eigentlich für jeden verwendeten Antikörper einzeln angepasst werden müssen (v.a. pH-Wert, Bromelinisierungszeit usw.). In dieser Arbeit wurden aufgrund von vielen Vergleichsmessungen meist die Antikörper BS 221 und BS 227 verwendet, da sie die besten Ergebnisse hinsichtlich Spezifität und Signalintensität erbrachten.

Die Bestimmung des Titers wurde von Dr. Weinstock (Transfusionsmedizin der Uniklinik Tübingen) durchgeführt. Dabei werden die Antikörperlösungen immer wieder 1:1 mit Puffer verdünnt, bis sie keine spezifische Reaktion (Agglutination der Erythrozyten im Reagenzglas) mehr zeigen. Ein hoher Titer spricht also für eine konzentrierte Antikörperlösung. Der Titer des Anti-A-Antikörpers BS 66 betrug 256.

4.4.11 Schwache Rhesus-Proben (D^{weak})

Von besonderer Bedeutung für die Diagnostik im Routinebetrieb ist unter anderem die Erkennung sogenannter schwacher Rhesus-Antigene D^{weak} [58,91]. Diese werden bei einigen Standardverfahren nicht gefunden und können bei einem Rhesus-negativen Blutkonservenempfänger Komplikationen hervorrufen. Darum wurde untersucht, ob und mit welcher Beschichtung eine extrem schwache D^{weak} -Probe im Quarzsystem

detektiert werden kann. Dabei zeigte sich, dass keine der bisher entwickelten Beschichtungen alleine in der Lage war, D^{weak} von Rhesus negativ unterscheiden zu können. Benutzt man hingegen ein spezielles, standardisierbares Messprogramm, so kann man durchaus Unterschiede erkennen (s. Abb. 4.17):

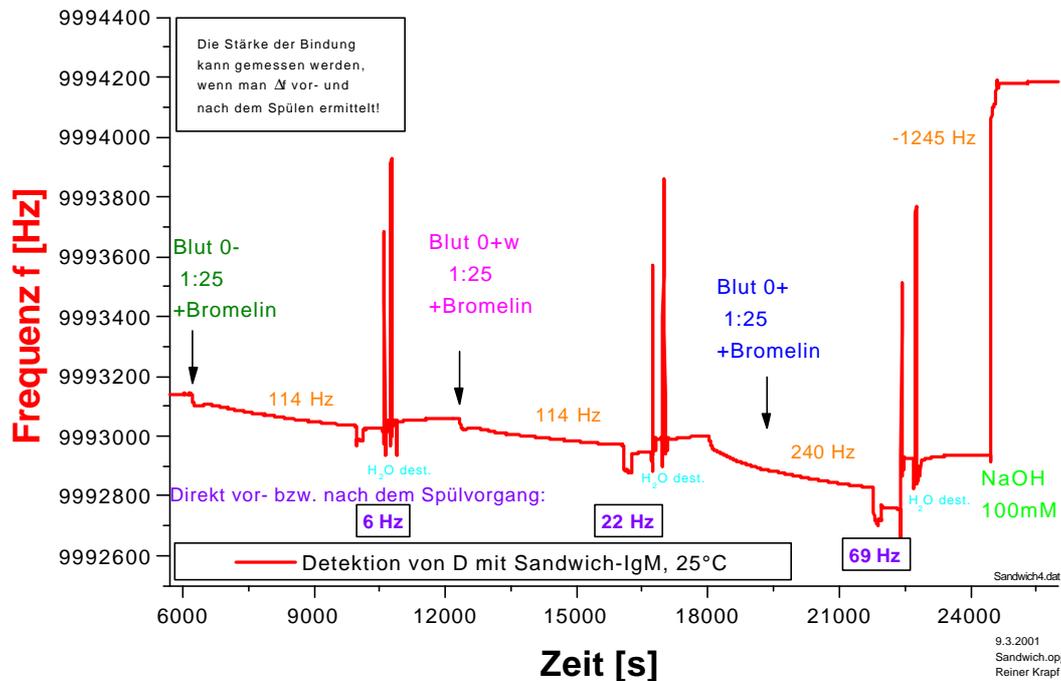


Abb. 4.17: Detektion auch schwacher Rhesus-Antigene durch die Druckmethode. Die Frequenzdifferenz vor bzw. nach dem Spülschritt zeigt die Stärke der Bindung an

Die „ganz normale“ Adsorptionsphase wird gar nicht betrachtet, denn die Ergebnisse hier sind nicht eindeutig und können nicht für einen D^{weak} -Nachweis genutzt werden.

Der Ablauf der Messungen ist folgender: Ähnlich der Druckmethode (s. Kap. 4.4.9) wird Blut injiziert, es folgt eine stopped-flow-Phase und anschließend ein Spülschritt. Dieser Spülschritt ist entscheidend: Unspezifisch bindende Erythrozyten werden dadurch eher weggespült, stark gebundene Erythrozyten bilden aber wie bei der Druckmethode einen zusätzliche Bindungseffekt aus. Es zeigte sich, dass bei Rhesus negativem Blut 6 Hz zusätzlich binden (unspezifische Bindung), bei D^{weak} -Blut 22 Hz und das stark bindende Rhesus positive Blut mit 69 Hz noch einmal an Frequenz zulegt. Das bedeutet, dass man jetzt nicht nur ja/nein-Informationen über die

Spezifität erhalten kann, sondern durch den Spülschritt auch noch Angaben über die Stärke der Bindung bekommt.

4.4.12 Einfluss des pH-Werts auf die Blutmessungen

Wie bereits mehrfach angedeutet, ist der pH-Wert des Puffers eine zentrale Größe bei der Blutanalytik mit Schwingquarzen. Dies kristallisierte sich durch viele unbrauchbare Blutmessungen mit PBS als Puffer (pH=7.4) heraus. Ohne am System etwas zu ändern, unterdrückt die Erhöhung des pH-Werts wirkungsvoll unspezifische Wechselwirkungen. Dies wurde durch zwei Vergleichsmessungen bestätigt, bei denen jeweils dieselbe Blutprobe (A₂) mit demselben Puffer vermessen wurde, bei der zweiten Messung aber nachträglich durch weitere TRIS-Zugabe der pH-Wert von 7.90 auf 8.20 erhöht wurde:

- pH 7.90: Negativprobe: 277 Hz Positivprobe: 5565 Hz
- pH 8.20: Negativprobe: 50 Hz Positivprobe: 5410 Hz

Die Positivproben brachten innerhalb der Reproduzierbarkeitsgrenzen fast dieselben Ergebnisse, während die Negativprobe bei pH=8.20 weniger als ein fünftel der unspezifischen Wechselwirkungen anzeigte wie bei pH=7.90. Bei pH=7.4 können unspezifische Wechselwirkungen, v.a. bei bromelinbehandelten Zellen, mehrere Kilohertz betragen. Daher sollte auf einen pH-Wert über 8 geachtet werden, v.a. bei der Bestimmung des Rhesusfaktors. Elektrostatische Veränderungen (Umladung von Carboxylresten in der Glykokalix der Erythrozytenmembran) verursachen vermutlich diesen Effekt, wobei nie negative Auswirkungen auf die Sicherheit bei Blutanalysen beobachtet wurden (falsch positive oder falsch negative Ergebnisse).

4.5 Sensitivität des Quarzsystems

Durch eine Blutmessung mit einem Anti-A-belegten Quarz und relativ konzentriertem A₁-Blut (1:25 verdünnt) wurde der Frequenzabfall ermittelt, anschließend der Quarz ausgebaut und mikroskopisch betrachtet. Die Belegung der Oberfläche war praktisch vollständig und wurde durch Auszählen der Zellen pro μm Quarzoberfläche ermittelt.

Korreliert man diese Werte miteinander, so erhält man die Sensitivität des Quarzes. Folgende Werte wurden ermittelt:

- Zellenanzahl: pro 100 μm -Kante: 14 Zellen \rightarrow 19.600 Zellen/ mm^2
- Quarzoberfläche: $\varnothing=5$ mm, $r=2.5$ mm \rightarrow $A=20$ mm^2
- Zellen auf dem Quarz: \rightarrow $n=392.000$ Zellen
- Gemessener Frequenzabfall: \rightarrow $\Delta f=6100$ Hz
- Erythrozytenvolumen MCV \rightarrow $V=90$ μm^3
- Dichte eines Erythrozyten \rightarrow $d=1.1$ $\text{pg}/\mu\text{l}^3$
- Gewicht eine Erythrozyten \rightarrow $m=100$ pg

Daraus ergeben sich die Zusammenhänge:

1 Hz = 64 Zellen	1 Zelle = 15.6 mHz
1 Hz = 6.4 ng	1 ng = 156 mHz

Nimmt man an, dass bei dieser Art von Messung eine Frequenzverschiebung von 10 Hz ausreicht (rein technisch ist dies problemlos möglich), um ein positives von einem negativen Signal zu unterscheiden, so kommt man auf eine Detektionsgrenze von 640 adsorbierten Zellen, das entspricht einer Oberflächenbeladung von nur ca. 0.16 %. Dies ist jedoch eine sehr theoretische Annahme, im realen Einsatz sollte bei einer Messung mit Zellen sicherheitshalber mit 100 Hz Frequenzverschiebung (6400 Zellen) gerechnet werden. Dies würde eine Belegung der Quarzoberfläche von nur 1.6 % voraussetzen, was ein sehr guter Wert ist. Es sollte somit möglich sein, auch nur schwach bindende oder leichtere Antigene (z.B. Proteine oder Antikörper) mit der Schwingquarztechnologie zu erfassen.

Die Frage ist, inwieweit sich diese theoretische Vorhersage der Empfindlichkeit praktisch umsetzen lässt. In Kap. 4.4.2 konnte für A_2 -Blut der Verdünnung 1:40.000 (das sind 25 Zellen/ μl) ein Frequenzabfall von 25 Hz erhalten werden. Injiziert wurden 210 μl an Blutprobe, also 5250 Zellen, wobei durch das stopped-flow-Verfahren nicht alle Erythrozyten die Messzelle erreichen, einiges verbleibt im Schlauchsystem. Durch

zwei Minuten Injektion bei 70 $\mu\text{l}/\text{min}$ und anschließendem Stopp der Pumpen können maximal 3500 Zellen die Quarzoberfläche erreichen - das wären dann 140 Erythrozyten/Hz. Vergleicht man diesen Wert mit den oben ermittelten 64 Zellen/Hz, so kann man eine recht gute Übereinstimmung feststellen. Die Differenz kann durch die Verwendung von A₂-Blut anstatt von A₁-Blut wie im obigen Fall erklärt werden. Die theoretisch vorhergesagte Empfindlichkeit kann also auch in der Praxis erreicht werden.

4.6 Nachweis von Proteinen

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Rammensee (Universität Tübingen) sollten erste Pilotversuche unternommen werden, ob sich mit einem Protein A – Antikörper-belegten Quarz auch Proteine detektieren lassen.

Das Hitzeschockprotein GP96 (96 kD) soll mit einem SingleChain-Antikörper [59] quantitativ bestimmt werden. Diese Art von Antikörper besitzt nur ein Fab-Fragment und kann durch das fehlende Fc-Fragment nicht an Protein A binden. Im Idealfall sollte eine Detektion im Blut, Abstrich oder Wundflüssigkeit möglich gemacht werden. Die erforderliche (geschätzte) Sensitivität des Tests (Nachweisgrenze) sollte im unteren Mikrogrammbereich (1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) liegen. Da SingleChain-Antikörper nicht direkt an Protein A ankoppeln kann, musste eine Sandwichbelegung verwendet werden. Der verwendete SingleChain-Antikörper ist ein rekombinantes Konstrukt, welches an seinem unteren Ende ein Cmyc eingebaut hat und so durch ein anti-Cmyc festgehalten werden kann. Folgende Belegungsvorschrift wurde verwendet:

Die gereinigten Quarze werden mit einer Protein A – Lösung (50 μl) eine Stunde lang belegt. Danach wird mit H₂O dest. gewaschen, getrocknet und mit IgG-Antikörper inkubiert (auch etwa eine Stunde lang). Hier wurde der anti-Cmyc-Antikörper 9E10 (0.93 mg/ml, 50 μl) verwendet. Anschließend wurde für 1 Stunde der SingleChain-Antikörper anti-GP96 (Klon B10C, 2mg/ml, 50 μl) inkubiert, gewaschen und getrocknet.

Nach Belegung des Quarzes wurde eine Lösung von 100 µg/ml (Stammlösung 1:10 in Puffer verdünnt) injiziert (s. *Abb. 4.17*), nach 3 Minuten die Pumpe abgeschaltet und 15 Minuten stehen lassen. Nach Inbetriebnahme der Pumpe und Stabilisierung der Frequenz war ein Frequenzabfall von 6 Hz festzustellen. Dies ist nicht sehr viel, ist aber auf eine Massenzunahme auf der Quarzoberfläche zurückzuführen. Da der Quarz innerhalb von 15 Minuten eine Drift von 5 Hz aufweist (siehe nachfolgender Pumpentest; die Drift kam durch unzureichende Thermostatisierung zustande, die Außentemperatur lag über 30°C, was der Thermostat nur schlecht ausgleichen konnte), kann man ca. 10 Hz spezifische oder unspezifische Bindung detektieren.

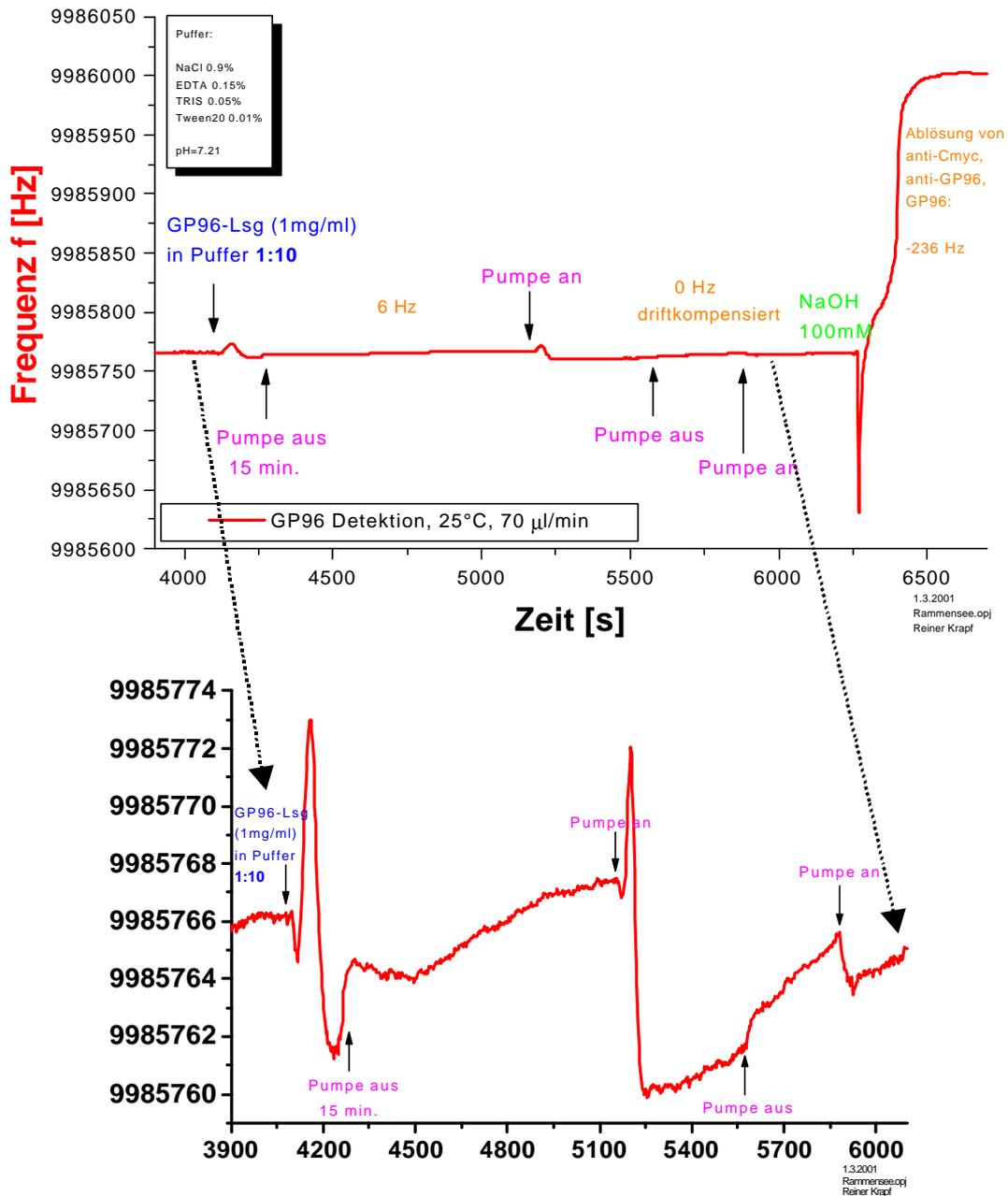


Abb. 4.18: Gesamtmessung der GP96-Detektion mit einem Protein A / Anti-Cmyc / Anti-GP96-Antikörper (oben) , Ausschnitt der GP96-Anlagerung und des Pumpeneffektes (unten)

Bei einem Analyten mit der Molekularmasse von 96 kD sollte eigentlich mehr zu erwarten sein, daher wurde in einer zweiten Messung die Ankopplung des anti-Cmyc an das Protein A verifiziert, um diese Fehlerquelle auszuschließen (s. Abb. 4.19). Als Ergebnis bleibt hier festzuhalten, dass die IgG-Ankopplung erfolgreich, jedoch äußerst langsam verläuft. Der Bindungsvorgang war selbst nach 130 Minuten Belegung noch nicht beendet – in dieser Zeit lagerte sich nach Spülen 470 Hz Substanz an. Auch beim

Spülvorgang ist eine langsame Ablösung zu beobachten. Die bisher gesammelte Erfahrung mit solchen Bindungskurven zeigt, dass ein so immobilisierter Quarz nicht vollständig mit Antikörper belegt ist. Vermutlich ist die Avidität der Bindung relativ gering (Protein A bindet nicht jedes IgG gleich gut, wobei humanes IgG₃ und IgG von Pferden, Ziegen, Ratten und Schafen besonders schlecht binden. Trotzdem ist der absolute Frequenzabfall von 470 Hz bei einer IgG-Belegung im Normalfall vollkommen ausreichend, um ein eindeutiges Messergebnis zu liefern. Diese Belegungsstufe kann daher als erfolgreich, aber nicht perfekt bezeichnet werden.

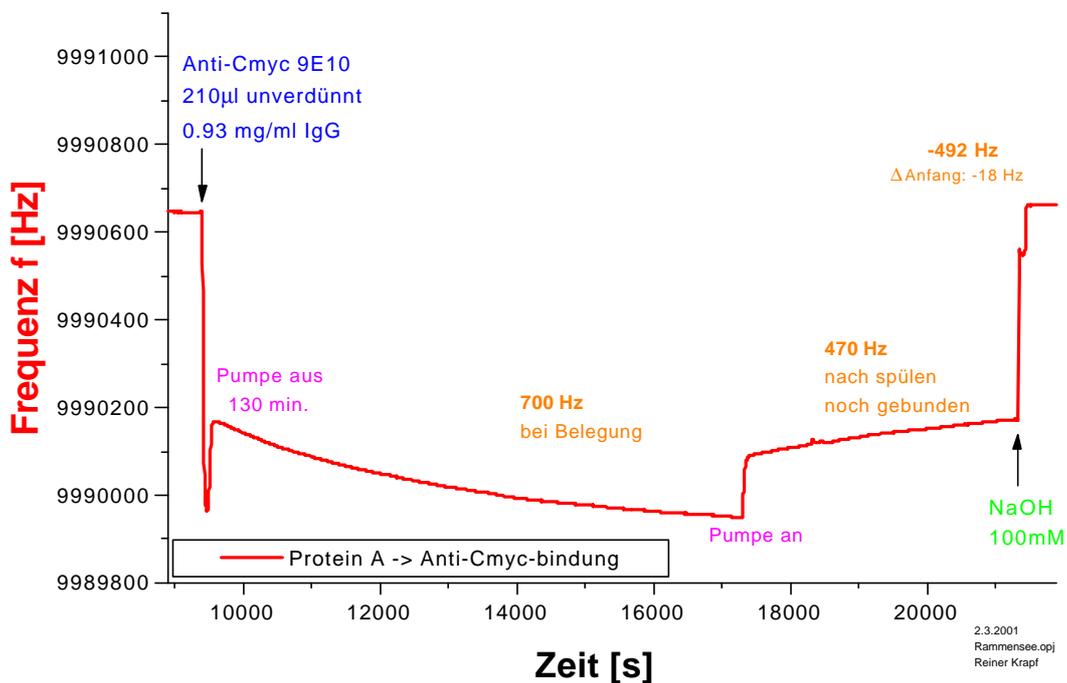


Abb. 4.19: Anti-Cmyc-Anlagerung an einen Protein A-belegten Quarz

Die zweite Belegungsstufe (SingleChain-Antikörper) müsste eigentlich funktionieren, sind doch Belegungstests mit Sandwich-Beschichtung (z.B. IgM, s. Abb. 4.14) bereits untersucht worden. Eine Online-Belegung mit dem SingleChain-Antikörper in der FIA konnte durch zu geringe verfügbare Menge nicht durchgeführt werden.

Fazit: Die Messungen zeigen, dass eine Detektion des GP96 mit einem antikörperbeschichteten Quarz vermutlich möglich ist. Die Frage stellt sich hingegen, ob die Nachweisgrenze für das zukünftige Einsatzgebiet niedrig genug ist. Die hier vorgenommene Messung sollte hinsichtlich einer völlig unoptimierten Umgebung nicht

überbewertet werden. Die Ankopplung des anti-GP96 an anti-Cmyc konnte aufgrund von Analytmangel nicht verifiziert werden. Da schon die Ankopplung des anti-Cmyc an Protein A unvollständig verläuft, ist mit optimierten Immobilisierungsbedingungen und einer sorgfältigen Antikörperauswahl (anti-Cmyc) mit Steigerungen der Empfindlichkeit zu rechnen.

Die Frage nach der Inkubationszeit konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erforscht werden. Es scheint wahrscheinlich, dass eine Analytanreicherung durch verlängerte Inkubation (z.B. 1 Stunde) bei der Quarzmethode nötig ist. Die Nachlieferung von Analyt an die Oberfläche des Quarzes (Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund von Konzentrationsgradienten) ist gerade bei geringen Konzentrationen ein zeitraubender Vorgang. 15 Minuten sind wahrscheinlich zu kurz.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Sensorsystem auf Quarzbasis entwickelt, das für den Einsatz in flüssigen biologischen Proben optimiert wurde und in der Lage ist, die ABO-Gruppe sowie den Rhesusfaktor einer Blutprobe eindeutig zu ermitteln.

5.1 Ergebnisse und Entwicklungen

5.1.1 Entwicklung einer FIA

Die Fließ-Injektions-Anlage (FIA) wurde für Blut als Analyten ausgelegt, indem große Schlauchdurchmesser verwendet wurden, um das Flusssystem vor Verstopfungen zu schützen. Die Biokompatibilität wurde durch den Einsatz von Teflonschläuchen und einem speziell angepassten Flusspuffer sichergestellt, sodass unspezifische Wechselwirkungen an Schläuchen, Ventilen, der Flusszelle und am Sensor selbst wirksam unterdrückt werden. Eine kompakte Anordnung der FIA-Komponenten erlaubt trotz großer Schlauchdurchmesser ein geringes Probenvolumen, sodass 210 µl Analyt genügen, um eine Messung durchzuführen. Die Flusszelle wurde geometrisch so gestaltet, dass ein optimaler Durchfluss gewährleistet wird und größtmögliche Frequenzsignale erhalten werden. Eine selbstgeschriebene Software steuert Ventile, Pumpen und Injektionszeiten. Damit ist eine vollautomatisierte Messung möglich. Durch die Verwendung von optisch transparenten Materialien ist die Durchflusszelle mit anderen spektroskopischen Verfahren kombinierbar, z.B. UV-VIS oder IR.

5.1.2 Entwicklung einer sensitiven Quarzbeschichtung

Mehrere Ansätze wurden bei der Optimierung einer sensitiven und selektiven Quarzbeschichtung verfolgt. So wurde eine Ankopplung von Antikörpern direkt auf Gold versucht und als unzureichend eingeordnet. Eine Anbindung von Protein A auf die Goldelektrode des Quarzes mit und ohne Thiol wurde untersucht, wobei festzustellen war, dass beide Verfahren prinzipiell funktionieren, dass aber die Protein A-Beschichtung in allen relevanten Belangen (Sensitivität, Regenerierbarkeit, Haltbarkeit) der Thiolmethode weit überlegen ist. Durch die hohe Affinität von Protein A an Gold

hat man eine äußerst einfache Beschichtungstechnik, die effektiv und dauerhaft Antikörper ankoppelt und durch Zugabe von Natronlauge regeneriert werden kann.

Da Protein A in der Regel v.a. IgG-Antikörper bindet, wurden mehrere Sandwichbeschichtungen entwickelt, um z.B. IgM oder SingleChain-Antikörper anzukoppeln. Dadurch ist nun eine Quarzbeschichtung vorhanden, die universell praktisch alle Arten von Antikörpern ankoppeln kann und die über die Blutgruppenbestimmung hinaus äußerst vielseitige Einsatzzwecke verspricht.

5.1.3 Bestimmung der Hauptblutgruppe und des Rhesusfaktors

Mit der erhaltenen Quarzbeschichtung konnte die Hauptblutgruppe AB0 schnell, sensitiv und sicher erhalten werden. Dabei erhält man innerhalb 1-2 Minuten das Ergebnis mit einem Signal von 1:560 bezüglich negativer zu positiver Probe. Ohne Vorbehandlung kann direkt Vollblut injiziert werden, das bis zu einer Verdünnung von 1:40.000 unterschieden werden kann. Damit beträgt das nötige Probenvolumen in der hier verwendeten FIA für eine komplette Hauptblutgruppenbestimmung 50 nl. Die Empfindlichkeit des Systems wurde zu 6.4 ng/Hz bestimmt.

Der Rhesusfaktor kann über vier unterschiedliche Verfahren erhalten werden:

1. Bromelinbehandeltes Blut bei Standardbeschichtung
2. Unbehandeltes oder bromelinisiertes Blut bei Sandwich-IgG-Beschichtung
3. Unbehandeltes oder bromelinisiertes Blut bei Sandwich-IgM-Beschichtung
4. Unbehandeltes Blut mit Standardbeschichtung und Druckmethode

Damit kann entweder bromelinbehandeltes oder unbehandeltes Vollblut verwendet werden, eine zwingende Bromelinbehandlung wie bei anderen Verfahren ist jedoch in keinem Fall mehr nötig. Selbst bei ganz schwach ausgeprägtem Rhesusfaktor (D^{weak}) kann mit der Druckmethode ein Nachweis erfolgen.

Die Regenerierung der Sensoren mit NaOH löst beim ersten Regenerationsschritt etwas von der Quarzbeschichtung ab, danach jedoch nicht mehr. Sie kann oftmals wiederholt werden, bis die Sensitivität des Quarzes zu stark nachlässt. Bei A-

Messungen wurden 7 Regenerationszyklen ohne deutlichen Signalverlust vorgenommen; mehr dürften kein Problem darstellen, wurden aber nicht untersucht. Der Quarz kann bei allen Aktionen (Belegung, Messung, Regeneration) immer in der Flusszelle eingebaut bleiben, eine Entfernung ist nicht nötig.

5.1.4 Nachweis von Proteinen

Der Versuch des Nachweises eines Hitzeschockproteins mit der Masse von 96 kDa gelang nur mit sehr kleinen Signalen (7 Hz) bei 100 μM . Die dabei verwendete Sandwichbeschichtung wurde allerdings nicht optimiert und die Inkubationszeit des Antigens von 15 Minuten war viel zu kurz. Die Messung zeigte jedoch, dass eine Detektion von Proteinen mit dem hier beschriebenen Quarzansatz möglich ist, aber noch stark verbessert werden muss, um an Sensitivität zu gewinnen.

5.2 Ausblick

Das hier entwickelte Gesamtkonzept eines quarzbetriebenen Biosensors funktioniert und ist modular aufgebaut, wodurch ein Mehrkanalaufbau ohne Probleme erfolgen kann. Als Durchflusssystem ist eine Inline-Messung, z.B. in Kombination mit anderen Geräten wie Herz-Lungenmaschinen oder Blutspendesystemen möglich, wobei kontinuierlich Blutparameter bestimmt werden könnten. Die gesamte Elektronik und Mechanik ist kostengünstig und so weit miniaturisierbar, dass der Bau von kleinen Handgeräten möglich und wirtschaftlich wird. Die Einsatzgebiete für solche Handgeräte wären z.B. bei Notärzten, Ambulanzen oder kleinen Labors gegeben, bei denen kein großes Analytikvolumen auftritt, jedoch eine schnelle und sichere Blutgruppenbestimmung mit wenig Aufwand realisiert werden muss. Weiterhin bietet sich diese Technologie durch die extrem kleine benötigte Probenmenge im Nanoliterbereich für Frühgeborenen- und Spurendiagnostik an. Darüber hinaus sind Quarze Massenware, die industriell in vielen Bereichen seit vielen Jahren eingesetzt werden. Analysegeräte auf Quarzbasis gibt es schon seit längerem, sie arbeiten jedoch alle an Luft und können keine Flüssigkeiten vermessen.

Dies wurde vor allem durch technische Probleme und unausgereiften Quarzbeschichtungen bisher verhindert – die einzigen käuflichen quarzbestückten

Geräte in Flüssigkeiten arbeiten als Zusatztechnik in elektrochemischen Analysegeräten oder im *Batch*, nie in einer FIA.

Eine Kommerzialisierung der Quarztechnik im Flüssigbereich ist durch Entwicklung dieser universellen Protein A-Quarzbeschichtung nun in greifbare Nähe gerückt. Weitere Arbeiten anderer Autoren beschreiben einen Weg, einzelne Viren mittels Quarztechnik nachweisen zu können [92], was mit dem hier vorgestellten System durch Erweiterung der Schaltungselektronik auch denkbar wäre. Auf dem Weg zum universellen Blutanalyseautomaten müssen allerdings noch viele klinische Tests durchlaufen werden, denn hier können falsche Messergebnisse fatale Folgen bei Patienten mit sich bringen. Mit dem Bau eines kompakten Prototyp-Gerätes wurde bereits begonnen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] P.F.W. Strengers, W.G. van Aken: *Blut – Von der Magie zur Wissenschaft*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996.
- [2] W. Göpel, J. Hesse, J.N. Zemel: *Sensors: A comprehensive survey, Vol. 2: Chemical and Biochemical Sensors*, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991 und 1992.
- [3] H. Naumer, W. Heller: *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1986.
- [4] F.W. Scheller, R.D. Schmid: *Biosensors: Fundamentals, Technologies and Applications*, VCH Weinheim 1992.
- [5] P.G. Edelman, J.Wang: *Biosensors & Chemical Sensors*, ACS Symposium Series 487, American Chemical Society 1992.
- [6] F.W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz: *Frontiers in Biosensorics III*, Birkhäuser Verlag, Berlin 1997
- [7] J. Ruzicka, E.H. Hansen: *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons 1988.
- [8] R. Bock: *Methoden der analytischen Chemie, Band 2*, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim 1980.
- [9] W. Göpel, J. Hesse, J.N. Zemel: *Sensors – A comprehensive Survey, Volume 1*, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim 1989.
- [10] P. Curie, J. Curie: *Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées*, C. R. Acad. Sci **91**, 294-297, 1880.
- [11] M. Otto: *Analytische Chemie*, 2. Auflage, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim 2000.
- [12] J.W. Grate, S.J. Martin, R.M. White, *Anal. Chem.* **65**, 940A und 987A, 1993.
- [13] K. Cammann, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken, B. Winter, *Angew. Chem.* **103**, 519-541, 1991.
- [14] A.J. Ricco, S.J. Martin, T.E. Zipperian, *Sens. Actuators* **8**, 319-333, 1985.
- [15] B. Neubig, W. Briese: *Das große Quarzkochbuch*, Franzis-Verlag, 1997.
- [16] D.S. Ballantine, R.M. White, S.J. Martin, A.J. Ricco, E.T. Zellers, G.C. Frye, H. Wohltjen: *Acoustic Wave Sensors, Theory, Design, and Physico-Chemical Applications*, Academic Press, San Diego 1997.

- [17] J.W. Grate, G.C. Frye, *Acoustic Wave Sensors*, Sensors Update Vol. 2 (H. Baltes, W. Göpel, J. Hesse), VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991 und 1992.
- [18] G.C. Frye, S.J. Martin, *Appl. Spectrosc. Rev.* **26**, 73-149, 1991.
- [19] R.L. Baer, C.A. Flory, M. Tom-Moy, S. Solomon, *Proc. IEEE Ultrason. Symp.*, 293-298, 1992.
- [20] M. Tom-Moy, R.L. Baer, D. Spira-Solomon, T.P. Doherty, *Anal. Chem.* **67**, 1510-1516, 1995.
- [21] E. Gizeli, N.J. Goddard, C.R. Lowe, A.C. Stevenson, *Sens. Actuators B* **6**, 131-137, 1992.
- [22] J. Du, G.L. Harding, A.F. Collings, P.R. Dencher, *Proc. Eurosensors X*, Leuven (Belgien), 1401, 1996.
- [23] A.J. Ricco, S.J. Martin, *Appl. Phys. Lett.* **50**, 1474-1476, 1987.
- [24] T.M. Niemczyk, S.J. Martin, G.C. Frye, A.J. Ricco, *J. Appl. Phys.* **64**, 5002-5008, 1988.
- [25] S.J. Martin, A.J. Ricco, T.M. Niemczyk, G.C. Frye, *Sens. Actuators* **20**, 253-268, 1989.
- [26] J.F. Alder, J.J. McCallum, *Analyst* **108**, 1169-1189, 1983.
- [27] G.G. Guilbault, J.M. Jordan, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* **19**, 1-28, 1988.
- [28] J.J. McCallum, *Analyst* **114**, 1173-1189, 1989.
- [29] M. Thompson, A.L. Kipling, W.C. Duncan-Hewitt, L.V. Rajakovic, B.A. Cavic-Vlasak, *Analyst* **116**, 881-890, 1991.
- [30] D.A. Buttry, M.D. Ward, *Chem. Rev.* **92**, 1355-1379, 1992.
- [31] K. Bodenhöfer, A. Hierlemann, G. Noetzel, U. Weimar, W. Göpel, *Anal. Chem.* **68**, 2210-2218, 1996.
- [32] J. Rickert, A. Brecht, W. Göpel, *Anal. Chem.* **69**, 1441, 1997.
- [33] M.A. Noel, P.A. Topart, *Anal. Chem.* **66**, 484-491, 1994.
- [34] D.M. Soares, W. Kautek, C. Fruböse, K. Doblhofer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **98**, 219-228, 1994.
- [35] G. Sauerbrey, *Z. Phys.* **155**, 206-213, 1959.

- [36] J.W. Grate, M. Klusty, *Anal. Chem.* **63**, 1719-1735, 1991.
- [37] A. Vidic: *Aufbau eines Quartz-Crystal-Microbalance-Sensors für biologische Analysen*, Diplomarbeit, Technische Fachhochschule Berlin 2000.
- [38] K.K. Kanazawa, J.G. Gordon II, *Anal. Chim. Acta* **175**, 99-105, 1985.
- [39] K.K. Kanazawa, J.G. Gordon II, *Anal. Chem.* **57**, 1170-1171, 1985.
- [40] W.C. Duncan-Hewitt, M. Thompson, *Anal. Chem.* **64**, 94-105, 1992.
- [41] L. Tessier, F. Patat, N. Schmitt, G. Feuilland, M. Thompson, *Anal. Chem.* **66**, 3569-3574, 1994.
- [42] Z.A. Shana, H. Zong, F. Josse, D.C. Jeutter, *J. Electroanal. Chem.* **379**, 21-33, 1994.
- [43] S.J. Martin, V.E. Granstaff, G.C. Frye, *Anal. Chem.* **63**, 2272-2281, 1991.
- [44] Z.A. Shana, F. Josse, *Anal. Chem.* **66**, 1955-1964, 1994.
- [45] H. Bandey, S. Martin, R. Cernosek, A. Hillman, *Anal. Chem.* **71**, 2205-2214, 1999.
- [46] S. Martin, H. Bandey, R. Cernosek, A. Hillman, M. Brown, *Anal. Chem.* **72**, 141-149, 2000.
- [47] M. Rodahl, B. Kasemo, *Sens. Actuators B (Chemical)* **37 (1-2)**, 111-116, 1996.
- [48] J.N. Glosli, M.R. Philpott, *J. Chem. Phys.* **98**, 9995-10008, 1993.
- [49] F.H. Stilling, A. Rahman, *J. Chem. Phys.* **60**, 1545, 1974.
- [50] Z. Shi, S. Wu, J. Lipkowski, *J. Electroanal. Chem.* **384**, 171-177, 1995.
- [51] O.M. Magnussen, B.M. Ocko, R.R. Adzic, J. Wang, *Phys. Rev. B*, **51**, 5510, 1995.
- [52] Z. Shi, J. Lipkowski, *J. Electroanal. Chem.* **403**, 225-239, 1996.
- [53] P. Deetjen, E.J. Speckmann: *Physiologie*, 2. Auflage, Urban & Schwarzenberg, Oldenburg 1994.
- [54] G.R. Burmester, A. Pezzutto: *Taschenatlas der Immunologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1998.
- [55] A.F. Ovejero, M. Negri: *Physiologie des Menschen*, Neuer Kaiser Verlag, Klagenfurt 2000.

- [56] K. Dröbner, D. Gemsa: *Wörterbuch der Immunologie*, 3. Auflage, Spektrum-Verlag, Heidelberg 2000.
- [57] C.A. Janeway, P. Travers: *Immunologie*, 2. Auflage, Spektrum-Verlag, Heidelberg 1997.
- [58] P.D. Issitt: *Applied Blood Group Serology*, Third Edition, Montgomery Scientific Publications, Miami 1989.
- [59] J.G. van der Tweel: *Immunologie – Das menschliche Abwehrsystem*, Spektrum-Verlag, Heidelberg 1999.
- [60] P.F.W. Strengers, W.G. van Aken: *Blut – Von der Magie zur Wissenschaft*, Spektrum-Verlag, Heidelberg 1996.
- [61] L. Stryer: *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum-Verlag, Heidelberg 1996.
- [62] J. Sjodahl, *FEBS Lett.* **67**, 1967-1978, 1976.
- [63] L. Bjorck, G. Kronvall, *J. Immunol.* **133**, 969-978, 1984.
- [64] H. Northoff, *Persönliche Mitteilung*, 2001.
- [65] M. Kaspar: *„Chemische Sensorik mit neuen Beschichtungen für die Flüssigphase“*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2000.
- [66] J.M. Abad, F. Pariente, L. Hernández, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* **368**, 183-189, 1998.
- [67] M. Aizawa, S. Kato, S. Suzuki, *J. Membr. Sci.* **7**, 1-10, 1980.
- [68] F. Caruso, E. Rodda, D.N. Furlong, *J. Coll. Interfac. Sci.* **178**, 104-115, 1996.
- [69] K.L. Prime, G.M. Whitesides, *Science* **252**, 1164-1166, 1991.
- [70] K.A. Davis, T.R. Leary, *Anal. Chem.* **61**, 1227-1230, 1989.
- [71] E. Delamarche, G. Sundarababu, H. Biebuyck, B. Michel, Ch. Gerber, *Langmuir* **12**, 1997-2006, 1996.
- [72] S. Dong, J. Li, *Bioelectr. and Bioenerg.* **42**, 7-13, 1997.
- [73] B. König, M. Grätzel, *Anal. Chim. Acta* **276**, 329-333, 1993.
- [74] B. König, M. Grätzel, *Anal. Lett.* **26(8)**, 1567-1585, 1993.
- [75] C. Köbflinger, S. Drost, F. Aberl, H. Wolf, *Fres. J. Anal. Chem.* **349**, 349-354, 1994.

- [76] R.J. Pei, J.M. Hu, Y. Hu, Y. Zeng, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **73**, 59-63, 1998.
- [77] L. Tessier, N. Schmitt, H. Watier, V. Brumas, F. Patat, *Anal. Chim. Acta* **347**, 207-217, 1997.
- [78] R. Helsel: *Visual Programming with HP VEE*, Second Edition, Prentice Hall PTR, New Jersey 1997.
- [79] E. Uttenthaler, C. Kößlinger, S. Drost, *Biosens. Bioelectron.* **13**, 1279-1286, 1998.
- [80] D. Zhang, G.M. Crean, T. Flaherty, A. Shallow, D.F. Donnelly, F.O. Gara, R. Fitzgerald, *Trans. Mat. Res. Soc. Jpn.* **15A**, 473-476, 1994.
- [81] R. Krapf, *Elektrochemisches Pharmascreeing mit Interdigitalelektroden und Rutheniumlabel*, Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1999.
- [82] N.B. Cherry, *Stain Technol.* **44**, 179-189, 1965.
- [83] M. Ferencik: *Handbook of Immunochemistry*, Chapman & Hall, London 1993.
- [84] W.D. Geoghegan, G.A. Ackerman, *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 1187-1200, 1977.
- [85] K. Park, *Scanning Microscopy Supplement* **3**, 15-24, 1989.
- [86] M. Horisberger, M.F. Clerk, *Histochem.* **82**, 219-223, 1985.
- [87] RSG-Electronic, Homepage: <http://www.rsg-electronic.de>
- [88] Vectron International (KVG Neckarbischofsheim), Homepage: <http://www.vi-kvg.de>
- [89] P.L. Strohm, S. Busch, *Transfusion* **9,2**, 93-97, 1969.
- [90] C.P. Price, D.J. Newman: *Principles and Practice of Immunoassay*, Second Edition, Macmillan Reference Ltd, London 1997.
- [91] H. Schenkel-Brunner: *Human Blood Groups*, Springer-Verlag, Wien 1995.
- [92] M.A. Cooper, *Nature Biotechnol.* **19,9**, 2001.
- [93] M. Kaspar, H. Stadler, T. Weiß, Ch. Ziegler, *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**, 602-610, 2000.

7 Anhang

7.1 Technische Zeichnungen

Die Flusszelle aus Teflon und die dazugehörige Edelstahl-Halterung zur Thermostatisierung wurden von Dipl. Phys. (TH) Aleksandar Vidic [37] entworfen und von mir für den Einsatz in der Blutanalytik weiterentwickelt.

Es handelt sich dabei um einen runden, hohlen Teflonzylinder, der unten links und rechts zwei Bohrungen für den Pufferein- und auslass besitzt (s. Abb. 7.1 links). Von unten kann nun ein Quarzhalter, in dem ein Schwingquarz mit aufgesetztem O-Ring liegt, durch eine Klemmvorrichtung angepresst werden (s. Abb. 7.1 rechts).

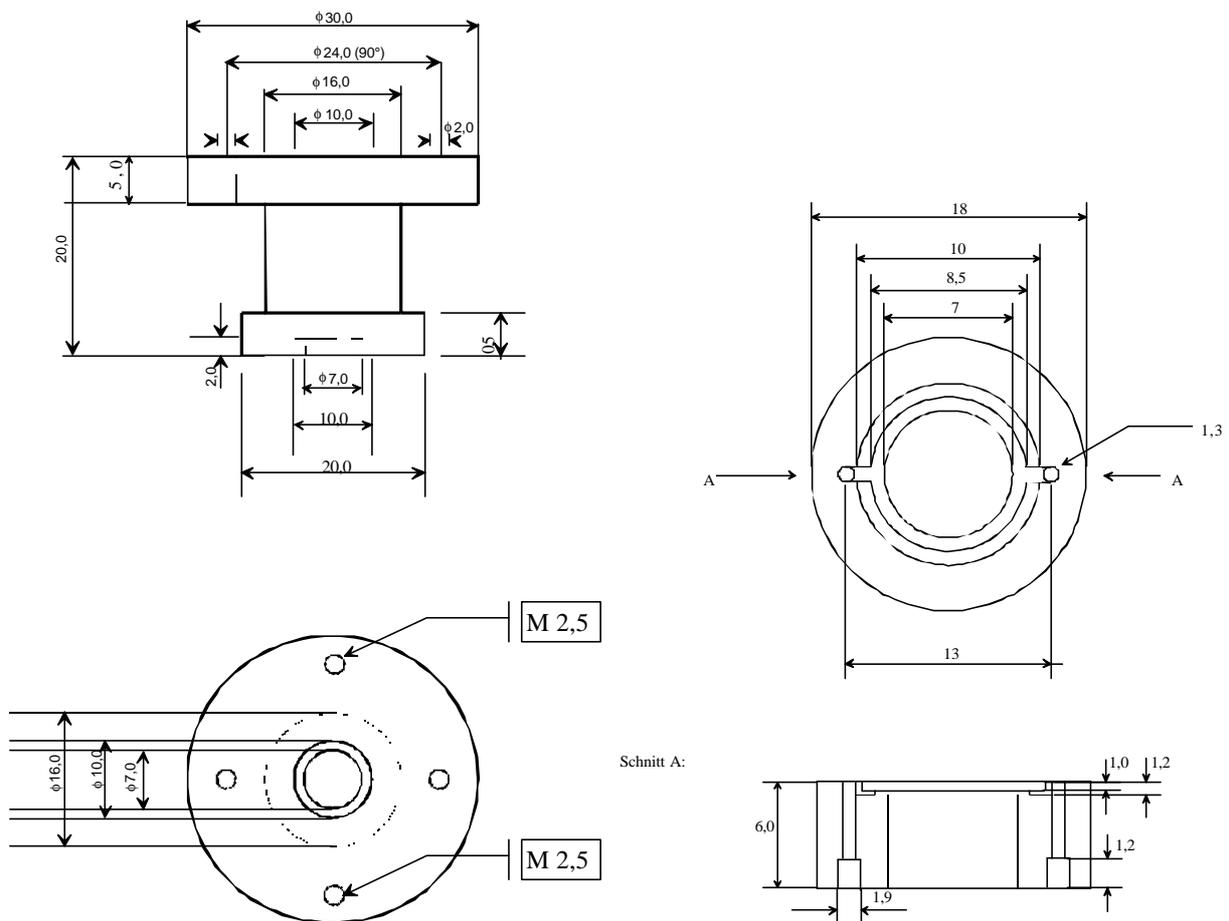


Abb. 7.1: Zellengrundkörper (links) und Quarzhalter (rechts), beides aus Teflon

Zum Abdichten nach oben wird ein Stempel aus Plexiglas in die Bohrung des Zellengrundkörpers hineingedreht. Je nach Tiefe des Eindrehens verändert sich das effektive Zellenvolumen. Durch Anschleifen des unteren Endes kann Einfluss auf die Fluidik der Messzelle genommen werden (s. *Abb. 7.2 A*).

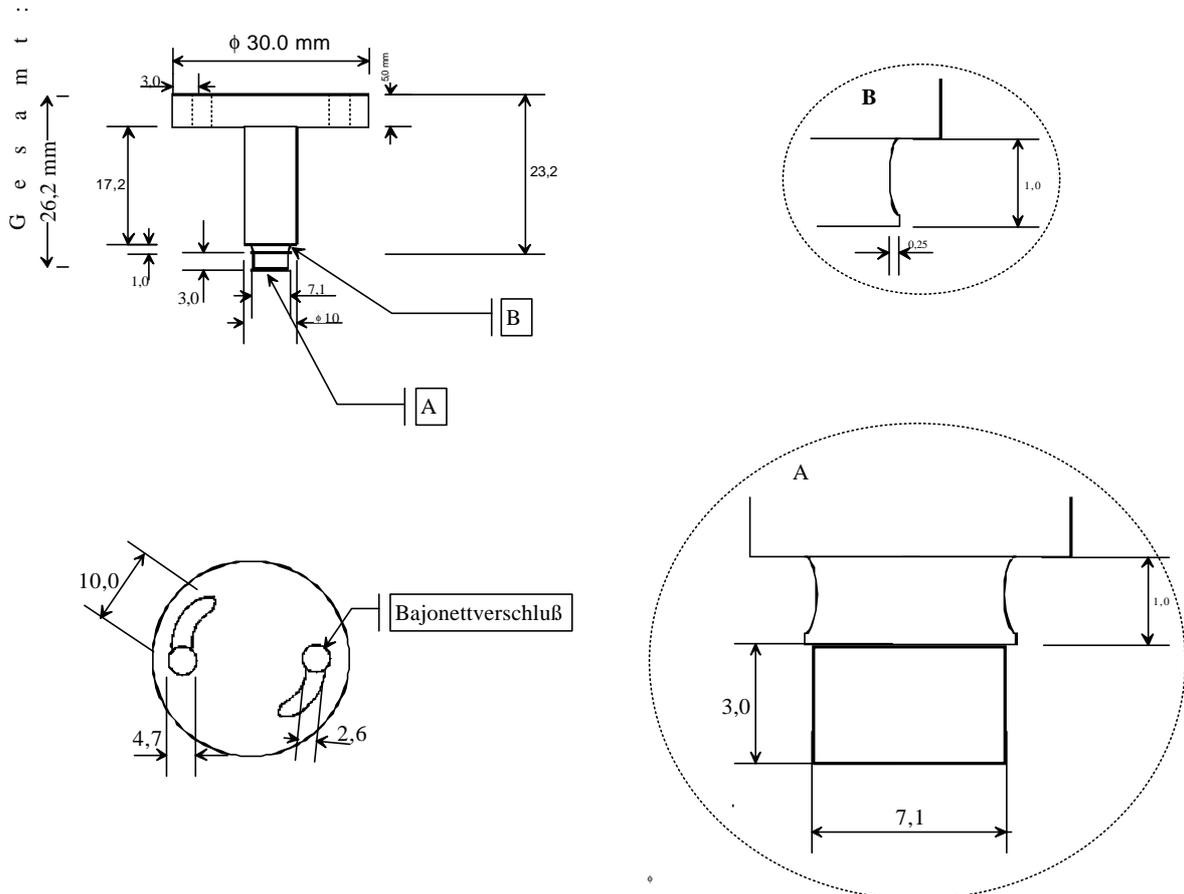


Abb. 7.2: Durchsichtiger Plexiglas-Stempel zur visuellen Kontrolle der Vorgänge in der Messzelle

Die zusammengesetzte Durchflusszelle ist in *Abb. 3.4* gezeigt.

7.2 Publikationen

Die Arbeit oder Auszüge davon wurden vorgestellt:

Vortrag:

„Automated Blood Testing with a Quartz Crystal Microbalance Biosensor“, European Society for Biomaterials 2001 Conference, London 2001.

Poster:

„Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen“, 2. Biosensor-Symposium, Tübingen 2001.

„Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen“, fortüne-/AKF-Kolloquium, Tübingen 2001.

Danksagung

Frau Prof. Christiane Ziegler möchte ich ganz herzlich für die Übernahme meiner Betreuung, Überlassung des äußerst interessanten Themas, Zeit für meine Anliegen, vorbehaltlose Unterstützung, exzellente Arbeitsbedingungen und für das große Vertrauen in mein selbstständiges Arbeiten danken.

Herrn Prof. Hinnak Northoff danke ich ganz herzlich für die sehr gute Kooperation und die Übernahme des Koreferats, für so viel Zeit zum Diskutieren, Planen, Besprechen und Entwickeln von tollen Ideen, und auch für die großzügige finanzielle und materialtechnische Unterstützung.

Herrn Dr. Christof Weinstock will ich sehr herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre, das Waschen von unzähligen Erythrozytensuspensionen, viel Zeit zum Reden, auch über nichtwissenschaftliche Themen, Ideen und große Hilfestellung bei „medizinischen“ Fragestellungen danken.

Herrn Prof. Wolfgang Göpel[†] gilt mein besonderer Dank dafür, dass ich bei ihm meine Promotion beginnen durfte und in der Zeit bis zu seinem tragischen Unfall viel von seinem Elan, Forschergeist, Organisationstalent und visionären Denken erleben durfte: Dies hat mein Leben nachhaltig geprägt.

Herrn Prof. Günter Gauglitz und seiner gesamten Arbeitsgruppe danke ich sehr für die Unterstützung für mich hier im Institut, für gute Nachbarschaft und für offene Ohren, wenn mal was anliegt.

Für die Mikroskop-Fluoreszenz-Aufnahmen danke ich Herrn Dr. Roland Brock.

Vielen Dank auch an Harpreet Singh, Sylvia Herter und Prof. Hans-Georg Rammensee für die gute Zusammenarbeit bei den Hitzeschock-Proteinmessungen.

Aleksandar Vidic gilt mein Dank für die sehr gute Zusammenarbeit im Bereich Elektronik und Entwicklung, ebenso Hartmut Stadler für seine Unterstützung im Bereich Impedanzmessungen.

Dr. Manfred Ernst von der Biotest AG und Dr. Michael Rose von der Immucor AG danke ich ganz herzlich für die großzügige Bereitstellung von Antikörpern.

Dr. Udo Weimar und der gesamten Arbeitsgruppe sowie der ganzen Arbeitsgruppe Ziegler und Reinhardt danke ich für vielfältige Unterstützung, sehr gute Atmosphäre und die gewinnbringenden Montags-Seminare.

Herzlichen Dank auch an Wolfgang Neu, Dr. Tilo Weiß und die Werkstatt um Klaus Schaupp, im Besonderen an Johannes Seidel für offene Ohren bei technischen Problemen, zahlreichen Hilfestellungen sowie „richtige“ Interpretation und Umsetzung meiner CAD-Zeichnungen.

Dem Kaffeeraum-Team um Ralf Mayer, Elke Nadler, Dr. Michael Kaspar, Simone Hahn, Olaf Wurzinger, Egon Merz, Dr. Oliver Maute und Dr. Götz Reinhardt gilt mein Dank für die regenerativen Mittagspausen, den Kuchen und den ausführlichen Analysen der Weltsituation.

Dem Team 8N23 um Dr. Christian Bauer, Dr. Michael Kaspar, später Michael Seidel und Kerstin Kröger danke ich sehr für fruchtbare Diskussionen auch im nichtwissenschaftlichen Bereich, schöne und kollegiale Atmosphäre und die lustige Zeit miteinander. Dr. Michael Kaspar danke ich im Besonderen für die geniale fachliche Kooperation und die vielen Grillsessions.

Abschließend will ich meiner Frau Katja, meinen Eltern und Schwiegereltern danken: Ohne Eure uneingeschränkte Unterstützung, Gebete, Hilfe und Liebe hätte ich es nicht geschafft. Danke!

Liste der Akademischen Lehrer

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H.P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, B. Koppenhöfer, D. Krug, E. Lindner, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, V. Schurig, F.F. Seelig, B. Speiser, G. Staudt, H. Stegmann, J. Strähle, H.D. Wiemhöfer, K-P. Zeller, Ch. Ziegler.

Lebenslauf

Name: Reiner Krapf
Anschrift: Pfarrbrunnenweg 9/1, 72770 Reutlingen
reiner@krapf-web.de
Familienstand: verheiratet mit Katja Krapf, geb. Morgenstern
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: ev.
Geburtsdatum: 10.2.1972
Geburtsort: Tübingen
Eltern: Ernst Krapf, Selbständiger
Christa Krapf, Bürokauffrau

Schulausbildung:

1978 – 1982: Ludwig-Krapf Grundschule Tübingen-Derendingen
1982 – 1983: Kepler Gymnasium Tübingen
1983 – 1991: Carlo-Schmid Gymnasium Tübingen
06/1991: Abitursprüfung

Studium:

10/1991: Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Fach Chemie-Diplom
03/1994: Abschluss der Vordiplomsprüfung
06/1998-01/1999: Diplomarbeit mit dem Thema „*Elektrochemisches Pharmascreening mit Interdigitalelektroden und neuem Rutheniumlabel*“ unter Anleitung von Prof Dr. W. Göpel am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
01/1999-12/1999: Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physikal. und Theoret. Chemie der Universität Tübingen
01/2000-11/2001: Wissenschaftlicher Angestellter im Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Transfusionsmedizin
01/1999-11/2001: Dissertation in der Flüssiganalytik/Sensorik in der Biosensor-Arbeitsgruppe von Prof. Göpel (Inst. f. Physikal. u. Theoret. Chemie), nach dessen Tod Fortführung der Arbeit mit dem *Titel „Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen“* bei Prof. Dr. Christiane Ziegler